

RAW264.7세포주와 염증생쥐모델에서 抗炎症 作用에 대한 行經紅花湯의 效果

대전대학교 한의과대학 부인과학교실
민병호, 유동열

ABSTRACT

Anti-inflammatory Effect of *Haingkyunghonghwatang* in cultured RAW264.7 cells and murine models of inflammation

Min Byung-Ho, Yoo Dong-youl

Dept. of Ob & Gyn, College of Oriental Medicine, Daejeon Univ.

Purpose : The Purpose of this research was to investigate the effects of Haingkyunghonghwatang(HKHHT) on anti-inflammatory effects.

Methods : As for the parameters of inflammation, levels of several inflammatory cytokines and chemical mediators were determined in mouse lung fibroblast cells (mLFC) and RAW264.7 cells. Also, changes in pathological features by drug treatment were investigated in the in vivo edema-induced rats by carrageenin /arachidonic acid or in the colitis-induced mice by DSS treatment.

Results : The cytotoxicity of HKHHT on mLFC and RAW264.7 cells wasn't observed at 100, 50, 10, and 1 μ g/ml of The treatments. IL-1 β , IL-6 and NOS-II mRNA expression of RAW264.7 cells was inhibited by The treatments in a dose-dependent manner. HKHHT treatment of RAW264.7cells(HtRc) inhibited TNF- α and COX-2 mRNA expression. HtRc significantly inhibited IL-6 and NO production. HtRc inhibited ROS production. HKHHT inhibited rat's paw edema induced by carrageenin or arachidonate treatment in all concentrations examined. The body weight and colon length of colitis-induced mice were recovered to a normal level by DSS treatment. Clinical disease levels were significantly improved compared to the control animals. HKHHT treatment of colitis-induced mice(HtCm) significantly increased hematological values such as WBC and RBC counts, Hgb and HCT levels, but decreased PLT values. HtCm decreased IL-6 and TNF- α production significantly HtCm significantly increased CD3+(T) cell counts. In contrast, HKHHT treatment decreased CD19+ B cell counts and CD3+/CD69+ significantly, and also decreased B/T ratio (%) though not significant.

Conclusion : These results indicated that HKHHT could be used for treating diverse female diseases caused by the inflammation.

Key words : Haingkyunghonghwatang(HKHHT), anti-inflammatory, RAW264.7 cells.

I. 緒 論

行經紅花湯은 清代 武¹⁾의 《濟陰綱目》에 최초로 수록된 처방으로 “治婦人室女經候不行 時作脹痛”이라 하여 血滯으로 인한 室女經閉를 치료할 목적으로 立方되었다.

經閉의 病因病機는 복잡 다양하지만 대체적으로 虛證과 實證으로 대별한다. 虛證은 肝腎不足, 氣血虛弱, 陰虛血燥 등으로, 實證은 氣滯血瘀, 痰濕阻滯 등으로 세분 할 수 있다²⁾.

經閉의 치료는 월경의 회복 및 배란주기의 확립을 통해 수태력을 보존하는 것을 목표로 하는 바, 補腎養肝, 補氣養血, 滋陰益精, 活血化瘀, 豁痰除濕의 치법이 활용되고 있다²⁾.

瘀血을 최근에는 炎症으로 인한 조직의 삼출, 변성, 괴사, 위축 혹은 증식 역시 瘀血의 병태와 유사하다고 인식하여^{3,4)} 기초 및 임상에서 활혈화어 약물에 대한 다양한 접근이 이루어지고 있다.

瘀血 및 抗炎症 작용에 대한 실험적 연구로 강⁵⁾, 유⁶⁾, 김⁷⁾, 이⁸⁾ 등은 活絡丹, 身痛逐瘀湯, 和血通經散, 加味通經湯 등이 抗血栓 및 소염, 진통에 효과가 있다고 보고 하였고, 趙⁹⁾, 孫¹⁰⁾ 등은 坐宮丹, 加味生化湯 등이 抗血栓과 진통에 효과가 있다고 보고 하였으나, 行經紅花湯에 대한 연구는 아직 접하지 못했다.

이에 著者는 活血通經, 散瘀止痛의 효능이 있는 行經紅花湯의 抗炎症 작용을 실험적으로 규명하고자 in vitro에서 세포 독성, 유관 싸이토카인(cytokines) 유전자 발현과 생성량에 미치는 영향을 검색하고, in vivo에서 염증 동물 병태 모델의 즉부종, clinical disease activity, 혈액학

적 변화, 혈청 중 IL-6와 TNF- α 의 생성량 및 림프내 유세포에 미치는 영향 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재 료

1) 동물

동물은 韓國生命工學研究院에서 구입한 자성 C57BL/6 6주령을 구하여, 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22±2°C, 1일중 12시간은 200-300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 고품사료(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사, 항생제 무첨가)와 물을 충분히 공급하였다.

2) 약물

실험에 사용된 行經紅花湯¹⁾의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

韓藥名	生 藥 名	重量(g)
當歸尾	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	4
赤芍藥	<i>Paeoniae Radix Rubra</i>	4
紫葳	<i>Campsis Flos</i>	4
劉寄奴	<i>Artemisiae Anomalaе Herba</i>	4
牛膝	<i>Achyranthis Bidentatae Radix</i>	4
玄胡索	<i>Corydalis Tuber</i>	4
紅花	<i>Carthami Flos</i>	4
蘇木	<i>Sappan Lignum</i>	4
桃仁	<i>Persicae Semen</i>	4
青皮	<i>Citri Reticulatae Viride Pericarpium</i>	3
香附子	<i>Cyperii Rhizoma</i>	3
桂心	<i>Cinnamomi Ramulus</i>	2
Total		44

3) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약은 SRB, DEPC, N H₄Cl, KHCO₃, EDTA, TCA, MTS, DMEM, DCF H-DA, RPMI-1640 media, RBC lysis solution, D-PBS, MgCl₂는 Sigma(U.S.A)社, FBS은 Hyclo ne (Logan, U.S.A)社, agarose는 FMC(U.S.A)社, PI, RNase는 Pharmingen (Torreyana, U.S.A)社, IL-6, TNF-α ELISA kit는 R&D system(Minneapolis, U.S.A)社, Dextran sodium sulfate는 Zoeter meer(Netherlands)社 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

기기는 열탕추출기(대웅, Co.,Korea), rotary v accum evaporator(Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer(EYELA FDU-540, Japan), CO₂ incubator(Forma scientific Co., U.S.A), micro-pipet (Gilson, Co., France), centrifuge(Sigma, Co., U.S.A), thermocycler system(MWG Biotech., Co., Germany), homogenizer (OMNI, Co., U.S.A), plate shaker (Lab-Line, Co., U.S.A), ELISA reader (Molecular Devices, Co., U.S.A) 및 버니아켈 리퍼스(M530-109, Mitutoyo, Japan) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 行經紅花湯 추출물 분리

HKHHT156g을 증류수2,000ml에 열탕추출기로 3시간 추출, 여과 후 감압증류 장치로 농축, 동결 건조기로 HKHHT추출물 16.9g을 얻어 -84℃로 보관, 적당히 회석, 사용하였다.

2) 세포 배양

생쥐의 정상 lung fibroblast cells(mLFCs)은 C57BL/6 생쥐의 폐 조직을 cold D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 다음, cornical tube(15ml)에 넣어 1,400rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 원심 분리 후 다시 tube에 DMEM(containing collagenase A 5mg/ml, BM)와 DNase type I (0.15mg/

ml, Sigma), antibiotics(penicillin 10⁴U/ml, streptomycin 10mg/ml, amphotericin B 25μg/ml)를 넣고 37℃ CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하고, 인산 완충 생리식염수(PBS)로 약 2회 1,500rpm에서 원심 분리한 후 10% FBS를 첨가한 DMEM에 1주일 동안 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFCs를 분리하여 5% FBS를 첨가한 DMEM 배양액에 1×10⁵cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다. RAW264.7 세포주도 10% FBS를 첨가한 DMEM 배양액에 1×10⁵cells/ml 농도로 맞추어 분주하였다.

3) 세포독성 측정

mLFCs에 HKHHT 추출물 (200μg/ml, 100μg/ml, 50μg/ml, 10μg/ml, 1μg/ml)를 처리하고, 배양 종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척한 후, 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50μl를 가하고 1시간 동안 4℃에 방치하였다. 이를 다시 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. 여기에 SRB(0.4%/1% acetic acid) 용액을 100μl/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4-5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10mM Tris Base로 100μl/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA leader로 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) RAW264.7 세포주의 역전사-중합효소 연쇄반응

(1) RNA 추출

먼저 RAW264.7 세포주는 24 well plate에 1×10⁶ 세포로 분주하였다. 여기에 HKHHT 추출물 (100μg/ml, 10μg/ml, 1μg/

ml)를 처리하고 1시간 후 LPS(2 μ g/ml)를 각각의 well에 첨가하여 6시간 배양하고 2,000rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고, 여기에 R NAzol^B 500 μ l를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 μ l를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000rpm에서 원심 분리한 후 약 200 μ l의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 200 μ l의 증류수에 녹여 heating block 75 $^{\circ}$ C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(2) 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사 반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 75 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 변성시키고, 이에 2.5 μ l의 10mM dNTPs mix, 1 μ l의 random sequence hexanucleotides(25pM/25 μ l), RNase inhibitor로서 1 μ l의 RNasin (20U/ μ l), 1 μ l의 100mM DTT, 4.5 μ l의 5 \times RT buffer(250mM Tris-HCl, pH 8.3, 37.5mM KCl, 15mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RTase(200U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000rpm에서 5초간 원심 침강하여 37 $^{\circ}$ C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RTase를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase c

hain reaction(PCR)에 사용하였다

(3) cDNA의 PCR증폭

PCR은 Primus 96 Legal PCR system (with high pressure lid, MWG, Germany)를 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 μ l의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 β -actin, IL-1 β , IL-6, IL-18, tumor necrosis factor- α (TNF- α), cyclooxygenase-2, 그리고 NOS-II 유전자를 증폭하기 위하여 sense primer(20pM/ μ l)와 antisense primer(20pM/ μ l)를 혼합하여 1 μ l를 가하고, 다시 3 μ l의 2.5mM dNTPs, 3 μ l의 10 \times PCR buffer(100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂), 그리고 0.18 μ l의 Taq polymerase (5U/ μ l)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 μ l 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation으로 95 $^{\circ}$ C에서 5분, denaturation으로 95 $^{\circ}$ C에서 5분, annealing으로 55 $^{\circ}$ C에서 1분, elongation으로 72 $^{\circ}$ C, 1분을 1cycle로 하여 25 cycles한 뒤 post-elongation을 72 $^{\circ}$ C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 μ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120 V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다

■ Mouse Oligonucleotide의 염기배열

Gene	Primer	Sequence
IL-1 β	sense	5'-GCAACTGTTCTGAACTCA-3'
	antisense	5'-CTGGAGCCTGTAGTGCAG-3'
IL-6	sense	5'-CCGTGATAGTGGCATCCATGAAAC-3'
	antisense	5'-GGACCAATACTGCTATAGGG-3'
TNF- α	sense	5'-AACCCCTACTGAACTCAGATTGTTAG-3'
	antisense	5'-TAAGTCAGTTTAAATGCTTAGGG-3'
IL-18	sense	5'-ACT _g TACAAC _g CAgTAATAC _g -3'
	antisense	5'-Ag _g TgAACATTACA _g ATTTTATCC-3'
NOS-II	sense	5'-CCGATATTTAGATAGTTAAAC-3'
	antisense	5'-ATGGCCTAGTCAGTCTTAAAT-3'
COX-2	sense	5'-TTCAAATgAgATTgTgggAAAAAT-3'
	antisense	5'-AgATCATCTCTgCCTgAgTATCTT-3'
β -actin	sense	5'-TGGATCTCTGTGGTCCATGAAAC-3'
	antisense	5'-GTCACAGTCAGCTGTATAGGG-3'

표준지표 유전자로서 β -actin이 사용되어

졌으며, PCR product의 양은 Windows 1D main program을 이용하여 최고값으로 측정하였다.

5) Enzyme-linked immuno sorbent assay(ELISA)에 의한 싸이토카인 측정
RAW264.7 세포주를 실험 3일 전에 subculture(1×10^5 cells/ml) 하여 96 well plate에 2×10^5 세포를 각 well에 분주한 후 우태아혈청 결핍 RPMI1640 배양액으로 overnight 시켰다. HKHHT 추출물을($100 \mu\text{g/ml}$, $10 \mu\text{g/ml}$, $1 \mu\text{g/ml}$) 처리하고 1시간 후 LPS($1 \mu\text{g/ml}$)를 각각의 well에 첨가하였다. 6시간 후 DMEM 배양액으로 각 well을 세척한 후 새로운 배양액과 HKHHT 추출물을 처리하고 24시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양 종료후 전체 배양액을 2,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 회수, IL-6와 TNF- α 의 생성량을 ELISA kit로 측정하였다.

6) Nitric oxide(NO) 생성량 측정

RAW264.7 세포주를 96 well plate에 2×10^4 세포로 분주하였다. 여기에 HKHHT 추출물을($100 \mu\text{g/ml}$, $10 \mu\text{g/ml}$, $1 \mu\text{g/ml}$) 처리하고 1시간 후 LPS($1 \mu\text{g/ml}$)를 각각의 well에 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 회수한 후 여기에 Griess 시약 용액 A(0.2% naphthylethylene diamine dihydrochloride in D.W.)와 용액 B(2% sulfonamide in 5% H₃PO₄)를 1:1로 혼합하여 처리하였다. 다시 배양 상층액 100 μl 를 96 well plate에 분주하고 혼합 용액 100 μl 를 처리한 후 ELISA reader를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 세포내 reactive oxygen species(ROS)의 분석

RAW264.7 세포주내의 ROS를 측정하기 위하여 24 well plate의 각 well에 5×10^5 cells씩 첨가하고, HKHHT 추출물($100 \mu\text{g/ml}$, $10 \mu\text{g/ml}$, $1 \mu\text{g/ml}$)를 처리하고 1시간 후 LPS($1 \mu\text{g/ml}$)를 처리한 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 DCFH-DA 50 μM 을 처리하고 5분간 배양하고 2회 수세한 후 flow cytometer (Becton Dickinson, Co., USA)로 세포내 형광 DCF 또는 ROS를 측정하였다.

8) Carrageenin과 arachidonic acid(AA)에 의한 족부종 측정

생쥐의 족부종은 Winter et al¹¹⁾와 DiMartino et al¹²⁾의 방법을 약간 수정하여 carrageenin과 arachidonic acid(AA)로 유발시켰다. 22-24g의 생쥐를 세 그룹으로 분할하였다. 먼저 정상군은 생리식염수를 0.1ml씩 생쥐의 뒷 발바닥에 피하주사하였고, 대조군은 carrageenin(생리식염수에 1% carrageenin) 0.05ml과 AA(0.2M carbonate 용액에 0.5% AA) 0.1ml씩 뒷 발바닥에 피하주사하였다. 실험군은 대조군과 동일한 조건에서 HKHHT 추출물 300mg/kg과 1,200mg/kg을 피하 주사 1시간 전에 경구투여 하였다. 뒷다리 부종은 버니아 캘리퍼스(M530-109, Mitutoyo, Japan)를 사용하여 0.01mm 까지 측정하였다.

9) 만성염증성 대장염 질환 동물모델
염증성 대장염 생쥐모델은 7일 동안 5% Dextran sodium sulfate(DSS, molecular weight 40,000, ICN Biomedicals, Zoetermeer, Co., The Netherlands)을 포함하는 물로 크기가 보통인 암컷 C57BL/6 생쥐에 유발시킨 후 8일 동안 생쥐의 몸무게, 대변출혈성, 그리고 행동 등을 매일 모니터링 하였다.

(1) 검액의 투여

실험군은 8마리씩(n=8 mice/group)을 한 군으로 하여 일반 고형사료 정상군, 5% Dextran 투여군(대조군) 그리고 HKH HT 추출물 투여군으로 나누었다. 정상군은 자유식이 하였으며, 대조군은 생리식염수를, 실험군은 HKHHT 추출물 300mg/kg, 1,200mg/kg을 5% Dextran 투여 1주 전부터 물에 타서 2주간 매일 1회씩 경구 투여하였다.

(2) 체중 측정

DSS 투여와 더불어 7일 동안 매일 오전 10시에 체중을 0.1g 단위까지 측정하였다.

(3) Clinical disease activity 측정

먹이 섭취량, 몸무게, 대변의 정도, 그리고 guaiac 페이퍼 시험(Colo-Screen ; Helena Laboratories Corp., Beaumont, Texas, U.S.A)에 의한 혈변 존재 등을 평가하여 매일매일 임상적 수치를 부과하였다. 대변의 정도는 four point scale : 0, normal ; 1, soft ; 2, very soft but formed ; and 3, liquid ; 4로 하였고, guaiac 페이퍼 시험의 강도는 0, negative ; 1, faintly blue ; 2, moderately blue ; 3, dark blue ; 4로 하여 매일 측정하였다.

(4) Colon의 길이 측정

DSS 투여 7일 후 생쥐를 치사시킨 후 대장을 적출하여 버니아캘리퍼스(M530-109, Mitutoyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

(5) 생화학적 혈청 검사

DSS 투여 7 일 후 대장염질환 생쥐에서 혈청을 분리하여 혈청내 WBC, RBC, Hgb, HCT 그리고 PLT를 측정하였다.

(6) IL-6와 TNF- α 의 혈청분석

실험 종료 후 (7일 후) 대장염질환 생쥐를 ethyl ether로 마취한 후 심장천자법으로 채혈한 후 혈청을 분리하여 IL-6 및 TNF- α 의 혈청 함유량을 ELISA로 측정하였다. 각 well에 생쥐의 혈청 100 μ l (1/100 dilution)씩 분주하였다. 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(7) 림프내 유세포 분석

대장염질환 생쥐에서 대장의 lamina propria와 림프절을 분리하여 100 mesh로 세포를 분리하였다. 분리된 세포에 적혈구 용혈액을 처리하여 적혈구를 제거하고 4 $^{\circ}$ C에서 면역 형광염색을 실시하였고, 각각에 PE-anti-mouse CD3e, FITC-anti-mouse CD69, 그리고 FITC-anti-mouse CD19를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산 완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD3e $^{+}$ /CD19 $^{+}$ 그리고 CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ 세포수를 백분율(%)로 분석하였다.

III. 結 果

1. 세포독성에 미치는 영향

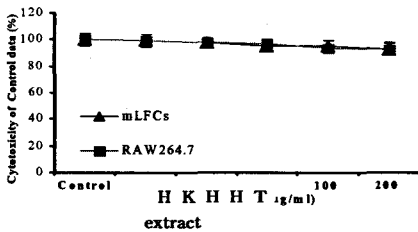
mLFCs 및 RAW264.7 세포주에 대한 세포독성 평가에서는 대조군에 비해 HKHHT extract의 200, 100, 50, 10, 1 μ g/ml 농도에서 세포독성은 나타나지 않았다(Table 1, Fig. 1).

Table 1. Cytotoxic effects of HKHHT Extract on mLFCs and RAW264.7 Cell Line

Drug	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	% of Control Data	
		mLFCs	RAW264.7
Control	0	100 \pm 4.6	100 \pm 4.3
	1	99.5 \pm 2.7	99.0 \pm 4.4
HKHHT extracts	10	97.4 \pm 3.3	97.3 \pm 3.7
	50	95.1 \pm 3.1	96.7 \pm 3.5
	100	95.3 \pm 4.1	93.3 \pm 2.7
	200	92.8 \pm 4.3	90.2 \pm 4.6

The data are expressed as the mean \pm SEM.

Fig. 1. Cytotoxicity of HKHHT extract on mLFCs and RAW264.7 cell line.



mLFCs and RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of HKHHT extract. The data (% cytotoxicity) in the Figure are expressed as the mean \pm SEM.

2. RAW264.7 세포주의 역전사-종합효소 연쇄반응

1) IL-1 β 유전자 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포주에서 IL-1 β 유전자 발현은 정상군의 Ht값이 48, 대조군이 102로 나타났으며, HKHHT extract 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 각각 31, 61, 91로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 2).

2) IL-6 유전자 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포주에서 IL-6 유전자 발현은 정상군의 Ht값이 14, 대조군이 96으로 나타났으며, HKHHT extract 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 각각 22, 36, 86로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 3).

3) IL-18 유전자 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포주에서 IL-18 유전자 발현은 정상군의 Ht값이 35, 대조군이 101

로 나타났으며, HKHHT extract 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 19로 나타나 대조군에 비해 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 4).

4) COX-2 유전자 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포주에서 COX-2 유전자 발현은 정상군의 Ht값이 21, 대조군이 205로 나타났으며, HKHHT extract 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 각각 17, 167, 142로 나타나 대조군에 비해 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 5).

5) NOS-II 유전자 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포주에서 NOS-II 유전자 발현은 정상군의 Ht값이 26, 대조군이 199로 나타났으며, HKHHT extract 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 각각 72, 168, 179로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 6).

6) TNF- α 유전자 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포주에서 TNF- α 유전자 발현은 정상군의 Ht값이 84, 대조군이 184로 나타났으며, HKHHT extract 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 각각 163, 173, 142으로 대조군에 비해 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 7).

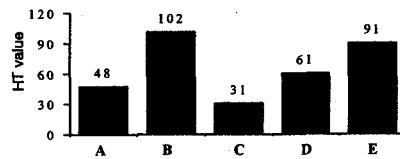


Fig. 2. Inhibitory effects of HKHHT extract on IL-1 β mRNA expression in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of HKHHT extract [100 (C), 10 (D), and 1 $\mu\text{g/ml}$ (E)] in the presence (B-E) or absence (A) of lipopolysaccharide (LPS; 2 $\mu\text{g/ml}$) for 6 hr. IL-18 mRNA synthesized by RT-PCR was analyzed on agarose gel electrophoresis and quantitated by Ht values. β -actin RT-PCR was performed as an internal loading control. The numbers above the bars in the lower panel Figure represent the Ht values for each treatment. (이하 Fig. 2-Fig.7. 동문)

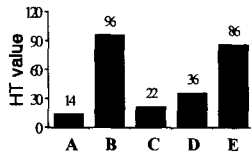


Fig. 3. Inhibitory effects of HKHHT extract on IL-6 mRNA expression in RAW264.7 cell line.

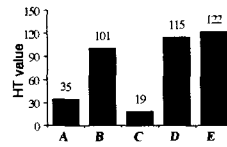


Fig. 4. Inhibitory effects of HKHHT extract on IL-18 mRNA expression in RAW264.7 cell line.

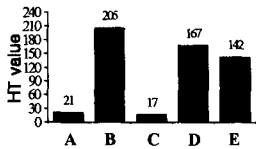


Fig. 5. Inhibitory effects of HKHHT extract on COX-2 mRNA expression in RAW264.7 cell line.

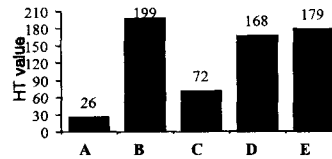


Fig. 6. Inhibitory effects of HKHHT extract on NOS-II mRNA expression in RAW264.7 cell line.

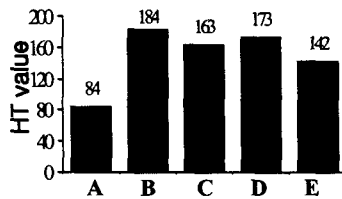


Fig. 7. Inhibitory effects of HKHHT extract on TNF-alpha mRNA expression in RAW264.7 cell line.

3. ELISA에 의한 사이토카인 측정

1) IL-6 생성량에 미치는 영향

RAW264.7 세포주에서 IL-6 생성량은 정상군이 $5.2 \pm 1.2 \text{ ng/ml}$, 대조군이 $104.1 \pm 21.3 \text{ ng/ml}$ 로 나타났으며, HKHHT extract

100, 10, $1 \mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 각각 40.2 ± 12.0 , 86.4 ± 16.4 , $97.8 \pm 23.5 \text{ ng/ml}$ 으로 나타나 대조군에 비해 $100 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성($p < 0.05$) 감소를 나타내었다(Table 2).

Drug	HKHHT ($\mu\text{g/ml}$)	Interleukin-6 production (ng/ml)
Media control	0	5.2 ± 1.2
LPS ($1 \mu\text{g/ml}$)	Control	104.1 ± 21.3
	100	$40.2 \pm 12.0^*$
	10	86.4 ± 16.4
	1	97.8 ± 23.5

Table 2. Inhibitory Effect of HKHHT Extract on the IL-6 Production in RAW264.7 Cell Line

The data are expressed as the mean \pm SEM. Comparisons between groups were analyzed using Student's paired test, and differences were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher T test ($p < 0.05$).

2) TNF- α 생성량에 미치는 영향
 RAW264.7 세포주에서 TNF- α 생성량은 정상군이 $12.5 \pm 4.3\text{ng/ml}$, 대조군이 $86.8 \pm 16.6\text{ng/ml}$ 로 나타났으며, HKHHT extract 1

00, 10, $1\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 각각 72.3 ± 18.2 , 88.5 ± 19.7 , $84.6 \pm 21.3\text{ng/ml}$ 으로 나타났다(Table 3).

Drug	NKHHT ($\mu\text{g/ml}$)	TNF- α production (ng/ml)
Media control	0	12.5 ± 4.3
	Control	86.8 ± 16.6
LPS ($1\mu\text{g/ml}$)	100	72.3 ± 18.2
	10	88.5 ± 19.7
	1	84.6 ± 21.3

Table 3. Inhibitory Effect of HKHHT Extract on the TNF- α Production in RAW264.7 Cell Line
 The data are expressed as the mean \pm SEM.

4. Nitric oxide(NO) 생성량에 미치는 영향
 RAW264.7 세포주에서 NO생성량은 정상군의 OD값이 0.074 ± 0.013 , 대조군이 0.546 ± 0.082 로 나타났으며, HKHHT extract 100, 10, $1\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 각각 0.148

± 0.028 , 0.329 ± 0.050 , 0.533 ± 0.072 로 나타나 대조군에 비하여 100, $10\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유의성 있게 NO 생성량을 억제하였다(Table 4).

Drug	HKHHT ($\mu\text{g/ml}$)	Nitric Oxide production (optical density, OD)
Media control	0	0.074 ± 0.013
	Control	0.546 ± 0.082
LPS ($1\mu\text{g/ml}$)	100	0.148 ± 0.028 ***
	10	0.329 ± 0.050 *
	1	0.533 ± 0.072

Table 4. Inhibitory Effect of HKHHT Extract on the Nitric Oxide Production in RAW264.7 Cell Line

Comparisons between groups were analyzed using Student's paired test and differences were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher T test (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

5. 세포내 reactive oxygen species(ROS)의 분석
 ROS 생성량은 대조군이 정상군에 비하여 큰 폭으로 증가하였으며, HKHHT extract 투

여군($100\mu\text{g/ml}$ C, $10\mu\text{g/ml}$ D)은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 ROS생성을 억제하였다(Fig. 8).

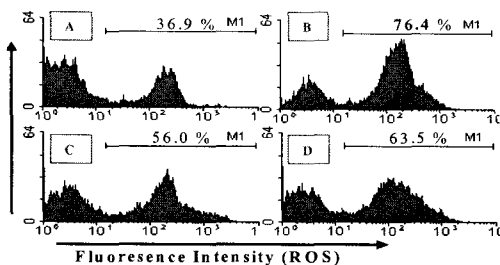


Fig. 8. Inhibitory effect of HKHHT extract on the ROS production in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cells were treated with various concentrations of HKHHT extract (C: 100µg/ml, D: 10µg/ml) in the presence (control,B) or absence (A) of LPS, (1µg/ml) for 48 hr. After culture, cells were treated with DCFH-DA reagent (50mM), harvested, and assayed for ROS positive cells (M1) by flow cytometry.

6. Carrageenin과 arachidonic acid에 의한 족부종에 미치는 영향

1h, 3h, 5h 간격으로 EV(ml)를 확인한 결과, EV(ml)는 대조군에서 각각 0.39 ± 0.03, 0.86 ± 0.04, 0.87 ± 0.04ml로 나타났고, HKHHT extract를 300mg/kg 투여군에서는 0.25 ± 0.06, 0.54 ± 0.04, 0.61 ± 0.05ml로 나타나

대조군에 비하여 35.6%, 37.2%, 29.9%의 유의성 있는 억제효과를 나타내었고, 1,200mg/kg 투여군에서는 0.17 ± 0.01, 0.32 ± 0.04, 0.33 ± 0.03ml로 나타나 56.4%, 62.8%, 62.1%의 유의성 있는 억제 효과가 나타났다(Table 5).

Group	Dose mg/kg	Time after carrageenin-induced paw edema in rat					
		1 h		3 h		5 h	
		EV(ml)	EI (%)	EV(ml)	EI (%)	EV (ml)	EI (%)
Control		0.39 ±0.03		0.86 ±0.04		0.87 ±0.04	
HKHHT extract	300	0.25 ±0.06**	35.9	0.54 ±0.04**	37.2	0.61 ±0.05**	29.9
	1,200	0.17 ±0.01***	56.4	0.32 ±0.04***	62.8	0.33 ±.03***	62.1

Table 5. Inhibitory Effect of HKHHT Extract on Paw Edema in Carrageenin and AA-induced Rats

EV : edema volume; EI: edema inhibition

The data are expressed as the mean ± SEM. Comparisons between groups were analyzed using Student's paired test and differences between the sample and the control groups were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher T test(**p<0.01, ***p<0.001).

7. 만성 염증성 대장염질환 생쥐모델에 미치는 영향

1) 체중의 변화에 미치는 영향

대장염 생쥐의 체중 변화는 정상군이 28.1

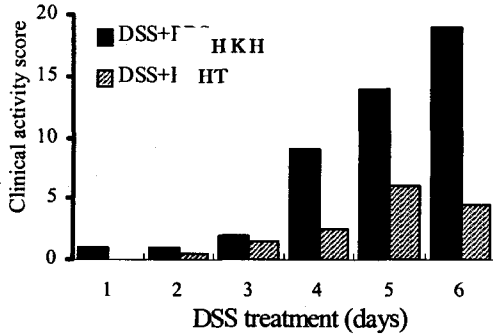
± 0.62g, 대조군이 23.7 ± 0.34g로 나타난 반면, HKHHT extract 투여군은 25.0 ± 0.55 g로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(p <0.01) 증가를 나타내었다(Table 6)

group	Drug treatment (mg/kg)	Final Body weight(g)
Normal	-	28.1 ± 0.62
5% DSS	Control	23.7 ± 0.34
	HKHHT	25.0 ± 0.55**

Table 6. The Effect of HKHHT Extract on Final Body Weight in DSS-mediated Colitis Mice

The data are expressed as the mean ± SEM. Comparisons between groups were analyzed using Student's paired test and differences between HKHHT-treated and the control mice were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher T test(**p<0.01).

2) Clinical disease activity에 미치는 영향
 Clinical disease activity 측정에서는 대조



군(DSS+PBS)에 비하여, HKHHT extract(DSS+HKHHT) 투여군에서 clinical activity score가 큰 폭으로 감소하였다(Fig. 9)

Fig. 9. The effect of HKHHT extract on the severity of clinical symptoms in DSS-mediated colitis mice.

Severity of colitis in DSS plus HKHHT-treated mice (n=8) or DSS plus PBS-treated mice (n=8). Daily clinical assessment of the DSS-induced colitis included the measurement of food intake and body weight, an evaluation of stool consistency, and the presence of blood in the stools by a guaiac paper test. The stool consistency was assessed using the following four-point scale: 0, normal; 1, soft; 2, very soft but formed; and 3, liquid. The blood intensity by the guaiac paper test was scored by the following scale: 0, negative; 1, faintly blue; 2, moderately blue; 3, dark blue; and 4, blood visible.

3) Colon의 길이에 미치는 영향
 대장염 생쥐의 colon의 길이 측정에서는 정상군은 11.5 ± 0.6cm로 나타났고, 대조군은 5.6 ± 0.3cm로 나타나 정상군에 비하여

큰 폭으로 감소하였고, HKHHT extract 투여군에서는 7.9 ± 0.5cm로 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.001) 결과를 나타내었다(Table 7).

group	Drug treatment (mg/kg)	Colon length (cm)
Normal	-	11.5 ± 0.6
5% DSS	Control	5.6 ± 0.3
	HKHHT	7.9 ± 0.5***

Table 7. The Effect of HKHHT Extract on Colon Length in DSS-mediated Colitis Mice

The data are expressed as the mean ± SEM. Comparisons between groups were analyzed using Student's paired test and differences between HKHHT-treated and the control mice were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher T test(***p<0.001).

4) 혈액학적 변화
 백혈구(WBC) 수 변화에서는 정상군이 3.6 ± 1.42(×10³ μl), 대조군이 0.4 ± 0.11(×10³ μl)로 나타났고, HKHHT extract 투여군은 2.11 ± 0.23(×10³ μl) 나타나 유의성 있는(p<0.001) 결과를 나타내었다(Table 8).

여 유의성 있는(p<0.01) 결과를 나타내었다(Table 8).

적혈구(RBC) 수 변화에서는 정상군이 9.78 ± 1.21(×10⁶ μl), 대조군이 7.21 ± 0.18(×10⁶ μl), HKHHT extract 투여군이 8.40 ± 0.34(×10⁶ μl)로 나타나 이 역시 대조군에 비하

Hgb(혈색소) 변화에서는 정상군은 15.4 ± 0.45(g/dl), 대조군은 11.5 ± 0.50(g/dl), HKHHT extract 투여군은 13.5 ± 0.35(g/dl)로 대조군에 비하여 유의성 있는(p<0.01) 결과를 나타내었다(Table 8).

HCT(적혈구용적) 변화에서는 정상군은 49.9 ± 1.44(%), 대조군은 37.2 ± 2.02(%), HKHHT extract 투여군은 42.0 ± 1.75(%로 나타

나 효과 있는 결과를 나타내었다(Table 8).

PLT(혈소판)수 변화에서는 정상군이 $1,103 \pm 110(\times 10^3 \mu\ell)$, 대조군은 $2,025 \pm 145(\times 10^3$

$\mu\ell)$, HKHHT extract 투여군은 $1,367 \pm 201(\times 10^3 \mu\ell)$ 로 유의성 있는($p < 0.01$) 결과를 나타내었다(Table 8).

Items	C57BL/6 Normal	5% DSS oral administration for 8 day	
		Control	HKHHT
WBC($\times 10^3 \mu\ell$)	3.6 ± 1.42	0.4 ± 0.11	$2.11 \pm 0.23^{***}$
RBC($\times 10^6 \mu\ell$)	9.78 ± 1.21	7.21 ± 0.18	$8.40 \pm 0.34^{**}$
Hgb(g/dl)	15.4 ± 0.45	11.5 ± 0.50	$13.5 \pm 0.35^{**}$
HCT(%)	49.9 ± 1.44	37.2 ± 2.02	42.0 ± 1.75
PLT($\times 10^3 \mu\ell$)	1103 ± 110	2025 ± 145	$1367 \pm 201^{**}$

5) 혈청 중 IL-6와 TNF- α 생성량에 미치는 영향

혈청중 IL-6 생성량을 측정한 결과, 정상군은 $9.4 \pm 2.6\text{pg/ml}$, 대조군은 $378 \pm 45.5\text{pg/ml}$ 로 나타난 반면, HKHHT extract 투여군에서는 $186 \pm 27.5\text{pg/ml}$ 로 나타나 유의성

Table 8. The Effect of HKHHT Extract on Hematological Values in DSS-mediated Colitis Mice

Mice were fed with DSS over 8 days, and HKHHT extract (1,200mg/kg body weight) or an equivalent volume of PBS was orally administered into the DSS-colitis mice. Final hematological values were measured by coulter counter. The data are expressed as the mean \pm SEM. Comparisons between groups were analyzed using Student's paired test and differences between experimental and control groups were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher T test (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

있는($p < 0.01$) 결과를 나타내었다(Table 9).

TNF- α 생성량은, 정상군에서는 $2.6 \pm 1.1\text{pg/ml}$, 대조군은 $214 \pm 26.1\text{pg/ml}$, HKHHT extract 투여군에서는 $69.1 \pm 25.4\text{pg/ml}$ 로 나타나 이 역시 유의성 있는($p < 0.01$) 결과를 나타내었다(Table 9).

group	Drug(mg/kg)	Cytokine production	
		IL-6 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
Normal	-	9.4 ± 2.6	2.6 ± 1.1
5% DSS	Control	378 ± 45.5	214 ± 26.1
	HKHHT	$186 \pm 27.5^{**}$	$69.1 \pm 25.4^{**}$

Table 9. The Effect of HKHHT Extract on IL-6 and TNF- α Production in DSS-mediated Colitis Mice

The data are expressed as the mean \pm SEM. Comparisons between groups were analyzed using Student's paired test and differences between experimental and control groups were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher T test (** $p < 0.01$).

6) 림프내 유세포에 미치는 영향

만성염증성 대장염 생쥐에서의 림프내 유세포를 분석한 결과, CD3+(T)은 정상군이 $70.4 \pm 2.01\%$, 대조군이 $27.6 \pm 3.66\%$, HKHHT extract 투여군이 $45.7 \pm 3.04\%$ 로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는($p < 0.01$) 결과를 나타내었다(Table 10, Fig. 22).

CD19+(B)는 정상군은 $29.0 \pm 2.56\%$, 대조군은 $65.6 \pm 3.50\%$, HKHHT extract 투여군,

$48.7 \pm 2.77\%$ 로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는($p < 0.01$) 결과를 나타내었다(Table 10, Fig. 22).

CD3+/CD69+에서는 정상군은 $4.3 \pm 0.30\%$, 대조군은 $12.4 \pm 2.13\%$, HKHHT extract 투여군, $5.5 \pm 0.99\%$ 로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는($p < 0.01$) 결과를 나타내었다(Table 10, Fig. 24).

B/T rate(%)를 보면, 정상군은 0.41% , 대

조군은 2.37%, HKHHT extract 투여군은 1.07%로 나타나 대조군에 비하여 감소 하였으

나 유의성은 없었다(Table 10).

Leucocyte type	C57BL/6 Normal(%)	5% DSS oral administration for 8 day	
		Control(%)	HKHHT(%)
CD3+(T)	70.4 ± 2.01	27.6 ± 3.66	45.7 ± 3.04**
CD19+(B)	29.0 ± 2.56	65.3 ± 3.50	48.7 ± 2.77**
CD8+/CD69+	4.3 ± 0.30	12.4 ± 2.13	5.5 ± 0.99**
B/T rate	0.41	2.37	1.07

Table 10. Cell Content in Lymph Node of DSS-mediated Colitis Mice

The data are expressed as the mean ± SEM. Comparisons between groups were analyzed using Student's paired test and differences between experimental and control groups were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher T test (**p<0.01).

IV. 考 察

行經紅花湯은 清代 武¹⁾의 《濟陰綱目》에 최초로 수록된 처방으로 “治婦人室女經候不行 時作脹痛”이라 하여 血滯로 인한 室女經閉를 치료할 목적으로 사용되었다.

經閉의 치료는 월경의 회복 및 배란주기의 확립을 통해 受胎力을 보존하는 것을 목표로 하며, 처방은 補腎養肝, 補氣養血, 滋陰益精, 活血化瘀, 豁痰除濕이 활용되고 있는데²⁾, 經閉症은 오랫동안 치료하지 않으면, 癥瘕^{1,14-16)}, 水腫^{1,15,16)}과 勞瘵^{15,17,18)}등의 질환을 야기 시킬 수 있으며, 《內經·陰陽別論》^{2,13)}에서는 “其傳爲風消 其傳爲息賁者 死不治”라 하였으므로 반드시 조기에 적절한 치료가 필요한 증이다.

行經紅花湯은 當歸尾, 赤芍藥, 紫菀, 劉寄奴, 牛膝, 玄胡索, 紅花, 蘇木, 桃仁, 青皮, 香附子, 桂心으로 구성 되었는데 각각의 效能을 살펴보면 當歸尾는 補血活血, 調經止痛, 赤芍藥은 清熱涼血, 散瘀止痛, 紫菀은 潤肺下氣, 劉寄奴는 破血通經, 散瘀止痛, 牛膝은 散瘀血, 消癰腫,

玄胡索은 活血散瘀, 理氣止痛, 紅花는 活血通經, 散瘀止痛, 蘇木은 行血破瘀, 消腫止痛, 桃仁은 活血祛瘀, 青皮는 疏肝破氣, 散結消瘀, 香附子는 理氣解鬱, 止痛調經, 桂心은 溫經通脈, 助陽化氣하는 효능이 있다¹⁹⁻²²⁾. 이상을 종합하여 보면 行經紅花湯은 活血通經, 散瘀止痛하는 효능이 있어 상기한 바와 같이 血滯으로 인한 經閉를 치료할 목적으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

최근, 瘀血이란 용어의 血을 營血이란 측면을 부각하여 血瘀라는 용어로 사용되기도 하는데, 이와 관련하여 瘀血을 혈액순환장애뿐 아니라 조직의 삼출, 변성, 괴사, 위축과 같이 대사 장애로 일어나는 조직의 병리반응 등과 유사한 개념으로 확대 해석 할 수 있다^{3,4)}.

炎症은 손상에 대한 살아있는 조직의 반응으로, 생체조직의 기질변화를 초래하는 침습에 대한 방어기전인데²³⁾, 炎症 반응은 그 원인과 반응조직의 차이에 상관없이 거의 유사한 변화를 보인다. 이는 생체 내 유리되는 공통적인 물질이 존재하기 때문인데, 이런 매개체로서는 활성산소, 산화질소(NO), 프로스타글란딘(PG), 여러 cytokines 등이 있다²⁴⁾.

본 연구에서는 먼저 실험 농도를 설정하기 위하여 mLFC와 RAW264.7 세포주에 대한 세포독성을 평가 하였고, RAW 264.7 세포주에서는 IL-1 β , IL-6, IL-18, COX-2, NOS-II 및 TNF- α 등의 유전자 발현에 미치는 영향과 IL-6, TNF- α , NO 및 ROS의 생성량에 미치는 영향을 관찰 하였으며, carrageenin과 arachidonic acid (AA)로 유발된 C57BL/6 생쥐의 족부 종과 만성 염증성 대장염 생쥐 모델에서 체중의 변화, clinical disease activity, colon의 길이, 혈액학적 변화, 혈청중 IL-6와 TNF- α 의 생성량, 림프내 유세포에 미치는 영향을 평가하였다.

세포독성에 미치는 영향 평가에서는 mLFC와 RAW264.7 세포주에 대하여 모든 실험 농도에서 세포독성 나타나지 않았지만 가장 고농도인 200 μ g/ml 농도를 제외하고 실험을 실시하였다. 정상세포에 대하여 본 시료가 세포독성이 없음을 시사하고 있다(Table 1).

면역과 염증에 관련된 여러 cytokine중 IL-1 β , IL-6, IL-18 및 TNF- α 는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 cytokine으로, 이중 특히 TNF- α 는 염증이 발생된 부위에는 높은 농도로 존재한다^{25,26}).

行經紅花湯 추출물이 대표적인 염증성 cytokines인 IL-1 β , IL-6, IL-18 및 TNF- α 의 유전자 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 평가한 결과, IL-1 β 유전자 발현과 IL-6 유전자 발현은 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였으며(Fig. 2, 3), IL-18 유전자 발현은 100 μ g/ml의 농도에서, TNF- α 유전자 발현은 대조군에 비해 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 4, 7).

RAW264.7 세포주에서 IL-6와 TNF- α

생성량에 미치는 영향에서, IL-6는 대조군에 비해 100 μ g/ml의 농도에서 유의성 있는 감소를 나타내었고(Table 2), TNF- α 는 각각의 농도에서 감소를 나타내어(Table 3), 상기 유전자 발현 결과와 부합되었다.

또한 만성 염증성 대장염 생쥐의 혈청중 IL-6와 TNF- α 생성량 검색에서 나타난 유의성 있는 결과(Table 9) 역시 in vitro 결과와 부합됨으로써, 본 시료가 면역 조절작용을 통한 항염증 효과가 있음을 알 수 있다. 본 실험에서 나타난 IL-1 β , IL-6, IL-18, NO, COX-2 유전자 발현 결과는 이를 입증해 주고 있다.

NO(Nitric oxide)는 NOS(nitric oxide synthase)효소에 의해 만들어진다. NOS는 I형과 II형, III형의 3종류가 있는데, 이중 II형은 iNOS(inducible NOS)로 과량의 NO를 생성해 각종 炎症疾患에 작용한다. 생산된 과량의 NO는 그 자체로도 유전자 및 단백질에 독성을 나타내지만 활성산소의 하나인 superoxide anion (O₂⁻)과 반응해 맹독성을 가진 peroxynitrite (ONOO⁻)를 생성하여, 암 형성과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다^{23,26}).

본 실험에서 行經紅花湯 추출물이 NOS-II 유전자 발현과 NO 생성량에 미치는 영향에서, NOS-II 유전자 발현은 대조군에 비해 농도 의존적으로 억제 하였으며, NO 생성량은 10 μ g/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 유의적으로 유전자 발현을 억제하였다(Table 4, Fig. 6).

세포막 지질 성분은 세균의 감염 등 외부 자극을 받으면 arachidonic acid로부터 cyclooxygenase(이하 COX) 효소의 작용을 받아 PG를 합성하게 된다. PG는

염증과 가장 관련이 깊은 것으로 알려져 있다. COX-1은 house keeping enzyme인 반면, 외부 자극에 의해 발현이 유도되는 COX-2는 염증과 암 등의 각종 퇴행성 질환을 일으키는데 중요한 역할을 한다²⁷⁻²⁹).

行經紅花湯 추출물이 RAW264.7 세포주에서 COX-2 유전자 발현에 미치는 영향에서는 각각의 농도에서 대조군에 비해 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 5).

인체 내에서는 일생을 통하여 끊임없이 반응력이 큰 ROS(Reactive Oxygen Species)와 RNS(Reactive nitrogen Species)가 불가피하게 생성되고 이들은 세포내의 DNA나 기타 핵산 등과 반응하여 산화적 손상 및 변이를 유발 한다³⁰).

行經紅花湯 추출물이 ROS 발현에 미치는 영향에서는 ROS 생성량은 대조군이 정상군에 비하여 큰 폭으로 증가한 반면, 行經紅花湯 투여군(100 μ g/ml, 10 μ g/ml)에서는 대조군에 비하여 농도 의존적으로 ROS의 생성을 억제하였다(Fig. 8).

다음으로 in vivo 실험에서는 크게 carrageenin과 arachidonic acid에 의한 즉부종에 미치는 영향과 만성 염증성 대장염 질환 동물 모델에 미치는 영향을 검색하였는데, 먼저 즉부종에 미치는 영향에서는, 1h, 3h, 5h 간격으로 EV(ml)를 확인한 결과, 300mg/kg 농도 투여군에서는 대조군에 비하여 35.6%, 37.2%, 29.9%의 유의성 있는 억제효과를 나타내었고, 1,200mg/kg 농도 투여군에서는 56.4%, 62.8%, 62.1%의 유의성 있는 억제 효과가 나타났다(Table 5).

만성 염증성 대장염질환 동물모델에 미치는 영향에서는 체중 변화, clinical disease activity, colon 길이, 혈액학적 변

화, 혈청 중 IL-6와 TNF- α 생성량, 림프내 유세포 변화 등을 통하여 본 시료의 항염증 효과를 규명하였다.

먼저 체중 변화는 대조군에 비하여 유의성 있는($p < 0.01$) 증가를 나타내었으며(Table 6), colon 길이 측정에서도 유의성 있는($p < 0.001$) 증가를 나타내었는데(Table 7), 이 같은 결과는 곧 clinical activity score 결과(Fig. 9)와 연관성이 있다는 점에서 본 시료의 항염증 작용이 인정된다.

염증의 가장 기본적인 검색 조건인 혈액학적 변화에서는 백혈구(WBC), 적혈구(RBC), 혈색소(Hgb) 수치가 염증으로 인해 감소된 대조군에 비해 유의성 있는($p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.01$) 증가를 나타내었고, 적혈구용적(HCT) 수치는 대조군에 비해 증가하였으나 유의성은 없었고(Table 8), 혈소판(PLT) 수치는 대조군에 비해 유의성 있는($p < 0.01$) 감소를 나타내었다(Table 8).

만성 염증성 대장염 질환 생쥐의 림프내 유세포 분석에서 CD3+(T)은 대조군에 비하여 유의성 있는($p < 0.01$) 증가를 나타내었고(Table 10), CD19+(B)는 유의성 있는($p < 0.01$) 감소를 나타내어(Table 10), B/T rate(%)가 대조군에 비하여 감소하였다(Table 10). 또한 CD3+/CD69+에서는 유의성 있는($p < 0.01$) 감소를 나타내었다(Table 10).

이러한 결과는 lymph node에서 T 세포가 염증 부위로 emigration이 일어남으로써 T세포와 B세포의 불균형이 일어남을 알 수 있다. 그러나 만성 염증성 대장염 질환 생쥐에 行經紅花湯을 투여한 실험군에서는 T 세포가 항염증 작용에 의하여 emigration이 되는 것이 억제

함으로서 T세포와 B세포의 불균형이 회복된 것을 알 수 있었다. 그리고 T 세포 활성 표지 분자인 CD69는 계속적인 self-Ag이나 mature한 수지상세포에 의하여 활성화가 일어나 만성 염증성 대장염 질환 생쥐에서 증가되는데, 본 실험에서 CD3e⁺/CD69⁺세포는 대조군에 비하여 감소하여 이 역시 다른 결과와 부합되었다.

이상의 결과로 보아 行經紅花湯의 항염증 작용이 인정되어, 부인과 질환에서 나타나는 다양한 炎症성 질환 치료에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 思料되며, 활혈화어 약물과 처방이 청열해독 약물과 더불어 공사지제로써 염증성 질환에 광범위하게 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 結 論

行經紅花湯(HKHHT)의 抗炎症 작용을 실험적으로 究明하고자 *in vitro*에서 세포독성, 유관 사이토카인(cytokines) 유전자 발현과 생성량에 미치는 영향을 검색하고, *in vivo*에서 염증 동물 병태 모델의 족부종, clinical disease activity, 혈액학적 변화, 혈청 중 IL-6와 TNF- α 의 생성량 및 림프내 유세포에 미치는 영향 등을 관찰한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. HKHHT는 mLFC 및 RAW264.7 세포주에 대하여 세포독성이 나타나지 않았다.
2. HKHHT는 RAW264.7 세포주에서 IL-1 β , IL-6 및 NOS-II 유전자 발현을 모든 실험 농도에서 농도 의존적으로 억제하였으며, IL-18 유전자 발현

은 100 μ g/ml 이상 농도에서 억제하였다.

3. HKHHT는 RAW264.7 세포주에서 TNF- α , COX-2 유전자 발현을 대조군에 비해 억제하였다.
4. HKHHT는 RAW264.7 세포주에서 IL-6, NO 생성량을 각각 100 μ g/ml, 10 μ g/ml 이상의 농도에서 유의성 있게 억제하였고, TNF- α 의 생성량은 대조군에 비해 억제하였다.
5. HKHHT는 RAW264.7 세포주에서 ROS 생성량을 대조군에 비해 농도 의존적으로 억제하였다.
6. HKHHT는 carrageenin과 arachidonic acid에 의한 족부종을 모든 농도에서 유의성 있게 억제하였다.
7. HKHHT는 만성 염증성 대장염 질환 동물 모델에서 체중과 colon 길이를 유의성있게 증가시켰고, clinical disease activity는 큰 폭으로 감소시켰다.
8. HKHHT는 만성 염증성 대장염 질환 동물 모델에서 백혈구, 적혈구, 혈색소, 유의성 있게 증가시켰고 적혈구 용적을 증가시킨 반면, 혈소판을 유의성 있게 감소시켰다.
9. HKHHT는 만성 염증성 대장염 질환 동물 모델에서 혈청중 IL-6와 TNF- α 의 생성량을 유의성 있게 감소시켰다.
10. HKHHT는 만성 염증성 대장염 질환 동물 모델에서 CD3⁺(T)를 유의성있게 증가시킨 반면, CD19⁺(B)와 CD3⁺ /CD69⁺는 유의성 있게 감소시켰으며, B/T rate(%)는 감소시켰으나 유의성은 나타나지 않았다.

이상의 연구결과 行經紅花湯은 抗炎症 作用이 있으므로 임상에서 여성의 비뇨생식기 炎症질환으로 야기된 무월경증에 응용될 수 있을 것으로 사료되며, 향후 行經紅花湯의 효능에 대한 지속적인고 광범위한 연구가 필요하리라고 생각된다.

- 투 고 일 : 2005년 07월 21일
- 심 사 일 : 2004년 08월 02일
- 심사완료일 : 2004년 08월 10일

參考文獻

1. 武之望. 濟陰綱目. 中國醫學叢書. 서울: 도서출판 일증사. 1992; 54.
2. 韓醫婦人科學 教材編纂委員會. 韓醫婦人科學 上. 서울: 도서출판 정담. 2002; 116, 119, 121, 122.
3. 張之南 등. 血瘀證與活血化瘀研究. 上海: 上海科學技術出版社. 1990; 429-431.
4. 安秉哲. 針灸 및 Laser 光線針刺戟이 Endotoxin에 의한 血栓症에 미치는 影響. 慶熙大學校大學院. 1984.
5. 강승범. 活絡丹의 抗炎症, 鎮痛 및 抗血栓 效果에 關한 研究. 圓光大學校 大學院. 1996.
6. 유지용. 身痛逐瘀湯의 抗炎症, 鎮痛 및 抗血栓效果에 關한 研究. 圓光大學校 大學院. 1996.
7. 김광겸. 和血通經散의 抗炎症, 抗血栓 및 鎮痛效果에 對한 研究. 圓光大學校 大學院. 1996.
8. 이혜경. 加味通經湯의 抗血栓, 消炎 및 鎮痛作用에 對한 研究. 大田大學校 大學院. 2002.
9. 趙善花. 坐宮丹이 抗菌 抗血栓 및 鎮痛作用에 미치는 影響. 大田大學校 大學院. 2001.
10. 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.
11. Winter et al. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Ther.* 1968; 62(1): 196-201.
12. DiMartino et al. The pharmacology of arachidonic acid-induced rat PMN leukocyte infiltration. *Agents Act ion.* 1989; 27(3-4): 325-327.
13. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울: 東洋醫學研究院出版部. 1985; 38, 55, 78, 86-88, 104, 107, 110, 116-124, 213, 233, 247, 256.
14. 方廣. 丹溪心法附餘. 서울: 大星文化社. 1982; 695.
15. 陳自明. 婦人大全良方. 北京: 文光圖書有限公司印行. 1975; 10-12.
16. 李梴. 醫學入門. 台聯國風出版社. 1979; 443, 445-446.
17. 吳錫璜. 聖濟總錄(十一). 上海: 文端樓. 1919; 卷一百五十一: 10-17.
18. 王肯堂. 女科準繩. 台北: 新文豐出版社. 1974; 卷二: 22-27.
19. 全國韓醫科大學本草學教授. 本草學. 서울: 永林社. 1995; 124-125, 195-196, 349-350, 354-355, 413-414, 423-425, 427-428, 437-439, 481-482, 578-580.
20. 임종필. 本草生藥學. 서울: 도서출판 신일상사. 2003; 46-48, 224-225, 261-266, 274-276, 377-379, 383-384.

21. 李泰浩. 最新國漢藥物學. 서울: 杏林出版社. 1981; 446, 519. 45-152.
22. 辛民敎. 原色臨床本草學. 서울: 남산당. 1986; 300, 385-387, 464-465, 467-472, 468, 480, 481, 518, 519.
23. 박광균. 구강생화학. 서울: 군자출판사. 1999; 318-325.
24. 대한병리학회. 병리학. 서울: 고문사. 1995; 71-104.
25. Aeberli D. et al. Inhibition of the TNF-pathway: use of infliximab and etanercept as remission-inducing agents in case of therapy-resistant chronic inflammatory disorders. *Swiss Med. Wkly.* 2002; 132: 414-422.
26. Feldman M. et al. Anti-TNF- α therapy is useful in rheumatoid arthritis and Crohn's disease: analysis of the mechanism of action predicts utility in other disease. *Transplant Proc.* 1998; 30: 4126-4127.
27. 문태철 등. 천연물로부터 사이클로옥시게나제-2 저해제 검색. *약학회지.* 1998; 42: 214-219.
28. 노민수 등. 리포폴리사카라이드에 의해 유도되는 대식세포의 프로스타글란딘 생합성을 저해하는 천연물의 탐색. *약학회지.* 1998; 42: 558-566.
29. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Immunol. Methods.* 1986; 89: 271-277.
30. 김영태 등. 한국 여성 자궁경부 종양에서의 항산화체계 및 산화적 스트레스. *대한산부인과학회지.* 2002; 45(1):1