

三白草의 消炎作用에 對한 實驗的 研究

대전대학교 한의과대학 부인과학교실
변형국, 신용완, 김의일, 김수민, 이정은, 유동열

ABSTRACT

Effect of Saururi Herba Seu Rhizoma on anti-inflammatory properties in RAW264.7 cell line and murine models of inflammation

Byun Hyung-kuk, Shin Yong-wan, Kim Eui-il, Kim Su-min,
Lee Jung-eun, 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 Saurui Herba Seu Rhizoma(SHSR) on Anti-inflammatory properties in Raw264.7 cell line and murine models of inflammation.

Methods : To investigate the effects of Saurui Herba Seu Rhizoma(SHSR) on anti-inflammation, we study cytotoxicity effects of SHSR on Mouse Lung Fibroblast Cells and Peritoneal Macrophages, Inhibitory effects of SHSR on the nitric oxide (NO) release, the ROS production, and the interleukin-6 production.

Results : The cytotoxicity of SHSR on mouse lung fibroblast Cells and Raw264.7 cell line was not observed. SHSR in RAW264.7 cell line inhibited IL-1 β , IL-6 mRNA gene expression depending upon the concentrations of extract and inhibited IL-18 mRNA gene expression at 100 $\mu\text{g/ml}$ of extract. SHSR in RAW264.7 cell line inhibit COX-2 mRNA gene expression at 100, 10 $\mu\text{g/ml}$ of extract. SHSR in RAW264.7 cell line inhibited NOS-II mRNA gene expression depending upon the concentrations of extract. SHSR in RAW264.7 cell line didn't inhibit TNF- α mRNA gene expression. SHSR in RAW264.7 cell line decreased IL-6 production depending upon the concentrations of extract. SHSR in RAW264.7 cell line decreased ITNF- α production according to the concentrations of extract. SHSR in RAW264.7 cell line inhibited NO release specially SHSR 100, 10 $\mu\text{g/ml}$ concentrations of extract. SHSR inhibit ROS production depending upon the concentrations of extract.

Conclusion : These results suggest that SHSR can be used treating a lot of women disease caused by inflammation.

Key words : Saururi Herba Seu Rhizoma, Anti-inflammation, women, inflammation

I. 緒 論

婦人科 영역에서 여성의 生殖器과 泌尿器系의 염증은 환자들이 婦人科를 찾아오는 가장 흔한 질환 중의 하나로 외음부와 질감염, 자궁경관염, 골반내 염증성질환 및 골반결핵 등이 그 대표적 증상이다¹⁾.

韓醫學의으로 여성 생식기 炎症은 帶下의 범주에 속하는데, 帶下는 “從帶脈而下”의 뜻으로 女性性器 分泌物을 總稱하며 一般的으로 말하는 帶下는 이 性器 分泌物이 增加하여 陰口外까지 流出되어 外陰部 또는 그 附近을 濕潤 또는 汚染하는 狀態를 말하고, 女性性器의 病變을 알 수 있는 가장 直接的이고 客觀的인 證標이므로 婦人科의 臨床診斷上 중요한 資料가 되며, 十女九帶과 할 만큼 상당수의 女性이 가지고 있는 증상이다²⁾.

三白草(Saururi Herba Seu Rhizoma)는 그 氣味가 苦辛, 寒 하며 清熱利濕, 消腫解毒 作用이 있어 全身浮腫, 小便淋瀝, 黃疸, 腫氣, 惡瘡 및 婦人 白帶下에 활용되고 있다^{3,4)}.

三白草에 관한 연구로 權⁵⁾은 浮腫, 脚氣, 黃疸, 疔腫, 淋濁, 白帶, 痢疾, 尿路感染, 腎炎, 風濕性 關節炎에 효과가 있다고 하였으며 秦⁶⁾은 抗炎症 및 消炎 作用이 있다고 보고 하였고, 이⁷⁾는 抗癌 및 세포독성 억제 효과가 있다고 보고 하였으나, 臨床과 연계된 여성의 生殖器 炎症에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

이에 저자는 清熱利濕, 消腫解毒의 功效이 있는 三白草의 抗炎症 作用을 究明하고자, 세포독성에 미치는 영향, IL-1 β , IL-6, IL-18, COX-2, NOS-II 및 TNF-

α 유전자의 발현에 미치는 영향과 IL-6, TNF- α , NO 및 ROS의 생성량에 미치는 영향에 대한 實驗評價를 통해 有意한 結果를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재 료

1) 동 물

實驗 動物은 韓國生命工學研究院에서 購入한 雌性 C57BL/6 6주령을 購入하여, 1週日 동안 實驗室 環境에 適應시킨 後 實驗에 使用하였다. 動物 飼育室의 條件은 conventional system으로 22 \pm 2 $^{\circ}$ C, 1日中 12時間은 200-300 Lux로 照明하고, 12時間은 모든 빛을 遮斷하였다. 飼料는 固形 飼料 (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) 약 물

실험에 사용된 三白草(Saururi Herba Seu Rhizoma : SHSR)는 大田大學校 附屬韓方病院에서 구입한 후 정선하여 사용하였다.

藥 物	生 藥 名
三白草	Saururi Herba Seu Rhizoma

3) 시약 및 기기

(1) 시약

본 실험에 사용된 시약은 sulforodamin-B(SRB), diethyl pyrocarbonate (DEPC), 3,4,5-dimethyl-thiazol-2,5- carboxymethoxyphenyl-2,4-sulfophenyl-2H-tetrazolim(MTS),2,7-dichl orodihydrofluorescin diacetate (DCFH-DA), complete adjuvant, chloroform, RPMI-1640 media, isopropanol, RBC lysis

solution, ethidium bromide (EtBr), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, acryl lamide, magnesium chloride (MgCl₂)는 Sigma Co.(U.S.A) 제품을 사용하였으며, fetal bovine serum (FBS)은 Hyclone, Logan, Co.(U.S.A) 제품을, agarose는 FMC, Co.(U.S.A), propidium iodide (PI), RNase는 Pharmingen, Torreyana, Co.(U.S.A) 제품을, IL-6, TNF- α ELISA kit는 R&D system Co. (Minneapolis, U.S.A) 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기 (대웅, Co., Korea), rotary vaccum evaporator (Büchi B-480, Co., Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Co., Japan), CO₂ incubator (Forma scientific Co., U.S.A), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo, Co., Japan), micro-pipet (Gilson, Co., France), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Co., Japan), centrifuge (Sigma, Co., U.S.A), deep-freezer (Sanyo, Co., Japan), thermocycler system (MWG Biotech., Co., Germany), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, Co., U.S.A), plate shaker (Lab-Line, Co., U.S.A) 및 ELISA reader (Molecular Devices, Co., U.S.A) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 추출물 분리

三白草 150 g 분량을 증류수 2,000 ml 에 가하여 열탕 추출기로 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치 (Rotary vaccum evaporator)로 농축한 다음 동결 건조기 (Freeze dryer)를 이용하여 완전 건조하여 추출물 7.5 g 을 얻어 냉동 (-84 °C) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 세포 배양

생쥐의 정상 lung fibroblast cell (mLFC)는 C57BL/6 생쥐의 폐 조직을 cold D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 다음, cornical tube (15 ml)에 넣어 1,400 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 원심분리 후 다시 tube에 DMEM (containing collagenase A 5 mg/ml, BM) 와 DNase type I (0.15 mg/ml, Sigma), antibiotics (penicillin 104 U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 μ g/ml)를 넣고 37 °C CO₂ 배양기에서 2 시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA를 첨가한 후 30 분간 계속 배양하고, 인산완충생리식염수 (PBS)로 약 2회 1,500 rpm에서 원심 분리한 후 10 % FBS를 첨가한 DMEM에 1주일 동안 배양하였다. 1주일 후 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA로 mLFC 세포를 분리하여 5% FBS를 첨가한 DMEM 배양액에 1×10^5 cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다.

RAW264.7 세포주도 10% FBS를 첨가한 DMEM 배양액에 1×10^5 cells/ml 농도로 맞추어 분주하였다.

3) 세포독성 측정

mLFC에 三白草 추출물 (200 μ g/ml,

100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리하고, 배양 종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척하고, 각 well에 50 % TCA (trichloroacetic acid)를 50 μl 를 가하고 1 시간 동안 4°C에 방치하였다. 이 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기중에서 건조하였다. SRB (0.4 %/1 % acetic acid) 용액을 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 가하고 실온에서 30 분간 염색하였다. 그리고 0.1 % acetic acid 용액으로 약 45회 세척한 다음 공기중에서 건조하고 10 mM Tris Base로 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker 에서 3.5 speed로 5 분간 shaking하고 ELISA leader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) RAW264.7 세포주의 역전사-중합효소 연쇄반응

(1) RNA 추출

먼저 RAW264.7 세포주는 24 well plate에 1×10^6 세포로 분주하였다. 여기에 三白草 추출물 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리하고 1시간 후 LPS (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 각각의 well에 첨가하여 6 시간 배양하고 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고, 여기에 RNAzol^B 500 μl 를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl_3) 50 μl 를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 μl 의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μl 와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80 % EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추

출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 μl 의 증류수에 녹여 heating block 75 °C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

(2) 역전사-중합효소 연쇄 반응

역전사 반응은 준비된 total RNA 3 μg 을 75°C에서 5분 동안 변성시키고, 이에 2.5 μl 10 mM dNTPs mix, 1 μl random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 μl), RNA inhibitor로서 1 μl RNase inhibitor (20 U/ μl), 1 μl 100 mM DTT, 4.5 μl 5×RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl_2)를 가한 후, 1 μl 의 M-MLV RT (200 U/ μl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μl 가 되도록 하였다. 이 20 μl 의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심 침강하여 37°C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

(3) cDNA의 PCR증폭

PCR은 Primus 96 Legal PCR system (with high pressure lid, MWG. in germany)를 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 μl 의 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 (20 pmole/ μl)와 antisense primer (20 pmole/ μl)를 혼합하여 1 μl 를 가하고, 다시 3 μl 2.5 mM dNTPs, 3

μl 10 \times PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 그리고 0.18 μl Taq polymerase (5 U/ μl)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 μl 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation으로 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분, denaturation으로 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분, annealing으로 55 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1분, elongation

으로 72 $^{\circ}\text{C}$, 1분을 1cycle로 하여 25 cycles한 뒤 post-elongation을 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 μl 씩 1.2 % agarose gel에 loading하여 120 V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

■ Mouse Oligonucleotide의 염기배열은 다음과 같다.

Gene	Primer	Sequence
IL-6	sense	5'-COGTCGATAGTGGCATCCATGAAAC-3'
	antisense	5'-GGACCAATACTGCTATAGGG-3'
TNF- α	sense	5'-AACCCCTTACTGAACTCAGATTGTTAG-3'
	antisense	5'-TAAGTCAGTTTAAATGCTTAGGG-3'
COX-2	sense	5'-TTCAAATGAGATTGTGGGAAAAT-3'
	antisense	5'-ACCGATACAGTACAGTACAGTA-3'
NOS-II	sense	5'-CGATATTTAGATACGTTAAAC-3'
	antisense	5'-ATGGCCTAGTCAGTCTCTAAAT-3'
β -actin	sense	5'-TGGAATCCTGTGGTCCATGAAAC-3'
	antisense	5'-GTCACAGTCAGCTGTATAGGG-3'

표준지표 유전자(internal control)로서 β -actin이 사용되어 졌으며, PCR product의 양은 Windows 1D main program(AAB,Co.,USA)을 이용하여 최고값(height, Ht)으로 측정하였다.

5) ELISA에 의한 싸이토카인 측정

RAW264.7 세포주를 실험 3일전에 subculture (1 \times 10⁵ cells/ml) 하여 96 well plate에 2 \times 10⁵ 세포를 각 well에 분주한 후 우태아혈청 결핍 RPMI1640 배양액으로 overnight 시켰다. 三白草 추출물(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리하고 1시간 후 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 각각의 well에 첨가하였다. 6시간 후 DMEM 배양액으로 각 well을 세척한 후 새로운 배양액과 三白草 추출물을 처리하고 24 hrs 시간 동안 CO₂ 배양기

에서 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 회수, IL-6는 enzyme-linked immuno-sorbent assay(ELISA)와, TNF- α 는 ELISA kit로 생산량을 측정하였다.

6) Nitric oxide(NO) 생성량 측정

RAW264.7 세포주를 96 well plate에 2 \times 10⁴ 세포로 분주하였다. 여기에 三白草 추출물 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리하고 1시간 후 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 각각의 well에 첨가하여 48 시간 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 회수하여 NO 생성량을 측정하기 위한 시약인 Griess 시약은 용액A (0.2% Naphthylethylene diamine

dihydrochloride in D.W.)와 용액B(2% Sulfonylamide in 5% H₃PO₄)를 제조하고 냉암소에 보관하며, 사용 직전에 두 용액을 1:1로 혼합하여 혼합 용액을 사용하였다. 배양 상층액 100 μ l를 96well plate에 분주하고 다시 혼합용액 100 μ l를 분주한 뒤 ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 세포내 reactive oxygen species(ROS)의 측정

RAW264.7 세포주내의 ROS를 측정하기 위하여 24 well plate의 각 well에 5 \times 10⁵ cells씩 첨가하고, 三白草 추출물 (100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml)를 처리하고 1시간 후 LPS (1 μ g/ml)를 처리한 후 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 DCFH-DA 50 μ M을 처리하고 5분간 배양하고 2회 수세한 후 flow

cytometer (Becton Dickinson, USA)로 세포내 형광 DCF 또는 ROS를 측정하였다.

Ⅲ. 實驗結果

1. 세포독성

mLFC에 대한 세포독성 평가에서는 대조군에 비해 SHSR extract 200, 100, 50, 10, 1 μ g/ml 농도에서 각각 77.4 \pm 3.9, 86.4 \pm 5.2, 90.1 \pm 4.7, 93.6 \pm 3.7, 97.5 \pm 4.4 %로 나타나 세포독성은 나타나지 않았다.

RAW264.7 세포주에 대한 세포독성에서는 상기한 동일 농도에서 각각 74.8 \pm 4.8, 87.3 \pm 3.8, 91.2 \pm 5.1, 94.1 \pm 5.8, 98.0 \pm 3.6 %로 나타나 역시 세포독성은 나타나지 않았다(Table 1, Fig. 1).

Table 1. Cytotoxicity of SHSR Extract against mLFC and RAW264.7 Cell Line

Drug	Dose (μ g/ml)	% of Control	
		mLFC	RAW264.7
Control	0	100 \pm 4.6	100 \pm 4.3
	1	97.5 \pm 4.4	98.0 \pm 3.6
SHSR	10	93.6 \pm 3.7	94.1 \pm 5.8
	50	90.1 \pm 4.7	91.2 \pm 5.1
	100	86.4 \pm 5.2	87.3 \pm 3.8
	200	77.4 \pm 3.9	74.8 \pm 4.8

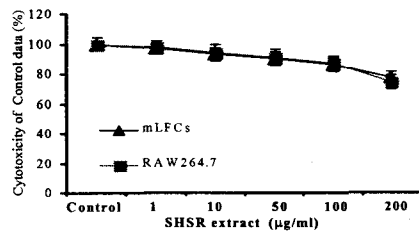


Fig. 1. Cytotoxicity effects of SHSR extract on mLFC and RAW264.7 cell line. mLFC and RAW264.7 cell line were pretreated with various concentration of SHSR extract.

2. RAW264.7 세포주의 역전사-중합효소 연쇄반응

1) IL-1 β 유전자 발현에 미치는 영향
RAW264.7 세포주에서 IL-1 β 유전자 발현은 정상군의 Ht값이 48, 대조군이

102로 나타났으며, SHSR extract 100, 10, 1 μ g/ml, 처리군에서는 각각 52, 77, 89로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 2).

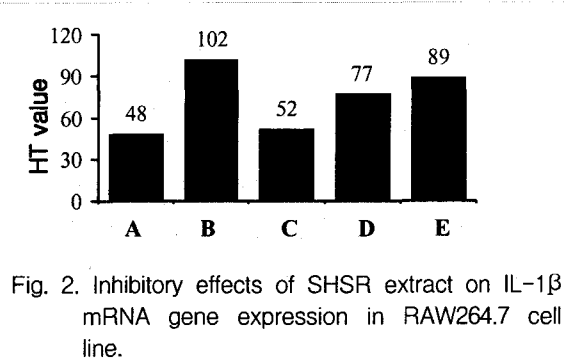
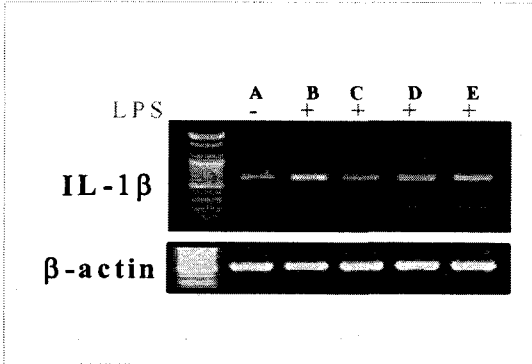


Fig. 2. Inhibitory effects of SHSR extract on IL-1 β mRNA gene expression in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cell line were pretreated with various concentration of SHSR extract {100 (C), 10 (D), 1 (E) $\mu\text{g}/\text{ml}$ } in the presence (B) or absence (A) of lipopolysacchride (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 6hr. Pro-inflammatory cytokines were observed IL-1 β mRNA expression in RAW264.7 cell line.

2) IL-6 유전자 발현에 미치는 영향
RAW264.7 세포주에서 IL-6 유전자 발현은 정상군의 Ht값이 14, 대조군이 96으로 나타났으며, SHSR extract 100, 10,

1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 처리군에서는 각각 58, 78, 91로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 3).

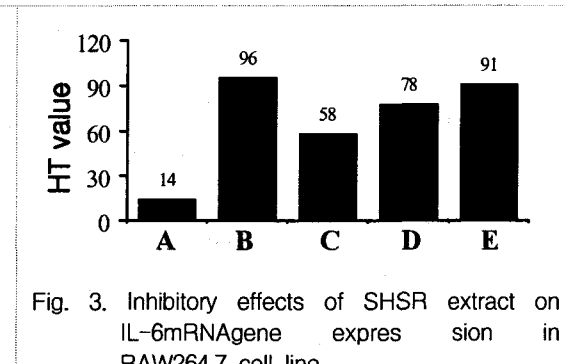
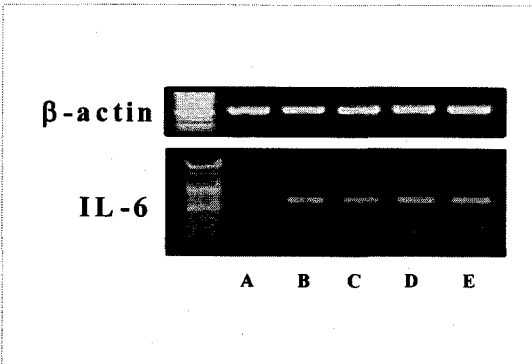


Fig. 3. Inhibitory effects of SHSR extract on IL-6mRNA gene expression in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cell line were pretreated with various concentration of SHSR extract {100 (C), 10 (D), 1 (E) $\mu\text{g}/\text{ml}$ } in the presence (B) or absence (A) of lipopolysacchride (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 6hr. Pro-inflammatory cytokines were observed IL-6 mRNA expression in RAW264.7 cell line.

3) IL-18 유전자 발현에 미치는 영향
RAW264.7 세포주에서 IL-18 유전자 발현은 정상군의 Ht값이 35, 대조군이 101로 나타났으며, SHSR extract 100,

10, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 처리군에서는 각각 49, 122, 116으로 나타나 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 대조군에 비해 유전자 발현을 억제하였다 (Fig. 4).

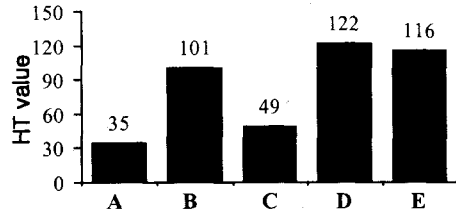
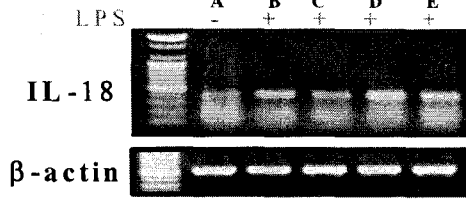


Fig. 4. Inhibitory effects of SHSR extract on IL-18mRNA gene expression in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cell line were pretreated with various concentration of SHSR extract {100 (C), 10 (D), 1 (E) $\mu\text{g}/\text{ml}$ } in the presence (B) or absence (A) of lipopolysacchride (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 6hr. Pro-inflammatory cytokines were observed IL-18 mRNA expression in RAW264.7 cell line.

4) COX-2 유전자 발현에 미치는 영향
RAW264.7 세포주에서 COX-2 유전자 발현은 정상군의 Ht값이 21, 대조군에이 205로 나타났으며, SHSR extract 100,

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 처리군에서는 각각 163 198으로 나타나 대조군에 비해 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 5).

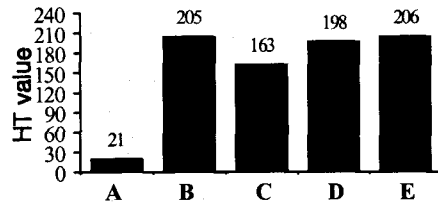
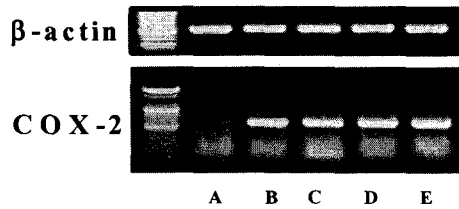
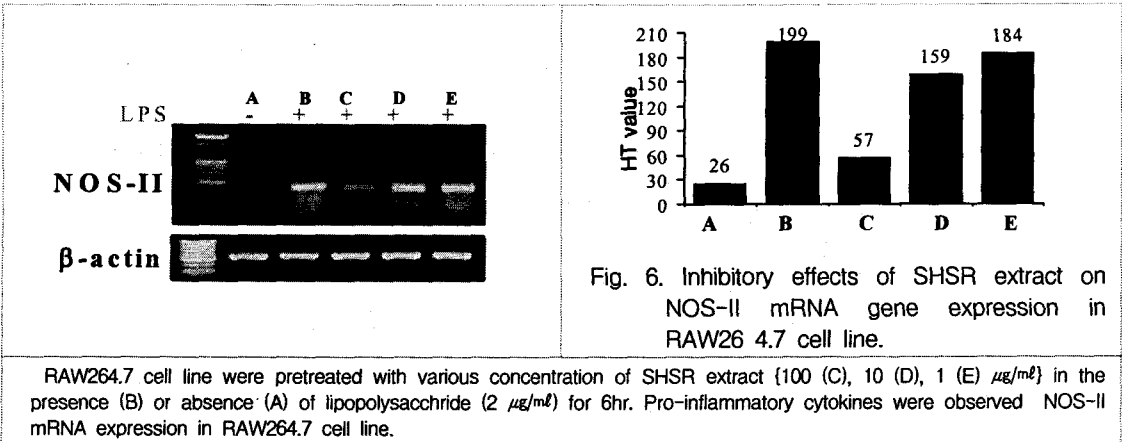


Fig. 5. Inhibitory effects of SHSR extract on COX-2 mRNA gene expression in RAW26 4.7 cell line.

RAW264.7 cell line were pretreated with various concentration of SHSR extract {100 (C), 10 (D), 1 (E) $\mu\text{g}/\text{ml}$ } in the presence (B) or absence (A) of lipopolysacchride (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 6hr. Pro-inflammatory cytokines were observed COX-2 mRNA expression in RAW264.7 cell line.

5) NOS-II 유전자 발현에 미치는 영향
RAW264.7 세포주에서 NOS-II 유전자 발현은 정상군의 Ht값이 26, 대조군이 119로 나타났으며, SHSR extract 100, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 처리군에서는 각각 57,

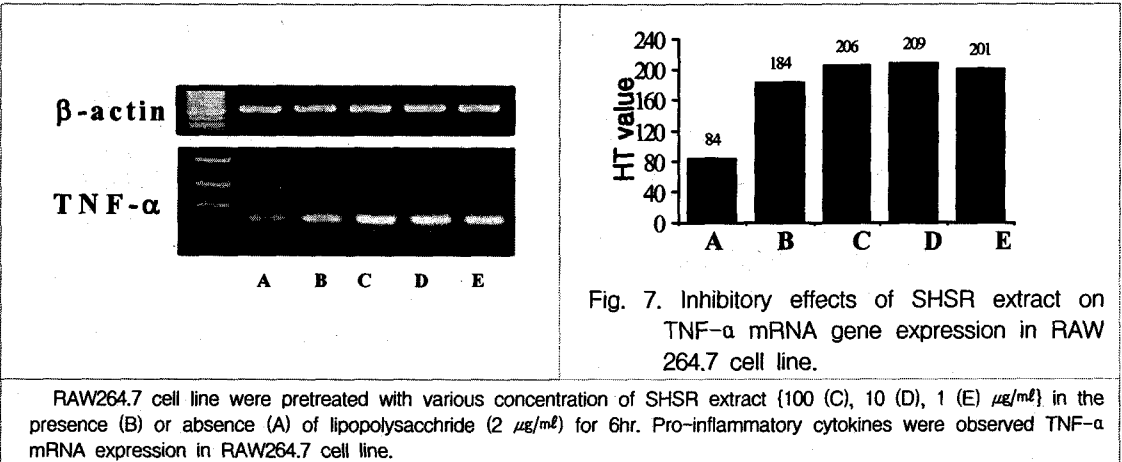
159, 184로 나타나 농도 의존적으로 유전자 발현이 감소되었는데, 특히 SHSR extract 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일 때 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 6).



RAW264.7 cell line were pretreated with various concentration of SHSR extract (100 (C), 10 (D), 1 (E) $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence (B) or absence (A) of lipopolysacchride (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 6hr. Pro-inflammatory cytokines were observed NOS-II mRNA expression in RAW264.7 cell line.

6) TNF- α 유전자 발현에 미치는 영향
RAW264.7 세포주에서 TNF- α 유전자 발현은 정상군의 Ht값이 84, 대조군이 184로 나타났으며, SHSR extract 100,

10, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 처리군에서는 각각 206, 209, 201로 나타나 효과적인 결과를 나타내지 않았다(Fig. 7).



RAW264.7 cell line were pretreated with various concentration of SHSR extract (100 (C), 10 (D), 1 (E) $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence (B) or absence (A) of lipopolysacchride (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 6hr. Pro-inflammatory cytokines were observed TNF- α mRNA expression in RAW264.7 cell line.

3. ELISA에 의한 싸이토카인 측정

1) IL-6 생성량에 미치는 영향

RAW264.7 세포주에서 IL-6 생성량은 정상군이 $5.2 \pm 1.2 \text{ ng}/\text{ml}$, 대조군이 $104.1 \pm 21.3 \text{ ng}/\text{ml}$ 로 나타났으며, SHSR extract 100, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서는 각각 51.3 ± 16.7 , 78.9 ± 14.6 , $101.0 \pm 25.6 \text{ ng}/\text{ml}$ 으로 나타나 농도 의

존적으로 IL-6 생성량을 감소시켰는데, 특히 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 대조군에 비해 유의성 있게 생성량을 감소시켰다(Table 2, Fig. 8).

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

Drug	SHSR ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Interleukin-6 production (ng/ml)
Media control	0	5.2 \pm 1.2
LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Control	104.1 \pm 21.3
SHSR + LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	100	51.3 \pm 16.7*
	10	78.9 \pm 14.6
	1	101.0 \pm 25.6

Statistically significant value compared with LPS-control group data by T test (* $p < 0.05$)

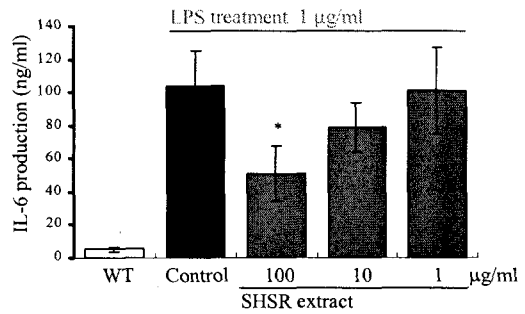


Fig. 8. Inhibitory effect of SHSR extract on the IL-6 production in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cell line were pretreated with various concentration of SHSR extract (100, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence or absence of lipopolysacchride (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24hr. The culture supernatant were collected after 24hr and IL-6 concentration in the supernatant was assayed by ELISA, and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods. Data are represented as means \pm S.E (N=3). Statistically significant value compared with LPS-control group data by T test (* $p < 0.05$).

2) TNF- α 생성량에 미치는 영향

RAW264.7 세포주에서 TNF- α 생성량은 정상군이 12.5 \pm 4.3 ng/ml , 대조군이 86.8 \pm 16.6 ng/ml 로 나타났으며,

SHSR extract 100, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서는 각각 79.5 \pm 14.4, 85.3 \pm 13.7, 81.5 \pm 16.4 ng/ml 으로 나타났다(Table 3, Fig. 9).

Table 3. Inhibitory Effect of SHSR Extract on the TNF- α Production in RAW264.7 Cell Line

Drug	SHSR ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	TNF- α production (ng/ml)
Media control	0	12.5 \pm 4.3
LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Control	86.8 \pm 16.6
SHSR + LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	100	79.5 \pm 14.4
	10	85.3 \pm 13.7
	1	81.5 \pm 16.4

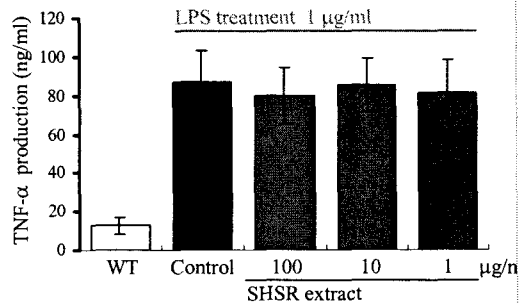


Fig. 9. Inhibitory effect of SHSR extract on the tumor necrosis factor- α production in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cell line were pretreated with various concentration of SHSR extract (100, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence or absence of lipopolysacchride (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24hr. The culture supernatant were collected after 24hr and TNF- α concentration in the supernatant was assayed by ELISA, and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods. Data are represented as means \pm S.E (N=3).

4. Nitric oxide(NO) 생성량에 미치는 영향

RAW264.7 세포주에서 NO 생성량은 정상군의 OD값이 0.074 \pm 0.013, 대조군이 0.546 \pm 0.082로 나타났으며, SHSR

extract 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 각각 0.220 ± 0.043 , 0.374 ± 0.038 , 0.508 ± 0.062 로 나타나 100, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도

에서 대조군에 비하여 유의성 있게 NO 생성을 억제하였다(Table 4, Fig. 10).

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

Drug	SHSR ($\mu\text{g/ml}$)	Nitric oxide production (optical density, OD)
Media control	0	0.074 ± 0.013
LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)	Control	0.546 ± 0.082
SHSR + LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)	100	$0.220 \pm 0.043^{**}$
	10	$0.374 \pm 0.038^{*}$
	1	0.508 ± 0.062

Statistically significant value compared with LPS-Control group data by T test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

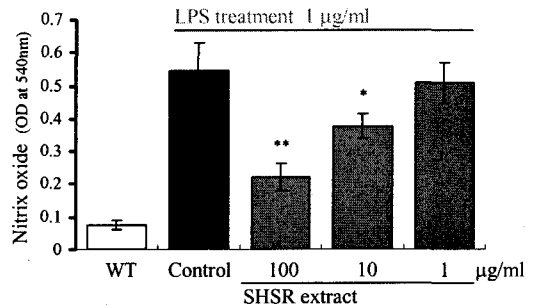


Fig. 10. Inhibitory effect of SHSR extract on the nitric oxide(NO) release in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cell line were pretreated with various concentration of SHSR extract (100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$) in the presence or absence of lipopolysacchride (1 $\mu\text{g/ml}$) for 48hr. The culture supernatant were collected after 24hr and NO concentration in the supernatant was assay, and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods. Data are represented as means \pm S.E (N=6). Statistically significant value compared with LPS-Control group data by T test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

5. 세포내 ROS의 생성량에 미치는 영향

ROS 생성량은 대조군이 정상군에 비하여 큰 폭으로 증가하였으며, SHSR

extract 투여군(100 $\mu\text{g/ml}$ C, 10 $\mu\text{g/ml}$ D)은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 생성을 억제하였다(Fig. 11).

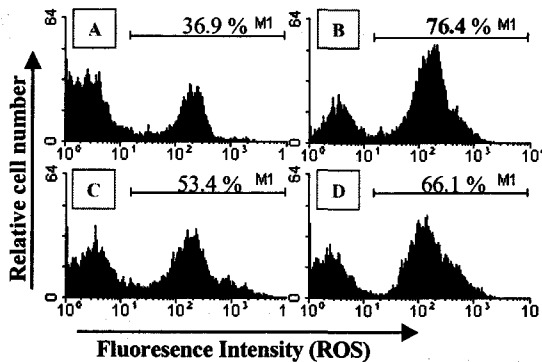


Fig. 11. Inhibitory effect of SHSR extract on the ROS production in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cell line were pretreated with various concentration of SHSR extract (100 $\mu\text{g/ml}$ C, 10 $\mu\text{g/ml}$ D)in the presence of LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ (control, B) or absence (A) for 48hr. After cultured, DCFH-DA reagent (50 mM) treatment and the cells were harvested, and assayed for ROS positive cells by flow cytometry, and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods.

IV. 考 察

婦人科 炎症 疾患의 상당수를 차지하는 여성의 生殖器 炎症은 外陰部와 腔 感染, 子宮頸管炎, 骨盤內 炎症性 疾患, 帶下 및 骨盤結核 등이 있으며 적절한 診斷과 治療로서 長期的인 合併症을 減少시켜야한다¹⁾.

이 중 女性 生殖器 炎症性 疾患의 가장 큰 領域인 帶下는 十女九帶라는 말이 存在할 만큼 여성에게 있어서 흔한 疾患이라 하겠다.

帶下에 對하여 韓醫學적 문헌을 살펴보면 《素問·骨空論》⁹⁾에서“任脈爲病 男子 內結七疝 女子帶下瘕聚”라 하여 처음 言及되었으며, 隋代 巢¹⁰⁾의 《諸病源候論·婦人雜病諸候·帶下候》에 帶下病이라 하여 病名으로 명확히 提示 되었다.

帶下는 赤帶下, 白帶下, 赤白帶下로 分類하기도 하는데 이는 白屬氣 赤屬血의 原理로 帶下를 氣血의 개념으로 分類¹¹⁻¹⁴⁾한 것이고, 原因에 따라 六淫性帶下, 內傷性帶下, 瘀血癥瘕性帶下, 五色帶下로 나누는데, 六淫性帶下는 다시 病因에 따라 細分하면 風冷性帶下, 寒濕性帶下, 濕熱性帶下 등으로 나누고, 內傷性帶下는 食毒帶下, 七情帶下, 濕痰帶下, 熱多帶下, 濕勝帶下로, 瘀血癥瘕性帶下는 瘀血帶下, 癥瘕帶下の 二種으로 나눌 수 있으며, 五色帶下는 五臟帶下라고도 하여 帶下의 色態에 따라 白, 靑, 黃, 黑, 赤의 五種으로 나눈다^{2,15-27)}.

帶下의 原因에 대해서는 諸家의 說이 分分하지만 이를 살펴보면 《靈樞邪氣藏府病形篇》²⁸⁾에서 “身半已下者 濕中之也”라 하여 帶下는 濕으로 인해서 發生

하는 任脈의 病으로 보고 있으나 內經以後 後世에 내려오면서 이를 漸次 具體的으로 여러 方面에서 論述하고 있는데 風冷, 寒濕, 濕熱, 食毒, 七情, 濕痰, 瘀血, 癥瘕, 肝腎兩虛, 肝鬱濕熱, 肝鬱風濕, 脾虛濕勝, 腎虛火旺, 肝脾氣鬱, 心經有熱, 氣血虛寒 등으로 요약할 수 있고 특히 腎氣가 不足하거나 脾의 功能에 障礙가 생겼을 때에 任脈이 弱하게 되고 帶脈의 功能이 堅固하지 못하게 되어 몸의 水濕이 生殖器로 흘러 내려가 帶下가 됨을 알 수 있다^{2,10,12,13,29-38)}.

帶下의 治療는 逐寒溫經, 清熱除濕, 散寒溫中收澀, 疏肝開鬱燥濕, 補脾胃, 升陽氣, 補任脈, 瀉火利水 等の 方法으로 治療하였다^{2,10,13,15-18,39)}.

西洋醫學的으로 帶下는 女性生殖器 感染으로 볼수 있으며 외음염, 질염, 經관염, 골반 염증성 질환, 성 전파성질환 등이 帶下의 범주에 속하는데 正常 分泌物의 量이 지나치거나 생식 내강의 어느 부위에 병적인 상황이 진행되어 생기는 이상 滲出物을 의미하는 것으로 瘙痒感, 灼熱感 등이 發生하고 甚해지면 糜爛 또는 濕疹을 초래하기도 한다⁴⁰⁾.

일반적으로 서양의학적 기전의 炎症反應이란 組織損傷 또는 細菌感染으로 인하여 發生하는 것으로 發赤, 發熱, 浮腫, 痛症, 機能喪失의 5대 증후를 보인다. 細菌感染 부위에 혈관이 확장되어 發赤과 發熱을 유발하며 毛細血管의 투과성이 증가되어 조직으로 체액과 세포들이 나와 滲出液이 축적되어 浮腫을 유발하는 것을 뜻한다.

또한 한의학에서의 생식기 염증은 臟腑氣血失調, 七情內傷, 月經不調, 流産, 盆盤 등으로 인하여 余邪未盡한데 濕熱,

熱毒, 濕濁, 寒濕 등의 邪氣가 胞宮에 侵襲하여 瘀血이 胞中에 積하여 氣血瘀阻하고 衝任虛損하여 발생한다고 보았으며 그 치료는 清熱解毒, 消炎止痛, 濕熱內阻, 氣滯血瘀, 瘀血包攬, 氣虛寒濕의 治法으로 治療하였다.

著者は 婦人科에서 清熱, 解毒, 利水, 消腫, 浮腫, 脚氣, 黃疸, 疔腫, 淋濁, 白帶, 痢疾, 尿路感染, 腎炎, 風濕性 關節炎에 效果가 있다고 알려진 三白草를 婦人科 女性 生殖器 炎症性 疾患 전반에 應用할 목적으로 三白草의 抗炎症作用을 實驗적으로 구명하고자 하였다.

이에 세포독성에 미치는 영향으로 약재의 안전성을 확인하고 IL-1 β , IL-6, IL-18과 COX-2, NOS-II 및 TNF- α 유전자 발현에 미치는 영향과 IL-6, TNF- α , NO 및 ROS의 생성량에 미치는 영향에 대한 실험을 실시하였다.

세포독성에 미치는 영향에서는 mLFC에 대한 세포독성 평가에서는 대조군에 비해 SHSR의 200, 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 각각 77.4 \pm 3.9, 86.4 \pm 5.2, 90.1 \pm 4.7, 93.6 \pm 3.7, 97.5 \pm 4.4 %로 나타나 세포독성은 나타나지 않았다.

RAW264.7 세포주에 대한 세포독성에서는 상기한 동일 농도에서 각각 74.8 \pm 4.8, 87.3 \pm 3.8, 91.2 \pm 5.1, 94.1 \pm 5.8, 98.0 \pm 3.6 %로 나타나 역시 세포독성은 나타나지 않았다(Table 1, Fig.1).

Cytokines은 면역세포 분화에서부터 면역반응의 여러 단계에 다양하게 반응하며 면역반응을 조절하며 자연면역과 특이면역의 대부분에서 중요한 기능을 한다²⁸⁾. 면역반응에 관여하는 림프계 세포, 염증세포, 그리고 이외 조혈계 세포들은 서로 다른 기능을 가진 세포들이

직접 접촉을 하거나 또는 이 세포들이 분비하는 단백질에 의하여 자극을 전달하여 효율적인 기능을 하게 되는데 이들 세포들이 분비하는 분자량이 작은 단백질을 cytokine이라 하며, cytokine들은 대부분 단백질 식세포들이 분비하며 이들이 분비하는 cytokine을 monokine이라 부르며 특이면역에 관여하는 cytokine들은 대부분 T림프구들이 분비하므로 이들이 분비하는 cytokine은 lymphokine이라 부른다⁴¹⁾.

Lymphokine들은 다른 세포들의 상호작용을 조절하는 기능을 가진 단백질로 interleukin(이하 IL)으로도 불린다. IL-6은 단구, 대식세포, Th2세포, 골수간질세포 등에서 분비되어 증식B세포의 형질세포로의 분화를 촉진하여 악성형질세포의 성장인자로 작용하며 형질세포의 항체분비를 항진시켜 면역 글로블린의 합성을 증가시키고 간세포에 작용하여 급성기 단백질생산을 유도하며 면역글로빈의 합성을 증진하는 등의 다양한 역할을 수행한다. TNF- α 는 대식세포와 비만세포 등에서 분비되며 종양세포에서 세포독작용을 하며 염증세포에서 IL-1과 유사한 염증유발 작용과 세포의 증식과 분화를 조절하고 만성염증이나 감염에서도 역할을 하며 중성구를 자극하여 탐식작용과 탈과립 등을 증가시켜 염증반응에서 중요한 역할을 한다.

면역과 염증에 관련된 여러 cytokines 중 IL-6 및 TNF- α 는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 cytokines으로 용모양막염에서의 IL-6 및 TNF- α 가 증가되거나⁴²⁾, pro-inflammatoy cytokines 중 IL-6 및 TNF- α 의 초기 급성염증시 증가하거나⁴³⁾, TNF- α 는 염증이 발생된 부위

에는 높은 농도로 존재하거나⁴⁴⁾ 여성의 감염시 pro-cytokines의 증가⁴⁶⁾ 등에 다양한 보고가 있어 염증과 면역반응에 있어서 IL-6과 TNF- α 의 조절이 중요하다고 할 수 있다.

이에 본 실험에서는 三白草가 대표적인 염증성 cytokines인 IL-1 β , IL-6, IL-18의 유전자 발현에 미치는 영향을 RAW264.7 세포주에 대한 PCR로 평가한 결과, IL-1 β 유전자 발현은 정상군의 Ht값이 48, 대조군이 102로 나타났으며, SHSR extract 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$, 처리군에서는 각각 52, 77, 89로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였고(Fig. 2), IL-6 유전자 발현은 정상군의 Ht값이 14, 대조군이 96으로 나타났으며, SHSR extract 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$, 처리군에서는 각각 58, 78, 91로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였으며(Fig. 3), IL-18 유전자 발현은 정상군의 Ht값이 35, 대조군이 101로 나타났으며, SHSR extract 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$, 처리군에서는 각각 49, 122, 116으로 나타나 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 대조군에 비해 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 4).

Cyclooxygenase(이하 COX)는 arachidonic acid로부터 prostaglandin(이하 PG)을 생성하는 과정에 작용하는 효소이며 현재 COX-1과 COX-2가 알려져 있다. COX-1은 조직내에서 기본적으로 존재하며 일정한 작용을 꾸준히 나타내는 반면 COX-2는 염증을 포함한 다양한 자극에 의해 단기간 내에 급격히 발현되는 것으로 알려져 있다. COX-2의 생성을 자극하는 요인으로는 IL-1, IL-2, TNF- α 와 같은 cytokines, 그리고 그람

음성균의 세포 표면에 존재하는 단백질로서 염증반응의 가장 중요한 역할을 하는 물질로 알려진 lipopolysaccharide(이하 LPS)가 있으며 IL-2와 IL-10에 의해 억제된다. 자극된 COX-2는 PG의 생성을 촉진하며 혈관의 수축작용과 염증반응에 관여하여 조기진통이나 임신중독증, 그리고 여러 여성생식기 감염 및 종양에서 비정상적으로 발현되어 자궁조직 내 PG 대사산물이 증가된다고 알려져 있다^{45,46)}.

Nitric Oxide(이하 NO)는 생체 내에서 많은 생리적 작용을 하는데 혈관에서는 강력한 혈관확장 작용을 하며 혈소판 응집을 저해하고 중성구나 혈소판이 혈관내피세포에 부착하는 것을 막는 등의 역할을 한다. 생체 내에서 NO의 전구물질은 L-arginine으로서 Nitric Oxide Synthesis(이하 NOS)의 작용으로 L-arginine이 산화되면 L-citrulline과 NO를 생성하게 된다. NO 자체는 매우 불안정한 라디칼기로서 생성된 지 수초 이내에 nitrite 또는 nitrate로 산화된다. NOS는 일종의 산화효소로서 혈관내피세포성 NOS, 신경세포성 NOS 및 유도성 NOS(이하 iNOS)의 세가지 아형으로 존재한다. 혈관내피세포성 NOS, 신경세포성 NOS는 활성화하는데 칼슘과 calmodulin이 필요하며 지속적으로 분비되는 반면 iNOS는 칼슘과 무관하게 활성화되며 염증성 사이토카인이나 LPS 등에 반응하여 분비된다⁴⁷⁾.

NO와 PG 그리고 이들과 관련된 두 효소, NOS와 COX-2는 염증반응의 단계에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 특히 iNOS와 COX-2의 염증반응에서의 중요성이 대두되고 있으며 이들을 염증

반응 및 염증 초기반응 물질에 의해 상승 조절되고, 활성화된 이들 효소에 의한 생성물이 급성 및 만성 염증반응의 중요한 매개체로 작용한다고 알려져 있다⁴⁸⁾.

인체 내에서는 일생을 통하여 끊임없이 반응력이 큰 Reactive Oxygen Species(ROS)와 Reactive Nitrogen Species(RNS)가 불가피하게 생성되고 이들은 세포내의 DNA나 기타 핵산 등과 반응하여 산화적 손상 및 변이를 유발한다⁴⁹⁾. 활성화된 대식세포는 많은 양의 산소 라디칼을 생성하게 되는데 이는 내피세포의 허혈과 재관류 동안에 중성구의 활성화 기간에 보이기도 한다. 세포막 NOS와 NO의 활성화는 hydroxyl radical을 생성하고 ROS를 발생시키며 세포의 원형질내에서는 미토콘드리아는 증가된 Ca²⁺로 에너지 공급을 더욱 감소시키고 free radical들의 생성 증가를 초래하고 free radical들은 DNA 손상 외에도 지질과산화(lipid peroxidation)에 의해 세포막을 손상시켜 세포사에 이르게 한다. 또한 모세혈관이나 blood-brain barrier의 cytokines의 투과성을 높이게 되어 염증과 산화적 스트레스로 인한 ROS는 유관하며 또한 NO와도 밀접한 관계가 있다^{50,51)}.

이에 본 연구에서는 SHSR가 COX-2, NOS-II, TNF- α , NO 및 ROS의 활성을 억제시키는 지의 여부를 평가한 결과 RAW264.7 세포주에서 COX-2 유전자 발현은 정상군의 Ht값이 21, 대조군에이 205로 나타났으며, SHSR extract 100, 10 $\mu\text{g/ml}$, 처리군에서는 각각 163 198으로 나타나 대조군에 비해 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 5).

RAW264.7 세포주에서 NOS-II 유전자 발현은 정상군의 Ht값이 26, 대조군이 119로 나타났으며, SHSR extract 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$, 처리군에서는 각각 57, 159, 184로 나타나 농도 의존적으로 유전자 발현이 감소되었는데, 특히 SHSR extract 100 $\mu\text{g/ml}$ 일 때 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 6).

RAW264.7 세포주에서 TNF- α 유전자 발현은 정상군의 Ht값이 84, 대조군이 184로 나타났으며, SHSR extract 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$, 처리군에서는 각각 206, 209, 201로 나타나 효과적인 결과를 나타나지 않았다(Fig. 7).

RAW264.7 세포주에서 IL-6 생성량은 정상군이 $5.2 \pm 1.2 \text{ ng/ml}$, 대조군이 $104.1 \pm 21.3 \text{ ng/ml}$ 으로 나타났으며, SHSR extract 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 각각 51.3 ± 16.7 , 78.9 ± 14.6 , $101.0 \pm 25.6 \text{ ng/ml}$ 으로 나타나 농도 의존적으로 IL-6 생성량을 감소시켰는데, 특히 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 대조군에 비해 유의성 있게 생성량을 감소시켰다(Table 2, Fig. 8).

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, SHSR extract 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 각각 79.5 ± 14.4 , 85.3 ± 13.7 , $81.5 \pm 16.4 \text{ ng/ml}$ 으로 나타났다(Table 3, Fig. 9).

RAW264.7 세포주에서 NO 생성량은 정상군의 OD값이 0.074 ± 0.013 , 대조군이 0.546 ± 0.082 로 나타났으며, SHSR extract 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 각각 0.220 ± 0.043 , 0.374 ± 0.038 , 0.508 ± 0.062 로 나타나 100, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도

에서 대조군에 비하여 유의성 있게 NO 생성을 억제하였다(Table 4, Fig. 10).

ROS 생성량은 대조군이 정상군에 비하여 큰 폭으로 증가하였으며, SHSR extract 투여군(100 µg/ml C, 10 µg/ml D)은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 생성을 억제하였다(Fig. 11).

이상의 연구결과를 종합하면 三白草는 IL-1β, IL-6, IL-18, COX-2 및 NOS-II의 유전자 발현과, IL-6, TNF-α, NO, ROS의 생성량을 유의성 있게 억제 하였는데, 이는 삼백초가 염증 발생시에 초기면역계의 작용을 억제 하여 항염증 효과를 나타낼 수 있음을 시사한다.

V. 結 論

三白草의 抗炎症작용의 효과를 평가하기 위해 독성실험을 하였고, RAW264.7 세포주에 대한 IL-1β, IL-6, IL-18, COX-2, NOS-II 및 TNF-α 유전자 발현에 미치는 영향과 IL-6, TNF-α, NO 및 ROS 생성량에 미치는 영향에 대한 실험을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 三白草는 세포독성을 나타내지 않았다.
2. 三白草는 RAW264.7 세포주에서 농도 의존적으로 IL-1β, IL-6의 유전자 발현을 억제하였으며, 100 µg/ml에서 IL-18의 유전자 발현을 억제하였다.
3. 三白草는 RAW264.7 세포주에서 COX-2 유전자 발현을 100, 10 µg/ml의 농도에서 유전자 발현을 억제하였다.
4. 三白草는 RAW264.7 세포주에서 농도 의존적으로 NOS-II 유전자 발현을 억제하였다.

5. 三白草는 RAW264.7 세포주에서 TNF-α 유전자 발현을 억제하지 못하였다.
6. 三白草는 RAW264.7 세포주에서 IL-6의 생성량을 농도 의존적으로 감소시켰다.
7. 三白草는 RAW264.7 세포주에서 TNF-α의 생성량을 감소시켰으나 유의성은 없었다.
8. 三白草는 RAW264.7 세포주에서 NO 생성을 농도 의존적으로 억제하였고, 특히 100, 10 µg/ml의 농도에서 유의성 있게 억제하였다.
9. 三白草는 ROS 생성을 농도 의존적으로 억제하였다.

이상의 실험 결과로 보아 三白草는 유관 cytokines의 조절을 통한 항염증작용이 인정되어 염증 치료에 유용할 것으로 사료되며, 향후 다양한 약물의 가미를 통한 지속적인 연구가 기대 된다.

□ 투 고 일 : 2005년 07월 21일

□ 심 사 일 : 2005년 08월 02일

□ 심사완료일 : 2005년 08월 10일

參 考 文 獻

1. 대한산부인과학회 교과서 편찬위원회. 부인과학. 서울: 도서출판 칼빈서적. 1997; 256-283.
2. 宋炳基. 漢方婦人科學. 서울: 행림출판. 1992; 230, 232-234, 237-239, 250.
3. 안덕균. 한국 본초도감. 서울: 교학사. 1999; 60.
4. 辛民敎. 임상본초학(개정증보판). 서울: 영림사. 2000; 41-45.

5. 權唱鎬, 郭在旭. 경희약대 논문집. 1988; 15: 137-154.
6. 秦尙佑 등. 대한 본초학회지. 원광대학교 한의과대학 본초학 교실. 1997; 13: 131-141.
7. 이인선. 삼백초 열수출물의 항암 및 세포독성 저해 효과. 한국식품저장유통학회지. 2001; 8(2): 213-216.
8. 김세종. 면역학 길라잡이. 서울; 도서출판 고려의학. 2000; 5-13, 65-68.
9. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울: 東洋醫學研究院出版部. 1982; 209.
10. 巢元方. 諸病源候論. 북경: 人民衛生出版社. 1982; 1059.
11. 周命新. 醫門寶鑑. 서울: 杏林書院. 1975; 332-334.
12. 龔廷賢. 萬病回春(卷下). 서울: 癸丑文化社. 1977; 183.
13. 張從政. 儒門事親校注. 河南省: 河南省科學技術出版社. 1984; 53-59, 279.
14. 方廣. 丹溪心法附餘. 서울: 大星文化社. 1986; 717-722, 739-743.
15. 傅靑主. 傅靑主女科. 서울: 大星文化社. 1984; 83-84.
16. 薛己. 校注婦人良方. 上海: 上海衛生出版社. 1958; 22-23.
17. 肖淑春. 東醫臨床婦人科學. 서울: 法仁文化社. 1999; 57, 58, 59, 77, 79, 81.
18. 張介賓. 景岳全書. 서울: 大星文化社. 1988; 49-50.
19. 王叔和. 脈經. 서울: 癸丑出版社. 1985; 241.
20. 陳夢雷 등. 古今圖書集成醫部全錄. 서울: 大星文化社. 1990; 463-478.
21. 武之望. 濟陰綱目. 서울: 一中社. 1992; 91-98.
22. 齊仲甫. 女科百問. 上海: 古籍書店. 1994; 64-65.
23. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 大星文化社. 1994; 83-84.
24. 唐宗海. 血證論. 서울: 一中社. 1992; 107.
25. 吳謙. 醫宗金鑒. 北京: 人民衛生出版社. 1995; 269.
26. 張杲. 醫說(四庫全書742冊). 서울: 大星文化社. 1975; 206.
27. 姜孝信. 東醫婦人科學. 서울: 醫文社. 1966; 194-201.
28. 張隱庵·馬元臺 註. 黃帝內經靈樞. 서울: 成輔社. 1975; 136.
29. 王期 등. 素問今釋. 貴州: 貴州人民出版社. 1981; 264.
30. 肅燾. 女科經論. 江邊: 江邊科學技術出版社. 1986; 290-308.
31. 李挺. 醫學入門. 서울: 大星文化社. 1990; 312-316.
32. 周鴻範. 白話中國秘方全書. 臺北市: 好兄弟出版社. 1983; 296-299.
33. 王肯堂. 證治準繩. 上海: 鴻寶濟書局. 1982; 117-134.
34. 林佩琴. 類證治裁. 서울: 성보사. 1980; 576, 657.
35. 葉桂. 葉天士女科. 서울: 大星文化社. 1989; 225-227.
36. 楊繩相. 古今名方. 河南省: 河南科學技術出版社. 1983; 601-617.
37. 武辰春, 張登本. 內經辭典. 北京: 人民衛生出版社. 1990; 186.
38. 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.
39. 楊士瀛. 直指方(四庫全書744冊). 서울: 大星文化社. 1995; 530.

40. 이경해 등. 여성건강간호학(하). 서울: 현문사. 1997; 1333-1365.
41. 오현호 譯 . 번역학입문. 서울: 지구문화사. 1995; 118-128.
42. Henrik Dollner. Histologic chorioamnionitis and umbilical serum levels of pro-cytokines and cytokine inhibitors. An International Journal of Obstetrics and Gynaecology. 2002; 109, 534-539.
43. Matthias Winkler. Role of cytokines and other inflammatory mediators. An International Journal of Obstetrics and Gynaecology. 2003; 110, 118-123.
44. Brian T. Pierce et al. The effect of fetal acidemia on fetal-placental vascular tone and production of inflammatory cytokines interleukin-6 and tumor necrosis factor- α . American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2002; 187(4): 894-897.
45. 이지현 등. 배양된 인간 영양배엽세포주에서 세균내독소에 의한 MMP-2와 MMP-9의 발현에 있어서 COX-2. 대한산부회지. 2002; 45(10): 1752-1757.
46. Charles N. Landen et al. Expression of cyclooxygenase-2 in cervical, endometrial, and ovarian malignancies. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2003; 188(5): 1174-1176.
47. 지병철, 문신용. Nitric Oxide가 인간 황체화 과립막세포의 아포프토시스에 미치는 영향. 대한산부회지 2002; 45(5): 766-773.
48. Carla Biondi. Interactions between the nitric oxide and prostaglandin E2 biosynthetic pathways in human amnion-like WISH cells. Journal of Reproductive Immunology. 2003; 60(1): 35-52.
49. 김영태 등. 한국 여성 자궁경부 종양에서의 항산화체계 및 산화적 스트레스. 대한산부인과학회지. 2002; 45(1): 145-152.
50. 소영. Nitric Oxide Synthase의 억제제가 전뇌허혈/재관류시 Hydroxyl Radical 생성에 미치는 영향. 대한마취과학회지. 1999; 36: 710-722.
51. D. Saugstad. Therapy in free radical disease in the newborn. Current Obstetrics & Gynaecology. 2000; 10(2): 103-108.