

RAW264.7세포주와 염증생쥐모델에서 抗炎症 작용에 대한 清熱活血湯加鷄血藤의 效果

대전대학교 한의과대학 부인과학교실
한충희, 유동열

ABSTRACT

The Anti-inflammatory Effect of *Cheongyeolhawlhyeoltanggagyehyeoldeung* (CYHHT) in cultured RAW264.7 cells and murine models of inflammation

Han Choong-Hee, 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 *Cheongyeolhawlhyeoltanggagyehyeoldeung* (CYHHT) 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 CYHHT on mLFC and RAW264.7 cells was not observed at 100, 50, 10, and 1 μ g/ml of CYHHT treatments. IL-1 β , IL-6 and NOS-II mRNA expression of RAW264.7 cells was inhibited by CYHHT treatments in a dose-dependent manner. CYHHT treatment of RAW264.7 cells inhibited TNF- α and COX-2 mRNA expression. CYHHT treatment of RAW264.7 cells significantly inhibited IL-6 and NO production. CYHHT treatment of RAW264.7 cells inhibited ROS production. CYHHT 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. CYHHT treatment of colitis-induced mice significantly increased hematological values such as WBC and RBC counts, Hgb and HCT levels, but decreased PLT values. CYHHT treatment of colitis-induced mice decreased IL-6 and TNF- α production significantly. CYHHT treatment of colitis-induced mice significantly increased CD3+(T) cell counts. In contrast, CYHHT treatment decreased CD19+ B cell counts and CD3+/CD69+ significantly, and also decreased B/T ratio (%) though not significant.

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

Key words : *Cheongyeolhawlhyeoltanggagyehyeoldeung*(CYHHT), anti-inflammatory, mLFC and RAW264.7 cells.

I. 緒 論

淸熱活血湯은 中國 近代의 時逸人에 의해 瘀血內蓄으로 인한 過少月經을 治療할 목적으로 立方되었으며¹⁾, 淸熱活血湯加鷄血藤은 淸熱活血湯에 行血補血, 舒筋活絡하는 鷄血藤²⁾을 加한 方劑이다.

過少月經은 月經의 日數가 2日 以下이거나 月經量이 過少한 것을 말하는데¹⁾, 여러 病因 중 瘀血內蓄으로 인한 過少月經은 活血化瘀, 淸熱涼血함으로써 調經하는 것을 基本 治法으로 하고 있다.^{1,3-4)}

最近에는 炎症으로 인한 組織의 滲出, 變成, 壞死, 萎縮 혹은 增殖 역시 瘀血의 病態와 類似하다고 인식하여^{5,6)} 基礎 및 臨床에서 活血化瘀藥物에 대한 多樣한 接近이 이루어지고 있다.

瘀血 및 抗炎症 作用에 대한 實驗的 研究로 崔⁷⁾, 李⁸⁾, 宋⁹⁾ 등은 芍藥甘草湯, 秦艽蒼朮湯, 龍膽瀉肝湯과 銀花瀉肝湯 등이 消炎, 鎮痛, 解熱 등의 效果가 있다고 보고하였으나, 淸熱活血湯에 대한 研究는 아직 접하지 못하였다.

이에 著者는 淸熱活血, 活血祛瘀의 效果가 있는 淸熱活血湯加鷄血藤의 抗炎症 作用을 實驗적으로 究明하고자 in vitro에서 세포독성, 有關 사이토카인(cytokines) 유전자 발현과 생성량에 미치는 영향을 검색하고, in vivo에서 염증 동물 병태 모델의 족부종, clinical disease activity, 혈액학적 변화, 혈청중 IL-6와 TNF- α 의 생성량 및 림프내 유세포에 미치는 영향 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

II. 實驗

1. 材 料

1) 動物

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±2°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 充分히 供給하였다.

2) 藥物

실험에 사용된 淸熱活血湯加鷄血藤¹⁾의 구성 藥물은 大田大學校 附屬韓方病院에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

■ Prescription of Cheongyeolhwlyeodtanggyehyeoldeung¹⁾ (이하 CYHHT로 지칭함)

韓藥名	生 藥 名	重量(g)
生地黃	<i>Rehmanniae Radix</i>	20
丹參	<i>Salviae Miltiorrhizae Radix</i>	12
杜仲	<i>Eucommiae Cortex</i>	12
牡丹皮	<i>Moutan Cortex</i>	6
紅花	<i>Carthami Flos</i>	6
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	6
赤芍藥	<i>Paeoniae Radix Rubra</i>	6
黃柏	<i>Phellodeni Cortex</i>	6
鷄血藤	<i>Spatholobi Caulis</i>	6
Total		80

3) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약은 sulforhodamin-B(SRB), diethyl pyrocarbonate (DEPC), NH₄Cl, KHCO₃, EDTA, TCA (trichloroacetic acid), carrageenin, arachidonic acid, antibiotic, 3,4,5-dimethyl-thiazol-2, 5-carboxymethoxyphenyl-2,4-sulfophenyl-2H-tetrazolium (MTS), dulbecco's minimum essential medium

(DMEM), 2,7-dichlorodihydro fluorescein diacetate (DCFH-DA), complete adjuvant, chloroform, RPMI-1640 media, isopropanol, RBC lysis solution, ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde, acrylamide, magnesium chloride(MgCl₂)는 Sigma (U.S.A)社 제품을 사용하였으며, fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone(Logan, U.S.A)社 제품을, agarose는 FMC(U.S.A)社 제품을, propidium iodide(PI), RNase는 Pharmingen (Torreyana, U.S.A)社 제품을, IL-6, TNF- α ELISA kit는 R&D system(Minneapolis, U.S.A)社 제품을, Dextran sodium sulfate는 Zoetermeer(Netherlands)社 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다. 기기는 열탕추출기(대웅, Co., Korea), rotary vacuum evaporator(Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), CO₂ incubator(Forma scientific Co., U.S.A), clean bench(Vision scientific Co., Korea), autoclave(Sanyo, Co., Japan), micropipet (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 (MVG Biotech., Co., Germany), ice-maker(Vision scientific Co., Korea), homogenizer(OMNI, Co., U.S.A), plate shaker (Lab-Line, Co., U.S.A), ELISA reader(Molecular Devices, Co., U.S.A) 및 버니야캘리퍼스(M530-109, Mitutoyo, Japan) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 行經紅花湯 추출물 분리

CYHHT 160g 분량을 증류수 2,000ml에 가하여 열탕 추출기로 3시간 추출하고 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장

치(Rotary vacuum evaporator)로 농축한 다음, 동결 건조기(Freeze dryer)를 이용하여 완전 건조하여 CYHHT 추출물 19.56g을 얻어 냉동(-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 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 25 μ g/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 \times 10⁵cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다. RAW264.7 세포주도 10% FBS를 첨가한 DMEM 배양액에 1 \times 10⁵cells/ml 농도로 맞추어 분주하였다.

3) 세포독성 측정

mLFCs에 CYHHT 추출물 (200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml)를 처리하고, 배양 종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척한 후, 각 well에 50% TCA(trichloroacetic acid)를 50 μ l를 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 100 μ l/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 그

리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4-5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10mM Tris Base로 100 μ l/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 1×10^6 세포로 분주하였다. 여기에 CYHI 추출물 (100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml)를 처리하고 1시간 후 LPS(2 μ g/ml)를 각각의 well에 첨가한 후 6시간 배양하고 2,000rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고, 여기에 RNAzol^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 vaccum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 20 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, 375mM 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 chain 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 25cycles한 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 염기 배열

Gene	Primer	Sequence
IL-1β	sense	5'-GCAACTGTTCCTGAACTCA-3'
	antisense	5'-CTCGGAGCGTGTAGTGCAG-3'
IL-6	sense	5'-CCGTGATAGTCGCATCCATGAAAC-3'
	antisense	5'-GGACCAATACCTGCCTATAGGG-3'
TNF-α	sense	5'-AACCCCTACTGAACTCAGATTGTTAG-3'
	antisense	5'-TAAGTCAGTTTAAATGCTTAGGG-3'
IL-18	sense	5'-ACTgTACAACCgCAgTAATACgg-3'
	antisense	5'-AgTgAACATTACAgATTTATCCC-3'
NOS-II	sense	5'-CCGATATTTAGATACGTTAAAC-3'
	antisense	5'-ATGGCCTAGTCAGTCTCTAAAT-3'
COX-2	sense	5'-TTCAAATgAgATTgTgggAAAAT-3'
	antisense	5'-AgATCATCTCTgCCTgAgTATCTT-3'
β-actin	sense	5'-TGGAATCCCTGGTCCATGAAAC-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) 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. CYHHT 추출물을 (100 μg/ml, 10 μg/ml, 1 μg/ml) 처리하고 1시간 후 LPS(1 μg/ml)를 각각의 well에 첨가하였다. 6시간 후 DMEM 배양액으로 각 well을 세척한 후 새로운 배양액과 CYHHT 추출물을 처리하고 24시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000rpm에서 5분간 원심 분리하여 상등액을 회수, IL-6와 TNF-α의 생성량을 ELISA kit로 측정하였다.

6) Nitric oxide(NO) 생성량 측정

RAW264.7 세포주를 96 well plate에 2×10^4 세포로 분주하였다. 여기에 CYHHT 추출물을 (100 μg/ml, 10 μg/ml, 1 μg/ml) 처리하고 1시간 후 LPS(1 μg/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 μl를 96 well plate에 분주하고 혼합 용액 100 μl를 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, CYHHT 추출물(100 μg/ml, 10 μg/ml, 1 μg/ml)를 처리하고 1시간 후 LPS(1 μg/ml)를 처리한 후 37°C에서 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 DCFH-DA 50 μM을 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 al¹⁰⁾와 DiMartino et al¹¹⁾의 방법을 약간 수정하여 carrageenin과 arachidonic acid(AA)로 유발시켰다. 22-24g의 생쥐를 세 그룹으로 분할하였다. 먼저 정상군은 생리식염수를 0.1ml씩 생쥐의 뒷 발바닥에 피하주사 하였고, 대조군은 carrageenin(생리식염수에 1% carrageenin) 0.05ml과 AA (0.2M carbonate 용액에 0.5% AA) 0.1ml씩 뒷 발바닥에 피하주사하였다. 실험군은 대조군과 동일한 조건에서 CYHHT 추출물 300mg/kg과 1,200mg/kg을 피하 주사 1시간 전에 경구투여 하였다. 뒷다리 부종은 버니아켈리퍼스(M530-109, Mitutoyo, Japan)를 사용하여 0.01mm 까지 측정하였다.

9) 만성염증성 대장염 질환 동물모델

대장염 질환 생쥐 모델은 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 대장염을 유발시킨 후 7일 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 CYHHT 투여군으로 나누었다. 정상군은 자유식이 하였으며, 대조군은 생리식염수를, 실험군은 CYHHT 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 경도, 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 경도는 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 처사시킨 후 대장을 적출하여 버니아캘리포스(M530-109, Mitutoyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

(5) 생화학적 혈청 검사

DSS 투여 7일 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 생성량을 ELISA로 측정하였다. 각 well에 생쥐의 혈청 100 μ l(1/100 dilution)씩 분주하였다. 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

(7) 림프내 유세포 분석

대장염질환 생쥐에서 대장의 lamina propria와 림프절을 분리하여 100 mesh로 세포를 분리하였다. 분리된 세포에 적혈구용혈액을 처리하여 적혈구를 제거하고 4 $^{\circ}$ C에서 면역 형광염색을 실시하였고, 각각에 PE-anti-mouse CD3e, FITC-anti-mouse CD69, 그리고 FITC-anti-mouse CD19를 넣고 30 분간 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. 實驗成績

1. 세포독성에 미치는 영향

mLFCs에 대한 세포독성 평가에서는 CYHHT 200, 100, 50, 10, 1 μ g/ml 농도에서 대조군(100%)에 비해 각각 86.34 \pm 3.3, 91.0

± 2.6, 94.1 ± 3.9, 98.3 ± 4.1, 98.2 ± 4.6%로 나타나 세포독성이 나타나지 않았다.

RAW264.7 세포주에 대한 세포독성 평가에서는 상기한 동일 농도에서 각각 87.8 ± 3.0, 93.1 ± 3.6, 93.7 ± 2.6, 94.6 ± 4.2, 97.2 ± 5.2%로 역시 세포독성이 나타나지 않았다(Table 1, Fig. 1).

2. RAW264.7 세포주의 역전사-중합효소 연쇄반응

1) IL-1β 유전자 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포주에서 IL-1β 유전자 발현은 정상군의 Ht값이 48, 대조군이 102로 나타났으며, CYHHT 100, 10, 1μg/ml 처리군에서는 각각 24, 82, 85로 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, CYHHT extract 100, 10, 1μg/ml 처리군에서는 각각 22, 72, 70로 나타나 대조군에 비해 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 3).

3) IL-18 유전자 발현에 미치는 영향

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

으며, CYHHT extract 100, 10μg/ml 처리군에서는 각각 14, 96으로 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, CYHHT extract 100, 10μg/ml 처리군에서는 각각 19, 187으로 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, CYHHT extract 100, 10, 1μg/ml 처리군에서는 각각 14, 112, 195로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 6).

6) TNF-α 유전자 발현에 미치는 영향

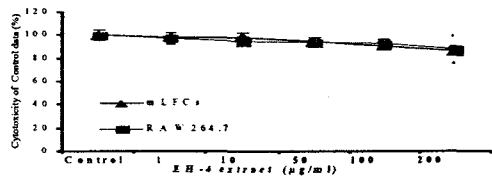
RAW264.7 세포주에서 TNF-α 유전자 발현은 정상군의 Ht값이 84, 대조군이 184로 나타났으며, CYHHT extract 100, 10, 1μg/ml 처리군에서 각각 16, 188, 183으로 나타나 100μg/ml 처리군에서 대조군에 비해 유전자 발현을 억제 하였다(Fig. 7).

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

Drug	Dose (μg/ml)	% of Control Data	
		mLFCs	RAW264.7
Control	0	100 ± 4.6	100 ± 4.3
	1	98.2 ± 4.6	97.2 ± 5.2
	10	98.3 ± 4.1	94.6 ± 4.2
CYHHT	50	94.1 ± 3.9	93.7 ± 2.6
	100	91.0 ± 2.6	93.1 ± 3.6
	200	85.34 ± 3.3*	87.8 ± 3.0*

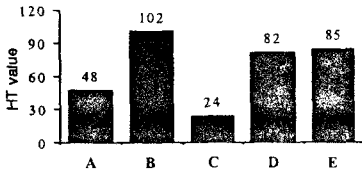
The data are expressed as the mean ± SEM. Comparisons between groups were analyzed using Student's paired test, and differences were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher T test (*p < 0.05).

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



mLFCs and RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of CYHHT extract. The data (% cytotoxicity) in the Figure are expressed as the mean ± SEM. Comparison between CYHDT-treated and untreated control 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).

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



RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of CYHHT extract [100 (C), 10 (D), and 1 μ g/ml (E)] in the presence (B-E) or absence (A) of lipopolysacchride (LPS; 2 μ g/ml) for 6 hr. IL-1 β 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. 3-Fig. 7 동문)

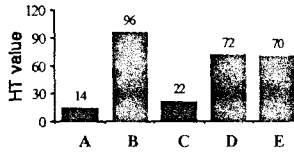


Fig. 3. Inhibitory effects of CYHHT extract on IL-6 mRNA expression in RAW264.7 cell line.

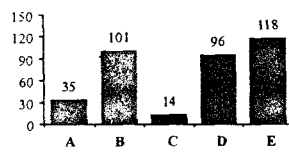


Fig. 4. Inhibitory effects of CYHHT extract on IL-18 mRNA expression in RAW264.7 cell line.

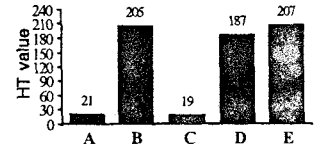


Fig. 5. Inhibitory effects of CYHHT extract on COX-2 mRNA expression in RAW264.7 cell line.

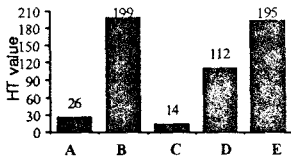


Fig. 6. Inhibitory effects of CYHHT extract on NOS-II mRNA expression in RAW264.7 cell line.

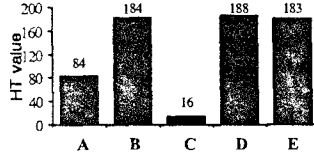


Fig. 7. Inhibitory effects of CYHHT extract on TNF- α mRNA expression in RAW264.7 cell line.

3. ELISA에 의한 싸이토카인 측정

1) IL-6 생성량에 미치는 영향

RAW264.7 세포주에서 IL-6 생성량은 정상군이 5.2 \pm 1.2ng/ml, 대조군이 104.1 \pm 21.3ng/ml으로 나타났으며, CYHHT

extract 100, 10, 1 μ g/ml 처리군에서는 각각 32.4 \pm 10.4, 56.8 \pm 15.7, 78.7 \pm 20.56ng/ml으로 나타나 대조군에 비해 100 μ g/ml 농도에서 유의성 있는(p<0.01) 감소를 나타내었다(Table 2).

Drug	CYHHT (μ g/ml)	IL-6 production (ng/ml)
Media control	0	5.2 \pm 1.2
	Control	104.1 \pm 21.3
LPS (1 μ g/ml)	100	32.4 \pm 10.4 **
	10	56.8 \pm 15.7
	1	78.7 \pm 20.5

Table 2. Inhibitory Effect of CYHHT 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 < 0.01).

2) TNF-α 생성량에 미치는 영향

RAW264.7 세포주에서 TNF-α의 생성량은 정상군이 12.5 ± 4.3ng/ml, 대조군이 86.8 ± 16.6ng/ml로 나타났으며, CYHHT extract 100, 10, 1μg/ml 처리군

에서는 각각 40.6 ± 13.6, 84.6 ± 24.3, 84.9 ± 26.5ng/ml으로 나타나 대조군에 비해 100μg/ml 농도에서 유의성 있는 (p<0.05) 감소를 나타내었다(Table 3).

Drug	CYHHT (μg/ml)	TNF-α production (ng/ml)
Media control	0	12.5 ± 4.3
LPS (1 μg/ml)	Control	86.8 ± 16.6
	100	40.6 ± 13.6 *
	10	84.6 ± 24.3
	1	84.9 ± 26.5

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

The data are expressed as the mean ± 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).

4. Nitric oxide(NO) 생성량에 미치는 영향

RAW264.7 세포주에서 NO 생성량은 정상군의 OD값이 0.074 ± 0.013, 대조군이 0.546 ± 0.082로 나타났으며, CYHHT

extract 100, 10, 1μg/ml 처리군에서는 각각 0.122 ± 0.015, 0.243 ± 0.066, 0.479 ± 0.052로 나타나 대조군에 비하여 100, 10 μg/ml의 농도에서 유의성 있게 NO 생성을 억제하였다(Table 4).

Drug	CYHHT (μg/ml)	Nitric Oxide production (optical density, OD)
Media control	0	0.074 ± 0.013
LPS (1 μg/ml)	Control	0.546 ± 0.082
	100	0.122 ± 0.015 ***
	10	0.243 ± 0.066 **
	1	0.479 ± 0.052

Table 4. Inhibitory Effect of CYHHT 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 < 0.01, ***p < 0.001).

5. 세포내 reactive oxygen species(ROS)의 분석

ROS 생성량은 대조군이 정상군에 비하여 큰 폭으로 증가하였으며, CYHHT

extract 투여군(100μg/ml C, 10μg/ml D)은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 ROS생성을 억제하였다(Fig. 8).

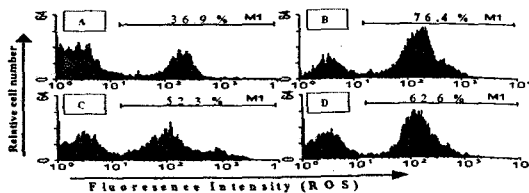


Fig. 8. Inhibitory effect of CYHHT extract on the ROS production in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cells were treated with various concentrations of CYHHT 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 ± 0.04 ml로 나타났고, CYHHT extract를 300mg/kg 투여군에서는 3h, 5h에서 각각 0.68 ± 0.03 , $0.66 \pm$

0.05 ml로 나타나 대조군에 비하여 20.9%, 24.1%의 유의성 있는 억제효과를 나타내었고, 1,200mg/kg 투여군에서는 0.18 ± 0.03 , 0.34 ± 0.04 , 0.41 ± 0.05 ml로 나타나 53.8%, 60.5%, 52.9%의 유의성 있는 억제효과가 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	
CYHHT extract	300	0.29 ± 0.06	25.6	$0.68 \pm 0.03^{**}$	20.9	$0.66 \pm 0.05^{**}$	24.1
	1,200	$0.18 \pm 0.03^{***}$	53.8	$0.34 \pm 0.04^{***}$	60.5	$0.41 \pm 0.05^{***}$	52.9

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

EV : edema volume; EI: edema inhibition
The data are expressed as the mean \pm 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) 체중 변화에 미치는 영향

대장염 생쥐의 체중 변화는 정상군이

28.1 ± 0.62 g, 대조군이 23.7 ± 0.34 g로 나타난 반면, CYHHT extract 투여군은 25.2 ± 0.54 g로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(p<0.05) 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
	CYHHT	$25.2 \pm 0.54^*$

Table 6. The Effect of CYHHT Extract on Final Body Weight 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 CYHHT-treated and the control mice were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher T test (*p < 0.05).

2) Clinical disease activity에 미치는 영향

Clinical disease activity 측정에서는 대조군(DSS+PBS)에 비하여, CYHHT

(DSS+CYHHT extract) 투여군에서 clinical activity score가 큰 폭으로 감소하였다(Fig. 9).

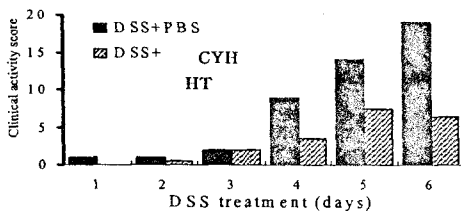


Fig. 9. The effect of CYHHT extract on the severity of clinical symptoms in DSS-mediated colitis mice

Severity of colitis in DSS plus CYHHT-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 colon 길이 측정에서는 정상군은 11.5 ± 0.6cm로 나타났고, 대조군은 5.6 ± 0.3cm로 나타나, 정상군에 비

하여 큰 폭으로 감소하였고, CYHHT extract 투여군에서는 6.7 ± 0.3cm로 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 결과를 나타내었다(Table 7).

group	Drug treatment (mg/kg)	Colon length (cm)
Normal	-	11.5 ± 0.6
5%DSS	Control	5.6 ± 0.3
	CYHHT	6.7 ± 0.3**

Table 7. The Effect of CYHHT 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 CYHHT-treated and the control mice were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher T test (**p < 0.01).

4) 혈액학적 변화

백혈구(WBC) 수 변화에서는 정상군이 3.6 ± 1.42(×10³μl), 대조군이 0.4 ± 0.11(×10³μl)로 나타났고, CYHHT extract 투여군이 1.56 ± 0.12(×10³μl)로 나타나 유의성 있는(p<0.001)결과를 나타내었다(Table 8).

적혈구(RBC) 수 변화에서는 정상군이 9.78 ± 1.21(×10⁶μl), 대조군이 7.21 ± 0.18(×10⁶μl), CYHHT extract 투여군이 8.36 ± 0.24(×10⁶μl)로 나타나 이 역시 대조군에 비하여 유의성 있는(p<0.01) 결과를 나타내었다(Table 8).

혈색소(Hgb) 변화에서는 정상군이 15.4 ± 0.45(g/dl), 대조군이 11.5 ± 0.50(g/dl),

CYHHT extract 투여군이 12.7 ± 0.14(g/dl)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(p<0.05) 결과를 나타내었다(Table 8).

적혈구용적(HCT) 변화에서는 정상군이 49.9 ± 1.44(%), 대조군이 37.2 ± 2.02(%), CYHHT extract 투여군이 44.1 ± 1.20(%)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(p<0.01) 결과를 나타내었다(Table 8).

혈소판(PLT) 수 변화에서는 정상군이 1,103 ± 110(×10³μl), 대조군은 2,025 ± 145(×10³μl), CYHHT extract 투여군이 1,407 ± 155(×10³μl)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(p<0.01) 결과를 나타내었다(Table 8).

Items	C57BL/6 Normal	5% DSS oral administration for 8days	
		Control	CYHHT
WBC(×10 ³ μl)	3.6±1.42	0.4±0.11	1.56±0.12***
RBC(×10 ⁶ μl)	9.78±1.21	7.21±0.18	8.36±0.24**
Hgb(g/dl)	15.4±0.45	11.5±0.50	12.7±0.14*
HCT(%)	49.9±1.44	37.2±2.02	44.1±1.20**
PLT(×10 ³ μl)	1103±110	2025±145	1407±155**

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

Mice were fed with DSS over 8 days, and CYHHT 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 ± 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<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

5) 혈청 중 IL-6와 TNF- α 생성량에 미치는 영향

혈청 중 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, CYHHT extract 투여군에서는 $201 \pm 25.8\text{pg/ml}$ 로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는

($p<0.01$) 결과를 나타내었다(Table 9).

TNF- α 생성량은, 정상군이 $2.6 \pm 1.1\text{pg/ml}$, 대조군이 $214 \pm 26.1\text{pg/ml}$, CYHHT extract 투여군이 $112 \pm 25.7\text{pg/ml}$ 로 나타나 이 역시 대조군에 비하여 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% Control	-	378 ± 5.5	214 ± 26.1
DSS CYHHT	1,200	$201 \pm 25.8^{**}$	$112 \pm 25.7^{**}$

Table 9. The Effect of CYHHT 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

만성 염증성 대장염 생쥐에서의 림프내 유세포를 분석한 결과, CD3+(T)은 정상군이 $70.4 \pm 2.01\%$, 대조군이 $27.6 \pm 3.66\%$, CYHHT extract 투여군이 $42.1 \pm 3.31\%$ 로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는($p<0.01$) 결과를 나타내었다(Table 10).

CD19+(B)는 정상군이 $29.0 \pm 2.56\%$, 대조군이 $65.6 \pm 3.50\%$, CYHHT extract 투여군이 $49.4 \pm 2.88\%$ 로 나타나 대조군

에 비하여 유의성 있는($p<0.01$) 결과를 나타내었다(Table 10).

CD3+/CD69+는 정상군이 $4.3 \pm 0.30\%$, 대조군이 $12.4 \pm 2.13\%$, CYHHT extract 투여군이 $7.6 \pm 1.50\%$ 로 나타나 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Table 10).

B/T rate(%)는 정상군이 0.41% , 대조군이 2.37% , CYHHT extract 투여군이 1.17% 로 나타나 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Table 10).

Leucocyte type	C57BL/6 Normal(%)	5% DSS oral administration for 8 day	
		Control(%)	CYHHT(%)
CD3+(T)	70.4 ± 2.01	27.6 ± 3.66	$42.1 \pm 3.31^{**}$
CD19+(B)	29.0 ± 2.56	65.3 ± 3.50	$49.4 \pm 2.88^{**}$
CD3+/CD69+	4.3 ± 0.30	12.4 ± 2.13	7.6 ± 1.50
B/T rate	0.41	2.37	1.17

Table 10. Cell Content in Lymph Node of 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 (** $p<0.01$).

IV. 考 察

清熱活血湯加鷄血藤은 瘀血內蓄으로 인

한 過少月經을 치료할 목적으로 立方된 清熱活血湯에 行血補血, 舒筋活絡 하는 鷄血藤을 加한 方劑이다²⁾.

清熱活血湯加鷄血藤은 生地黃, 杜沖, 丹

蓼, 赤芍藥, 牡丹皮, 紅花, 黃芩, 黃柏, 鷄血藤으로 구성되어 있는데 각각의 구성藥物의 效能을 살펴보면 生地黃은 涼血瀉火 消瘀通經하고, 杜冲은 益腎培肝 滋養強壯하며, 丹蓼은 行血清血 去瘀生新하고, 赤芍藥은 淸熱涼血 瀉肝散瘀하며, 牡丹皮는 和血涼血 淸熱通經하고, 紅花는 破瘀活血 消腫止痛하고, 黃芩은 除濕淸火 消炎安胎하고, 黃柏은 除熱益陰 除濕淸熱하며, 鷄血藤은 行血補血 舒筋活絡하므로^{12,13)}, 전체적으로 보아 본 처방은 淸熱涼血, 活血祛瘀하는 방제임을 알 수 있다.

經行不利, 즉 過少月經은 月經週期는 正常인데 經血의 量이 적고 심지어 몇 방울만 나오거나 또는 生理期間이 짧고 量도 적은 것을 말한다¹³⁾.

血은 人體를 滋養하는 一次의인 物質的 根據이며 生命이 誕生되고 維持되는데 가장 必要한 要素로서, 病理的인 概念은 人體代謝의 機質的인 不足과 損傷, 그리고 物質的인 循環의 自體에 초점을 맞춰 血虛와 血瘀로 대분하고 있는데¹⁴⁾, 瘀血이란 生理的 機能을 喪失한 血液이 凝聚하여 形成된 一種의 病理的 產物인 同時에 致病因子가 되는 것으로 체내에서 血液이 정체된 것을 말하며, 經脈外로 溢出하여 조직 間에 축적됨으로서 괴사된 血液인 惡血과 血液循環이 障礙를 받아 經脈官內나 器官內에 瘀積된 蓄血도 모두 瘀血의 범위에 속하며, 血液運行循環障礙와 血液速度減少의 病理狀態를 包括한다^{4,15)}.

最近에는 瘀血에 관한 多量의 研究가 시도되어 血液循環障礙, 특히 循環障礙로 일어나는 訣血, 鬱血, 血栓形成 및 水腫 등과 代謝障礙로 일어나는 조직의 병리 반응 및 細胞分化不良과 炎症으로 인한

조직의 滲出, 變成, 壞死, 萎縮 或 增殖 등이 瘀血의 病態와 유사하다고 보고 있으며, 瘀血이란 용어도 물질적인 血液의 성질보다는 機能的인 면의 營血 개념에서 血瘀라는 용어가 사용되기도 한다^{6,7)}.

본 연구에서는 먼저 실험 농도를 설정하기 위하여 mLFC와 RAW264.7 세포주에 대한 세포독성을 평가 하였고, RAW264.7 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 족부종과 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 세포독성이 나타나지 않았지만 가장 고농도인 200 μ g/ml 농도를 제외하고 실험을 실시하였다. 이는 기존의 실험 결과와 유사한 결과로 정상세포에 대하여 본 시료가 세포독성이 없음을 시사하고 있다(Table 1, Fig. 1).

면역과 염증에 관련된 여러 cytokines 중 IL-1 β , IL-6, IL-18 및 TNF- α 는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 cytokines으로, IL-6는 B-cell과 T-cell의 증식과 분화를 촉진시키며 면역계와 조혈계에 다양한 기능을 나타내는데 주로 B-cell, T-cell, monocyte 등에 의해 분비되며, 면역계에서 면역반응, 급성기 반응과 hemopoiesis를 조절하는 역할과 함께 host defense

mechanism에서 중요한 역할을 담당하며, 이중 특히 TNF- α 는 염증이 발생된 부위에는 높은 농도로 존재한다^{16,17}.

淸熱活血湯加鷄血藤 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 10 μ g/ml 이상의 농도에서, TNF- α 유전자 발현은 100 μ g/ml 농도에서 대조군에 비해 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 4, 7).

RAW264.7 세포주에서 IL-6와 TNF- α 생성량에 미치는 영향에서도 대조군에 비해 100 μ g/ml의 농도에서 모두 유의성 있는 감소를 나타내어(Table 2, 3), 상기 유전자 발현 결과와 부합되었다.

또한 만성 염증성 대장염 생쥐의 혈청 중 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.

Nitric oxide(NO)는 nitric oxide synthase(NOS) 효소에 의해 만들어지며, 체내 염증 과정에서는 과량의 NO가 만들어져 관절염을 비롯한 각종 급성, 혹은 만성 염증 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NOS중 II형은 inducible NOS(iNOS)로 과량의 NO를 생성해 각종 염증질환에 작용하는 것으로 알려져 있다. NO는 그 자체로도 유전자 및 단백질에 독성을 나타내지만 활성산소의 하나인 superoxide anion(O₂⁻)과 반응

해 맹독성을 가진 peroxyntirite (ONOO-)를 생성하므로 암 형성과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다^{4,18}.

본 실험에서 淸熱活血湯加鷄血藤 추출물이 NOS-II 유전자 발현과 NO 생성량에 미치는 영향은 모두 10 μ g/ml 이상의 농도 처리군에서 대조군에 비해 유의적으로 유전자 발현을 억제하였다(Table 4, Fig. 6).

Prostaglandin(PG)은 arachidonic acid로부터 만들어진다. 이 arachidonic acid는 cyclooxygenase (COX) 효소의 작용을 받아 PG를 합성하는데, PGE₂와 PGI₂은 혈관 투과성 향진에 작용을 하고, tromboxane은 백혈구 유주에 관여하는 등 PG는 염증과 가장 관련이 깊다. 이런 PG합성하는 COX-2는 염증과 암 등의 각종 퇴행성 질환에 중요한 역할을 한다^{19,20}.

淸熱活血湯加鷄血藤 추출물이 RAW264.7 세포주에서 COX-2 유전자 발현에 미치는 영향에서는 10 μ g/ml 이상의 농도 처리군에서 대조군에 비해 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 5).

인체 내에서는 Reactive Oxygen Species(이하 ROS)와 Reactive Nitrogen Species(RNS)가 불가피하게 생성되고 이들은 세포내의 DNA나 기타 핵산 등과 반응하여 산화적 손상 및 변이를 유발한다²¹.

세포막 NOS와 NO의 활성화는 hydroxyl radical을 생성하고 ROS를 발생시키며 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 투과

성을 높이게 되어 염증과 산화적 스트레스로 인한 ROS와 유관하며 또한 NO와도 밀접한 관계가 있다²²⁾.

淸熱活血湯加鷄血藤 추출물이 ROS 발현에 미치는 영향에서는 ROS 생성량은 대조군이 정상군에 비하여 큰 폭으로 증가한 반면, 淸熱活血湯加鷄血藤 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 족부종에 미치는 영향과 만성 염증성 대장염 질환 동물 모델에 미치는 영향을 검색하였는데, 먼저 족부종에 미치는 영향에서는 1h, 3h, 5h 간격으로 EV(ml)를 확인한 결과, 300mg/kg 농도 투여군에서는 3h, 5h에서 대조군에 비하여 20.9%, 24.1%의 유의성 있는 억제효과가 나타났고, 1,200mg/kg 투여군에서는 53.8%, 60.5%, 52.9%의 유의성 있는 억제 효과가 나타났다(Table 5).

만성 염증성 대장염 질환 동물 모델에 미치는 영향에서는 체중 변화, clinical disease activity, colon 길이, 혈액학적 변화, 혈청 중 IL-6와 TNF- α 생성량, 림프내 유세포 변화 등을 통하여 본 시료의 항염증 효과를 究明하였다.

먼저 체중 변화는 대조군에 비하여 유의성 있는($p < 0.05$) 증가를 나타내었으며(Table 6), colon 길이 측정에서도 유의성 있는($p < 0.01$) 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), 적혈구용적(HCT) 수치가 모두 염증으로 인해 감소된 대조군에 비해 유의성 있는($p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.01$) 증가를 나타내었으며(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).

CD3+/CD69+에서는 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다(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 淸熱活血湯加鷄血藤을 투여한 실험군에서는 T 세포가 항염증 작용에 의하여 emigration이 되는 것이 억제함으로써 T세포와 B세포의 불균형이 회복된 것을 알 수 있었다. 그리고 T 세포 활성화 표지 분자인 CD69는 지속적인 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 淸熱活血湯加鷄血藤의 항염증 작용이 인정되어, 부인과 질환에서 나타나는 다양한 炎症성 질환 治療에 유용하게 活用될 수 있을 것으로

思料되며, 활혈화어 약물과 처방이 청열해독 약물과 더불어 공사지제로써 염증성 질환에 광범위하게 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 結 論

淸熱活血湯加鷄血藤(CYHHT)의 抗炎症 작용을 실험적으로 究明하고자 *in vitro*에서 세포독성, 유관 싸이토카인(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. CYHHT는 mLFC 및 RAW264.7 세포주에 대하여 세포독성이 나타나지 않았다.
2. CYHHT는 RAW264.7 세포주에서 IL-1 β , IL-6 유전자 발현을 모든 실험 농도에서 억제하였으며, IL-18 유전자 발현은 10 μ g/ml 이상의 농도에서, TNF- α 는 100 μ g/ml 농도에서 유전자 발현을 억제하였다.
3. CYHHT는 RAW264.7 세포주에서 NOS-II, COX-2 유전자 발현을 10 μ g/ml 이상의 농도에서 억제하였다.
4. CYHHT는 RAW264.7 세포주에서 IL-6, TNF- α 의 생성량을 100 μ g/ml 농도에서, Nitric oxide 생성량을 10 μ g/ml 이상의 농도에서 유의성 있게 억제하였다.
5. CYHHT는 RAW264.7 세포주에서 ROS 생성량을 대조군에 비해 농도 의존적으로 억제하였다.
6. CYHHT는 carrageenin과 arachidonic acid에 의한 족부종을 모든 농도에서 유의성 있게 억제하였다.
7. CYHHT는 만성 염증성 대장염 질환 동물 모델에서 체중과 colon 길이를 유의성 있게 증가시켰고, clinical disease activity는 큰 폭으로 감소시켰다.
8. CYHHT는 만성 염증성 대장염 질환 동물 모델에서 백혈구, 적혈구, 혈색소, 적혈구용적을 유의성 있게 증가시킨 반면, 혈소판을 유의성 있게 감소시켰다.
9. CYHHT는 만성 염증성 대장염 질환 동물 모델에서 혈청중 IL-6와 TNF- α 의 생성량을 유의성 있게 감소시켰다.
10. CYHHT는 만성 염증성 대장염 질환 동물 모델에서 CD3+(T)를 유의성 있게 증가시킨 반면, CD19+(B)는 유의성 있게 감소시켰으며, CD3+/CD69+, B/T rate(%)는 감소시켰으나 유의성은 나타나지 않았다.

이상의 결과로 보아 淸熱活血湯加鷄血藤은 抗炎症 작용이 인정되어 여성의 泌尿生殖器 炎症疾患에 응용될 수 있을 것으로 思料되며, 향 후 淸熱活血湯加鷄血藤의 개별 藥物에 대한 계속적인 研究가 필요하리라 생각된다.

- 투 고 일 : 2005년 07월 21일
- 심 사 일 : 2005년 08월 01일
- 심사완료일 : 2005년 08월 10일

參考文獻

1. 宋炳基. 漢方婦人科學. 서울: 杏林出版. 1986; 32, 167, 175, 178.
2. 안덕균. 한국본초도감. 서울: 교학사. 1999; 570.
3. 韓醫婦人科學 編纂委員會. 韓醫婦人科學. 서울: 도서출판 정담. 2001; 143.
4. 姜明孜. 臨床婦產科學. 서울; 一中社. 1992; 30.
5. 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.
6. 安秉哲. 針灸 및 Laser 光線針刺戟이 Endotoxin에 의한 血栓症에 미치는 影響. 慶熙大學校大醫院. 1984.
7. 崔圭東. 芍藥甘草湯이 抗痙攣 鎮痛 解熱 抗炎症 및 抗潰瘍에 미치는 影響. 慶熙大韓醫大論文集. 1982; 5: 209-205.
8. 李龍根. 秦艽蒼朮湯과 加味方이 鎮痛 解熱 抗炎症 作用 및 腸管 輸送 등에 關한 實驗的研究. 大韓外官科學會誌. 1989; 2(1): 1-16.
9. 宋炳基. 龍膽瀉肝湯과 銀花瀉肝湯의 抗炎症 解熱鎮痛 利尿 및 抗菌效果. 大韓韓醫學會誌. 1981; 2(2): 84-95.
10. 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.
11. DiMartino et al. The pharmacology of arachidonic acid-induced rat PMN leukocyte infiltration. Agents Action. 1989; 27(3-4): 325-327.
12. 李尙仁. 本草學. 서울: 修書院. 1981; 85, 108, 428, 430, 459, 505, 507.
13. 김덕희. 수점산이 瘀血病態에 미치는 影響. 慶熙大韓醫大論文集. 1990; 13: 261-276.
14. 吳洙錫. 婦人良方大全의 譯解와 韓方 婦人科의 意義에 關한 研究. 대한한방부인과학회지. 2002; 15(4): 76-97.
15. 中醫研究院. 廣東中醫學院合編. 中醫 名詞術語選釋. 香港: 知識出版社. 1985; 104.
16. 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.
17. 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.
18. 문태철 등. 천연물로부터 사이클로옥시게나제-2 저해제 검색. 약학회지. 1998; 42: 214-219.
19. 노민수 등. 리포폴리사카라이드에 의해 유도되는 대식세포의 프로스타글란딘 생합성을 저해하는 천연물의 탐색. 약학회지. 1998; 42: 558-566.
20. 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.
21. 김영태 등. 한국 여성 자궁경부 종양

- 에서의 항산화체계 및 산화적 스트레스. 대한산부인과학회지. 2002; 45(1): 145-152.
22. 임소영. Nitric Oxide Synthase의 억제제가 전뇌허혈 재관류시 Hydroxyl Radical 생성에 미치는 영향. 대한마취과학회지. 1999; 36: 710-722.