

## 聖愈湯加減方の 抗炎症 및 抗酸化 효과에 관한 연구

대전대학교 한의과대학 부인과교실

김의일, 유동열

### ABSTRACT

#### The Experimental Study on Anti-oxidant and Anti-inflammatory Effect of *Sungyoutanggagambang*(SYTG)

Eui-Il Kim, Dong-Youl Yoo

Dept. of Oriental Medicine Graduate School, Daejeon University

**Purpose:** This study was performed to evaluate anti-oxidant activities and anti-inflammatory effects of *Sungyoutanggagambang*(SYTG).

**Methods:** In the study of anti-oxidant activities, SYTG was investigated by DPPH radical scavenger activity, superoxide dismutase activity and superoxide anion radical scavenger activity. In the study of anti-inflammatory effects, SYTG was investigated using cultured cells and murine models. As for the parameters of inflammation, levels of several inflammatory cytokines and chemical mediators which are known to be related to inflammation were measured in mouse lung fibroblast cells(mLFCs) and RAW264.7 cells.

**Results:** Prior to the experiment, we investigated the security of SYTG by measuring GOT and GPT in serum.

1. SYTG showed high antioxidant activity in a concentration-dependent degree by measured scavenging activity of DPPH free radical, superoxide dismutase and superoxide anion radical

2. SYTG inhibited IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , COX-2 and NOS-II mRNA expression as compared with the control group in a concentration-dependent degree in RAW264.7 cell line.

3. SYTG inhibited IL-1 $\beta$ , IL-6 production significantly at 100  $\mu$ g/ml and TNF- $\alpha$  production significantly at 50, 100  $\mu$ g/ml as compared with the control group in RAW264.7 cell line.

4. SYTG inhibited IL-1 $\beta$  and IL-6 production significantly as compared with the control group in serum of acute inflammation-induced mice, and decreased IL-1 $\beta$ , IL-6 production in spleen tissue, and also decreased IL-1 $\beta$ , IL-6 production in liver tissue.

**Conclusion:** These results suggest that SYTG can be useful in treating diverse female diseases caused by inflammation such as endometriosis, myoma, pelvic congestion, chronic cervicitis, chronic pelvic inflammatory disease and so on.

**Key Words:** *Sungyoutanggagambang*, anti-oxidant activitie, anti-inflammatory effect.

## I. 서 론

聖愈湯은 李<sup>1)</sup>의 《蘭室秘藏·瘡瘍門》에 처음 수록된 처방으로 임상에서 陰虧氣弱하고, 正氣虛로 인한 증상을 치료하는 氣血雙補劑로 활용되고 있다<sup>2-7)</sup>.

《黃帝內經》<sup>8)</sup>에 “精氣奪即虛”, “正氣存內 邪不可干”, “風雨寒熱 不得虛邪不能獨傷人”, “邪之所湊 其氣必虛”라고 하였는데, 이러한 正氣의 개념은 서양의학의 면역반응과 유사한 개념으로 인식되고 있으며<sup>9-14)</sup>, 생체조직이 손상 되었을 때, 기질 변화된 손상부위를 최소화시키고, 정상상태로 되돌리려는 염증반응도 면역과정의 일부분으로 볼 수 있다<sup>15)</sup>.

염증이 발생한 부위는 발적, 발열, 동통, 종창, 기능장애와 같은 징후가 발생한다<sup>15)</sup>. 《靈樞·癰疽》篇<sup>16)</sup>에서 “營衛稽留于經脈之中 則血泣而不行 不行則衛氣從之而不通 壅遏而不得行 故熱 大熱不止 熱勝則肉腐 肉腐則爲膿…”라고 언급한 바와 같이, 이러한 일련의 염증반응은 瘀血과도 밀접한 관계가 있는데<sup>17)</sup>, 자궁내막증, 골반염증성 질환과 감염, 골반을 혈 증후군 등의 염증성 질환에 活血祛瘀의 효능을 지닌 처방을 사용하여 항염증 효과를 입증하고 있는 것으로도 알 수가 있다<sup>4,18,19)</sup>.

본 연구에 사용된 聖愈湯加減方은 吳<sup>2)</sup>의 《醫宗金鑑·刪補名醫方論》에서 “四物湯加 人蔘黃芪 一方去芍藥”이라고 한 바를 따라, 기존의 聖愈湯<sup>1)</sup>에서, 生地黃을 去하여, 扶正의 의미를 강화하고<sup>20-22)</sup>, 각각 항염증 및 항산화에 대한 활성효과가 입증된 赤芍藥<sup>23)</sup>, 香附子<sup>24)</sup>, 玄胡索<sup>25)</sup>, 鷄血藤<sup>26)</sup>의 活血之劑를 加하여, 항염증 효과를 증대시킨 경험방으로, 저

자는 본 처방이 실험적으로도 항염증에 유의한 효과가 있을 것으로 사료되었다.

이에 聖愈湯加減方の 항염증 및 항산화 효과를 알아보기 위해서 항산화 활성에 미치는 영향, RAW264.7 세포주에서 염증 관련 cytokine의 유전자 발현 및 생성에 미치는 영향, 급성 염증성 질환 생쥐 모델의 혈청내, 비장 및 간 조직내 cytokine 변화에 미치는 영향 등에 대해 실험하였으며 그 결과 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실 험

### 1. 재 료

#### 1) 동 물

실험동물은 대한실험동물센터에서 구입한 SD(Sprague-Dawley)계 흰쥐와 Balb/c계 생쥐를 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22±2℃, 1일 중 12시간은 200-300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 고형사료 (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

본 실험에 사용한 聖愈湯加減方<sup>1)</sup>(이하 SYTG으로 지칭)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 처방의 내용과 1첩 용량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of *Sungyoutanggagambang*(SYTG)

藥名	生藥名	用量 (g)
人參	<i>Ginseng Radix</i>	6
黃芪	<i>Astragali Radix</i>	15
熟地黃	<i>Rehmannae Radix Preparat</i>	20
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	10
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	6
赤芍藥	<i>Paeoniae Radix Rubra</i>	10
香附子	<i>Cyperi Rhizoma</i>	10
玄胡索	<i>Curcumae Radix</i>	10
鷄血藤	<i>Spatholobi Caulis</i>	12
Total amount		99

3) 시약 및 기기

(1) 시약

본 실험에 사용된 시약중 Dulbecco's phosphate buffered saline, Hank's balanced salt solution, Hank's balanced salt solution, 3.8% sodium citrate, lipopolysaccharide (LPS), chlorosulforrodamin-B (SRB), diethyl pyrocarbonate (DEPC), NH<sub>4</sub>Cl, KHCO<sub>3</sub>, tris-base, tris-HCL, ethanol, EDTA, trichloroacetic acid (TCA), acetic acid, carrageenin, arachidonic acid, 3-4,5-dimethyl-thiazol-2, dulbecco's minimum essential medium (DMEM), collagenase A, DNase type I, penicillin, streptomycin, amphotericin, 2,7-dichlorodihydro fluorescein diacetate (DCFH-DA), anti-body avidin-HRP, complete adjuvent, chloroform, RPMI-1640, isopropanol, Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), RNAzol<sub>B</sub> acid, magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>)은 Sigma (Sigma Co., USA) 제품을, normal saline 은 중외제약 제품을, fetal bovine serum (FBS)은 Hyclone (Hyclone Logan, USA)

제품을, RNase는 Pharmingen (Torreyana, USA) 제품을, IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, NOS-II ELISA kit는 R&D system (Minneapolis, USA) 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기기

본 실험에 사용된 기기는 centrifuge (Beckman Co., USA.), rotary vacuum evaporator (Büchi 461, Swiss), deep freezer (Sanyo Co., Japan), freeze dryer (Eyela Co., Japan), roller Mixer (Gowon scientific technology Co., Korea), 열탕추출기 (대웅, Co., Korea), CO<sub>2</sub> incubator (Forma scientific Co., USA), 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), thermocycler system (MWG Biotech., Co., Germany), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, Co., USA), plate shaker (Lab-Line, Co., USA), ELISA reader (Molecular Devices, Co., USA), Quantitative real-time-PCR (Abi, Co., USA) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

SYTG 2첩을 3,000 ml round flask에 넣고 증류수 2,000 ml를 가한 후, 3시간 가열 추출하여, 침전물을 3회 여과 (3M filter paper)하고, 이 여과액을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. Round flask에 농축된 용액을 -70℃ deep freezer에서 4시간 동안 방치하고,

24시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하여 24.5 g의 분말을 얻어서 실험에 필요한 농도로 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

2) 세포독성 측정

mLFCs에 SYTG (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 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 세척하였다. 세척한 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50 ml를 가하고, 1시간 동안 4°C에 방치하였다. 이를 다시 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. 여기에 SRB (0.4%/1% acetic acid) 용액을 100 ml/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4-5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10mM Tris Base로 100  $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 간독성 검사

SD계 흰쥐에 14일간 구강으로 SYTG을 98.3 mg/200 g으로 투여하고, 생쥐에서 심장 천자를 통하여 채혈한 후 혈청을 분리하여 GOT, GPT를 측정하였다.

4) 항산화 활성 측정

(1) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 소거능<sup>48)</sup>

150mM DPPH/EtOH 450 ml에 SYTG를 1000, 500, 250, 125, 62.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 희석하여 50 ml씩 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이를 흡광도 517 nm에서 측정하여 아래의 방법으로 계산하였다.

DPPH 소거능 (%) =

$$\left( \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{SYTG 투여군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

(2) Superoxide dismutase (SOD) 유사활성<sup>28)</sup>

SYTG 0.2 ml에 tris-HCl buffer (pH 8.5) 2.6 ml과 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml를 가하여 25°C에서 10분 반응 후 1 N HCl 0.1 ml로 반응 정지시켰다. 반응액을 420 nm에서 흡광도를 측정하고 buffer를 첨가한 것을 대조군으로 하여 아래와 같이 저해율을 측정하였다.

SOD 유사활성 (%) =

$$100 - \left( \frac{\text{SYTG 투여군의 흡광도}}{\text{buffer 첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

(3) Superoxide anion radical (SAR) 소거활성<sup>29)</sup>

Superoxide anion radical 소거능 측정은 xanthine, xanthine oxidase를 이용하여 NBT으로 측정하였다. 0.1 mM EDTA가 함유된 50mM phosphate buffer (pH 7.8) 2.5 ml에 2mM xanthine 0.2 ml과 1mM NBT (nitro blue tetrazolium) 0.1 ml이 혼합된 반응액에 SYTG를 1000, 500, 250, 125, 62.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의, 농도로 섞은 후 xanthine oxidase 0.2 unit/ml을 가하여 15분 동안 반응하였다. 반응 후 550 nm에서 측정하였다. 대조군은 DW를 첨가하여 사용하였다.

Superoxide anion radical 소거능 (%) =

$$\left( \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{SYTG 투여군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

5) Mouse lung fibroblast cells (mLFCs) 배양

정상 Balb/c계 생쥐의 폐조직 1 g을 잘게 분쇄하여 ACK 용액으로 적혈구를

제거한 후 cool D-PBS로 3회 세척하여 conical tube (15 ml)에 넣고 1,400 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 tube에 DMEM {containing collagenase A (5 mg/ml, BM, Indianapolis, USA)와 DNase type I (0.15 mg/ml, Sigma), antibiotics (penicillin  $10^4$  U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25  $\mu$ g/ml)}를 넣고 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 배양 후 인산완충생리식염수 (PBS)로 약 2회 1,500 rpm에서 원심분리하였다. 이를 DMEM-10% FBS로 1주일 동안 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 세포를 분리하여 연속으로 1주일씩 3회 반복하여 살아있는 부착세포를 DMEM-5% FBS 배양액에서 배양하였다.

#### 6) Quantitative real-time-PCR

##### (1) RAW 264.7 세포배양

Murine macrophage cell line RAW264.7 세포주는 10% FBS를 첨가한 DMEM에 넣고 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 배양 후 인산완충생리식염수 (PBS)로 약 2회 1,500 rpm에서 원심분리하였다. 이를 DMEM-10% FBS로 1주일 동안 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 세포를 분리하는 작업을 3회 반복하여 살아있는 부착 세포를 DMEM-5% FBS 배양액에서 배양하였다.

##### (2) RAW 264.7 세포에서 RNA 분리

먼저 RAW264.7 세포주는 24 well plate에  $1 \times 10^6$  세포로 분주하였다. 여기에 SYTG (100  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml)를 처리하고 1시간 후 LPS 2  $\mu$ g/ml

를 각각의 well에 첨가한 후 6시간 배양하고 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 여기에 RNAzol B 500  $\mu$ l를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl<sub>3</sub>) 50  $\mu$ l를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200  $\mu$ l의 상층액을 회수하여 2-propanol 200  $\mu$ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20  $\mu$ l의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

##### (3) 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3  $\mu$ g을 DNase I (10 U/ $\mu$ l) 2 U/tube를 37°C heating block에서 30분간 반응한 후 75°C에서 10분 동안 변성시키고, 이에 2.5  $\mu$ l 10 mM dNTPs mix, 1  $\mu$ l random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25  $\mu$ l), RNA inhibitor로서 1  $\mu$ l RNase inhibitor (20 U/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l 100 mM DTT, 4.5  $\mu$ l 5 $\times$ RT buffer (250 mM, Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>)를 가한 후, 1  $\mu$ l의 M-MLV RT (200 U/ $\mu$ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20  $\mu$ l가 되도록 하였다. 이 20  $\mu$ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심 침강하여 37°C heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA

를 합성한 다음, 95℃에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

(4) 정량적 증합 효소 연쇄 반응

Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였으며, 사용된 primers는 아래와 같다.

Table 2. Contents of Used Primers

G3PDH	Forward Primer	5' TGAAGCAGGCATCTGAGGG 3'
	Reverse Primer	5' CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG 3'
TNF-alpha	Forward Primer	5'TTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATC GGTCC 3'
	Reverse Primer	5'GTATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG 3'
IL-6	Forward Primer	5' TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC 3'
	Reverse Primer	5' GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG 3'
IL-1β	Forward Primer	5' CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG 3'
	Reverse Primer	5' GATCCACACTCTCCAGCTGCA 3'
COX-2	Forward Primer	5' TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA 3'
	Reverse Primer	5' TGGCTCTGCAGGATTTTCATG 3'
NOS-II	Forward Primer	5'GGCAGCCTGTGAGACCTTTG 3'
	Reverse Primer	5'GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC 3'

Real time PCR의 조건은 다음과 같다 : 50℃에서 2분, 94℃에서 10분간 반응하여 pre-denaturation 시킨 뒤, 95℃에서 15초, 60℃에서 1분간 반응하여 40회 반복 수행하였다. SYTG 투여군과 대조군은 internal standard로 G3PDH를 사용하여 아래의 수식으로 target group의 Quantitative PCR을 정량하여 RQ (relative quantitative) 값을 측정하였다.

$$y = x (1+e)^n$$

x = starting quantity, y = yield,

n = number of cycles

e = efficiency

7) 염증사이토카인 분석

RAW264.7 세포주는 24 well plate에  $1 \times 10^6$  세포로 분주하였다. 여기에 SYTG (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 처리하고 1시간 후 LPS 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 각각의 well에 첨가한 후 3시간 배양하고 세포를 harvest하

여 -20℃의 냉동고에 보관한 후 IL-1β, IL-6, TNF-α ELISA kit의 방법에 따라 분석하였다 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) Lipopolysaccharide (LPS)로 유도된 염증 생쥐 모델

(1) IL-1β, IL-6, TNF-α 생성량 측정  
SYTG 투여군은 20 g Balb/c계 생쥐를 기준으로 검액 9.6 mg을 생리식염수 0.2 ml에 용해시켜 oral zonde를 이용하여 하루에 1회씩 7일간 경구 투여하였다. 7일 후 lipopolysaccharide (LPS) 1 mg/kg을 복강에 주사한 후 90분 후에 ethyl ether로 마취하고 심장천자법으로 채혈하였다. 채혈 후 혈청을 분리하여 IL-1β, IL-6, TNF-α 생성량을 ELISA로 측정하였다. 각 well에 생쥐의 혈청 100  $\mu\text{l}$  (1/100 dilution)씩 분주한 후 antibody cytokine-biotined conjugated 100  $\mu\text{l}$ 를 처

리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 2 시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody avidin-HRP conjugated 100  $\mu$ l를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100  $\mu$ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 100  $\mu$ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 간과 비장 조직에서의 정량적 중합 효소 연쇄 반응

LPS로 유도된 실험 생쥐의 비장 및 간조직 0.1g과 RNazolB 500  $\mu$ l를 넣고 용해될 때까지 분쇄하고, 이를 원심분리 후 상층액을 제거하였다. 여기에 RNazolB 500  $\mu$ l를 넣고 용해될 때까지 혼합하였으며, 이 혼합 부유액에 chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) 50  $\mu$ l를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200  $\mu$ l의 상층액을 회수하여 2-propanol 200  $\mu$ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20  $\mu$ l의 증류수에 녹여 heating block 75 $^{\circ}\text{C}$ 에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

9) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean $\pm$ standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 분석 방법을 이용하여 결정하였다.

### III. 실험 성적

#### 1. 안정성 검사

1) 세포독성에 미치는 영향

세포독성을 관찰한 결과 mLFCs에서는 대조군의 세포생존율 100.0  $\pm$  6.5%에 대하여, SYTG의 200, 100, 50, 10, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각각 83.6  $\pm$  4.7, 86.4  $\pm$  5.9, 92.4  $\pm$  4.8, 98.6  $\pm$  5.8, 99.5  $\pm$  5.0%로 나타났다(Fig. 1).

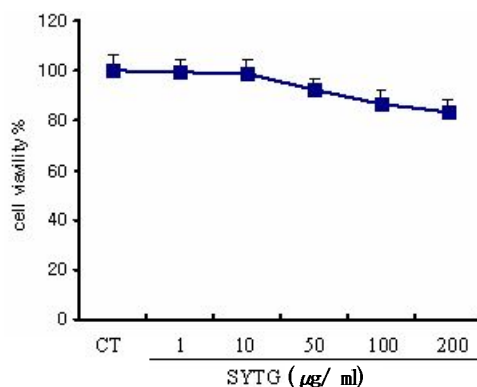


Fig. 1. Cytotoxicity of SYTG on mouse lung fibroblast Cells (mLFCs). mLFCs were treated with various concentration (200, 100, 50, 10, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) of the SYTG.

2) 간독성 검사

간 기능 측정의 지표 성분인 GOT는 정상군이 153  $\pm$  31.6 I.U./l, SYTG 투여군에서는 140  $\pm$  41.9 I.U./l로 나타났다. GPT 수치에서는, 정상군이 50.2  $\pm$  7.0 I.U./l, SYTG 투여군에서 60.6  $\pm$  7.7 I.U./l로 나타났다. SYTG 투여군은 GOT와 GPT의 수치가 정상 범위로 나타나 약물에 의한 간 독성은 발견되지 않았다(Fig. 2).

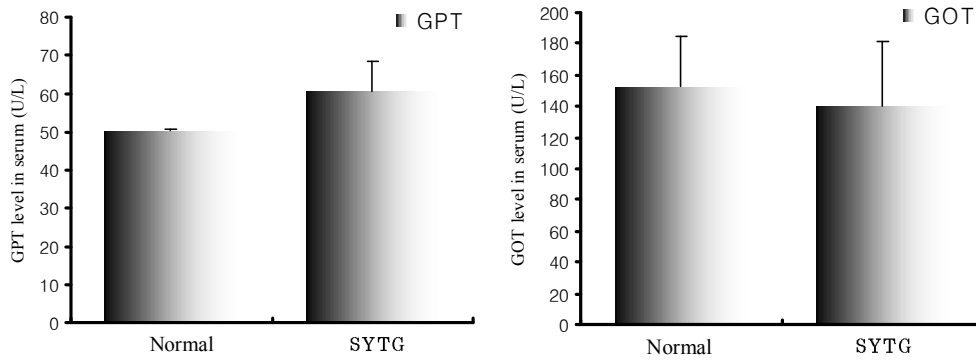


Fig. 2. Effect of SYTG on the GOT and GPT in rat .

Normal : oral administration of normal saline.

SYTG : oral administration of 98.3 mg/200 g of SYTG.

2. 항산화 활성에 미치는 영향

1) DPPH 소거능 측정

DPPH의 소거 활성은 SYTG 1000, 500, 250, 125, 62.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각각

$81.18 \pm 2.23$ ,  $77.91 \pm 1.47$ ,  $58.04 \pm 2.43$ ,  $36.39 \pm 0.09$ ,  $21.70 \pm 0.56\%$ 의 소거 활성 효과를 나타내었다(Fig. 3).

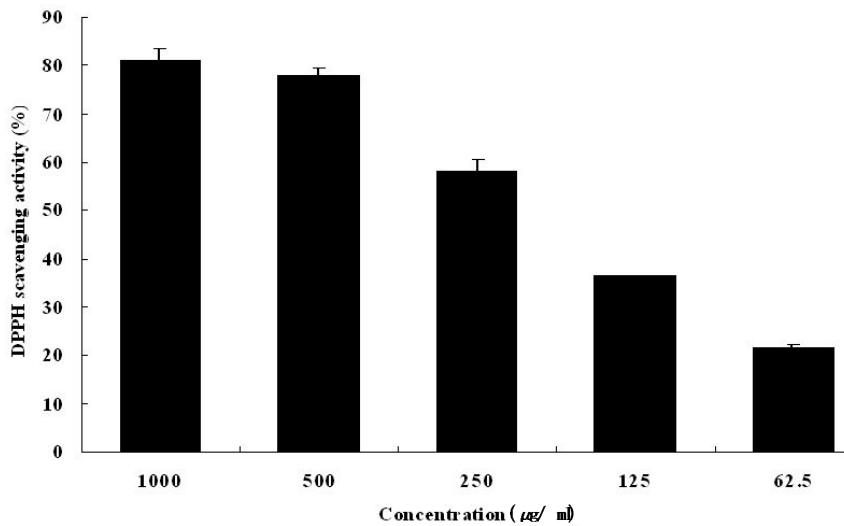


Fig. 3. Scavenging activity of SYTG on DPPH free radical.

SYTG were reacted with DPPH for 30 minutes at 37°C, and the absorbance at 518 nm due to DPPH radical was determined. The results are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

2) SOD 유사활성 측정

SOD의 유사활성은 SYTG 1000, 500, 250, 125, 62.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각각  $24.95 \pm 4.85$ ,

$20.26 \pm 1.73$ ,  $12.17 \pm 3.77$ ,  $16.35 \pm 2.53$ ,  $12.89 \pm 4.96\%$ 의 유사활성을 나타내었다(Fig. 4).

3) SAR 소거활성 측정



SAR의 유사활성은 SYTG 1000, 500, 250, 125, 62.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각각  $43.04 \pm 4.30$ ,  $35.98 \pm 2.09$ ,  $31.39 \pm 5.62$ ,  $21.63 \pm 4.55$ ,  $13.48 \pm 5.22\%$ 의 소거 활성 효과를 나타내었다 (Fig. 5).

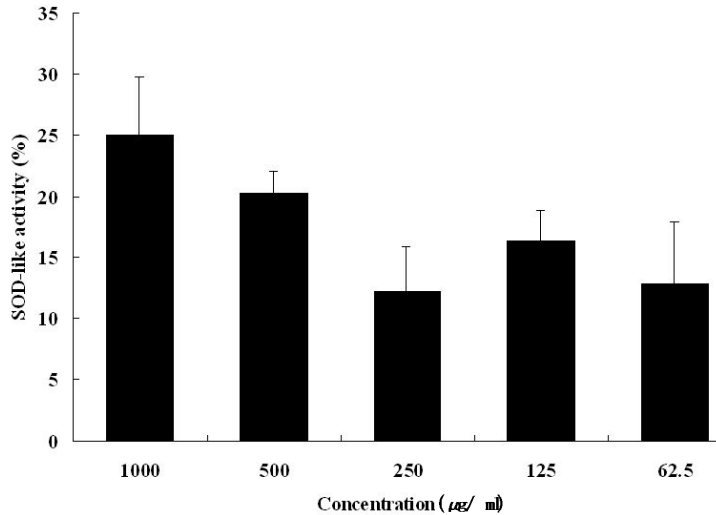


Fig. 4. Scavenging activity of SYTG on Superoxide dismutase. SYTG were reacted with tris-HCl buffer (pH 8.5) 2.6 ml and 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml for 10 minutes at 25°C, and the absorbance at 420 nm to 1 N HCl 0.1 ml was determined. The results are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

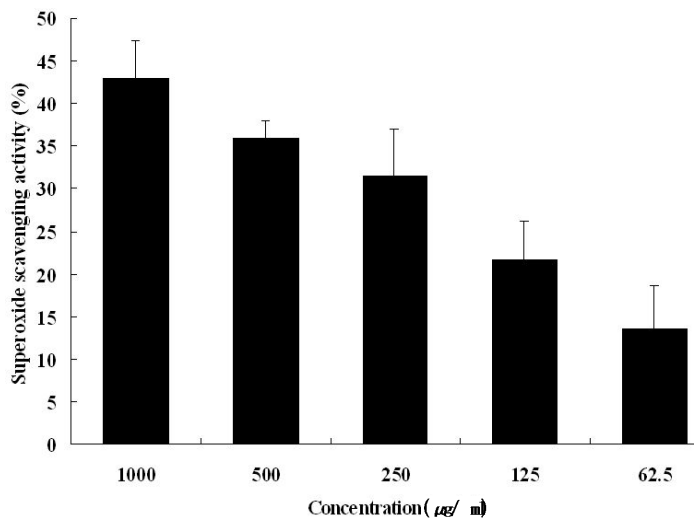


Fig. 5. Scavenging activity of SYTG on Superoxide anion radical. SYTG were reacted with 50mM phosphate buffer (pH 7.8, 0.1 mM EDTA) 2.5 ml and 2 mM xanthine 0.2 ml and 1mM NBT (nitro blue tetrazolium) 0.1 ml for 15 minutes with xanthine oxidase 0.2 unit/ml, and the absorbance at 550 nm. The results are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

### 3. RAW264.7 세포주에서 염증 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향

#### 1) IL-1 $\beta$ 유전자 발현

RAW264.7 세포주에서 IL-1 $\beta$  유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이  $0.086 \pm 0.029$  대조군이  $1.02 \pm 0.02$ , CSA는  $0.220 \pm 0.061$ 로 나타났으며, SYTG 100, 50, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 투여군에서는 각각  $0.293 \pm 0.069$ ,  $0.658 \pm 0.144$ ,  $1.095 \pm 0.106$ 의 RQ 값을 나타내어 대조군에 비해 100, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 유의성 있는 (\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ ) 억제 효과를 나타내었다 (Fig. 6).

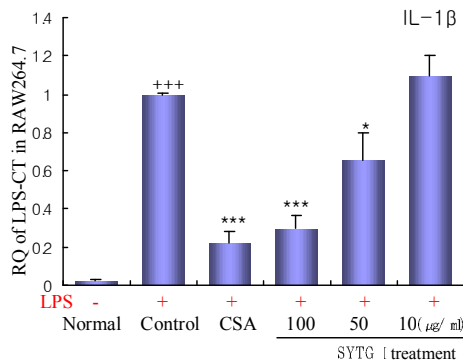


Fig. 6. Inhibitory effects of SYTG on IL-1 $\beta$  mRNA expression in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of SYTG (100, 50, and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS; 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 6 hrs. IL-1 $\beta$  mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. Statistically significant value compared with normal by T test (\*\*\* $p < 0.001$ ). Statistically significant value compared with control by T test (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

#### 2) IL-6 유전자 발현

RAW264.7 세포주에서 IL-6 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이  $0.315 \pm 0.09$  대조군이  $1.073 \pm 0.073$ , CSA는  $0.203 \pm 0.006$ 로 나타났으며, SYTG 100, 50, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 투여군에서는 각각  $0.372 \pm 0.046$ ,  $0.56 \pm 0.046$ ,  $0.655 \pm 0.063$ 의 RQ 값을

나타내어 대조군에 비해 모든 농도에서 농도 의존적으로 유의성 있는 (\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ ) 억제 효과를 나타내었다 (Fig. 7).

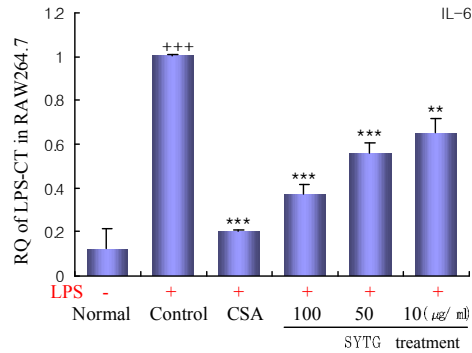


Fig. 7. Inhibitory effects of SYTG on IL-6 mRNA expression in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of SYTG (100, 50, and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS; 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 6 hrs. IL-6 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. Statistically significant value compared with normal by T test (\*\*\* $p < 0.001$ ). Statistically significant value compared with control by T test (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

#### 3) TNF- $\alpha$ 유전자 발현

RAW264.7 세포주에서 TNF- $\alpha$  유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이  $0.027 \pm 0.007$  대조군이  $1.006 \pm 0.006$ , CSA는  $0.238 \pm 0.06$ 로 나타났으며, SYTG 100, 50, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 투여군에서는 각각  $0.314 \pm 0.066$ ,  $0.439 \pm 0.02$ ,  $0.538 \pm 0.12$ 의 RQ 값을 나타내어 대조군에 비해 100, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 유의성 있는 (\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ ) 억제 효과를 나타내었다 (Fig. 8).

#### 4) COX-2 유전자 발현

RAW264.7 세포주에서 COX-2 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이  $0.202 \pm 0.06$  대조군이  $1.106 \pm 0.106$ , CSA는  $0.268 \pm 0.055$ 로 나타났으며, SYTG 100, 50, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 투여군에서는 각각  $0.52 \pm$

0.077,  $0.525 \pm 0.144$ ,  $0.685 \pm 0.028$ 의 RQ 값을 나타내어 대조군에 비해 모든 농도에서 유의성 있는 (\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ ) 억제 효과를 나타내었다(Fig. 9).

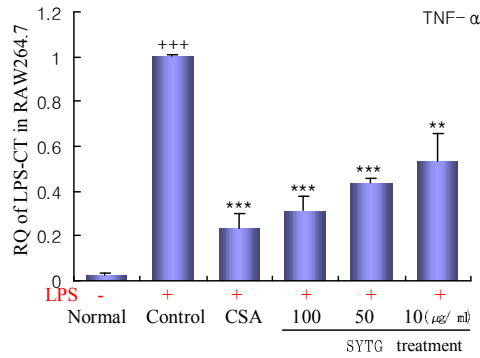


Fig. 8. Inhibitory effects of SYTG on TNF- $\alpha$  mRNA expression in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of SYTG (100, 50, and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS: 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 6 hrs. TNF- $\alpha$  mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. Statistically significant value compared with normal by T test (+++ $p < 0.001$ ). Statistically significant value compared with control by T test (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

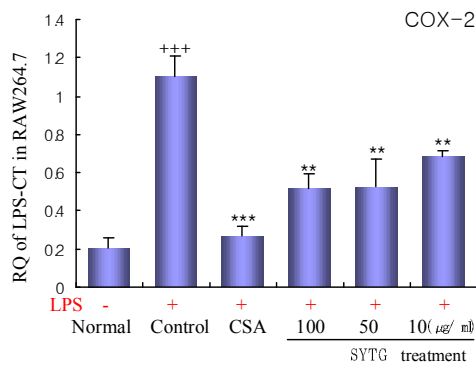


Fig. 9. Inhibitory effects of SYTG on COX-2 mRNA expression in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of SYTG (100, 50, and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS: 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 6 hrs. COX-2 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. Statistically significant value compared with

normal by T test (+++ $p < 0.001$ ). Statistically significant value compared with control by T test (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

5) NOS-II 유전자 발현

RAW264.7 세포주에서 NOS-II 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이  $0.13 \pm 0.045$  대조군이  $1.067 \pm 0.067$ , CSA는  $0.122 \pm 0.042$ 로 나타났으며, SYTG 100, 50, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 투여군에서는 각각  $0.0734 \pm 0.056$ ,  $0.724 \pm 0.027$ ,  $0.0842 \pm 0.026$ 의 RQ 값을 나타내어 대조군에 비해 모든 농도에서 유의성 있는 (\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ) 억제 효과를 나타내었다(Fig. 10).

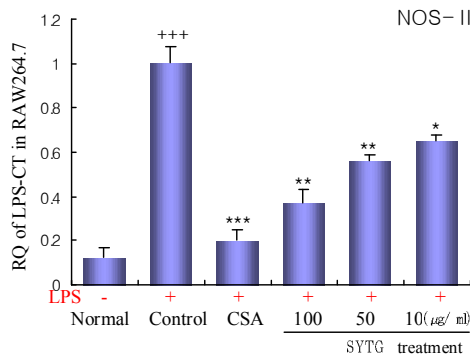


Fig. 10. Inhibitory effects of SYTG on NOS-II mRNA expression in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of SYTG (100, 50, and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS: 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 6 hrs. NOS-II mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. Statistically significant value compared with normal by T test (+++ $p < 0.001$ ). Statistically significant value compared with control by T test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

4. RAW264.7 세포주에서 염증 사이토카인 생성량에 미치는 영향

1) IL-1 $\beta$  생성량

RAW264.7 세포주에서 IL-1 $\beta$  생성량은

정상군은  $38.5 \pm 18.2$  pg/ml, 대조군은  $701.0 \pm 59.4$  pg/ml, SYTG 100  $\mu\text{g/ml}$ 는  $458.0 \pm 60.8$  pg/ml, SYTG 50  $\mu\text{g/ml}$  투여군은  $582.0 \pm 83.4$  pg/ml로, 대조군에 비하여 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 유의성 있는 (\* $p < 0.05$ ) 억제 효과를 나타내었다(Fig. 11).

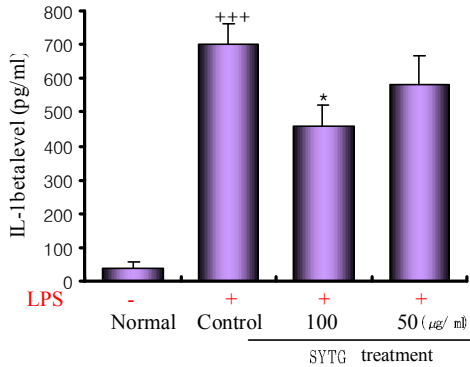


Fig. 11. Effect of SYTG on the levels of IL-1 $\beta$  in the RAW264.7 cell. RAW264.7 cell was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. The levels of IL-1 $\beta$  were determined using a commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with normal by T test (+++ $p < 0.001$ ). Statistically significant value compared with control by T test (\* $p < 0.05$ ).

### 2) IL-6 생성량

RAW264.7 세포주에서 IL-6 생성량은 정상군은  $363.0 \pm 77.8$  pg/ml, 대조군은  $6002.0 \pm 729.7$  pg/ml, SYTG 100  $\mu\text{g/ml}$ 는  $3210.0 \pm 585.5$  pg/ml, SYTG 50  $\mu\text{g/ml}$  투여군은  $4650.0 \pm 704.3$  pg/ml로, 대조군에 비하여 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 유의성 있는 (\* $p < 0.05$ ) 억제 효과를 나타내었다(Fig. 12).

### 3) TNF- $\alpha$ 생성량

RAW264.7 세포주에서 TNF- $\alpha$  생성량은 정상군은  $272.5 \pm 81.3$  pg/ml, 대조군은  $3243.5 \pm 392.4$  pg/ml, SYTG 100  $\mu\text{g/ml}$ 는  $1655.0 \pm 131.5$  pg/ml, SYTG 50  $\mu\text{g/ml}$  투여군은  $2416.0 \pm 109.3$  pg/ml로, 대조

군에 비하여 100, 50  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 유의성 있는 (\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ) 억제 효과를 나타내었다(Fig. 13).

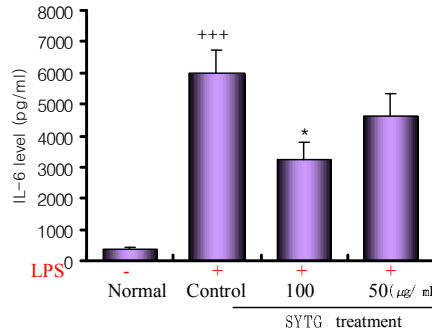


Fig. 12. Effect of SYTG on the levels of IL-6 in the RAW264.7 cell. RAW264.7 cell was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. The levels of IL-6 were determined using a commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with normal by T test (+++ $p < 0.001$ ). Statistically significant value compared with control by T test (\* $p < 0.05$ ).

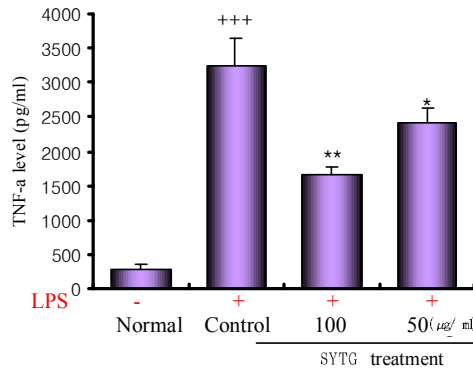


Fig. 13. Effect of SYTG on the levels of TNF- $\alpha$  in the RAW264.7 cell. RAW264.7 cell was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. The levels of TNF- $\alpha$  were determined using a commercially available ELISA kit. Statistically significant value compared with normal by T test (+++ $p < 0.001$ ). Statistically significant value compared with control by T test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

**5. 급성 염증성 질환 생쥐 모델의 혈청 내 싸이토카인 변화에 미치는 영향**

1) IL-1 $\beta$  생성량

혈청내 IL-1 $\beta$  생성량을 측정한 결과, 정상군은 50.3  $\pm$  11.24 pg/ml, 대조군은 75.8  $\pm$  0.42 pg/ml로 나타난 반면, SYTG 투여군에서는 62.5  $\pm$  5.4 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (\*p<0.05) 억제 효과를 나타내었다(Fig. 14).

2) IL-6 생성량

혈청내 IL-6 생성량을 측정한 결과, 정상군은 153.0  $\pm$  12.3 pg/ml, 대조군은 497.0  $\pm$  0.84 pg/ml로 나타난 반면, SYTG 투여군에서는 454.0  $\pm$  12.4 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (\*\*\*)p<0.001) 억제 효과를 나타내었다(Fig. 15).

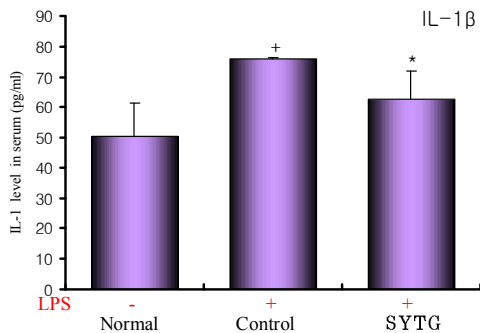


Fig. 14. The effect of SYTG on IL-1 $\beta$  production in sera following LPS co-treatment.

Female mice were co-treatment with SYTG (9.8 mg/20 g) and LPS (1 mg/kg). Total IL-1 $\beta$  levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit (Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany). Statistically significant value compared with normal data (+:p<0.05). Statistically significant value compared with control data (\*:p<0.05)

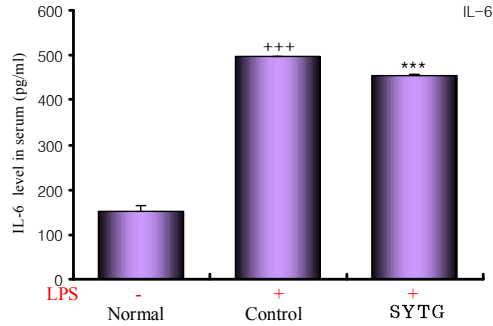


Fig. 15. The effect of SYTG on IL-6 production in sera following LPS co-treatment.

Female mice were co-treatment with SYTG (9.8 mg/20 g) and LPS (1 mg/kg). Total IL-6 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit (Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany). Statistically significant value compared with normal data (+++ :p<0.001). Statistically significant value compared with control data (\*\*\*)p<0.001)

**6. 급성 염증성 질환 생쥐 모델의 비장 및 간 조직내 싸이토카인 변화에 미치는 영향**

1) IL-1 $\beta$  mRNA 발현량

비장 및 간 조직내 IL-1 $\beta$  mRNA 생성량을 측정한 결과, 간조직에서 정상군은 0.088  $\pm$  0.014 pg/ml, 대조군은 1.066  $\pm$  0.006 pg/ml로 나타난 반면, SYTG 투여군에서는 0.818  $\pm$  0.029 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (\*\*\*)p<0.001) 억제 효과가 나타났다. 비장조직에서 정상군은 0.064  $\pm$  0.010 pg/ml, 대조군은 0.995  $\pm$  0.006 pg/ml로 나타난 반면, SYTG 투여군에서는 0.599  $\pm$  0.085 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (\*\*p<0.01) 억제 효과가 나타났다(Fig. 16).

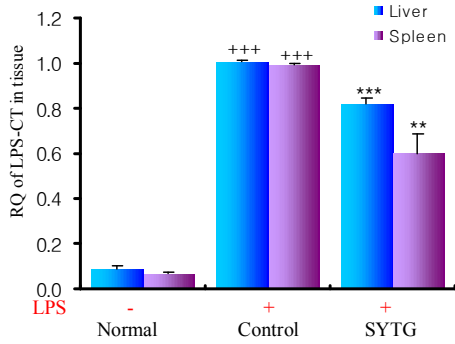


Fig. 16. Inhibitory effects of SYTG on IL-1β mRNA expression level in spleen and liver following LPS co-treatment. Female mice were co-treatment with SYTG (9.8 mg/20 g) and LPS (1 mg/kg). Spleen and liver were collected after 90 minutes and total RNA was extracted and IL-1β mRNA express were measured real-time PCR. Statistically significant value compared with normal data (+++:p<0.001). Statistically significant value compared with control data (\*\*:p<0.01, \*\*\*:p<0.001)

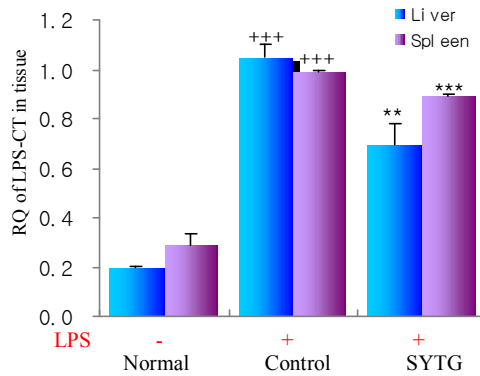


Fig. 17. Inhibitory effects of SYTG on IL-6 mRNA expression level in spleen and liver following LPS co-treatment. Female mice were co-treatment with SYTG (9.8 mg/20 g) and LPS (1 mg/kg). Spleen and liver were collected after 90 minutes and total RNA was extracted and IL-6 mRNA express were measured real-time PCR. Statistically significant value compared with normal data (+++:p<0.001). Statistically significant value compared with control data (\*\*:p<0.01, \*\*\*:p<0.001 )

2) IL-6 mRNA 발현량

비장 및 간 조직내 IL-6 mRNA 생성량을 측정 한 결과, 간조직에서 정상군은 0.196 ± 0.008 pg/ml, 대조군은 1.051 ± 0.051 pg/ml로 나타난 반면, SYTG 투여군에서는 0.698 ± 0.081 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (\*\*p<0.01) 억제 효과가 나타났다. 비장조직에서 정상군은 0.290 ± 0.045 pg/ml, 대조군은 0.989 ± 0.011 pg/ml로 나타난 반면, SYTG 투여군에서는 0.893 ± 0.004 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (\*\*\*)p<0.001) 억제 효과가 나타났다(Fig. 17).

IV. 고 찰

聖愈湯은 李<sup>1)</sup>의 《蘭室秘藏·瘡瘍門》에 처음 수록된 처방으로 惡瘡에 출혈이 과다하여 心煩不安한 증상을 치료한다고 하였고, 《醫宗金鑑·刪補名醫方論》<sup>2)</sup>에서는 일체의 출혈 과다로 인하여 발생된 陰虧氣弱의 증상을 치료한다고 하였다<sup>2,6)</sup>. 이후 聖愈湯은 四物湯에 人蔘, 黃芪를 加하여, 益氣, 攝血하는 효능을 강화시킨 처방으로<sup>6)</sup>, 임상에서 氣血兩虛증상에 널리 응용되는데, 특히 月經 困難症, 胎動不安, 產後 惡露不下, 產後腹痛 등의 다양한 부인과 질환에서 氣血虛弱 증상에 응용되는 대표적 처방이다<sup>4,5,7,30)</sup>.

한의학에서는 《素問》〈上古天真論〉<sup>8)</sup>에서 “眞氣從之精神內守 病安從來”, 〈刺法論〉<sup>8)</sup>에서 “五疫之氣 ……正氣存內 邪

不可干”이라 하여, 질병의 발생과 진행의 원리를 인체의 正氣와 邪氣의 상호 투쟁 및 消長進退에 의한 것으로 보았는데, 이러한 正邪의 개념은 오늘날 면역학 이론과 유사한 개념으로 인식되고 있다<sup>11-13)</sup>. 즉 正氣부족을 면역기능저하와 관련지어 그 중요성을 설명하였는데, 補氣補血하여 인체의 陰陽과 臟腑의 기능실조를 조정함으로써 扶正하는 것이 질병에 대한 저항력을 증강시켜, 질병발생에 중요한 요소임을 강조하였다<sup>11-13)</sup>.

炎症은 조직이 손상을 받았을 때 손상을 극소화 시키고 손상된 부위를 정상상태로 되돌리려는 생체의 자기방어체계인 면역과정의 일부분으로 볼 수 있다<sup>15,31,32)</sup>. 또한, 炎症은 손상부위의 혈관, 신경, 세포, 체액의 반응이 서로 복잡하게 관여되어 발생부위에 發赤, 發熱, 疼痛, 腫脹, 機能障礙와 같은 증후가 나타난다<sup>33)</sup>.

이러한 염증의 일련의 과정은 疼痛, 出血, 寒熱, 腫塊 등을 주요증상으로 하는 瘀血의 病態<sup>18)</sup>와 유사한데, 瘀血이란 생리적 기능을 상실한 혈액이 凝聚하여 형성된 일종의 병리적 산물인 동시에 발병인자가 되는 것으로<sup>34)</sup>, 內經<sup>8)</sup>에서는 ‘惡血’, ‘留血’, ‘血凝’, ‘脈不通’, ‘血泣’ 등의 용어로 표현되었으며, 이를 정리하여 張<sup>35)</sup>이 《金匱要略·驚悸吐衄下血胸滿瘀血病脈證治》篇에서 최초로 ‘瘀血’이란 명칭을 사용하였다.

瘀血은 주로 氣虛, 氣滯, 血虛, 痰阻 등의 병리 상태에 의해 형성되며<sup>36-40)</sup>, 辨證類型에 따라 活血化瘀, 益氣活血, 滋陰化瘀, 行氣活血, 溫經活絡, 攻逐血瘀, 祛瘀止血 등의 치법이 운용되고 있는데<sup>41-43)</sup>, 특히, 唐<sup>44)</sup>은 《血證論》에서 瘀血치료에 있어, 祛瘀를 하여도 新血이 재생하지

않는 것은 正氣가 부족한 때문이므로 補血해야 한다고 주장하여, 補血祛瘀法 및 祛瘀補氣法 등을 응용하였으며, 王<sup>45)</sup>은 “元氣既虛 必不能達于血管 血管無氣, 必停留而瘀”라 하여 氣虛가 瘀血발생에 중요한 원인이므로, 瘀血의 치료에 있어서도 扶正의 의미가 중요함을 강조하였다.

따라서, 염증의 치료에 있어서도, 補血 補氣하는 扶正法과 活血祛瘀하는 祛邪法이 서로 결합되어 보다 좋은 치료효과를 낼 것으로 기대된다. 본 연구에 사용된 聖愈湯加減方은 聖愈湯의 구성약물인 熟地黃, 川芎, 當歸, 人蔘, 黃芪의 補氣血劑<sup>22)</sup>에, 赤芍藥, 香附子, 玄胡索, 鷄血藤의 活血之劑<sup>22)</sup>를 加한 처방으로, 각 구성약물에 대한 효능 및 실험적 연구를 살펴보면, 熟地黃은 滋陰補血하고 益精眞髓하여 肝腎陰虛를 치료하고<sup>22)</sup>, 當歸는 補血和血하고 調經止痛한다<sup>22)</sup>, 川芎은 活血行氣하고 祛風止痛하여 風濕痺痛 跌僕腫痛을 치료하며<sup>22)</sup>, 人蔘은 大補元氣하고, 勞傷虛損을 치료하여 氣血津液부족에 응용되고 있으며<sup>22)</sup>, 黃芪는 益胃固表하고, 利水消腫하여, 潰久不斂를 치료한다<sup>22)</sup>. 또한, 赤芍藥은 清熱涼血, 散瘀止痛하고<sup>22)</sup>, 香附子是 理氣解鬱, 止痛調經하며<sup>22)</sup>, 玄胡索은 行氣化瘀, 清心解鬱하고<sup>22)</sup>, 鷄血藤은 行血補血, 舒筋活絡하는 효능이 있는데<sup>22)</sup>, 이상은 活血之劑로써, 赤芍藥<sup>23)</sup>, 香附子<sup>24)</sup>, 玄胡索<sup>25)</sup>, 鷄血藤<sup>26)</sup> 모두에서 항염증 및 항산화효과가 있음이 여러 논문에서 밝혀지고 있다.

따라서, 본 연구에 사용된 聖愈湯加減方은 扶正法과 祛邪法이 서로 결합되어 있으므로, 항염증 및 항산화 효과를 더욱 증대시킬 것으로 사료된다.

이에 저자는 聖愈湯加減方의 항염증

및 항산화 효과를 알아보기 위해서 항산화 활성에 미치는 영향, RAW264.7 세포주에서 염증 관련 cytokine의 유전자 발현 및 생성에 미치는 영향, 급성 염증성 질환 생쥐 모델의 혈청내, 비장 및 간 조직내 cytokine 변화에 미치는 영향 등에 대해 실험하였으며 그 결과 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

실험에 앞서 SYTG의 안전성 평가를 위해 mLFCs의 생존율과 SD계 흰쥐에 10일간 약물을 투여한 실험군의 혈중 GOT, GPT 활성도를 측정하였다. mLFCs의 생존율 측정에서 SYTG 200, 100, 50, 10, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  투여군에서 모두 대조군(정상군)과 비교하여 세포생존율에 유의한 차이가 없었으며 (Fig. 1), SYTG 투여군의 GOT와 GPT의 수치에서는 모든 농도에서 대조군(정상군)과 비교하여 정상 범위로 나타났다. 따라서 SYTG는 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도까지는 세포독성에 안전할 것으로 사료되며, 간 독성지표물질에 대해서도 최대 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도까지는 안전한 것으로 나타났다 (Fig. 1, 2).

염증반응은 그 원인과 반응조직의 차이에 상관없이 거의 유사한 조직학적 변화를 보인다<sup>15)</sup>. 이러한 현상은 손상에 의하여 생체 내 국소부위에 유리되는 공통적인 물질요인의 존재를 추정케 하는데 이러한 화학적 매개체로는 활성산소, 산화질소(NO), prostaglandin(이하 PG), 염증을 유발시키는 여러 cytokine 등이 있다<sup>15)</sup>.

이러한 염증 매개 인자 중, 염증반응으로 인한 자극을 통하여 대식세포와 호중구에서 생성되는 활성산소종은 생체 내에서 많은 세포구성요소와 반응하여 끊임없이 체내 고분자들을 공격하여 결

극에는 광과민성 피부질환, 급성 용혈성 빈혈, 다발성 경화증, 노인성 치매를 비롯하여 변이, 노화, 발암 등과 같은 심각한 손상을 일으킨다<sup>46-48)</sup>.

이러한 활성산소의 피해로부터, 생체 조직을 보호하기 위해서, 활성산소의 유리가 다른 분자와 반응하기 전에 인체에 무해한 형태로 바꾸고, 다른 분자들로부터 자유 유리의 형성을 억제시키는 항산화제의 사용이 일반적이다<sup>33)</sup>. 유리기 소거작용은 활성라디칼(free radical)에 전자를 공여하여 항산화 효과를 나타내는 작용으로 해석될 수 있으므로, 유리의 소거율은 항산화효능의 척도로서 이용된다<sup>49)</sup>.

DPPH는 안정한 유리기로 cysteine, glutathione과 같은 항산화 아미노산과 aromatic amine등에 의해 환원되어 탈색되고, 비교적 간단하여 항산화능 측정에 많이 이용되고 있다<sup>49)</sup>.

또한 정상적인 산화적 인산화의 과정 동안 소모되는 전체 산소의 0.4~4% 정도는 free radical anion superoxide( $\cdot\text{O}_2^-$ )로 전환되며, 생성된  $\cdot\text{O}_2^-$ 는 다른 활성세포종으로 전환되어 직접적 또는 간접적으로 세포손상을 유발한다<sup>50)</sup>. 정상적으로는  $\cdot\text{O}_2^-$ 는 내인성 항산화 방어기전인 superoxide dismutase(SOD)에 의해 빠르게 과산화수소로 전환되어 세포내 산화-환원 균형을 유지한다<sup>50)</sup>. 따라서 radical anion superoxide의 소거활성 및 SOD 유사활성 측정 역시 산화적 손상을 억제하는 항산화능 측정에 많이 이용된다<sup>50)</sup>.

SYTG의 항산화 효과를 입증하기 위하여, DPPH 소거활성, superoxide dismutase(SOD) 유사활성 및 superoxide anion radical 소거활성을 SYTG 농도별로 측



정한 결과, SOD 유사활성 측정에서의 SYTG 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리 군을 제외한 나머지 모든 경우에서 농도 의존적으로 항산화 활성 효과를 나타내었다(Fig. 3, 4, 5).

내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide (LPS)는 RAW264.7 세포와 같은 macrophage 또는 monocyte에서 Interleukin(IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, transforming growth factor (TNF)- $\alpha$ 와 같은 pro-inflammatory cytokine을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 또한 이러한 염증매개 물질의 형성은 phospholipase A<sub>2</sub>의 활성으로 인해 arachidonic acid가 prostaglandins(PG)으로 바뀌는 과정 및 NO형성과정으로 이어지게 된다<sup>51)</sup>.

면역과 염증에 관련된 여러 cytokine 중 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 cytokine으로, IL-6는 B-cell과 T-cell의 증식과 분화를 촉진시키며 면역계와 조혈계에 다양한 기능을 나타내는데, 면역계에서 면역반응, 급성기 반응과 hemopoiesis를 조절하는 역할과 함께 host defense mechanism에서 중요한 역할을 담당한다<sup>52,53)</sup>.

TNF- $\alpha$ 는 대식세포와 비만세포 등에서 분비되어 염증세포에서 염증유발 작용과 세포의 증식과 분화를 조절한다. 또한 중성구를 자극하여 탐식작용과 탈과립 등을 증가시키는 등 염증반응에서 중요한 역할을 하여 최근에는 TNF- $\alpha$ 를 차단하는 약물들이 염증의 치료제로 연구되고 있다<sup>14,53,54)</sup>.

Cyclooxygenase(COX)는 arachidonic acid를 PGs로 전환하는 효소로 COX-1과 COX-2로 분류된다. COX-1은 체내에서 혈소판의 형성, 위벽보호, 신장기능의 유지 등 정상적인 생체기능에 작용하

며, COX-2는 염증매개물질인 PGE<sub>2</sub>를 형성시킨다. PGE<sub>2</sub>는 혈관의 수축작용과 염증반응에 관여하여 조기진통이나 임신중독증 그리고 여러 여성생식기 감염 및 종양에서 비정상적으로 발현된다고 알려져 있다<sup>55,56)</sup>.

Nitric oxide(이하 NO)는 혈관에서 강력한 혈관확장 작용을 하며 혈소판 응집을 저해하고 중성구나 혈소판이 혈관내피세포에 부착하는 것을 막는 역할을 하지만<sup>57)</sup>, 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관투과성, 부종등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다<sup>58,59)</sup>.

Nitric oxide synthesis(이하 NOS)는 L-arginine을 NO로 산화시키는 일종의 산화효소이다. NOS는 혈관내피세포성 NOS, 신경세포성 NOS 및 유도성 NOS(이하 iNOS)의 세 가지 아형으로 존재하는데, 이 중 iNOS는 염증성 cytokine이나 LPS 등에 반응하여 분비된다<sup>57)</sup>.

SYTG의 항염증 효과에 대한 연구에서 대표적인 염증성 cytokines인 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 유전자 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 평가한 결과, IL-1 $\beta$ 에서의 SYTG 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  투여군을 제외한 SYTG 100, 50 및 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군 모두에서 각각 대조군에 비해 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 6, 7, 8).

SYTG를 처리한 RAW264.7 세포주에서 염증반응을 촉진시키는 PG와 NO를 형성시키는 효소인 COX-2 와 NOS-II의 유전자 발현에 미치는 영향을 알아본 결과, SYTG 100, 50 및 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  투여군 모두에서 각각 대조군에 비해 농도 의존적으로 COX-2 와 NOS-II의 유전자 발

현을 억제하였다(Fig. 9, 10).

또한 SYTG를 처리한 RAW264.7 세포주에서 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 생성량을 측정된 결과, IL-1 $\beta$ 와 IL-6의 생성량에서는 SYTG 투여군 100  $\mu$ g/ml 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는(P<0.05) 억제 효과를 나타내었고(Fig. 10, 11), TNF- $\alpha$ 의 생성량에서는 대조군에 비하여 100, 50  $\mu$ g/ml 농도에서 유의성 있는(\*\*p<0.01, \*p<0.05) 억제 효과를 나타내었다(Fig. 11, 12, 13).

급성 염증성 질환 생쥐 모델을 이용한 SYTG의 항염증 효과에 대한 연구에서는 혈청 내 cytokine의 생성량과 비장 및 간 조직 내 cytokine의 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보았는데, 먼저 혈청 내 IL-1 $\beta$ , IL-6의 생성량을 측정된 결과 IL-1 $\beta$ , IL-6의 생성량에서 대조군에 비하여 유의성 있는(P<0.05, 0.001) 억제 효과를 나타내었다(Fig. 14, 15).

비장과 간 조직에서의 IL-1 $\beta$ , IL-6의 유전자 발현에 미치는 영향을 알아본 결과, IL-1 $\beta$ , IL-6의 생성량에서 대조군에 비하여 유의성 있는(P<0.01, 0.001, P<0.001, 0.01) 억제 효과를 나타내었다(Fig. 16, 17).

이상의 실험적 연구 결과를 종합해 볼 때, 聖愈湯加減方の 항염증 및 항산화 효과가 인정되어, 韓醫學에서 다양한 염증성 질환 및 산화적 손상으로 인한 질환에 유효하게 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 결 론

聖愈湯加減方(SYTG)의 항산화 및 항염증 효과의 규명을 위해서 항산화 활성

에 미치는 영향, 염증관련 cytokines의 생성량 및 유전자 발현에 미치는 영향, 급성 염증성 질환 생쥐 모델에서의 cytokine 변화에 미치는 영향 등을 관찰한 결과는 다음과 같다.

1. SYTG는 200  $\mu$ g/ml 농도까지 mLFCs에 대해 세포독성을 가지지 않았으며, SD계 흰쥐 혈청의 간 독성지표물질에 대해서도 최대 200  $\mu$ g/ml 농도까지 안전하였다.
2. SYTG는 농도가 증가 할수록 높은 DPPH 소거활성, superoxide anion radical 소거활성을 보였으며, 1000, 500, 125, 62.5  $\mu$ g/ml 농도에서 SOD 유사활성을 보여, 항산화효과가 있는 것으로 나타났다.
3. SYTG는 RAW264.7 세포주에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , COX-2 및 NOS-II의 유전자 발현을 대조군에 비해 농도 의존적으로 억제하였다.
4. SYTG는 RAW264.7 세포주에서 IL-1 $\beta$ 와 IL-6 생성량을 100  $\mu$ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였고, TNF- $\alpha$  생성량을 100, 50  $\mu$ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다.
5. SYTG는 급성 염증 유발 생쥐의 혈청 내 IL-1 $\beta$ , IL-6의 생성을 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다. 비장 및 간 조직에서의 유전자 발현에서도 IL-1 $\beta$ , IL-6의 생성량을 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다.

이상의 실험 결과로 보아 聖愈湯加減方은 항산화 및 항염증 효과가 인정되므로, 氣血虛弱과 瘀血證이 겸해진 부인과

염증 질환에 유효하게 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

- 투 고 일 : 2008년 10월 22일
- 심 사 일 : 2008년 10월 28일
- 심사완료일 : 2008년 11월 7일

## 참고문헌

1. 李杲. 蘭室秘藏. 서울: 醫聖堂. 1994:103.
2. 吳謙 等. 醫宗金鑑. 서울: 法人文化社. 2006:406.
3. 한의부인과학 교재편찬위원회. 韓醫婦人科學(上). 서울: 도서출판 정담. 2001:61, 101, 121, 181.
4. 한의부인과학 교재편찬위원회. 韓醫婦人科學(下). 서울: 도서출판 정담. 2001:105, 352, 374, 378, 384.
5. 김 탁. 월경통의 병인 및 치료지침. 대한산부인과학회지. 2005;48(7):1613-1620.
6. 韓醫科大學 方劑學教授 共編. 方劑學. 서울: 永林社. 1999:288.
7. 肖淑春. 東醫臨床婦人科學. 서울: 法人文化社. 1999:98, 128, 131, 135, 136, 141, 375.
8. 홍원식. 精校黃帝內經素問. 東洋醫學研究院出版社. 1985:38, 55, 78, 86-88, 104, 107, 110, 116-124, 213, 233, 247, 256, 273.
9. 정우열. 韓方病理學. 이리: 서울공판사. 1983:5-34.
10. 蔡浩然, 鄭鎮鴻, 金東熙. 加味八珍湯이 免疫調節作用에 미치는 영향. 大韓韓方婦人科學會誌. 1999;12(2):198-224.
11. 蔡禹錫. 免疫疾患의 韓方概念과 治療에 關한 文獻的 考察. 大韓韓醫學會誌. 1990;11(2):54-58.
12. 黃義玉 等. 免疫學에 關한 文獻的 考察. 大韓韓醫學會誌. 1989;10(1): 193-226.
13. 趙鍾寬. 免疫에 關한 東洋醫學的 考察. 東洋醫學. 1986;12(1):19-23.
14. 安文生 等. Homeostasis와 免疫反應調節論의 抗害承制論的 解析. 大韓韓方內科學會誌. 1990;11(2):53-67.
15. 대한병리학회. 병리학Ⅱ. 서울: 고문사. 1995:71-104, 112-120, 540-542.
16. 홍원식. 精校黃帝內經靈樞. 서울: 東洋醫學研究院出版社. 1981:317, 347.
17. 潘鴻鵠. 中의학치료염증학. 군사의학 과학기술출판사. 2000:3-15, 329, 650, 683.
18. 김정현, 이태균. 골반염에 관한 문헌적 고찰. 대한한방부인과학회지. 1994;7(1):31-46.
19. 김동일, 이동규, 이태균. 만성 골반통을 유발하는 골반을혈증후군의 임상예에 관한 연구. 대한한방부인과학회지. 2002;15(2):114-125.
20. 李時珍. 本草綱目. 北京: 中國書店. 1994:73-79.
21. 李杲. 東垣十種醫書. 서울: 大星文化社. 1996:372-373.
22. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編. 本草學. 서울: 永林社. 1998:190-192, 195-196, 354-355, 409-410, 413-414, 445-446, 531-533, 534-536, 578- 581.
23. 손현주, 김만옥, 위재준. 복분자와 적작약의 항산화성분. 한국농화학회. 1992;35(4):327-327.
24. 김선기 등. 향부자의 성분 및 Nitric Oxide 생합성 저해효과. 생약학회지. 2000; 31(1):1-6.
25. 김영중 등. 현호색의 Acetylcholinesterase 활성 저해 성분 및 그 작용기전. 생약

- 학회지 . 1996;27(2):91-95.
26. 차배천, 이은희, 노미애. 계혈등의 항산화 활성. 생약학회지. 2005;36(1):50-55.
  27. Blois MS. Atioxident determination by the use of a stable free radical Nature. 1958;181(1):199-200.
  28. Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxid dismutase. Eur J Biochem. 1975;47:468-474.
  29. Nishikimi M, Rao NA, Yagi K. The occumence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. Biochem Biophys Res Commun. 1972;46:849-854.
  30. 宋炳基. 韓方婦人科學. 서울: 행림출판. 1995:17-19.
  31. 松岡建平. 成人病的 豫防과 治療. 서울: 日月書閣. 1987:133-134, 137-138.
  32. 이연태. 最新免疫學. 서울: 集文堂. 1989:355-358.
  33. 박광균. 구강생화학. 서울: 군자출판사. 1999:318-325.
  34. 姜明孜. 臨床婦產科學. 서울: 成輔社. 1989:104-107.
  35. 張機. 仲經全書. 集文書局. 1972:172-173, 228, 236.
  36. 史載祥 등. 實用血瘀證學. 인민위생출판사. 1999:1-3, 5-8, 15-16.
  37. 한방병리학교재편찬위원회. 한방병리학. 한의문화사. 2007:52-57, 111-117, 389, 475.
  38. 전병훈 등. 瘀血의 개념에 관한 동의학적 고찰. 대한동의병리학회지. 1989;4(1):93 -102.
  39. 張之南 등. 血瘀證與活血化瘀研究. 上海科學技術出版社. 1990:429-431.
  40. 康舞洙. 한의학에서 瘀血에 대한 개념. 대한한의학회지. 1984;5(1):138-140.
  41. 성도중의학원. 中醫方劑與治法. 사천: 사천과학기술출판사. 1984:367.
  42. 양의아 등. 중의학문답(상). 북경: 인민위생출판사. 1985:118.
  43. 장진여. 風火痰瘀論. 북경: 인민위생출판사. 1986:113-114.
  44. 唐宗海. 血證論. 力行書局有限公司. 1984:115-120.
  45. 王清任. 醫林改錯. 서울: 一中社. 1992:85-86.
  46. Halliwell B, Gutterridga JM. Oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem J. 1984;219:1-14.
  47. Halliwell B, Gutterridga JM. Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford Universitu Press. 1999.
  48. Lee JM. Protective effect of Ganoderma lucidum and Panax ginseng, C.A. Meyer on oxidative damage. Seoul National University MS Thesis. 1997.
  49. Cheng ZJ et al. Antioxidantat properties of butein isolated from Dalbergia odorifera. Biochim Biophys Acta. 1987;1392:291-299.
  50. Korycka-Dahl M et al. Superoxide Dismutase Activity in Bovine Milk Serum. J Food Protection. 1994;42:867-871.
  51. Scott MG, Hancock RE. Cationic antimicrobial peptides andtheir multifunctional role in the immune system. Crit Rev Immunol. 2000;20

- :407-431.
52. 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.
  53. Feldman M et al. Anti-TNF- $\alpha$  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.
  54. Brian TP et al. The effect of fetal acidemia on fetal-placental vascular tone and production of inflammatory cytokines interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2002; 187(4):894-897.
  55. Charles NL Jr et al. Expression of cyclooxygenase-2 in cervical, endometrial, and ovarian malignancies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2003;188(5):1174-1176.
  56. 이지현 등. 배양된 인간 영양배엽세포주에서 세균내독소에 의한 MMP-2와 MMP-9의 발현에 있어서 COX-2. 대한산부회지. 2002;45(10): 1752-1757.
  57. 지병철, 문신용. Nitric Oxide가 인간 황체화 과립막세포의 아포프토시스에 미치는 영향. 대한산부회지. 2002; 45(5):766-773.
  58. Ryu JH et al. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage. *Phytother Res.* 2003;17:485-489.
  59. Mu MM et al. The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *J. Endotoxin Res.* 2001;7:431-438.