

## 血府逐瘀湯加味方の 炎症 病理 因子와 酸化力 損傷에 미치는 영향

대전대학교 한의과대학 부인과교실

한혜숙, 임현정, 신선미, 김수민, 이정은, 유동열

### ABSTRACT

#### The Experimental Study on Anti-oxidant and Anti-inflammatory Effect Hyulbuchukeotanggamibang (HBCT)

Hye-Suk Han, Hyun-Jung Lim, Sun-Mi Shin, Soo-Min Kim, Jung-Eun Lee,  
Dong-Youl Yoo

Dept. of Oriental Medicine Graduate School, Daejeon University

**Purpose:** This study was performed to evaluate anti-inflammatory effects of Hyulbuchukeotanggamibang water extract (HBCT).

**Methods:** In the study of anti-inflammatory effects, HBCT was investigated using cultured cells and a 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 determined in mouse lung fibroblast cells (mLFCs) and RAW264.7 cells.

**Results:** Prior to the experiment, we investigated the cytotoxicity of HBCT. HBCT showed a safety in cytotoxicity on mLFCs. In experiment of anti-inflammatory effect, HBCT effected scavenging activity on DPPH free radical, superoxide dismutase and superoxide anion radical. HBCT inhibited IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , COX-2 and NOS-II mRNA expression in a concentration-dependent manner in RAW264.7 cell line, and inhibited significantly IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  production at 100 $\mu$ g/ml in a concentration-dependent manner.

**Conclusion:** These results suggest that HBCT can be used for treating diverse female diseases caused by inflammation such as endometriosis, pelvic pain, cervicitis, pelvic inflammatory disease and pelvic tuberculosis and so forth.

**Key Words:** Hyulbuchukeotanggamibang, anti-inflammatory effects, inflammatory cytokines, RAW264.7 cell.

## I. 서 론

血府逐瘀湯은 清代 王<sup>1)</sup>의 《醫林改錯》에 처음으로 수록된 처방으로, 婦人科 領域에서는 瘀血로 인한 無月經, 月經痛, 胎盤의 殘留, 稽留流產 등의 치료에 활용되고 있으며<sup>2,3)</sup>, 여기에 行血補血, 清熱除濕, 消瘀止痛의 효능이 있는 鷄血藤<sup>4)</sup>을 加한 血府逐瘀湯加味方은 活血祛瘀의 효과를 증대시킨 경험방이다.

瘀血은 체내에 있는 혈액이 停滯된 것으로, 離經之血이나 혈액의 運行이 不暢하여 經脈이나 臟腑에 阻滯된 血液을 포함하는 병리적 산물인 동시에 중요한 발병인자 중 하나이다<sup>5-7)</sup>.

婦人은 월경, 임신, 출산이라는 고유한 생리적 특징<sup>8,9)</sup>을 가지고 있으며, 이로 인해 婦人病證의 대강을 이루고 있는 月經病, 性器病, 妊娠病과 產後病 등에서 瘀血이 病因으로서 차지하는 중요성은 매우 크다<sup>9,10)</sup>고 할 수 있다. 자궁내막증, 자궁근증, 자궁선근증, 만성 골반통, 골반울혈증후군 등의 질환의 주된 病機를 瘀血로 보고 있으며, 급·만성 골반염과 같은 여성 생식기의 염증성 질환에도 活血祛瘀法을 사용하여 좋은 치료효과를 나타내고 있다<sup>11)</sup>.

염증은 손상조직에 대한 살아있는 조직의 반응으로 발적, 발열, 종창, 동통, 기능상실이 대표적인 증상이라고 할 수 있다<sup>12,13)</sup>. 이러한 염증의 일련의 과정은 동통, 출혈, 한열, 종괴 등을 주요증상으로 하는 瘀血의 병태와 유사함을 알 수 있다<sup>14)</sup>.

血府逐瘀湯에 대한 실험적 연구로는 면역기능에 미치는 영향<sup>15)</sup>, 혈전생성관

여인자에 미치는 영향<sup>16)</sup>, 스트레스<sup>17)</sup>, 고지혈증<sup>18)</sup>, 간기능<sup>19)</sup>, 암전이 억제<sup>20)</sup>, 자궁내막증<sup>21)</sup>에 대한 효과가 규명된 바가 있으며, 行經紅花湯<sup>22)</sup>, 清熱解毒湯加鷄血藤<sup>23)</sup>, 加味薏苡仁湯<sup>24)</sup>, 加減清上防風湯<sup>25)</sup>, 四物湯<sup>26)</sup>, 升摩葛根湯加味方<sup>27)</sup> 등의 처방이 抗炎症 효과가 있음이 보고 되었으나, 血府逐瘀湯加味方の 항염증작용에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 血府逐瘀湯加味方の 抗炎症 작용을 구명하기 위하여 항산화활성에 미치는 영향과 RAW264.7 세포주에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , COX-2, NOS-II의 유전자 발현에 미치는 影響 및 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 생성량에 미치는 영향에 대하여 실험을 수행한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험

### 1. 재 료

#### 1) 동 물

실험 동물은 대한실험동물센터에서 구입한 Balb/c계 mouse를 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 1일 중 12 시간은 200-300 Lux로 조명하고, 12 시간은 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 血府逐瘀湯加味方

(HBCT)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 처방의 내용과 1첩 용량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of Hyulbuchukeotanggamibang(HBCT)

韓藥名	生藥名	用量(g)
桃仁	<i>Persicae Semen</i>	10
紅花	<i>Carthami Flos</i>	6
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	10
生地	<i>Rehmanniae Radix</i>	15
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	6
赤芍藥	<i>Paeoniae Radix Rubra</i>	12
牛膝	<i>Achyranthis Bidentatae Radix</i>	12
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	6
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	6
枳殼	<i>Aurantii Fructus</i>	10
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	6
鷄血藤	<i>Spatholobi caulis</i>	12
Total		111

### 3) 시약 및 기기

#### (1) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 Dulbecco's phosphate buffered saline, Hank's balanced salt solution, 3.8% sodium citrate, fibrinogen, heparin, lipopolysaccharide (LPS), chlorosulforrodamin-B(SRB), diethyl pyrocarbonate (DEPC), NH4Cl, KHCO3, 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-bady avidin-HRP, complete adjuvent, chloroform, RPMI-1640, isopropanol, Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), RNAzolB, acid,

magnesium chloride(MgCl<sub>2</sub>)은 Sigma (Sigma Co., USA) 제품을, normal saline은 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 kit은 R&D system (Minneapolis., USA) 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

#### (2) 기기

본 실험에 사용된 기기는 centrifuge (Beckman Co., USA), rotary vaccum 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), Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA) 등을 사용하였다.

## 2. 방 법

### 1) 검액의 조제

HBCT 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°C deep freezer에서 4시간 동안 방치하고, 24시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하여 24.0 g의 분말을 얻어서 실험에 필요한 농도로 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

### 2) 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. 원심 분리 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.

### 3) 세포독성 측정

mLFCs에 HBCT (200  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml)를 처리하고, 배양 종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척한 후, 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50  $\mu$ l를 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  $\mu$ l/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4-5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10mM Tris Base로 100  $\mu$ l/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 4) 항산화 활성 측정

#### (1) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 소거능 측정

150mM DPPH/EtOH 150  $\mu$ l에 HBCT를 1000, 500, 250, 125, 62.5  $\mu$ g/ml 농도로 희석하여 100  $\mu$ l씩 첨가한 후 37°C에

서 30분간 반응시켰다. 이를 흡광도 517 nm에서 측정하여 아래의 방법으로 계산하였다.

$$\text{DPPH 소거능 (\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{HBCT 투여군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

(2) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

HBCT 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.

$$\text{SOD 유사활성 (\%)} = 100 - \frac{\text{HBCT 투여군의 흡광도}}{\text{buffer 첨가군의 흡광도}} \times 100$$

(3) Superoxide anion radical(SAR) 소거활성 측정

Superoxide anion radical 소거능 측정은 xanthine, xanthine oxidase를 이용하여 NBT법으로 측정하였다. 0.1mM 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 HBCT를 1000, 500, 250, 125, 62.5 ( $\mu\text{g/ml}$ )의, 농도로 섞은 후 xanthine oxidase 0.2 unit/ml을 가하여 15분 동안 반응하였다. 반응 후 550 nm에서 측정하였다. 대조군은 DW를 첨가하여 사용하였다.

$$\text{Superoxide anion radical 소거능 (\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{HBCT 투여군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

5) Quantitative real-time-PCR

(1) RAW264.7 세포 배양

Murine macrophage cell line RAW264.7 세포주를 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 원심 분리하였다. 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) RAW264.7 세포에서 RNA 분리

먼저 RAW264.7 세포주는 24 well plate에  $1 \times 10^6$  세포로 분주하였다. 여기에 HBCT (100  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ )를 처리하고 1시간 후 lipopolysaccharide (LPS) 2  $\mu\text{g/ml}$ 를 각각의 well에 첨가한 후 6시간 배양하고 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고, 여기에 RNazolB 500  $\mu\text{l}$ 를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl<sub>3</sub>) 50  $\mu\text{l}$ 를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200  $\mu\text{l}$ 의 상층액을 회수하여 2-propanol 200  $\mu\text{l}$ 와 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 DEPC를 처리한 20  $\mu\text{l}$ 의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(3) 역전사-중합효소 연쇄 반응

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3  $\mu\text{g}$ 을 DNase I (10 U/ $\mu\text{l}$ ) 2U/tube를 37°C heating block에서 30분간 반응한 후 75°C에서 10분 동안 변성시키고, 이에 2.5  $\mu\text{l}$  10 mM dNTPs mix, 1  $\mu\text{l}$  random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25  $\mu\text{l}$ ), RNA inhibitor로서 1  $\mu\text{l}$  RNase inhibitor (20 U/ $\mu\text{l}$ ), 1  $\mu\text{l}$  100 mM DTT, 4.5  $\mu\text{l}$  5×RT buffer (250 mM, Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>)를 가한 후, 1  $\mu\text{l}$ 의 M-MLV RT (200 U/ $\mu\text{l}$ )를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로써 최종 부피가 20  $\mu\text{l}$ 가 되도록 하였다.

이 20  $\mu\text{l}$ 의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심 침강하여 37°C heating block에서 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.

(4) 정량적 중합 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.

G3PDH	Forward Primer 5' TGAAGCAGGCATCTGAGGG 3' Reverse Primer 5' CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG 3'
TNF-alpha	Forward Primer 5' TTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCC 3' Reverse Primer 5' GTATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG 3'
IL-6	Forward Primer 5' TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC 3' Reverse Primer 5' GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG 3'
IL-1 $\beta$	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°C에서 2분, 94°C에서 10분간 반응하여 pre-denaturation 시킨 뒤, 95°C에서 15초, 60°C에서 1분간 반응하여 40회 반복 수행하였다. HBCT 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

6) 염증 cytokine 생성량 분석

RAW264.7 세포주는 24 well plate에  $1 \times 10^6$  세포로 분주한 후 여기에 HBCT (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 배양하였다. 이를 수집하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 의 냉동고에 보관한 후 IL- $1\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  ELISA kit의 방법에 따라 분석하였다 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 통계 처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는  $\text{mean} \pm \text{standard error}$ 로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

### III. 성 적

#### 1. 세포독성

mLFCs에서 대조군의 세포 생존율을  $100.0 \pm 6.5\%$ 로 고정하였을 때, HBCT 200, 100, 50, 10, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서는 각각  $78.9 \pm 5.6$ ,  $86.4 \pm 5.8$ ,  $90.1 \pm 3.9$ ,  $96.1 \pm 4.3$ ,  $115.4 \pm 4.8\%$ 로 나타났다(Fig. 1).

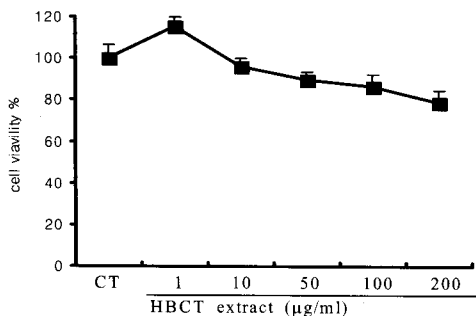


Fig. 1. Cytotoxicity of HBCT on mouse lung fibroblast cells (mLFCs). mLFCs were treated with various concentration (200, 100, 50, 10, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) of the HBCT extract.

#### 2. 항산화 활성에 미치는 영향

##### 1) DPPH 소거 활성능

DPPH의 소거 활성능은 HBCT 1000,

500, 250, 125, 62.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각각  $85.35 \pm 0.33$ ,  $82.31 \pm 0.52$ ,  $59.38 \pm 0.81$ ,  $35.58 \pm 2.77$ ,  $20.69 \pm 1.90\%$ 의 소거 활성 효과를 나타내었다(Fig. 2).

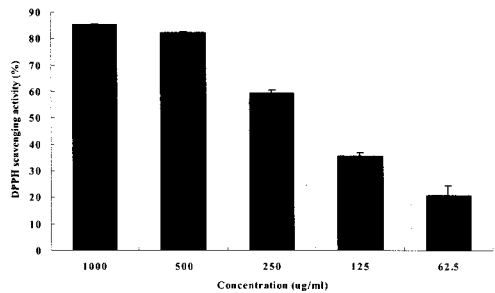


Fig. 2. Scavenging activity of HBCT on DPPH free radical.

HBCT were reacted with DPPH for 30 minutes at  $37^{\circ}\text{C}$ , and the absorbance at 518 nm due to DPPH radical was determined. The results were the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

##### 2) SOD 유사 활성능

SOD 유사 활성능은 HBCT 1000, 500, 250, 125, 62.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각각  $57.93 \pm 3.13$ ,  $50.71 \pm 4.36$ ,  $29.97 \pm 3.35$ ,  $29.69 \pm 3.81$ ,  $23.63 \pm 1.00\%$ 의 유사활성을 나타내었다(Fig. 3).

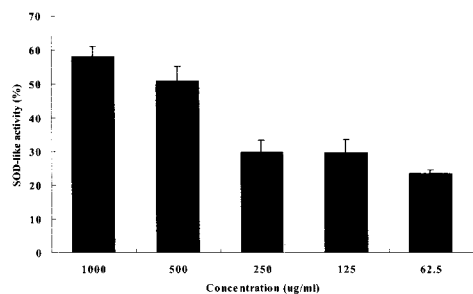


Fig. 3. Scavenging activity of HBCT on Superoxide dismutase.

HBCT were reacted with tris-HCl buffer (pH 8.5) 2.6 ml and 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml for 10 minutes at  $25^{\circ}\text{C}$ , and the absorbance at 420nm to 1 N HCl 0.1 ml was determined. The results were the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

3) SAR 소거 활성능

SAR의 소거 활성능은 HBCT 1000, 500, 250, 125, 62.5  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각  $63.03 \pm 0.12$ ,  $45.86 \pm 0.69$ ,  $33.61 \pm 2.33$ ,  $27.51 \pm 0.84$ ,  $9.71 \pm 0.58\%$ 의 소거 활성 효과를 나타내었다(Fig. 4).

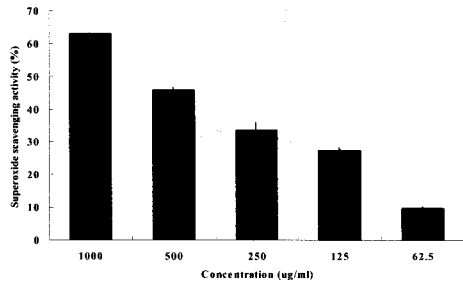


Fig. 4. Scavenging activity of HBCT on Superoxide anion radical.

HBCT were reacted with 50 mM 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 were the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

3. RAW264.7 세포주에서 염증 cytokine 유전자 발현에 미치는 영향

1) IL-1 $\beta$  유전자 발현

RAW264.7 세포주에서 IL-1 $\beta$  유전자 발현 RQ 값은 정상군이  $0.021 \pm 0.008$ , 대조군이  $0.995 \pm 0.006$ , CSA 투여군이  $0.22 \pm 0.061$ 로 나타났으며, HBCT 100, 50, 10  $\mu\text{g/ml}$  농도 투여군에서는 각각  $0.144 \pm 0.022$ ,  $0.331 \pm 0.11$ ,  $0.631 \pm 0.021$ 로 나타나 대조군에 비해 모든 농도에서 유의성 있는 ( $***p < 0.001$ ) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 5).

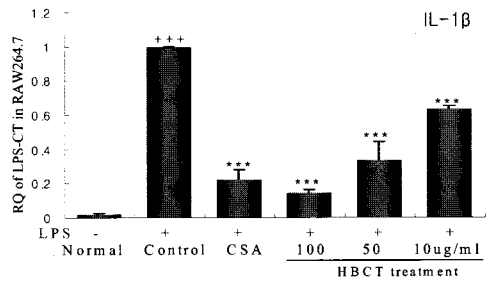


Fig. 5. Inhibitory effects of HBCT extract on IL-1 $\beta$  mRNA expression in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of HBCT extract (100, 50, and 10  $\mu\text{g/ml}$ ) in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS; 2  $\mu\text{g/ml}$ ) 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 ( $***p < 0.001$ ).

2) IL-6 유전자 발현

RAW264.7 세포주에서 IL-6 유전자 발현 RQ 값은 정상군이  $0.124 \pm 0.091$ , 대조군이  $1.006 \pm 0.006$ , CSA 투여군이  $0.203 \pm 0.006$ 로 나타났으며, HBCT 100, 50, 10  $\mu\text{g/ml}$  농도 투여군에서는 각각  $0.535 \pm 0.06$ ,  $0.719 \pm 0.004$ ,  $0.977 \pm 0.041$  RQ 값을 나타내어, 대조군에 비해 100, 50  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 유의성 있는 ( $***p < 0.001$ ,  $***p < 0.001$ ) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 6).

3) TNF- $\alpha$  유전자 발현

RAW264.7 세포주에서 TNF- $\alpha$  유전자 발현 RQ 값은 정상군이  $0.027 \pm 0.007$ , 대조군이  $1.006 \pm 0.006$ , CSA 투여군이  $0.238 \pm 0.060$ 로 나타났으며, HBCT 100, 50, 10  $\mu\text{g/ml}$  농도 투여군에서는 각각  $0.171 \pm 0.004$ ,  $0.231 \pm 0.075$ ,  $0.558 \pm 0.047$  RQ 값을 나타내어 대조군에 비해 모든 농도에서 유의성 있는 ( $***p < 0.001$ ) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 7).



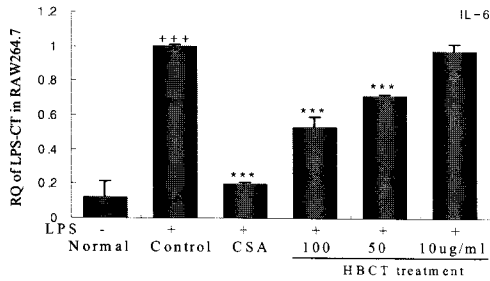


Fig. 6. Inhibitory effects of HBCT extract on IL-6 mRNA expression in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of HBCT extract (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).

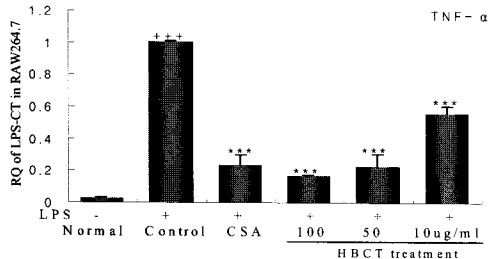


Fig. 7. Inhibitory effects of HBCT extract on TNF- $\alpha$  mRNA expression in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of HBCT extract (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).

#### 4) COX-2 유전자 발현

RAW264.7 세포주에서 COX-2 유전자 발현 RQ 값은 정상군이  $0.202 \pm 0.06$ , 대조군이  $1.106 \pm 0.106$ , CSA 투여군이  $0.268 \pm 0.055$ 로 나타났으며, HBCT 100,

50, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 투여군에서는 각각  $0.211 \pm 0.052$ ,  $0.208 \pm 0.013$ ,  $0.29 \pm 0.077$  RQ 값을 나타내어 대조군에 비해 모든 농도에서 유의성 있는 (\*\*p<0.01) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 8).

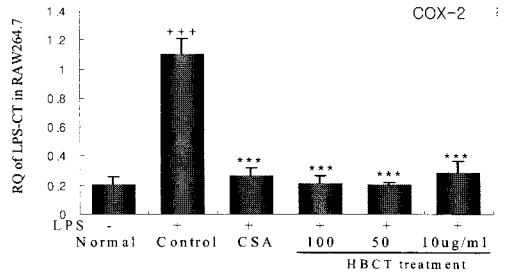


Fig. 8. Inhibitory effects of HBCT extract on COX-2 mRNA expression in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of HBCT extract (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).

#### 5) NOS-II 유전자 발현

RAW264.7 세포주에서 NOS-II 유전자 발현 RQ 값은 정상군이  $0.13 \pm 0.045$ , 대조군이  $1.067 \pm 0.067$ , CSA 투여군이  $0.122 \pm 0.042$ 로 나타났으며, HBCT 100, 50, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 투여군에서는 각각  $0.516 \pm 0.045$ ,  $0.61 \pm 0.138$ ,  $0.819 \pm 0.102$  RQ 값을 나타내어 대조군에 비해 모든 농도에서 유의성 있는 감소 효과를 나타내었다(Fig. 9).

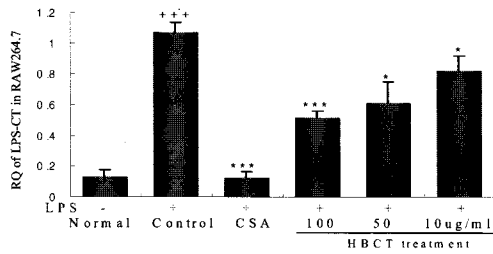


Fig. 9. Inhibitory effects of HBCT extract on NOS-II mRNA expression in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of HBCT extract (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 ( $*p<0.05$ ,  $***p<0.001$ ).

#### 4. RAW264.7 세포주에서 염증 cytokine 생성량에 미치는 영향

##### 1) IL-1 $\beta$ 생성량

ELISA kit로 측정된 IL-1 $\beta$  생성량은 정상군이  $38.5 \pm 18.2$  pg/ml, 대조군이  $701.0 \pm 59.4$  pg/ml, HBCT 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 투여군이  $463.0 \pm 82.0$  pg/ml, HBCT 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 투여군이  $556.5 \pm 62.9$  pg/ml로 나타나, 대조군에 비하여 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 투여군에서 유의성 있는 ( $*p<0.05$ ) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 10).

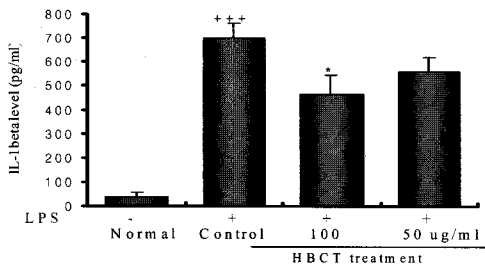


Fig. 10. Effect of HBCT extract on the levels of IL-1 $\beta$  in the RAW264.7 cell. RAW264.7 cell was collected from the

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

ELISA kit로 측정된 IL-6 생성량은 정상군이  $363.0 \pm 77.8$  pg/ml, 대조군이  $6002.0 \pm 729.7$  pg/ml, HBCT 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 투여군이  $3718.0 \pm 485.7$  pg/ml, HBCT 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 투여군이  $4633.5 \pm 98.2$  pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 유의성 있는 ( $*p<0.05$ ) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 11).

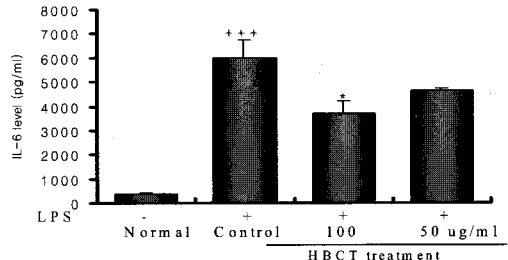


Fig. 11. Effect of HBCT extract on the levels of IL-6 in the RAW264.7 cell.

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 ( $*p<0.05$ ).

##### 3) TNF- $\alpha$ 생성량

ELISA kit로 측정된 TNF- $\alpha$  생성량은 정상군이  $272.5 \pm 81.3$  pg/ml, 대조군이  $3243.5 \pm 392.4$  pg/ml, HBCT 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$

농도 투여군이  $1824 \pm 270.1$  pg/ml, HBCT 50  $\mu$ g/ml 농도 투여군이  $2578.5 \pm 146.2$  pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 100  $\mu$ g/ml 농도에서 유의성 있는 (\* $p < 0.05$ ) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 12).

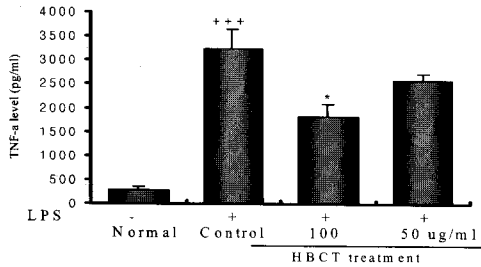


Fig. 12. Effect of HBCT extract on the levels of TNF- $\alpha$  in the RAW264.7 cell. RAW264.7 cell was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. The levels of TNF- $\alpha$  were 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 (\* $p < 0.05$ ).

#### IV. 고찰

瘀血이란 생리적 기능을 상실한 혈액이 凝滯하여 형성된 일종의 病理的 산물인 동시에 발병인자가 되는 것으로, 經脈 外로 溢出하여 조직 간에 축적됨으로써 괴사된 혈액인 惡血과 혈액순환이 장애를 받아 經脈管內나 器官內에 瘀積된 畜血도 모두 瘀血의 범위에 속한다<sup>28-30</sup>.

瘀血이 발생하여 혈류가 원활하게 흐르지 못하면 결과적으로 氣의 運行을 방해하여 氣滯를 형성한다. 氣滯는 瘀血을 가중시키고, 瘀血은 다시 氣滯를 가중시키는 악순환이 계속되어 氣血이 통하지 않게 되며 그 결과로 痛症을 유발하게

된다. 瘀血이 비교적 甚하고 지속되면 결국 腫塊를 형성하게 되고 이로 인해 脈中의 혈류가 원활하지 못하고 완만해져 혈액이 脈中에 축적되어 血液이 점차 紫色으로 변하고, 경우에 따라서 어떤 부위의 絡脈은 혈액이 쌓여 확장케 된다. 결국 동통, 출혈, 한열, 종괴, 말초혈관의 확장 등 瘀血의 주요증상이 나타나게 되는 것이다<sup>14,31</sup>. 이러한 어혈의 병태는 발적, 발열, 종창, 동통, 기능상실이 대표적인 증상이라고 할 수 있는 염증반응<sup>12</sup>)과 유사함을 알 수 있으며, 최근의 어혈에 관한 다양한 연구에서는 대사장애로 일어나는 조직의 병리반응 및 세포분화불량과 염증으로 인한 조직의 삼출, 변성, 괴사, 위축 혹은 증식 등이 瘀血의 病態와 유사하다고 보고 있다<sup>31</sup>.

손상부위의 혈관, 신경, 세포, 체액의 반응이 관여하는 복잡한 과정으로 이루어지는 염증반응은 살아있는 조직, 즉 혈관이 있는 조직에서만 일어날 수 있는 특징을 가지고 있다<sup>12,13</sup>. 즉 염증은 미세혈관계를 통하여 나타나는 생체의 방어 기전으로 면역계를 동반하는 생체의 방어와 치유에 핵심적인 역할을 하고 있을 뿐 아니라 많은 질병의 병리작용에 관련되어 있는 대단히 중요한 과정으로 이해될 수 있다<sup>12,32</sup>.

염증의 증상은 세균 감염 부위에 혈관이 확장되어 발적과 발열을 유발하며 모세혈관의 투과성이 증가되어 조직으로 체액과 세포들이 나와 삼출액이 축적되어 부종을 유발하게 되는데, 이는 전신 증상과 국소증상으로 나눌 수 있다. 전신증상은 발열, 피로, 식욕감퇴, 쇠약 등이 있고, 국소증상으로는 발적, 발열, 종창, 동통, 기능상실 등이 있는데, 이와 같

은 炎症의 국소적 증상의 발현기전은 혈류 및 혈관크기의 변동(changes in vascular flow and caliber), 혈관투과성의 변화(permeability changes), 백혈구침윤(leukocytic infiltration)에 기인한다<sup>12,13,33</sup>.

血府逐瘀湯은 清代 王清任이 저술한 《醫林改錯》<sup>1)</sup>에 최초로 기록되어 있는 처방으로 活血行瘀시키는 桃紅四物湯과 疏肝理氣시키는 四逆散, 胸膈의 結氣를 열어주는 桔梗과 瘀血을 下行시키는 牛膝로 구성되어 一切의 氣滯血瘀證을 通治<sup>2,34-36</sup>한다.

血府逐瘀湯加味方を 구성하는 약물별 효능을 살펴보면, 加味한 鷄血藤은 行血하되 陰血을 傷하지 않게 하며 補血하되 滯血하지 않게 하는 장점이 있어 婦女의 月經不調와 痛經 및 經閉의 證을 치료한다<sup>4,37</sup>. 當歸는 補血和血, 調經止痛, 破惡血, 養新血 함으로써 一切의 血證을 치료하고, 生地黃은 涼血, 消瘀, 痛經함으로써 陰虛發熱, 吐衄崩中, 瘀血瘤血, 折跌絕筋 등 證을 치료한다. 桃仁은 活血, 破血, 祛瘀하고 紅花는 活血, 祛瘀, 痛經함으로써 血滯經閉, 癥瘕積聚, 跌打損傷 등 證을 치료하고, 枳殼은 破氣, 行痰, 消積함으로써 胸痞結胸, 脘腹, 痞悶脹滿, 心腹結氣 등 證을 치료하며, 赤芍藥은 清熱涼血, 活血散瘀함으로써 經閉, 跌打損傷, 疝瘕積聚 등 氣血瘀滯의 證을 치료하고, 柴胡는 退熱, 疏肝解鬱, 升舉陽氣하고 血凝氣滯를 散함으로써 肝氣鬱結 胸脇疼痛, 月經不調 등 證을 치료하며, 甘草는 補中益氣, 痛經脈함으로써 十二經을 通行시키고 諸藥을 調和시킨다. 桔梗은 開宣肺氣 함으로써 開胸膈滯氣하며, 川芎은 行氣開鬱, 活血止痛, 消瘀血

함으로써 月經不調, 產後瘀滯腹痛, 跌打損傷, 癰疽瘡瘍 등 證을 치료하고, 牛膝은 散惡血, 破癥結, 痛經함으로써 婦女血滯經閉, 痛經, 月經不調, 跌打損傷 등의 瘀滯作痛 등을 치료한다<sup>38-42</sup>.

이상으로 보아 血府逐瘀湯加味方は 活血祛瘀, 清熱除濕하는 효능이 있어서, 瘀血로 인한 현대의학에서의 炎症에 좋은 효과를 나타낼 것으로 사료된다.

이에 著者는 血府逐瘀湯加味の 抗炎症作用의 究明을 위해서 항산화 활성에 미치는 영향과 RAW264.7 세포주에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , COX-2, NOS-II의 遺傳子 發現에 미치는 影響 및 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 생성량에 미치는 영향에 대한 實驗을 수행하였다.

먼저 실험 농도의 설정을 위해 mLFCs에 대한 세포독성을 평가하였는데 血府逐瘀湯加味方(HBCT)은 200, 100, 50, 10 및 1  $\mu$ g/ml 농도에서 대조군( $100 \pm 6.5\%$ )에 비해 각각  $78.9 \pm 5.6$ ,  $86.4 \pm 5.8$ ,  $90.1 \pm 3.9$ ,  $96.1 \pm 4.3$ ,  $115.4 \pm 4.8\%$ 로 나타나 세포독성이 없는 것으로 평가되었다(Fig. 1).

산소가 필요한 대사과정에서 불가피하게 세포를 파괴시키는 독성물질들이 부산물로 만들어지는데 이것을 활성산소라고 한다. 활성산소는 생체 조직을 공격하여 세포를 산화, 손상시키는 주범이며 유해산소라고도 한다. 체내산화에 수반되는 활성 산소종(reactive oxygen species; ROS)으로서는 oxygen ( $^1O_2$ ), superoxide ( $O_2^-$ ), hydroxy radical ( $HO^{\cdot}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )등이 있으며, 이러한 활성 산소종들은 염증 반응에 관여 한다<sup>42</sup>. 인체에 흡입된 산소의 일부가  $O_2^-$  (superoxideanion),  $HO^{\cdot}$  (hydroxy radical),

$H_2O_2$ (hydrogen peroxide),  $O_2$ (singlet oxygen) 등과 같은 활성산소인 free radical로 변환되어 지질의 과산화반응을 진행시켜 세포막의 파괴, 세포의 노화, DNA에 대한 세포손상을 유발시켜 생체의 기능을 약화시킨다. 인체 내에는 활성산소의 독성으로부터 조직을 보호하고 항상성을 유지하려는 방어계로는 selenium, Vt. C, E 등의 비효소계와 SOD와 catalase, peroxidase 등과 같은 효소계가 존재 한다<sup>44,45)</sup>. 특히 SOD는 세포내에 생성된  $O_2^-$ 를  $H_2O_2$ 로 전환시키는 효소로서 알려져 있다<sup>46,47)</sup>.

이에 抗酸化활성에 미치는 영향을 실험적으로 입증하고자 DPPH 소거 활성, SOD 유사 활성, SAR 소거활성을 측정 한 결과, HBCT 1000, 500, 250, 125, 62.5  $\mu g/ml$  농도에서 DPPH 소거 활성 효과, SOD의 유사 활성 및 SAR의 소거 활성 효과를 나타냈다(Fig. 2-4). 이는 血府逐瘀湯加味方이 활성산소의 독성으로부터 조직을 보호하고 항상성을 유지시키는 작용이 있음을 의미한다.

염증반응은 국소반응과 전신반응으로 나누게 되는데, 그 중 전신반응은 그 원인과 반응조직의 차이에 상관없이 거의 유사한 조직학적 변화를 보인다. 이러한 현상은 조직 손상 후에 일어나는 변화로서 손상에 의하여 생체 내 국소부위에 유리되는 공통적인 물질요인의 존재를 추정하게 한다. 이러한 물질을 염증의 화학적 매개체라고 하는데 여기에는 혈관 활성 아민류, 혈장단백 분해효소, 아라키돈산 대사물 (prostaglandin, leukotriene), 산소유래유리기 (oxygen-derived free radical), 혈소판 활성인자, 산화질소(NO), cytokine 등이 있다<sup>12,13)</sup>.

Cytokine이란 세포, 주로백혈구에서 분비되는 단백질성 물질인데, 이 중에 특이면역에 관여는 cytokine들은 인터루킨 (interleukin, IL)이라고도 부른다<sup>48,49)</sup>.

면역과 염증에 관련된 여러 cytokines 중 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 cytokines으로, IL-6는 B-cell과 T-cell의 증식과 분화를 촉진시키며 면역계와 조절계에 다양한 기능을 나타내는데, 주로 B-cell, T-cell, monocyte 등에 의해 분비되며, 면역계에서 면역반응, 급성기 반응과 hematopoiesis를 조절하는 역할과 함께 host defense mechanism에서 중요한 역할을 담당 한다<sup>50,51)</sup>. TNF- $\alpha$ 는 대식세포와 비만세포 등에서 분비되어 염증세포에서 IL-1과 유사한 염증유발 작용과 세포의 증식과 분화를 조절하고 만성염증이나 감염에서도 역할을 하며 중성구를 자극하여 탐식작용과 탈과립 등을 증가시켜 염증반응에서 중요한 역할을 한다. 특히 TNF- $\alpha$ 는 염증이 발생된 부위에는 높은 농도로 존재하며, 최근에는 TNF- $\alpha$ 를 차단하는 약물들이 염증의 치료제로 연구되고 있다<sup>50-52)</sup>.

HBCT의 항염증 효과에 대한 연구에서 대표적인 염증성 cytokines인 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 유전자 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 평가한 결과, RAW264.7 세포주에서 IL-1 $\beta$  유전자 발현 RQ 값은 대조군  $0.095 \pm 0.006$ 에 비해 HBCT 투여군 100, 50, 10  $\mu g/ml$ 에서 각각  $0.144 \pm 0.022$ ,  $0.331 \pm 0.11$ ,  $0.631 \pm 0.021$ 로 나타나 대조군에 비해 모든 농도에서 유의성 있는 감소효과를 나타내었고, IL-6 유전자 발현 RQ 값도 대조군  $1.006 \pm 0.006$ 에 비해 HBCT 투

여균 100, 50, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각각  $0.535 \pm 0.06$ ,  $0.719 \pm 0.004$ ,  $0.977 \pm 0.041$ 로 나타나 대조군에 비해 100, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 유의성 있는 감소 효과를 나타내었다. 또한, TNF- $\alpha$  유전자 발현 RQ 값도 대조군  $1.006 \pm 0.006$ 에 비해 HBCT 투여군 100, 50, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각각  $0.171 \pm 0.004$ ,  $0.231 \pm 0.075$ ,  $0.558 \pm 0.047$ 로 나타나 대조군에 비해 모든 농도에서 유의성 있는 감소 효과를 나타내었다.

이상에서 HBCT 100, 50, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  투여군은 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 유전자 발현을 각각 대조군에 비해 농도의존적으로 억제하였는데 (Fig. 5-7), 이는 血府逐瘀湯加味方이 면역계와 조혈계에 영향을 미침을 의미한다.

그리고 염증 cytokine의 생성량을 평가한 결과, RAW264.7 세포주에서 IL-1 $\beta$  생성량이 정상군이  $38.5 \pm 18.2$  pg/ml, 대조군이  $701.0 \pm 59.4$  pg/ml HBCT 투여군 100, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각각  $463.0 \pm 82.0$ ,  $556.5 \pm 62.9$  pg/ml로 나타나, 대조군에 비해 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 투여군에서 유의성 있는 ( $p < 0.05$ ) 감소 효과를 나타내었고, IL-6 생성량 역시 정상군  $363.0 \pm 77.8$  pg/ml, 대조군  $6002.0 \pm 729.7$  pg/ml, HBCT 투여군 100, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각각  $3718.0 \pm 485.7$ ,  $4633.5 \pm 98.2$  pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 유의성 있는 ( $p < 0.05$ ) 감소 효과를 나타내었다.

또한, TNF- $\alpha$  생성량도 정상군  $272.5 \pm 81.3$ , 대조군  $3243.5 \pm 392.4$  pg/ml, HBCT 투여군 100, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각각  $1824 \pm 270.1$ ,  $2578.5 \pm 146.2$  pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$

농도에서 유의성 있는 ( $p < 0.05$ ) 감소 효과를 나타내었다.

Cyclooxygenase(COX)는 arachidonic acid로부터 prostaglandin(PG)을 생성하는 과정에 작용하는 효소이며, 현재 COX-1과 COX-2가 알려져 있다. COX-1은 조직 내에서 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- $\alpha$ 와 같은 cytokines 그리고 그람 음성균의 세포 표면에 존재하는 단백질로서 염증반응의 가장 중요한 역할을 하는 물질로 알려진 lipopolysaccharide(LPS)가 있으며 IL-2와 IL-10에 의해 억제된다<sup>53,54</sup>.

RAW264.7 세포주에서 COX-2 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군 값이  $0.268 \pm 0.055$ , 대조군이  $1.106 \pm 0.106$ 로 나타났으며, HBCT 100, 50 및 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  투여군에서는 각각  $0.211 \pm 0.052$ ,  $0.208 \pm 0.013$ ,  $0.29 \pm 0.077$ 의 RQ 값을 나타내어 대조군에 비해 농도의존적으로 유전자 발현을 억제하였다 (Fig. 8).

Nitric Oxide(NO)는 생체 내 혈관에서 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 (NOS)의 작용으로 L-arginine이 산화되면 L-citrulline과 NO를 생성하게 된다. NOS는 일종의 산화효소로서 혈관내피세포성 NOS, 신경세포성 NOS 및 유도성 NOS(iNOS)의 세 가지 아형으로 존재한다. 혈관내피세포성 NOS, 신경세포성

NOS는 활성화하는데 칼슘과 calmodulin이 필요하며 지속적으로 분비되는 반면 iNOS는 칼슘과 무관하게 활성화되며 염증성 cytokine이나 LPS등에 반응하여 분비된다<sup>55)</sup>.

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 염증반응 및 염증 초기반응 물질에 의해 상승 조절되고, 활성화된 이들 효소에 의한 생성물이 급성 및 만성 염증반응의 중요한 매개체로 작용한다고 알려져 있다<sup>56)</sup>.

RAW264.7 세포주에서 NOS-II 유전자 발현에 미치는 영향을 알아본 결과, RQ 값은 正常群이  $0.13 \pm 0.045$ , 대조군이  $1.067 \pm 0.067$ 로 나타났으며, HBCT 100, 50 및 10  $\mu\text{g/ml}$  투여군에서는 각각  $0.516 \pm 0.045$ ,  $0.61 \pm 0.138$ ,  $0.819 \pm 0.102$ 의 RQ 값을 나타내어 대조군에 비해 농도의존적으로 유전자 발현을 억제하였다 (Fig. 9).

또한 RAW264.7 세포주에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 생성량을 측정한 결과 HBCT 100  $\mu\text{g/ml}$  투여군은 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 생성을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 10-12).

이상의 실험적 연구 결과를 종합하여 볼 때, 血府逐瘀湯加味方(HBCT)은 DPPH 소거 활성효과, SOD 유사 활성 및 SAR 소거 활성효과를 나타냈고, RAW264.7 세포주에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  및 COX-2, NOS-II의 유전자 발현을 유의성 있게 억제하였으며, IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 생성을 유의성 있게 억제하였

으므로, HBCT의 抗炎症 효과가 입증되었다고 판단된다.

## V. 결 론

血府逐瘀湯加味方(HBCT)의 抗炎症 효과의 규명을 위하여 염증 관련 cytokine의 유전자 발현과 생성량에 미치는 영향 등을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 血府逐瘀湯加味方は 세포독성이 나타나지 않았다.
2. 血府逐瘀湯加味方は 1000, 500, 250, 125, 62.5  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 DPPH 소거 활성효과, SOD 유사 활성 및 SAR 소거 활성효과를 나타내었다.
3. 血府逐瘀湯加味方は 100, 50, 10  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , COX-2 및 NOS-II의 유전자 발현을 유의성 있게 억제하였으며, 100, 50  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 IL-6의 유전자 발현을 유의성 있게 억제 하였다.
4. 血府逐瘀湯加味方は 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 생성을 유의성 있게 억제하였다.

이상의 실험 결과로 보아 血府逐瘀湯加味方(HBCT)은 抗炎症 효과가 인정되므로, 瘀血과 濕熱로 인한 여성의 생식기와 비뇨기 염증질환에 유효하게 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

- 투 고 일 : 2008년 1월 18일
- 심 사 일 : 2008년 1월 28일
- 심사완료일 : 2008년 2월 1일

## 참고문헌

1. 王清任. 醫林改錯. 北京: 中國中醫藥出版社. 1995:24-28.
2. 上海中醫學院. 方劑學. 香港: 商務印書館. 1977:177.
3. 楊恒茂 등. 實用中醫婦科方藥學. 西安: 陝西科學技術出版社. 1998:55-56.
4. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編. 本草學. 서울: 永林社. 1994:445-446.
5. 鄭燦吉, 金聖勳, 郭桂豪. 동의병리학. 대전: 한림원. 1994:69-73, 348, 351-355.
6. 전국한의과대학 병리학 교실編. 동의병리학. 서울: 一中社. 1999:152-165, 272-274, 424-426.
7. 易法銀 主編. 中醫瘀血證診療大全. 北京: 中國中醫藥出版社. 1999:1-11, 664.
8. 羅元愷 主編. 實用中醫婦科學. 上海: 上海科學技術出版社. 1996:13, 20-21, 277, 281.
9. 宋炳基. 韓方婦人科學. 서울: 행림출판. 1995:17-19.
10. 한의부인과학 교재편찬위원회. 韓醫婦人科學(上). 서울: 도서출판 정담. 2002:61, 101, 190-191.
11. 이정은, 유동열. 加味補陽還五湯의 抗血栓 및 抗炎작용에 대한 실험적 연구. 동의생리병리학회지. 2006;20(4):957-965.
12. 大韓病理學會. 병리학 II. 서울: 高文社. 1995:71-104, 112-120, 540-542.
13. 송계용 지제근, 함의근. 핵심 병리학. 서울: 고려의학. 1998:62-94.
14. 전국한의과대학 병리학 교실編. 동의병리학. 서울: 一中社. 1999:152-165, 272-274, 424-426.
15. 洪喜鐸, 金淳烈, 李泰均. 血府逐瘀湯이 免疫機能에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 1996;9(1):177-189.
16. 金英宣. 血府逐瘀湯이 血栓生成關與 因子에 미치는 영향. 경원대학교 대학원. 2000.
17. 崔裕旻. 血府逐瘀湯이 스트레스에 미치는 영향. 경원대학교 대학원. 2004.
18. 崔順子. 血府逐瘀湯이 STZ 糖尿病랫트의 高脂血證에 미치는 영향. 경원대학교 대학원. 2004.
19. 梁秀光. 血府逐瘀湯이 STZ 유도 糖尿病 상태의 肝 機能에 미치는 영향. 경원대학교 대학원. 2004.
20. 李眞華 등. 血府逐瘀湯이 癌轉移 抑制에 미치는 영향. 대한한방종양의학회지. 1999;5(1):61-75.
21. 馬敏珠. 血府逐瘀湯治療子宮內膜異位症. 上海中醫藥雜誌. 1993;2:16-17.
22. 閔丙鎬. RAW264.7 세포주와 염증 생쥐모델에서 抗炎症 작용에 대한 行經紅花湯의 효과. 대전대학교 대학원. 2005.
23. 韓忠熙 등. RAW264.7 세포주와 염증 생쥐모델에서 抗炎症 作用에 대한 清熱活血湯加鷄血藤의 效果. 대한한방부인과학회지. 2005;18(3):92-109.
24. 尹泰汝. 加味薏苡仁湯의 抗炎症 작용에 대한 실험적 연구. 대전대학교 대학원. 1974.
25. 徐銀成. 加減清上防風湯의 抗炎症 효과에 대한 실험적 연구. 원광대학교 대학원. 2004.
26. 崔仁暎. 비만세포주 HMC-1에서 四物湯의 抗炎症 효과. 원광대학교 대학원. 2005.
27. 宋成必. 升摩葛根湯加味方이 抗炎症



- 치료에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 2004.
28. 김성훈 등. 동의병리학. 대전: 도서출판 한림원. 1994:348-359.
  29. 이중달. 그림으로 보는 병리학. 서울: 고려의학. 1990:127-134.
  30. 길리화. 내과진단학. 서울: 제일의학사. 1994:6-8.
  31. 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.
  32. 대한피부과학회 교과서 편찬위원회. 피부과학. 서울: 여문각. 2001:161-166, 461-464.
  33. Stanley L. Robbins et al. Pathologic basis of disease, 5th ed., philadelphia: Saunders. 1994:99-114, 117-121, 318-319, 623-626.
  34. 葉威禮. 從活血化瘀十方試探王清任的臨床思惟. 福建中醫藥. 1985:16(110):2-4.
  35. 廣東中醫學院 編著. 新編中醫學 概要. 香港: 南務印書館. 1976:299-300.
  36. 陳子富. 宋向元治療經驗發揮. 北京中醫學院學報. 1986:3:149-17.
  37. 金昌玟 등. 中藥大辭典. 서울: 도서출판 정담. 1999:1:223.
  38. 李尙仁. 本草學. 서울: 成輔社. 1975: 57-59, 100-102, 107-108, 197-199, 325-326, 350-352, 398-400, 420-421, 425-427, 448-449, 455-456.
  39. 江蘇新醫學院. 中藥大辭典. 香港: 商務印書館. 1997:74-76, 220-222, 417-420, 567-573, 876-879, 992-994, 1093-1095, 1507-1508, 1775-1777, 1787-1789, 1832-1837.
  40. 李時珍. 本草綱目. 서울: 高文社. 1975: 400-403, 414-416, 456-458, 484-489, 494-496, 563-564, 596-601, 996-997, 1189-1190.
  41. 唐慎微. 重修政和經史證類備用本草. 北京: 人民衛生出版社. 1987:327-328.
  42. 上海中醫學院. 中草藥學. 香港: 商務印書館. 1977:57-60, 121, 129-130, 354-355, 378-382, 388-389, 469-471, 525-527, 564-566.
  43. McCord, J. M.. Free radicals and inflammation: protection of synorial fluid by superoxide dismutase. Science. 1974:185:529-531.
  44. Harman, D.. Freeradicaltheory of aging: Role of freeradicals in the organization and evolution of life, aging and disease process, Free Radicals, Aging and Degenerative Disease(ed. Johnson J.E., et al.). Alan R. Liss Inc., New York: 1986:3-49.
  45. Halliwell B.. Free radical and antioxidant. A personal view, Nurt. Review. 1994:52(8):253-265.
  46. Asayama K, Janco R. L., Burr I. M.. Selective induction of manganous superoxide dimutase in human monocytes. Am. J. Physiol.. 1985:249:393-397.
  47. Fridovich I. Superoxide dismutase. Adv. Enzymol. 1986:57:61-97.
  48. 김세종. 면역학길라잡이. 서울: 고려의학. 2000:65-68.
  49. 홍천수 譯. Pathophysiology로 이해하는 내과학. 서울: 도서출판 정담. 2002:10-12.
  50. Aeberi D., et al. Inhibition of the TNF-pathway use of influximab and etatnercept as remission-inducing agents in case of therapy

- resistant chronic inflammatory disorders. *Swiss Med. Wkly.* 2002; 132:414-422.
51. 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.
52. 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- $\alpha$ . *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2002;187(4):894-897.
53. Charles N. Landen, Jr, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in cervical, endometrial, and ovarian malignancies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2003;188(5):1174-1176.
54. 이지현 등. 배양된 인간 영양배엽 세포주에서 세균내독소에 의한 MMP-2와 MMP-9의 발현에 있어서 COX-2, 대한산부인과학회지. 2002;45(10):1752-1757.
55. 지병철, 문신용. Nitric Oxide가 인간 황체화 과립막세포의 아포프토시스에 미치는 영향. 대한산부인과학회지. 2002;45(5):766-773.
56. Carla Biondi et al. Interactions between the nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthetic pathways in human amnion-like WISH cells. *Journal of Reproductive Immunology.* 2003;60(1):35-52.