대한한의학 방제학회지 제16권 1호 THE KOREAN JOURNAL OF ORIENTAL MEDICAL PRESCRIPTION 16(1):79~94, 2008

# 芷貝散의 抗炎症 效能에 대한 硏究

이상현, 박찬기*
홍익한의원, *형상한의원

## ABSTRACT

# Anti-Inflammatory Effects of *Ji-Pae-San* Water Extract

Sang-Hyun Lee, Chan-Ki Park*
Hong ik Oriental Clinic, *Hyung sang Oriental Clinic

Although inflammatory mediators such as nitric oxide(NO) and pro-inflammatory cytokines are involved in host defense mechanism, these overproduction contributes to the pathogenesis of several diseases such as otitis media, hearing loss, periodontitis, bacterial sepsis, rheumatoid arthritis, chronic inflammation and autoimmune diseases. We investigate the anti-inflammatory effects of water extract from Ji-Pae-San(JPSWE) fomulated with *Angelica dahurica* plus *Fritillaria Verticillata*, *Angelica dahurica* (ADWE), and *Fritillaria Verticillata*(FUVE) *in vitro* and *in vivo*. Each extract inhibited the production of inflammatory mediators(NO, IL-1β, IL-6, TNF-α, and prostaglandin $E_2$) and the expression of inducible NO synthase(iNOS) and cyclooxygenase-2(COX-2) in lipopolysaccharide(LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages in a dose-dependent manner. These inhibitory effects were synergistically increased by their combination. JPSWE also inhibited TNF-α, IL-1β, IL-6, and $PGE_2$ production as

• 교신저자 : 박찬기
• 제주시 삼도1동 579-5번지 형상한의원
• Tel : 064-702-1075 E-mail : mrkiss@korea.com
• 접수 : 2008/ 06/ 03 채택 : 2008/ 06/ 09

well as COX activity in LPS-stimulated mice. Moreover, JPSWE significantly suppressed death by LPS-septic shock in mice(survival rate: 100%).

These results suggest that Ji-Pae-San may be useful for therapeutic drugs against inflammatory immune diseases, probably by suppressing the production of inflammatory mediators.

*Key word : Ji-Pae-San, Angelica dahurica, Fritillaria Verticillata* inflammatory mediators

## Ⅰ. 緖 論

芷貝散은 白芷(*Angelica dahurica*)와 貝母(*Fritillaria verticillata*)가 各等分으로 構成된 方劑로 祛風消腫, 淸熱散結의 效能이 있어 乳房結核에 使用하였으며[1-9] 明代 醫學入門[10]에 古芷貝散으로 收錄된 이후 東醫寶鑑[1]과 여러 醫書[2-8]에서 一切乳癰, 乳房結核, 乳痛등의 치료에 활용되어 왔다.

白芷는 消腫止痛의 效能이 있어 癰疽, 瘡瘍, 外感으로 인한 頭痛 및 頭面部의 諸疾患에 使用하였으며 藥理學的으로는 解熱, 鎭痛, 抗菌作用이 있는 것으로 밝혀져 있다[9,11-15]. 또한 白芷는 coumarin계 화합물을 다량 함유하고 있어 prostaglandin $E_2$($PGE_2$)을 억제시켜 抗炎症(anti-inflammation) 효과가 있고, cyclooxygenase-2(COX-2)의 발현과 활성을 억제시키고, 미생물의 성장을 억제시키는 효과가 보고되고 있다[25-31].

貝母는 淸熱散結의 效能이 있어 癭瘤, 瘰癧, 乳癰 等에 活用하며 藥理的으로는 血壓降下, 末梢血管擴張, 氣管支擴張作用이 있어 粘液分泌를 抑制시키므로[11-13,15-23] 鎭咳祛痰의 目的으로 많이 活用하고 있으며[14,18,24], alkaloid fritilline, fritillarine, verficine, verticilline, peinine, peiminoaide 등을 함유하고 있어 鎭咳, 祛痰, 排膿, 解熱, 淸熱, 利尿, 解毒, 血壓降下 等에 이용하는 것으로 알려져 있다. 최근에 白芷의 성분 중 alkaloid계 화합물은 angiotensin converting enzyme을 억제하는 효과가 있고, cGMP을 억제함으로써 nitric oxide(NO)을 줄여주는 효과가 있으며, 貝母에 함유된 verticinone은 인간백혈병 세포주인 HL-60 세포의 분화를 촉진하는 것으로 알려졌다[32-34].

한편 미국에서 인체에 미생물 침입에 따른 미생물 독소 때문에 패혈증(septic shock, sepsis)과 만성 炎症질환으로 1년당 사망하는 인구가 50,000명에 이른다고 알려져 있는데[35], sepsis와 慢性炎症性 질환을 야기하는 미생물 독소는 그램음성 세균의 세포벽에 함유되어 있는 lipopolysacchride(LPS)인 것으로 확인되고 있다.

LPS는 선천면역(innate immunity)을 담당하는 세포의 활성을 증대시켜 tumor necrosis factor-alpha(TNF-α), interleukin-1beta(IL-1β), interleukin-6(IL-6) 등 pro-inflammatory cytokine의 분비를 촉진하고 다량 생산하여 inducible nitric oxide(iNOS)와 COX-2의 발현을 증대시켜 炎症性 매개물질로 알려진 NO와 $PGE_2$의 생산을 대량으로 유도하는 것으로, 이로 인하여 septic shock는 물론

만성 炎症을 유발하고, 심하면 사망에 이르게 하기도 한다.

이에 저자는 芷貝散이 乳癰의 치료에 사용된 方劑이고, 乳癰은 넓은 의미의 만성적 염증 반응과 연관성이 있는 점을 착안하여 芷貝散 및 그 구성 약물인 白芷와 貝母의 抗炎症(anti-inflammation)과 항패혈증(anti-sepsis) 효과를 알아보기 위하여 설치류 RAW 264.7 대식세포와 동물 실험에서 염증매개물질인 NO, $PGE_2$, pro-inflammatory cytokine(IL-1β, IL-6, TNF-α)의 생성과 iNOS 및 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재 료

1) 시 약

Tumor necrosis factor-alpha(TNF-α), interleukin-1beta(IL-1β), inter leukin-6 (IL-6), 및 prostaglandin $E_2$($PGE_2$) and cyclooxygenase-2 (COX2) assay kit는 R&D Systems(Minneapolis, U.S.A.)사로부터 구입하였다.

Anti-iNOS, anti-COX-1 및 anti-COX-2 antibody는 Santa cruz biotechnology Inc.(California, U.S.A.)로 부터 구입하였다.

Lipopolysacchride(LPS)는 Sigma(USA)사로부터 구입했으며, 기타 사용된 모든 시약은 분석 등급으로 Sigma와 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

2) 실험동물

6주령의 Balb/c계 마우스 40 마리를 Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME, USA)로부터 확보하고, 2주간 스트레스을 해소한 다음 8주령을 대상으로 실험에 사용하였다. 마우스의 유지는 무균 및 항온·항습이 유지되는 사육장(엠제이티디, 서울)에서 유지하고, 무균 물과 사료를 충분히 공급하면서 실험하였다.

### 2. 방 법

1) 약물의 추출 및 제조

실험에 사용한 白芷와 貝母는 원광대학교 부속 익산 한방병원에서 구입하여 형태학적 동정을 하여 사용하였다. 白芷와 貝母를 각 100 g씩 정량하여 대웅약탕기(DWP-1800T)에 각각 600 ㎖씩 증류수를 첨가하여 100℃에서 2시간 30분 동안 煎湯하였다. 芷貝散은 白芷 50g와 貝母 50g을 증류수 600 ㎖를 첨가하여 상기와 같이 추출하였다. 이와 같이 煎湯한 白芷 추출액 100 ㎖과, 貝母 추출액 120 ㎖, 芷貝散은 150 ㎖를 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

2) RAW 264.7 세포주의 배양

芷貝散 및 이를 구성하고 있는 추출물이 炎症 반응 매개물질의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 설치류의 대식세포 RAW 264.7을 사용하였다.

설치류의 대식세포 RAW 264.7 세포는 American Tissue Culture Collection (ATCC TIB TIB-71, Rockville, MD)에서 구입하여, DMEM 배지로 1 × $10^6$ Cell/㎖의 농도를 유지했고, 여기에 10%의 열에 비활성화된 우태아 혈청, 페니실린 G(100 U/㎖), 스트렙토마이신(100 ㎍/㎖) 및 L-글루타민(2 mM)를 보충하여, 5% $CO_2$와 95%의 공기를 포함하는 가습 조건하에서 37℃ 온도를 유지하여 배양하였다. 충분히 성장한 세포들은 각각의 추출물을 여러 가지 농도(100-1000 ㎍/㎖)로 2시간동안 전 처리하고 1 ㎍/㎖의 LPS로 자극하여 炎症 매개물질의 생성능력을 측정하였다.

3) RAW 264.7의 cytokine, COX 및 $PGE_2$ 측정

LPS로 RAW 264.7($1\times10^6$ cells/㎖) 세포를 자극하기 전 芷貝散, 白芷 또는 貝母 추출물을 여러 농도(100-1,000 ㎍/㎖)로 2시간동안 전 처리하였다. pro-inflamma tory cytokine, COX-1, COX-2, $PGE_2$ 등 炎症매개물질의 생성에 미치는 약물의

효과를 검증하기 위해서 LPS(1 ㎍/㎖)로 자극한 후 이들 炎症매개물을 세포 상층액에서 측정하였다. TNF-α의 측정은 6시간, IL-1β와 IL-6의 측정은 12시간, COX-1과 COX-2의 활성 측정은 18시간, $PGE_2$은 18시간에 측정하였다.

pro-inflammatory cytokine, COX-2 및 $PGE_2$ assay kit(R&D System Inc., Minneopolis, U.S.A.)을 이용하여 ELISA법으로 정량하였다.

4) MTT 분석

RAW 264.7 대식세포의 생존율은 여러 농도의 추출물처리 또는 추출물과 LPS(1 ㎍/㎖)를 동시에 처리하여 24시간 배양 후 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 MTT 분석법으로 측정하였다. 요약하면, 지수성장을 하는 세포들은 DMEM 배지에서 $1\times10^6$ cells/㎖의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 약물을 처리하였다. 4시간동안 배양한 뒤 1 ㎍/㎖의 농도로 배양하기 위해서 MTT용액이 첨가하고 다시 2시간 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 동일한 용량의 용해완충액(50% n,n-dimethylfor mamide을 포함하는 20% SDS 용액, pH 4.7)을 첨가함으로써 용해하였다. formazan의 양은 570 ㎚에 흡수되는 양을 측정함으로서 결정하였다.

5) 아질산 농도의 측정

NO의 기질인 L-아지닌은 L-시트룰린과 일산화질소로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약 (Griess reagent: 0.5%의 설파닐아미드, 2.5%의 인산 및 0.5%의 나프틸에틸렌아민)은 아질산염과 화학반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 일산화질소의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하여 540 ㎚에서 그 최대 흡수정도를 측정하여 구할 수 있다. 즉, 100 ㎕의 그리스 시약을 상기 대조군과 실험군의 샘플 1 내지 6의 각각에 100 ㎕씩을 첨가하고, 그 혼합물을 37℃에서 10분간 배양하였다. 그 샘플의 빛의 흡수는 스펙트로포토메다(MD, U.S.A.)로 540 ㎚에서 측정하였다. 아질산산염의 농도 정도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다.

6) Western blot

각 추출물과 LPS가 처리된 세포를 용해한 다음 단백질을 블레드포드 방법에 따라 정량하고 50 ㎍을 10% SDS-PAGE로 분리한 다음 transfer solution(20% methanol, 25mM Tris, 192mM glycine, pH 8.3)을 이용해 nitrocellulose membrane에 분리된 단백질을 전사시켰다. 비특이반응을 제거하기 위해서 5% 비지방 skim milk가 함유된 TBS로 4℃에서 2시간 이상 충분히 흔들면서 방치하였다. 그 후 TBS로 3회 세척하고 anti-iNOS antibody(1: 1,000), anti-COX-2 antibody(1: 1,000)을 주입하여 3시간동안 실온에서 반응시킨 후 충분히 세척하고 horse radish peroxidase가 부착된 anti-goat IgG(1 : 2,000)을 주입하고 1시간 동안 실온에서 반응시켰다.

Membrane은 TBS로 충분히 세척하고 통상적인 ECL방법으로 발색시켰다.

7) LPS에 의한 sepsis 모델동물

Balb/crP 마우스를 18시간 동안 절식 시킨 후 LPS을 마우스 체중 1 ㎏ 당 10 ㎎을 복강에 주사했다. 사망율은 48시간 동안 관찰하였고, 혈청중에 유리되는 pro-inflammatory cytokine과 NO와 PGE2 생산 및 COX 활성은 LPS을 주사한 후 6시간에 측정하였다.

8) 약물의 투여

芷貝散, 白芷 또는 貝母 추출물을 마우스 체중 ㎏ 당 800 ㎎을 LPS 주사전 5시간 간격으로 2회 투여한 후 18시간 절식시킨 다음 다시 1회 더 경구투여하고 2시간 후에 LPS로 sepsis를 유도하였다. 대조군은 생리식염수를 경구 투여하였다. 각 실험군 당 마우스는 8마리를 대상으로 하였다.

9) 동물모델의 cytokine, COX 및 $PGE_2$ 측정

sepsis 동물모델에서 芷貝散과 구성약물 추출물이 pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IL-1β 및 IL-6), COX-1, COX-2 및 $PGE_2$의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 이들 炎症 매개물질이 최대로 생산되는 6시간 후에 심장으로부터 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다. 혈청에서 유리되는 NO, TNF-α, IL-1β, IL-6, 및 $PGE_2$ 등을 assay kit(R&D System Inc., Minneopolis, U.S.A.)를 이용하여 ELISA법으로 정량하였다. COX의 활성은 Caymam(MI, U.S.A.)사 assay kit를 이용하여 측정하였다.

10) 통계 분석

결과는 평균값±표준편차로 표현했다.

통계 분석은 Student's t-test를 이용했다.

## Ⅲ. 실험결과

### 1. 芷貝散과 구성 약물이 세포 생존율에 미치는 영향

LPS가 처리된 RAW 264.7 대식세포에서 芷貝散과 그 구성약물의 농도에 따른 세포 생존율을 MTT assay법에 준하여 조사한 결과 Fig. 1과 같다. 먼저 RAW 264.7 대식세포에 각 약물을 100-1000 ㎍/㎖ 농도로 처리한 결과 어떤 약물도 세포의 생존율에 영향을 주지 않았다(95-100%). 이러한 결과를 바탕으로 어떠한 약물이 처리되지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 나타냈을 때 LPS 처리군의 생존율은 약 80%로 감소하였으나, 芷貝散과 그 구성약물을 100-1000 ㎍/㎖의 농도로 처리했을 때 농도에 의존적으로 세포생존율이 높아졌다. 특히 500 ㎍/㎖의 농도에서는 대조군과 비슷하게 세포 생존율이 향상되었다(Fig. 2).

### 2. 芷貝散 과 구성 약물이 NO 생성에 미치는 영향

芷貝散과 그 구성약물이 LPS 유도 NO 생성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 RAW 264.7 대식세포($1\times10^6$ cells/㎖)를 접종하고 5시간 후에 각각의 약물을 100-1,000 ㎍/㎖의 농도로 2시간동안 전 처리한 다음 LPS(1 ㎍/㎖)를 처리하여 24시간 배양하였다. 그 결과 아무런 약물이 처리되지 않고 LPS로 자극한 대조군은 22.2 μM의 아질산염을 생성시킨 반면, 芷貝散과, 白芷 또는 貝母를 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 아질산염의 생성이 억제되었다(Fig. 3). 특히 白芷와 貝母로 구성된 芷貝散의 경우 250 ㎍/㎖ 농도부터 아질산염을 억제시키는데 상승 효과가 있었다.

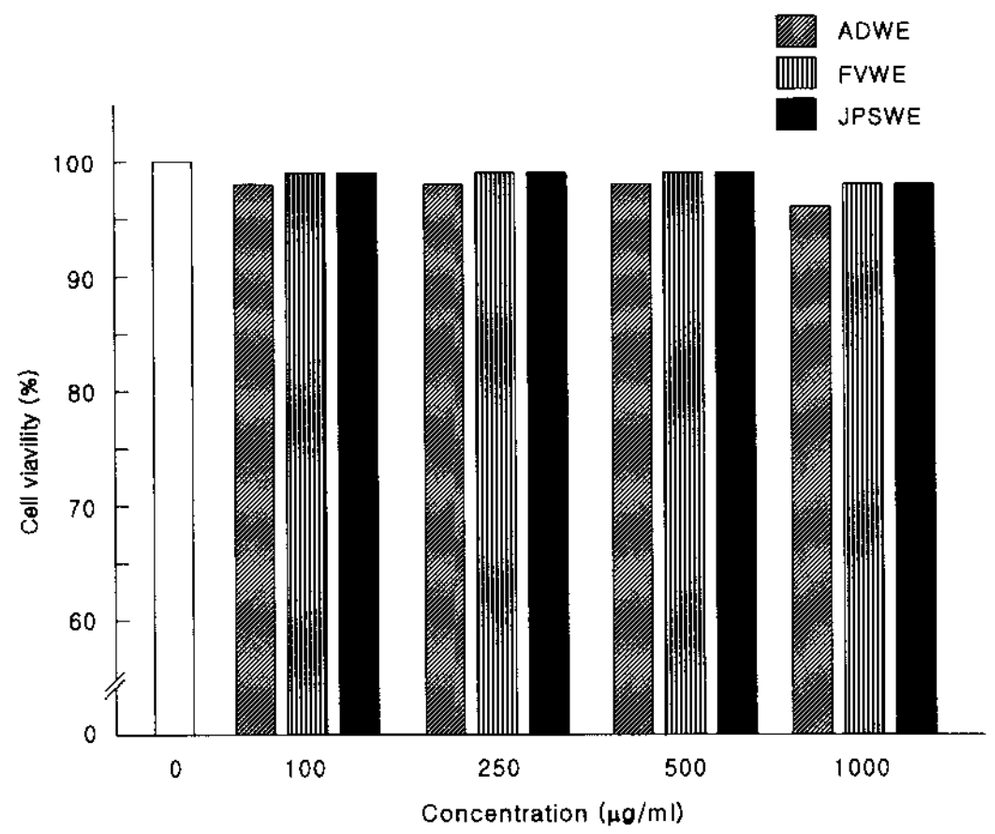


Fig. 1. Cell viability in Ji-Pae-San(JPSWE), *Angelica dahurica*(ADWE) *or Fritillaria Verticillata*(FVWE)-treated RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 macrophages($1\times10^6$/well plate) were incubated for 24 h in the presence or absence of each extract at indicated doses. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiments.

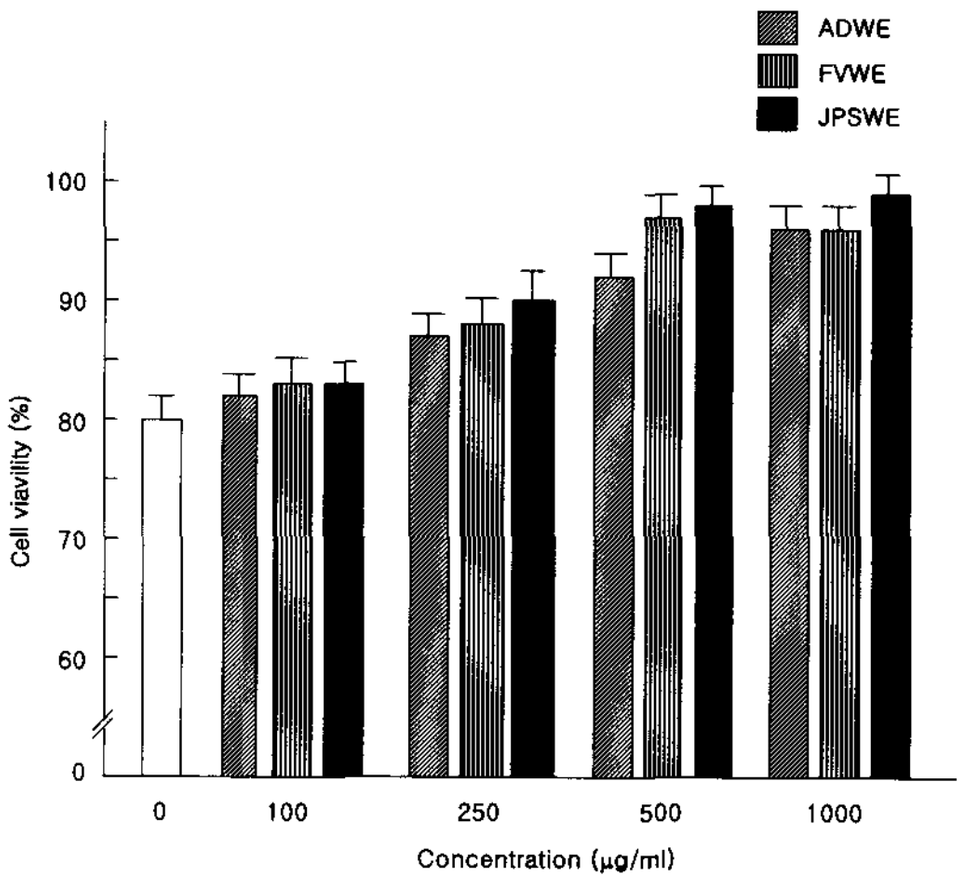


Fig. 2. Cell viability in Ji-Pae-San(JPSWE), *Angelica dahurica*(ADWE) *or Fritillaria Verticillata*(FVWE)-treated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells.

Cells($1\times10^6$/well plate) were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without 1 ㎍/㎖ LPS for 24 h. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiments.

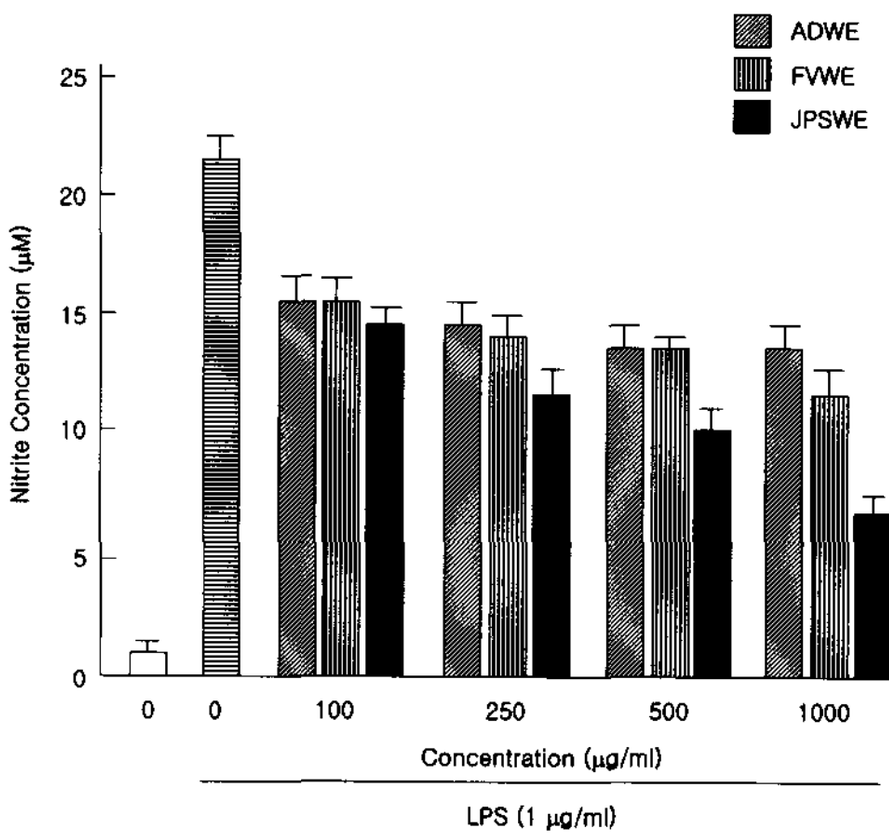


Fig. 3. Inhibitory effects of Ji-Pae-San(JPSWE), *Angelica dahurica*(ADWE) *or Fritillaria Verticillata* (FVWE) on NO production by LPS-stimulat ed RAW 264.7 macrophages.

Cells($1\times10^6$/㎖) were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without 1 ㎍/㎖ LPS for 24 h. NO released by cells was measured by the method of Griess. Data are means ± S.D. of three independent experiments.

## 3. 芷貝散과 구성 약물이 iNOS 발현에 미치는 영향

NO는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로써, NO synthase (NOS)에 의해 L-argine으로부터 생성된다. LPS로 대식세포를 자극하면 iNOS가 과량 발현되면서 많은 양의 NO을 생성하게 된다. 따라서 上記에서 실험한 약물에 의한 NO 생성 억제와 iNOS와의 관계를 알아보기 위해서 芷貝散과 그 구성약물인 白芷, 貝母가 iNOS 단백질 발현에 미치는 효과를 조사하였다. 그 결과 NO 생성 억제와 같이 iNOS 단백질 발현이 약물의 농도에 의존적으로 억제되는 사실을 관찰하였다(Fig. 4).

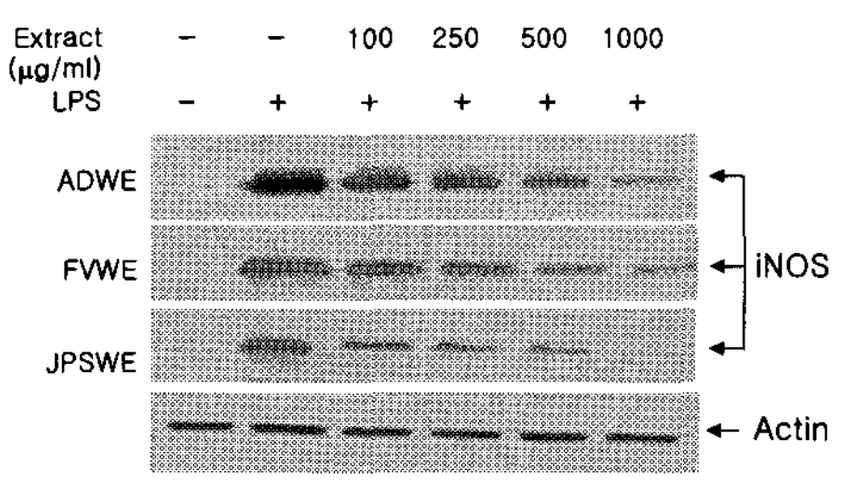


Fig. 4. Inhibitory effects of Ji-Pae-San(JPSWE), *Angelica dahurica*(ADWE) *or Fritillaria Verticillata*(FVWE) on the expression of iNOS in RAW 264.7 macrophages stimulated with LPS.

Cells($1\times10^6$/㎖) were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without 1 ㎍/㎖ LPS for 24 h. Western blot analysis was carried out as described in materials and methods.

## 4. 芷貝散과 구성 약물이 PGE2 생성에 미치는 영향

芷貝散과 구성약물이 LPS 유도 $PGE_2$ 생성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 RAW 264.7 대식세포($1\times10^6$ cells/㎖)를 접종하고 5시간

후에 각각의 약물을 100-1,000 ㎍/㎖의 농도로 2시간동안 전 처리한 다음 LPS(1 ㎍/㎖)를 처리하여 18시간 배양하였다. 그 결과 아무런 약물이 처리되지 않고 LPS로 자극한 대조군은 3.2 ng/㎖의 $PGE_2$를 생성시킨 반면, 芷貝散, 白芷 또는 貝母를 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 $PGE_2$의 생성이 크게 억제시켰다(Fig. 5). 특히 芷貝散의 경우 500 ㎍/㎖ 농도부터 $PGE_2$을 억제시키는데 상승 효과가 있었다.

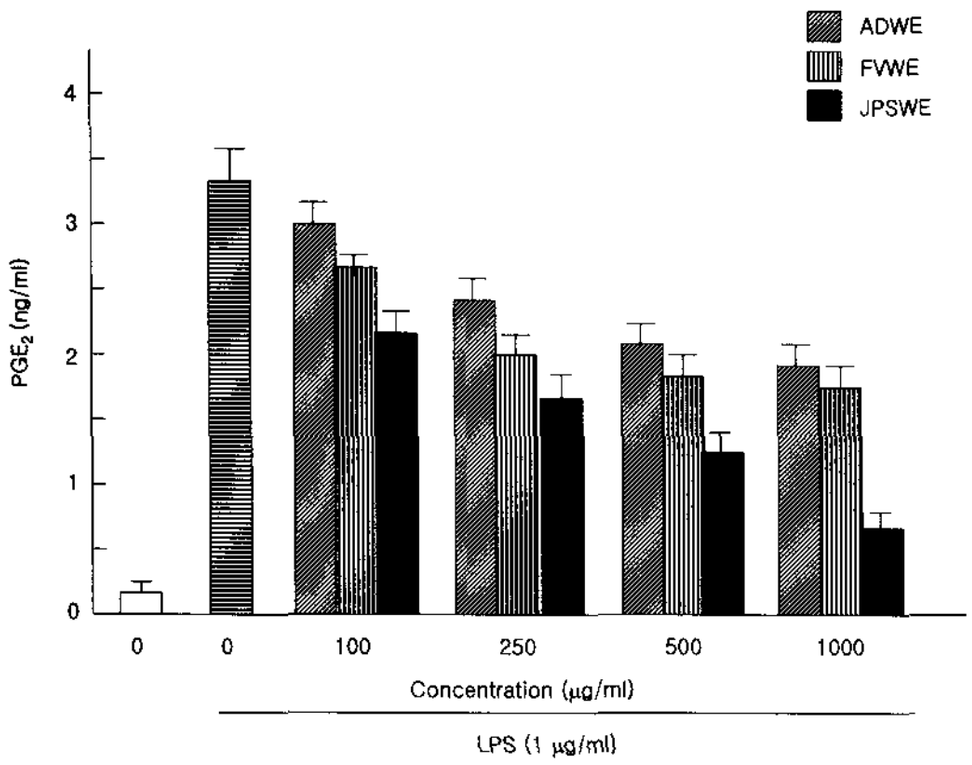


Fig. 5. Inhibitory effects of Ji-Pae-San(JPSWE), Angelica dahurica(ADWE) or Fritillaria Verticillata(FVWE) on the production of PGE2 inRAW 264.7 macrophages stimulated with LPS.

Cells (1×106/㎖) were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without 1 ㎍/㎖ LPS for 18 h. $PGE_2$ production assay was carried out as described in Materials and methods.

## 5. 芷貝散과 구성 약물이 COX-2 발현에 미치는 영향

Cyclooxygenase(COX)는 arachidonic acid에서 prostanoid로 전환시키는 효소로 알려졌는데, COX-1과 COX-2에 의해 합성된 적은 양의 prostanoid는 생체의 항상성 유지에 필요하지만, 과량의 prostanoid는 NO와 비슷하게 炎症반응을 가속화시킨다고 알려졌다.

그래서 본 연구에서도 $PGE_2$ 생성에 직접적으로 영향을 미치는 COX-2의 발현을 immunoblot 방법으로 조사하였다. 그 결과 芷貝散과 그 구성약물인 白芷 貝母가 $PGE_2$ 생성을 억제하는 것과 같이 COX-2 단백질 발현을 약물의 농도에 의존적으로 억제시키는 사실을 관찰하였다(Fig. 6). 또한 芷貝散은 그 구성약물보다 NO는 물론 $PGE_2$ 생성 억제와 같이 COX-2 발현을 현저히 억제시키는 상승 효과가 있었다.

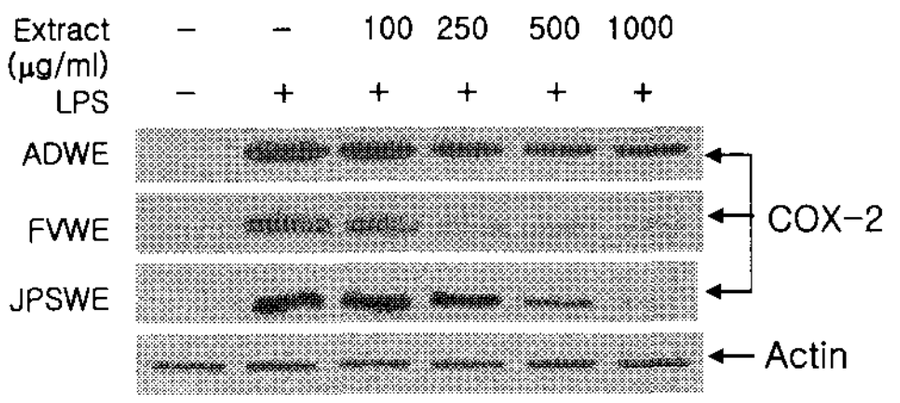


Fig. 6. Inhibitory effects of Ji-Pae-San(JPSWE), *Angelica dahurica*(ADWE) *or Fritillaria Verticillata*(FVWE) on the expression of COX-2 in RAW 264.7 macrophages stimulated with LPS.

Cells($1\times10^6$/㎖) were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without 1 ㎍/㎖ LPS for 18 h. Western blot analysis was carried out as described in Materials and methods.

## 6. 芷貝散과 구성 약물이 pro-inflammatory cytokine 생성에 미치는 영향

sepsis의 유발 원인 중에 하나가 대식세포 활성에 의한 다양한 炎症매개 인자인 cytokine의 발현과 생성에 기인하고 있다. 따라서 芷貝散과 그 구성약물인 白芷와 貝母가 활성화된 대식세포에서 pro-inflammatory cytokine의 생성 억제효과를 조사하기 위하여, RAW264.7 cells($1x10^6$ cells/㎖)를 LPS(1 ㎍/㎖)와 실험 약제를 동시에 처리하고, TNF-α의 경우 6시간, IL-1β와 IL-6는 12시간이 경과한 후 생성된 pro-inflammatory cytokine의 양을 kit를 이용하여 측정하였다.

LPS로 활성화한 대식세포는 TNF-α, IL-1β 그리고 IL-6를 다량 생성하였고, 芷貝散과 그를 구성하는 약물인 白芷 貝母를 각각 첨가하였을 때 이들 cytokine의 생성은 억제되었다. 즉, 芷貝散과 그 구성 약물인 白芷 貝母는 농도 의존적으로 TNF-α의 생성을 억제하였으며(Fig. 7), IL-1β의 경우도 TNF-α와 같이 농도 의존적으로 억제 하였다(Fig. 8). 그리고 IL-6의 경우 역시 농도 의존적으로 현저히 억제 하였다(Fig. 9). 특이할 만한 결과는 白芷와 貝母를 각각 처리한 실험군보다 동시에 조합하여 제조한 芷貝散에서 pro-inflammatory cytokine의 생성 억제가 크게 일어나는 상승효과가 있었다.

이러한 결과는 方劑學적으로 구성된 처방의 효과가 구성약물 단독 사용하였을 때보다 강하게 나타나고 있음을 보여주고 있다. 따라서 芷貝散이 炎症질환이나 패혈증을 예방하거나 치료할 수 있음을 시사하고 있다.

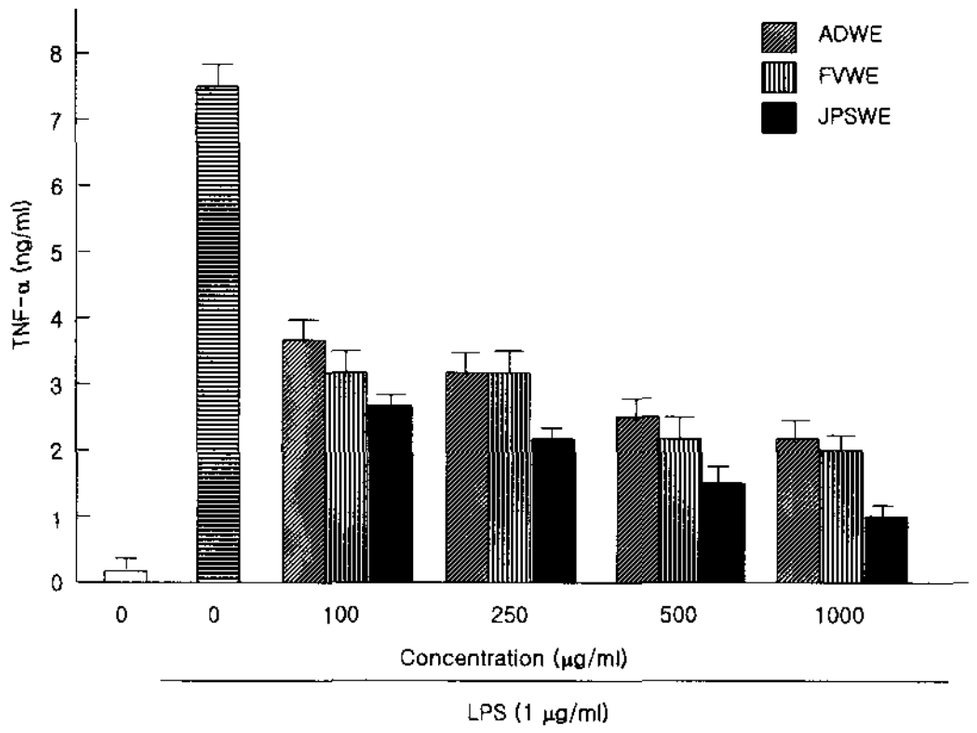


Fig. 7. Effects of Ji-Pae-San(JPSWE), *Angelica dahurica*(ADWE) *or Fritillaria Verticillata* (FVWE) on the productions of TNF-α in RAW 264.7 macro phages stimulated with LPS.

Cells($1\times10^6$/ml) were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without 1 ㎍/㎖ LPS for 6 h. at indicated concentrations. The productions of TNF-α was determined as described in Materials and methods. Each column represents the mean ± S.D. from three independent experiments.

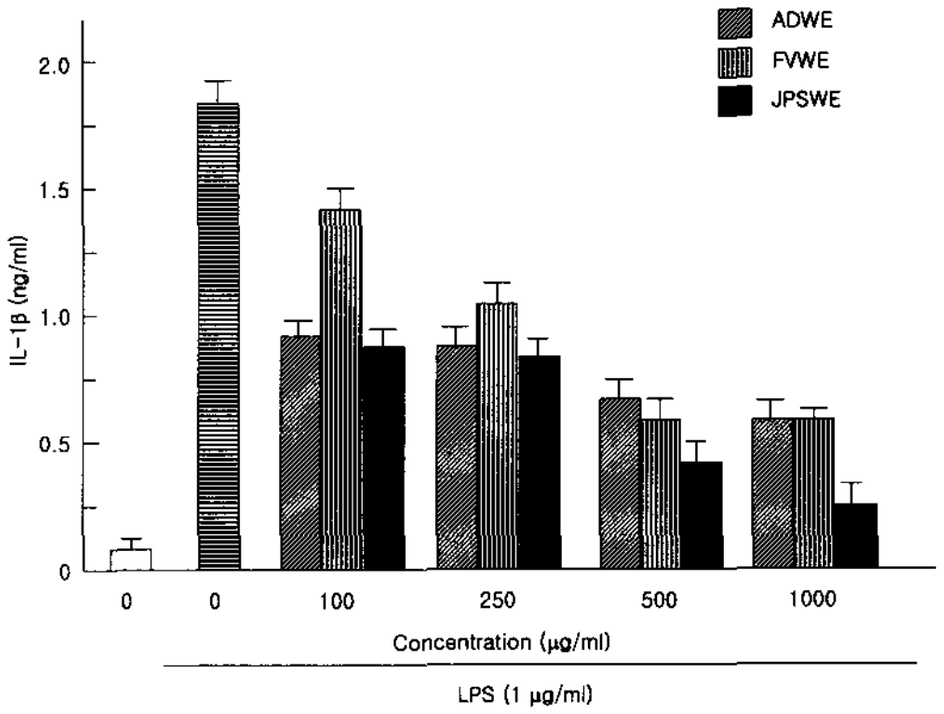


Fig. 8. Effects of Ji-Pae-San(JPSWE), *Angelica dahurica*(ADWE) *or Fritillaria Verticillata* (FVWE) on the productions of IL-1β in RAW 264.7 macro phages stimulated with LPS.

Cells($1\times10^6$/㎖) were pretreated with or without extract at indicated concentrations for 2 h and then incubated with or without 1 ㎍/㎖ LPS for 12 h. at indicated concentrations. The productions of IL-1β was determined as described in materials and methods. Each column represents the mean ± S.D. from three independent experiments.

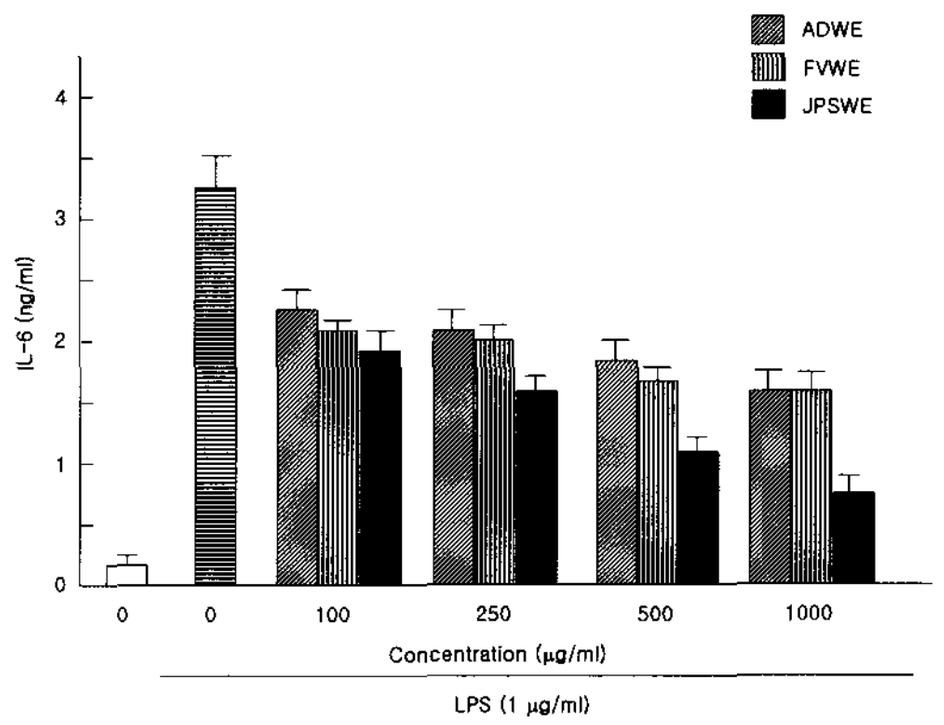


Fig. 9. Effects of Ji-Pae-San(JPSWE), *Angelica dahurica*(ADWE) *or Fritillaria Verticillata*(FVWE) on the productions of IL-6 in RAW 264.7 macrophages stimulated with LPS.

Cells were incubated with or without 1 ㎍/㎖ LPS for 12 h in the presence or absence of JPSWE, ADWE or FVWE on the productions of IL-1β in RAW 264.7 macrophages stimulated with LPS at indicated concentrations. The productions of IL-6 was determined as described in materials and methods. Each column represents the mean ± S.D. from three independent experiments.

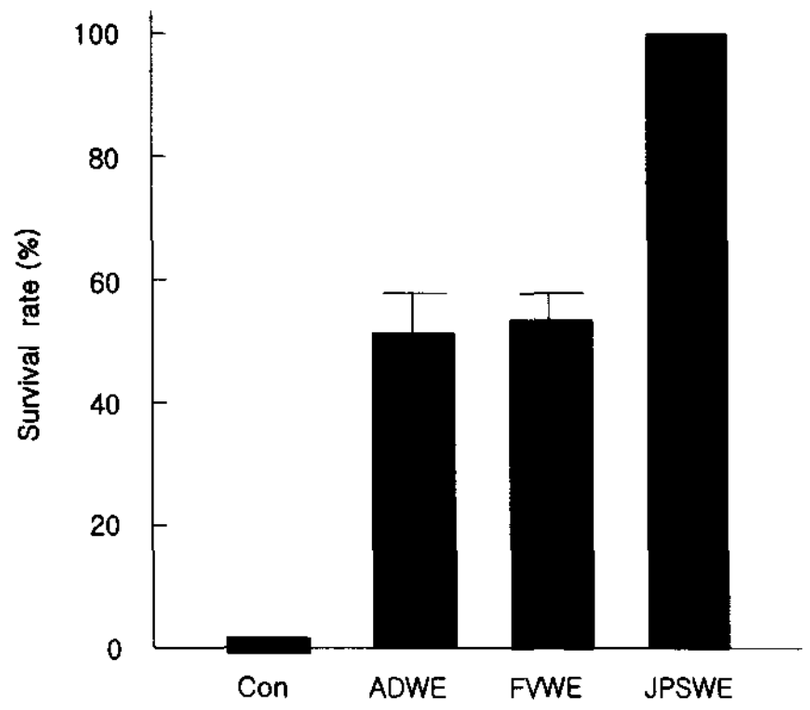


Fig. 10. Survival rate of Ji-Pae-San(JPSWE), *Angelica dahurica*(ADWE) *or Fritillaria Verticillata* (FVWE) on LPS-induced sepsis in mice.

Mice were administrated JPSWE, ADWE or FVWE(1000mg/kg) 3 times per 1 day before LPS injection. Survival rate were determined at 48 h after LPS injection (10 mg/kg body) Each column represents the mean ± S.D. from n=8 mice.

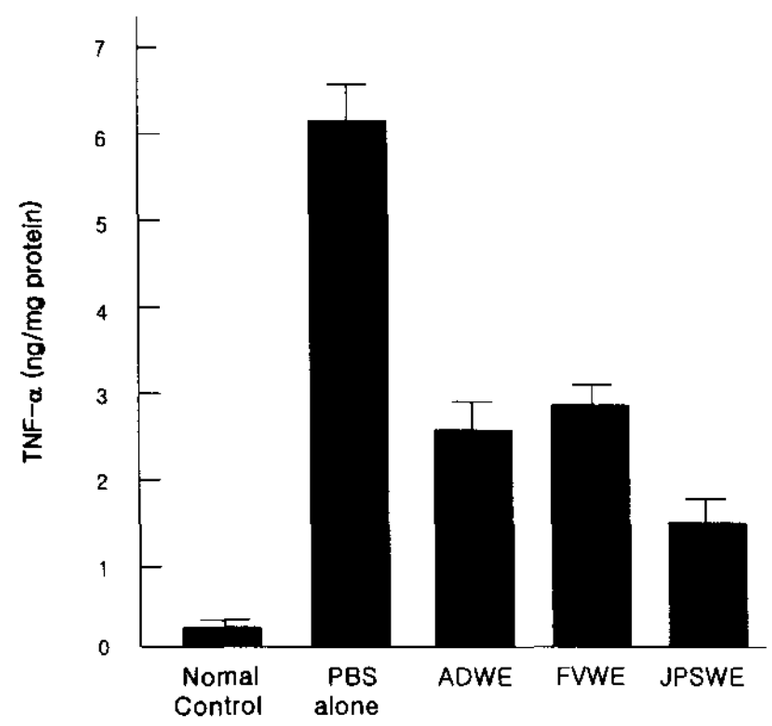


Fig. 11. Effects of Ji-Pae-San(JPSWE), *Angelica dahurica*(ADWE) *or Fritillaria Verticillata* (FVWE) on LPS-induced TNF-α in mice.

Mice were admini strated JPSWE, ADWE or FVWE 3 times per 1 day before LPS injection. TNF-α assay of serum was determined as described in materials and methods. Each column represents the mean ± S.D. from n=8 mice.

### 7. 芷貝散과 구성약물이 LPS로 유도한 마우스 생존율에 미치는 영향

sepsis는 LPS로 유도할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 Balb/crP 마우스를 대상으로 체중 1kg 당 10 mg의 LPS를 복강에 주사하여 약물의 효과를 알아보았다. 먼저 芷貝散과 그 구성약물(1000 mg/kg)을 5시간 간격으로 2회 경구투여한 후 18시간 절식시킨 다음 다시 1회 투여하고 2시간이 경과한 후 LPS를 복강에 주사하였다. 그 후 48시간동안 마우스의 생존율을 조사하였다. 그 결과 대조군은 100% 사망한 반면, 白芷 투여군은 45% 사망으로 생존율이 55%로 나타났고, 貝母투여군은 40%가 사망하여 60%의 생존율을 보인 반면, 芷貝散을 투여한 실험군은 모두 생존하여 그 생존율이 100%로 매우 높게 나타나서 芷貝散 투여군이 각각의 약물을 투여한 실험군 보다 생존율이 매우 높게 나타나 생존율에 있어서 상승효과를 보여주었다(Fig. 10). 이러한 결과는 RAW 264.7 대식세포에서 보여준 芷貝散의 炎症 매개물질의 억제 효과를 증명해주고 있다. 그러므로 본 연구에서는 생체에서 혈중으로 유리되는 炎症 매개물질의 억제를 조사해 보았다.

### 8. 芷貝散과 구성약물이 LPS 유도 마우스 혈청에 유리되는 pro-inflamma tory cytokine 생성에 미치는 영향

sepsis 모델에서 芷貝散과 약물이 투여된 마우스의 혈청내로 유리되는 pro-inflammatory cytokine의 생성에 미치는 영향을 알아보았다. 약물투여는 생존율 조사와 같은 방법으로 수행하였고, LPS를 복강에 주사한 후 6시간 후에 에테르로 마우스를 마취한 후 심장으로부터 채혈한 다음 혈청을 분리하여 pro-inflammatory cytokine을 ELISA법으로 조사하였다. 생리식염수로 경구투여하고 LPS만 투여한 대조군의 혈청내 유리되는 TNF-α, IL-1β 그리고 IL-6는 대량으로 생성한 반면 芷貝散과 구성약물인 白芷, 貝母를 처리하고 LPS를 처리한 실험군에서는 이들 cytokine의 생성량이 현저히 억제되었다. 특이할 만한 결과는 각각의 약물을

투여한 실험군에서 白芷보다는 貝母 투여군이 이들 사이토카인의 생성을 더욱 억제하였으며, 이들 약물을 배합한 芷貝散의 경우 pro-inflammatory cytokine을 억제하는 상승효과가 있었다(Fig. 11)(Fig. 12)(Fig. 13).

따라서 芷貝散과 그 구성약물이 sepsis 모델에서 생존율이 향상된 원인중의 하나가 pro-inflammatory cytokine을 억제시켰기 때문이라 사료된다.

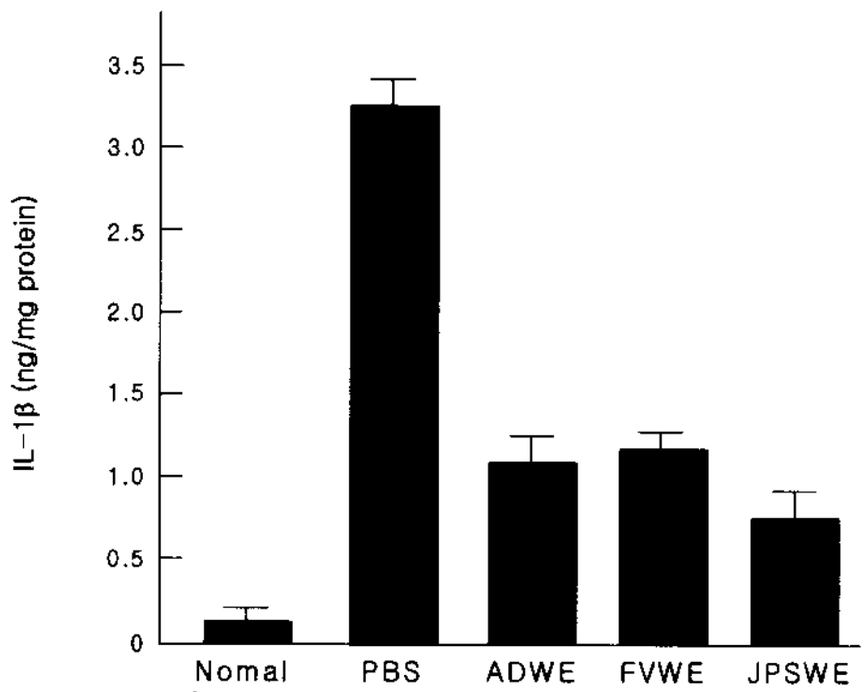


Fig. 12. Effects of Ji-Pae-San(JPSWE), *Angelica dahurica*(ADWE) *or Fritillaria Verticillata* (FVWE) on LPS-induced IL-1β production in mice.

Mice were administrated JPSWE, ADWE or FVWE 3 times per 1 day before LPS injection. IL-1β assay of serum was determined as described in materials and methods. Each column represents the mean ± S.D. from n=8 mice.

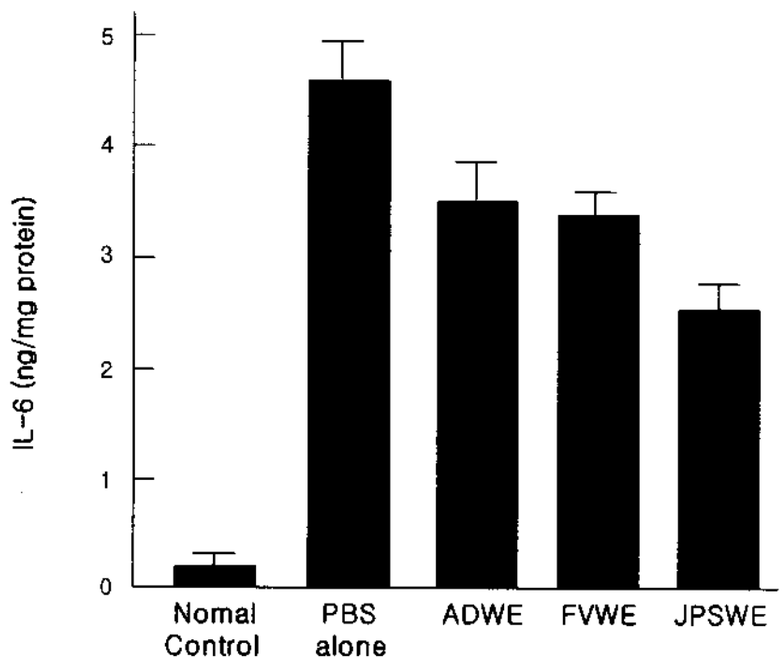


Fig. 13. Effects of Ji-Pae-San(JPSWE), *Angelica dahurica*(ADWE) *or Fritillaria Verticillata* (FVWE) on LPS-induced IL-6 production in mice.

Mice were administrated JPSWE, ADWE or FVWE 3 times per 1 day before LPS injection. IL-6 assay of serum was determined as described in materials and methods. Each column represents the mean ± S.D. from n=8 mice.

## 9. 芷貝散과 구성약물이 PGE2 생성 및 COX 활성에 미치는 영향

sepsis 모델에서 芷貝散과 그 구성약물인 白芷, 貝母가 투여된 마우스의 혈청내로 유리되는 $PGE_2$ 생성 및 COX 활성에 미치는 영향을 알아보았다. 약물투여는 생존율 조사와 같은 방법으로 수행하였고, LPS를 복강에 주사한 후 6시간 후에 에테르로 마우스를 마취한 후 심장으로부터 채혈한 다음 혈청을 분리하여 $PGE_2$ 생성 및 COX 활성을 ELISA법으로 조사하였다. 생리식염수로 경구투여하고 LPS만 투여한 대조군의 혈청내 유리되는 $PGE_2$는 대량으로 생성한 반면 芷貝散과 구성약물을 처리하고 LPS를 처리한 실험군에서는 $PGE_2$의 생성량이 현저히 억제되었다. 특이할 만한 결과는 白芷와 貝母를 배합한 芷貝散의 경우 $PGE_2$를 억제하는 상승효과가 있었다(Fig. 14).

한편 생리식염수로 경구투여하고 LPS만 투여한 대조군의 혈청내 유리되는 COX의 활성은 매우 증가되었고 이를 100%로 정했을 때 白芷는 61%, 貝母는 78%로 나타났으나, 이들의 약물을 배합한 芷貝散의 경우 54%로 각각의 약물을 투여한 실험군보다 COX의 활성이 크게 억제되는 상승효과가 있었다(Fig. 15). 따라서 LPS 투여에 의한 생존율의 향상과 같은 결과를 얻어 芷貝散이 강력한 抗炎症작용이 있음을 증명해주었다.

이러한 결과는 芷貝散이 炎症매개물질을 *in vitro* 뿐만 아니라 *in vivo*에서도 강력한 抗炎症작용이 있는 것을 제시해주어 인체의 炎症성 면역질환과 sepsis에 항 소염제로서 활용할 수 있음을 시사해주고 있다..

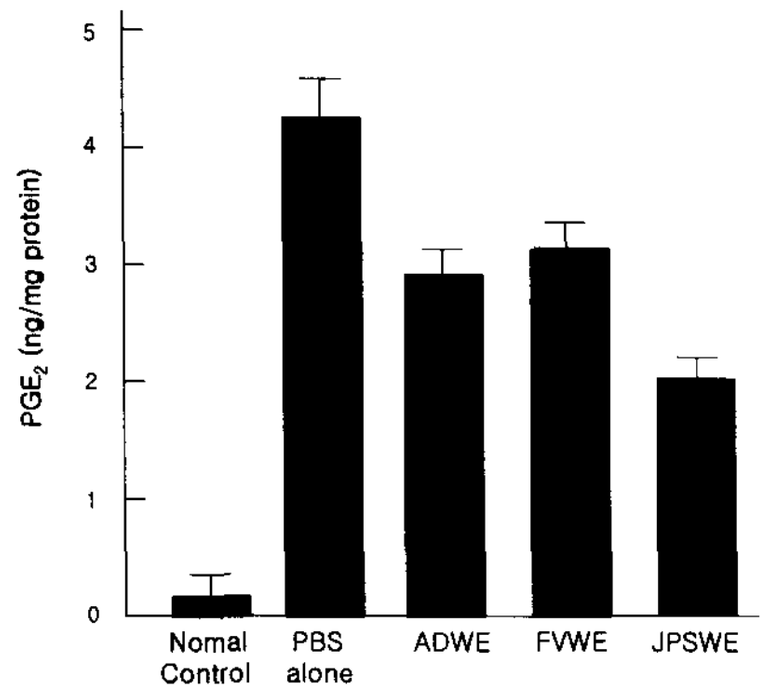


Fig. 14. Effects of Ji-Pae-San(JPSWE), *Angelica dahurica*(ADWE) *or Fritillaria Verticillata* (FVWE) on LPS-induced $PGE_2$ production in mice.

Mice were administrated JPSWE, ADWE *or* FVWE 3 times per 1 day before LPS injection. $PGE_2$ assay of serum was determined as described in materials and methods. Each column represents the mean ± S.D. from n=8 mice.

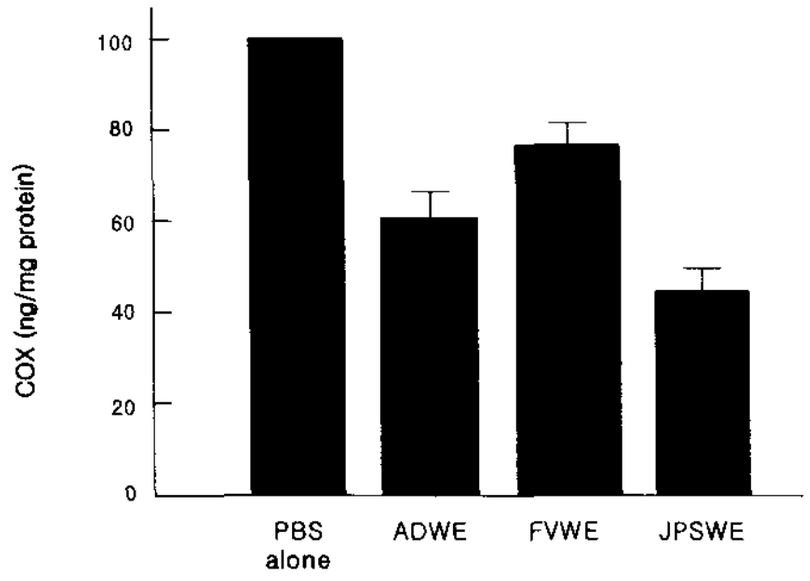


Fig. 15. Effects of Ji-Pae-San(JPSWE), *Angelica dahurica*(ADWE) *or Fritillaria Verticillata* (FVWE) on LPS-induced COX activity in mice.

Mice were administrated JPSWE, ADWE *or* FVWE 3 times per 1 day before LPS injection. COX activity assay of serum was determined as described in materials and methods. Each column represents the mean ± S.D. from n=8 mice.

## Ⅳ. 考 察

芷貝散은 白芷와 貝母가 各等分으로 構成되어 乳房結核을 치료하는 방제로 알려져 있으며[1], 白芷는 繖形科에 屬한 多年生 草本인 구릿대 및 개구릿대의 根으로 性味는 辛溫 無毒하고 歸經은 肺, 脾, 胃에 속하며, 祛風解表, 消腫止痛, 通鼻止帶의 效能이 있어[7] 頭痛, 眉稜骨痛, 齒痛, 鼻淵, 寒濕腹痛, 腸風, 痔漏, 赤白帶下, 癰疽, 瘡瘍, 皮膚乾燥, 瘙痒, 疥癬을 治療한다고 하였으며[7,11], 藥理學的으로는 解熱, 鎭痛作用과 抗菌作用이 있는 것으로 밝혀져 있다[9,11-15].

貝母는 百合科에 屬한 多年生 草本인 貝母 및 中國貝母의 鱗莖으로 止咳化痰, 淸熱散結의 效能이 있으며[7], 본 실험에 사용된 것은 中國의 東海岸 地域인 浙江省에서 自生하는 浙貝母로 性味는 大苦寒 無毒하고, 歸經은 肺, 三焦, 肝 및 胃이며[7,15], 虛勞咳嗽, 吐痰喀血, 心胸鬱結, 肺痿肺癰, 瘰癧, 瘭癤, 喉痺, 乳癰 등에 活用하고[8,9,11], 血壓降下, 末梢血管擴張, 氣管支擴張作用이 있으며, 粘液分泌를 抑制하는 鎭咳祛痰劑로 알려져 있다[11-13,15-23].

白芷는 coumarin계 화합물을 다량 함유하고 있어 $PGE_2$를 억제시켜 抗炎症(anti-inflammation)효과가 있으며, COX-2의 발현과 활성을 억제시키고, histamine 방출을 억제시키는 효과가 있고, tacrine으로 유발된 간세포의 손상을 복원시키는가 하면 cytochrome CP450의 활성을 억제하고 미생물의 성장을 억제시키는 효과가 있는 것으로 보고되고 있다[25-31].

貝母는 alkaloid로 fritilline, fritillarine, verficine verticilline, peinine, peiminoaide 등이 함유되어 있어 鎭咳, 祛痰, 排膿, 解熱, 淸熱, 利尿, 解毒, 血壓降下 等에 이용되는 것으로 알려졌다.

최근에 白芷의 성분 중 alkaloid계 화합물은 angiotensin converting enzyme을 억제하는 효과가 있고, cGMP을 억제함으로써 nitric oxide(NO)을 줄여주는 효과가 있으며, 貝母에 함유된 verticinone은 인간백혈병 세포주인 HL-60 세포의 분화를 촉진하는 것으로 알려졌다[32-34,39].

한편 미생물이 인체에 침입하면 독소 때문에 면

역세포가 활성화된다. 대식세포를 비롯한 림프구가 적당히 활성화되면 pro-inflammatory cytokine이 분비되어서 NO, $PGE_2$와 같은 강력한 炎症매개물질이 생산되고 이것들은 미생물의 감염을 방지하여 인체의 항상성을 유지케 한다. 그러나 과민하게 활성화되어 炎症매개물질을 지속적으로 생산하면 만성 炎症질환을 유발하게 되고, 순간적으로 대량의 炎症매개물질이 생산하게 되면 sepsis을 유발하여 사망에 이르기도 한다[35].

sepsis와 慢性炎症性 질환을 야기하는 미생물 독소는 그램음성 세균의 세포벽에 함유되어 있는 LPS인 것으로 잘 알려졌다. LPS는 선천면역(innate immunity)을 담당하는 세포의 활성을 증대시켜 TNF-α, IL-1β, IL-6 등 pro-inflammatory cytokine의 분비를 촉진하고 다량 생산하여 iNOS와 COX-2의 발현을 증대시켜 炎症性 매개물질로 알려진 NO와 $PGE_2$의 생산을 대량으로 유도하는 것으로 알려졌다[35-37]. 이로 인해 septic shock와 慢性 炎症이 유발되고, 그 반응이 심하면 사망에 이르기도 한다.

선천면역을 담당하는 단핵구/대식세포(monocytes/macrophages)는 숙주의 방어 체계에 매우 중요한 세포이다. 이들은 외부 이물질이 체내에 침입하면 적당히 반응하여 상기와 같은 炎症매개물질을 생산하여 체내를 방어하지만, 대량으로 생산된다면 그로 인해 炎症반응이 가속화되어 shock는 물론 만성 炎症疾患을 야기시킨다[35-38].

東醫寶鑑에서 白芷와 貝母가 함께 配伍된 處方은 모두 17種으로 이중 10種이 癰疽에 活用되고 있는데, 癰疽란 광범위한 의미에서 만성적 炎症에 해당하는 韓醫學的 用語로 볼 수 있으며, 芷貝散이 乳癰의 치료에 사용된 方劑이고, 乳癰은 넓은 의미의 만성적 염증 반응과 연관성이 있는 점을 착안하여 芷貝散과 구성약물의 抗炎症효과를 RAW 264.7 설치류 대식세포와 LPS로 유도한 sepsis 모델동물에서 조사하였다.

芷貝散과 구성 약물이 세포 생존율에 미치는 영향을 살펴보면 아무런 약물이 처리되지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 나타냈을 때 LPS 처리군의 생존율은 약 80%로 감소하였으나, 芷貝散과 그 구성약물인 白芷, 貝母를 100-1000㎍/ml의 농도로 처리했을 때 농도에 의존적으로 세포생존율이 높아졌다. 특히 500 ㎍/ml의 농도에서는 대조군과 비슷하게 세포 생존율이 향상되었다. 이는 芷貝散과 구성약물이 LPS로 처리하여 80%로 감소한 새포생존율을 대조군과 비슷하게 향상시키는 실험 결과로 세포의 독성작용이 없음을 시사하고 있다(Fig. 1)(Fig. 2).

芷貝散과 구성 약물이 NO 생성에 미치는 영향을 살펴보면 白芷와 貝母로 구성된 芷貝散의 경우 250 ㎍/㎖ 농도부터 NO를 억제시키는데 상승 효과가 있었다(Fig. 3). 즉 芷貝散을 抗炎症약물로 사용할 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

芷貝散과 구성 약물이 iNOS 발현에 미치는 영향을 살펴보면 NO의생성 억제실험과 같이 iNOS 단백질 발현을 농도 의존적으로 억제 하였다(Fig. 4). 특히 白芷와 貝母로 구성된 芷貝散이 적은 농도에서 iNOS 단백질 발현을 효과적으로 억제하는 것으로 보아 方劑 構成法 中 두 가지 藥物을 배합하는 相須, 相使配合과 상관성이 있음을 시사해주고 있다.

芷貝散과 구성 약물이 $PGE_2$ 생성에 미치는 영향을 살펴보면 LPS로 자극한 대조군은 3.2 ㎍/㎖의 $PGE_2$를 생성시킨 반면, 芷貝散, 白芷 또는 貝母를 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 $PGE_2$의 생성이 크게 억제되었다(Fig. 5). 특히 白芷와 貝母로 구성된 芷貝散의 경우 500 ㎍/㎖ 농도부터 $PGE_2$을 억제시키는데 상승 효과가 있었다. 이와 같은 실험 결과는 芷貝散과 구성약물이 炎症性 매개물의 하나인 $PGE_2$ 의 생성을 크게 억제하는 한편 芷貝散이 白芷, 貝母 等 구성약물 보다 상승효과를 발휘하고 있어 方劑構成의 타당성을 제시하는 것으로 볼 수 있다.

芷貝散과 구성 약물이 COX-2 발현에 미치는

영향을 살펴보면 $PGE_2$ 생성에 직접적으로 영향을 미치는 COX-2의 발현을 immunoblot 방법으로 조사하였다. 그 결과 芷貝散과 그 구성약물인 白芷 貝母가 $PGE_2$ 생성 억제에서와 같이 COX-2 단백질 발현은 약물의 농도에 의존적으로 억제하는 사실을 관찰하였다(Fig. 6). 이와 같은 결과는 $PGE_2$의 생성이 COX-2의 발현 억제와 깊은 관련성이 있음을 제시한 것이며, 芷貝散이 抗炎症劑로 활용할 수 있음을 시사한다고 볼 수 있다.

芷貝散과 구성 약물이 pro-inflammatory cytokine 생성에 미치는 영향을 살펴보면 LPS로 활성화한 대식세포는 TNF-α, IL-1β 그리고 IL-6를 다량 생성하였고, 芷貝散과 그를 구성하는 약물인 白芷 貝母를 각각 첨가하였을 때 이들 cytokine의 생성은 억제되었다. 특이할 만한 결과는 白芷와 貝母를 각각 처리한 실험군보다 芷貝散에서 pro-inflammatory cytokine의 생성억제가 크게 일어나 상승효과가 있었다(Fig. 7)(Fig. 8)(Fig. 9). 方劑學적으로 구성된 처방의 효과는 구성약물 단독으로 처리했을 때보다 pro-inflammatory cytokine의 생성 억제효과가 상승적으로 작용하고 있음을 보여주고 있다. 따라서 芷貝散이 炎症疾患이나 패혈증을 예방하거나 치료할 수 있음을 시사하고 있다.

芷貝散과 구성약물이 LPS로 유도한 마우스 생존율에 미치는 영향을 살펴보면 sepsis 실험에서 대조군은 100% 사망한 반면, 白芷 투여군은 45% 사망으로 생존율이 55%로 나나타났고, 貝母 투여군은 40%가 사망하여 60%의 생존율을 보인 반면, 芷貝散을 투여한 실험군은 모두 생존하여 그 생존율이 100%로 매우 높게 나타나서 芷貝散 투여군이 각각의 약물을 투여한 실험군 보다 생존율이 매우 높게 나타나 생존율에 있어서 상승효과를 보여주었다(Fig. 10). 이러한 결과는 모델 동물실험에서도 세포배양 조건 실험을 증명해주는 것이며 芷貝散의 炎症 매개물질의 억제에 대한 상승효과를 나타내는 것으로 方劑構成의 理論的 타당성을 입증해 주는 것으로 볼 수 있다.

芷貝散과 구성약물이 LPS 유도 마우스 혈청에 유리되는 pro-inflammatory cytokine 생성에 미치는 영향을 보면 sepsis 모델에서 芷貝散과 약물이 투여된 마우스의 혈청내로 유리되는 pro-inflammatory cytokine의 생성에 미치는 영향을 알아보았다. 특이할 만한 결과는 각각의 약물을 투여한 실험군에서 白芷보다는 貝母 투여군이 이들 cytokine의 생성을 더욱 억제하였으며, 이들 약물을 배합한 芷貝散의 경우 pro-inflammatory cytokine을 억제하는 상승효과가 있었다(Fig. 11)(Fig. 12)(Fig. 13). 따라서 芷貝散과 그 구성약물이 sepsis 모델에서 생존율이 향상된 원인중의 하나가 pro-inflammatory cytokine을 억제시켰기 때문이라 사료된다

芷貝散과 구성약물이 $PGE_2$ 생성 및 COX 활성에 미치는 영향을 보면 생리식염수로 경구투여하고 LPS만 투여한 대조군의 혈청내 유리되는 $PGE_2$는 대량으로 생성한 반면 芷貝散과 구성약물을 처리하고 LPS를 처리한 실험군에서는 $PGE_2$의 생성량이 현저히 억제되었다. 특이한 것은 芷貝散이 $PGE_2$를 억제하는 상승효과가 있었다(Fig. 14). 따라서 芷貝散과 그 구성약물이 sepsis 모델에서 생존율이 향상된 원인중의 하나가 $PGE_2$를 억제시켰기 때문이라 사료된다.

한편 생리식염수로 경구투여하고 LPS만 투여한 대조군의 혈청내 유리되는 COX의 활성은 매우 증가되었고 이를 100%로 정했을 때 白芷는 61%, 貝母는 78%로 나타났으나, 이들의 약물을 배합한 芷貝散의 경우 54%로 각각의 약물을 투여한 실험군보다 COX의 활성이 크게 억제되는 상승효과가 있었다(Fig. 15). 따라서 COX의 활성억제가 $PGE_2$ 억제와 상관성이 있음을 보여주고 있다. 芷貝散과 구성약물의 대식세포 실험에서의 抗炎症 효과및 모델동물 실험에서의 anti-sepsis 실험을 종합하여 보면 芷貝散과 구성약물인 白芷, 貝母가 여러 가지 炎症性 매개물들을 현저하게 억제하는 작용을 보여주고 있으며 특히 芷貝散의 효과가 구성약물인 白芷, 貝母를 각각 투여했을 때 보다, 상승적으

로 작용하고 있는 것으로 보아 방제구성의 필요성에 대한 이론적 근거를 제시하고 있어 그 시사하는 바가 크며 앞으로 여기에 대한 작용 기전에 대한 폭넓은 연구가 더욱 필요하다고 사료된다.

## V. 結 論

芷貝散 및 구성약물인 白芷와 貝母의 抗 炎症 작용과 抗 sepsis효과를 세포 배양과 동물실험에서 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 芷貝散과 白芷 및 貝母는 세포 배양 조건에서 RAW 264.7 대식세포에서 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하여 NO, $PGE_2$ 및 pro-inflammatory cytokine(TNF-α, IL-1β 그리고 IL-6)의 생성을 효과적으로 억제하였다.
2. 芷貝散은 RAW 264.7 대식세포에서 炎症性 매개물질의 생성을 억제하는데 있어서 白芷와 貝母를 단독으로 투여한 경우보다 상승효과가 있었다.
3. 白芷와 貝母는 LPS로 유도한 sepsis 모델동물에서 각각 55%와 60% 생존율을 향상시키는 효과가 있었고, 芷貝散은 100% 생존율을 보여 각각의 약물보다 매우 뛰어난 상승효과가 있었다.
4. 白芷와 貝母는 sepsis 모델동물에서 炎症性 매개물질인 $PGE_2$, COX 및 pro-inflammatory cytokine(TNF-α, IL-1β 그리고 IL-6)의 생성을 효과적으로 억제 하였다.
5. 芷貝散은 sepsis 모델동물에서 炎症性 매개물질의 생성을 억제하는데 있어서 白芷와 貝母를 단독으로 투여한 경우보다 매우 뛰어난 상승효과가 있었다.

이러한 결과는 芷貝散이 급성 및 慢性 炎症 질환뿐만 아니라 sepsis를 치료할 목적으로 이용할 수 있음을 시사하고 있다.

## 參考文獻


1. 許浚 : 東醫寶鑑, 법인문화사, 서울, p. 690-692, 1409, 1475, 1999.
2. 黃度淵 : 方藥合編, 永林社, 서울, p. 216, 1991.
3. 江克明 外 : 校正方劑大辭典, 醫聖堂, 서울, p. 500, 1991.
4. 彭懷仁 外 : 中醫方劑大辭典, 人民衛生出版社, 北京, p. 146, 1996.
5. 張浩良 外 : 中國方劑精華辭典, 天津科學技術出版社, 天津, p. 542, 1996.
6. 江克明 外 : 簡明方劑辭典, 上海科學技術出版社, 上海, p. 500, 1989.
7. 辛民教 : 臨床本草學, 永林社, 서울, p. 506, 636, 1996.
8. 梁基相 : 漢藥의 配合과 應用, 傳統醫學研究所, 서울, p. 43, 44, 287, 1993.
9. 辛民教 : 本草求眞, 木과土, 서울, pp. 245-246, 1999.
10. 李梴 : 醫學入門婦人小兒外科, 大星文化社, 서울, p. 364, 1990.
11. 辛民教 外 : 鄕藥生藥大事典, 永林社, 서울, pp. 170-171, 409-411, 1990.
12. 楊濟 : 臨證用藥配伍指南, 中國醫藥科技出版社, 北京, p. 29, 332, 1996.
13. 態輔信 : 臨床韓藥辭典, 醫聖堂, 서울, p. 10, 161, 1994.
14. 凌一揆 外 : 中藥本草學, 保健新聞社, 서울, p. 172, 173, 544, 545, 1998.
15. 김형균 외 : 한약의 약리, 고려의학, 서울, p. 179, 248-249 2000.
16. 尹用甲 : 東醫方劑와 處方解說, 醫聖堂, 서울, p. 63, 65, 1998.
17. 李尙仁 : 本草學, 書苑堂, 서울, pp. 222-224, 352-354, 1997.
18. 苗明三 外 : 法定中藥藥理與臨床, 世界圖書出

版公司, 西安, p. 339, 1998.
19. 張廷模 外 : 中華臨床中藥學下卷, 人民衛生出版社, 북경, p. 1323, 1998.
20. 洪元植 外 : 漢醫學辭典, 成輔社, 서울, p. 561, 1990.
21. 김동일 외 : 東醫學事典, 까치, 서울, p. 62, 1990.
22. 陸昌洙 外 : 亞細亞本草學, 癸丑文化社, 서울, p. 27, 556, 557, 1998.
23. 김호철 : 한약약리학, 집문당, 서울, p. 74, 357, 359, 2001.
24. 서부일 외 : 國譯本草備要, 一中社, 서울, pp. 157-159, 188-191, 2000.
25. Ban HS, Lim SS, Suzuki K, Jung SH, Lee S, Lee YS, Shin KH, Ohuchi K. Inhibitory effects of furanocoumarins isolated from the roots of Angelica dahurica on prostaglandin E2 production. Planta Med. 2003, 69: 408-412.
26. Nam C, Kim S, Sim Y, Chang I. Anti-acne effects of oriental herb extracts: a novel screening method to select anti-acne agents. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol. 2003, 16: 84-90.
27. Lin CH, Chang CW, Wang CC, Chang MS, Yang LL. Byakangelicol, isolated from Angelica dahurica, inhibits both the activity and induction of cyclooxygenase-2 in human pulmonary epithelial cells. J Pharm Pharmacol. 2002, 54: 1271-1278.
28. Oh H, Lee HS, Kim T, Chai KY, Chung HT, Kwon TO, Jun JY, Jeong OS, Kim YC, Yun YG. Furocoumarins from Angelica dahurica with hepatoprotective activity on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. Planta Med. 2002, 68: 463-4.
29. Guo LQ, Taniguchi M, Chen QY, Baba K, Yamazoe Y. Inhibitory potential of herbal medicines on human cytochrome P450-mediated oxidation: properties of umbelliferous or citrus crude drugs and their relative prescriptions. Jpn J Pharmacol. 2001, 85: 399-408.
30. Kimura Y, Okuda H. Histamine-release effectors from Angelica dahurica var. dahurica root. J Nat Prod. 1997, 60: 249-251.
31. Kwon YS, Kobayashi A, Kajiyama S, Kawazu K, Kanzaki H, Kim CM. Antimicrobial constituents of Angelica dahurica roots. Phytochemistry. 1997, 44: 887-889.
32. Oh H, Kang DG, Lee S, Lee Y, Lee HS. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory alkaloids from Fritillaria *Verticillata*. Planta Med. 2003, 69: 564-565.
33. Pae HO, Oh H, Choi BM, Oh GS, Paik SG, Jeong S, Hwang KM, Yun YG, Chung HT. Differentiation-inducing effects of verticinone, an isosteroidal alkaloid isolated from the bulbus of Fritillaria *Verticillata*, on human promyelocytic leukemia HL-60 cells. Biol Pharm Bull. 2002, 25: 1409-1411.
34. Kang DG, Oh H, Cho DK, Kwon EK, Han JH, Lee HS. Effects of bulb of Fritillaria *Verticillata* maxim. on angiotensin converting enzyme and vascular release of NO/cGMP in rats. Ethnopharmacol. 2002, 81: 49-55.
35. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. Cell Signal. 2001, 13: 85-94.
36. Paik YH, Schwabe RF, Bataller R, Russo MP, Jobin C, Brenner DA. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. Hepatology. 2003, 37: 979-982.
37. Boveris A, Alvarez S, Navarro A. The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. Free Radic

Biol Med. 2002, 33: 1186-1193.

38. Gee K, Lim W, Ma W, Nandan D, Diaz-Mitoma F, Kozlowski M, Kumar A. Differential regulation of CD44 expression by lipopolysaccharide (LPS) and TNF-alpha in human monocytic cells: distinct involvement of c-Jun N-terminal kinase in LPS-induced CD44 expression. J Immunol. 2002, 169: 5660-5672.

39. Pae, H.O., Seo, W.G., Kim, N.Y., Oh, G.S., Kim, G.E., Kim, Y.H., Kwak, H.J., Yun, Y.G., Jun, C.D. and Chung, H.T. (2001) Induction of granulocytic differentiation in acute promyelocytic leukemia cells (HL-60) by water-soluble chitosan oligomer. Leukemia Research 25, 339-346.