

## 調肝湯加減方의 抗酸化活性 및 抗炎症作用에 대한 實驗的 研究

대전대학교 한의과대학 부인과교실  
변형국, 유동열

### ABSTRACT

#### The Experimental Study on Anti-oxidant and Anti-inflammatory Effect of Jogantanggagambang(JGTG)

Hyung-Kuk Byun, Dong-Youl Yoo  
Dept. of Oriental Medicine Graduate School, Daejeon University

**Purpose:** This study was performed to evaluate anti-inflammatory effects of Jogantanggagambang(JGTG).

**Methods:** In the study of anti-oxidant activities, JGTG was investigated by DPPH radical scavenger activity, superoxide dismutase activity and superoxide anion radical scavenger activity. In the study of anti-inflammatory effects, JGTG 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:

1. JGTG showed a safety in cytotoxicity and toxicity of liver.
2. JGTG effected scavenging activity on DPPH free radical, superoxide dismutase and superoxide anion radical.
3. JGTG in RAW 264.7 cell decreased IL-1 $\beta$  mRNA expression, IL-6 mRNA expression, TNF- $\alpha$  mRNA expression at 50, 100  $\mu$ g/ml and also decreased NOS-II mRNA expression at 100  $\mu$ g/ml, and decreased COX-2 mRNA expression at 10, 50, 100  $\mu$ g/ml.
4. JGTG in RAW 264.7 cell decreased significantly IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  at 50, 100  $\mu$ g/ml.
5. JGTG inhibited significantly IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  production in serum of acute inflammation-induced mice.
6. JGTG decreased significantly IL-1 $\beta$  mRNA production in spleen tissue.

**Conclusion:** These results suggest that JGTG can be used for treating diverse female diseases caused by inflammation

**Key Words:** Jogantanggagambang, JGTG, superoxide anion radical, cytokine.

## I. 서 론

瘀血이란 생리적 기능을 상실한 혈액이 凝聚하여 형성된 일종의 병리적 산물인 동시에 致病因子로, 최근에는 염증으로 인한 조직의 삼출, 변성, 괴사, 위축, 증식 역시 瘀血의 범주에 포함시키고 있다<sup>1,2)</sup>. 염증은 균의 감염, 열, 외상, 항원 항체반응 등 생체조직의 기질변화를 초래하는 侵襲에 대한 방어기전으로 발생 부위는 發赤, 發熱, 疼痛, 腫脹, 機能障礙와 같은 炎症의 5대 징후가 나타난다<sup>1-3)</sup>.

《靈樞·癰疽篇》<sup>4)</sup>에는 “營衛稽留于經之中 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”이라 하여 瘀血과 염증과의 상관관계에 대하여 명확하게 기술하고 있다.

濕熱은 급성 염증성 증후를 유발하는 기본인자가 되는데, 濕熱의 積盛으로 인하여 기기가 阻滯되면 인체의 혈액 혹은 진액이 粘滯凝聚되면서 瘀血과 痰濁을 유발시키게 된다. 이로 인하여 조직의 변성과 괴사가 일어나면 종창, 동통, 화농성 궤양, 농혈 및 악취 등의 염증성 소견이 나타난다<sup>3,5)</sup>. 한방 부인과 임상에서 痛經, 經行腹痛, 無月經, 帶下, 熱入血室, 癥瘕, 不妊, 產後腹痛, 產後發熱 등의 주병기가 瘀血과 濕熱下注라는 점은 이를 잘 반영하고 있다<sup>6)</sup>.

調肝湯加減方은 補腎養血, 調肝緩痛의 효능이 있는 調肝湯<sup>5)</sup>에 補血滋陰, 清熱除濕, 散瘀止痛의 효능을 지닌 약물<sup>7-11)</sup>을 加味한 처방으로, 임상에서 瘀血, 濕熱 등으로 구분되는 炎症性 疾患에 효과가 있을 것으로 판단된다.

항염증 작용에 대한 실험적 연구로 송

<sup>12)</sup>, 민<sup>13)</sup>과 한<sup>14)</sup>은 康寧湯, 行經紅花湯, 清熱解毒湯加鷄血藤이 항염증 효과가 있음을, 김<sup>15)</sup>, 홍<sup>16)</sup>, 이<sup>17)</sup> 등은 각각 清熱消毒飲, 秘方奪命散, 少腹逐瘀湯이 항염증 및 항혈전 효과가 있음을 보고하였으나, 調肝湯加減方에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다. 이에 저자는 調肝湯加減方の 항염증 작용 및 항산화 효과를 알아보기 위해 항산화 활성, RAW 264.7세포주에서 염증관련 cytokines의 유전자 발현 및 생성에 미치는 영향, 급성 염증성 질환 생쥐 모델에서의 혈청내, 비장 및 간 조직 내의 cytokine 변화에 미치는 영향에 대한 실험을 시행하여 유의한 결과를 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 고품사료 (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 調肝湯加減方<sup>5)</sup>의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 처

방의 내용과 1첩 용량은 다음과 같다 (Table 1).

Table 1. Prescription of Jogantanggagambang (JGTG)

韓藥名	生藥名	用量(g)
當歸	Angelicae Radix	5
白芍藥	Paoniae Radix	5
山茱萸	Corni Fructus	5
續斷	Dipsaci Radix	5
杜沖	Eucomiae Cortex	5
烏藥	Linderae Radix	5
巴戟	Morindae Radix	5
川楝	Meliae Fructus	5
鬱金	Curcumae Radix	5
鷄血藤	Mucunae Caulis	6
熟地黃	Rhemaniae Radix	10
益母草	Leonuri Herba	10
Total		71

### 3) 시약 및 기기

#### (1) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 Dulbecco's phosphate buffered saline, Hank's balanced salt solution, heparin, lipopolysaccharide, chlorosulforodam-in-B (SRB), diethyl pyrocarbonate (DEPC), NH<sub>4</sub>Cl, KHCO<sub>3</sub>, tris-base, tris-HCL, ethanol, EDTA, TCA (trichloroacetic acid), acetic acid, carrageenin, arachidonic acid, antibiotic, dulbecco's minimum essential medium (DMEM), collagenase A, Indianapoilis, DNase type I, antibiotics, penicillin, streptomycin, amphotericin, 2,7-dichlorodihydro fluorescin diacetate (DCFH-DA), anti-body 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) 제

품을, normal saline은 중외제약 제품을, fetal bovine serum (FBS)은 Hyclone (Hyclone Logan., USA) 제품을, RNase는 Pharmingen (Torreyana., USA) 제품을, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , COX-2, NOS-II ELISA kit은 R&D system (Minneapolis., USA) 제품을 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 (Shimazue, 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 (Applied biosystems., USA) 등을 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 검액의 조제

JGTG 2첩을 3,000 ml round flask에 넣고 증류수 2,000 ml를 가하여, 3시간 가열 추출한 후, 침전물을 3회 여과(3M

filter paper)하고, 이 여과액을 rotary vaccum evaporator에서 감압 농축하였다. Round flask에 농축된 용액을 -70°C deep freezer에서 4시간 동안 방치하고, 24시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하여 2칩당 29.5 g의 분말을 얻어서 실험에 필요한 농도로 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

2) 항산화 활성 측정

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

150 mM DPPH/EtOH 150  $\mu$ l에 JGTG를 1000, 500, 250, 125, 62.5  $\mu$ g/ml 농도로 희석하여 100  $\mu$ l씩 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이를 흡광도 517 nm에서 측정하여 아래의 방법으로 계산하였다.

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

(2) Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정

JGTG 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.

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

(3) Superoxide anion radical (SAR)

소거능 측정

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

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

3) Mouse lung fibroblast cells (mLFCs) 배양

정상 Balb/c계 생쥐의 폐조직 1 g을 잘게 분쇄하여 ACK 용액으로 적혈구를 제거한 후 cold 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<sup>4</sup> 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 PBS로 약 2회 1,500 rpm에서 원심분리 하였다. 이를 DMEM-10% FBS로 1주일 동안 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA

로 세포를 분리하여 연속으로 1주일씩 3회 반복하여 살아있는 부착세포를 DMEM-5% FBS 배양액에서 배양하였다.

#### 4) 세포독성 측정

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

#### 5) 간독성 검사

SD계 흰쥐에 14일간 구강으로 약물을 처리하고 심장 천자를 통하여 채혈한 후 혈청을 분리하여 GOT, GPT를 측정하였다.

#### 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 PBS로 약 2회 1500 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 cell에서 RNA 분리

먼저 RAW264.7 세포주는 24 well plate에 1×10<sup>6</sup> 세포로 분주하였다. 여기에 JGTG 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 6 시간 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 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20  $\mu\text{l}$ 의 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  $\mu\text{g}$ 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 μl의 M-MLV RT (200 U/μl)를 다시 가하고, DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μl가 되도록 하였다. 이 20 μl의 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 시

킨 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-α	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°C에서 2분, 94°C에서 4분간 반응하여 pre-denaturation 시킨 뒤, 95°C에서 15초, 60°C에서 1분간 반응하여 40회 반복 수행하였다. JGTG 투여군과 대조군은 internal standard로 G3PDH를 사용하여 표적 유전자의 발현을 표준화하였다.

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

x : starting quantity

y : yield

n : number of cycles

e : efficiency로 계산하여 RQ (relative quantitative)을 측정하였다.

7) 염증cytokine 분석

RAW264.7 세포주는 24 well plate에 1×10<sup>6</sup> 세포로 분주하였다. 여기에 JGTG 100 μg/ml, 50 μg/ml를 처리하고 1시간 후 LPS 50 μg/ml를 각각의 well에 첨가한 후 3시간 배양하고 세포를 harvest하여 -20°C의 냉동고에 보관한 후, IL-1β, IL-6, TNF-α ELISA kit의 방법에 따라 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) Lipopolysaccharide(LPS)로 유도된 염증 생쥐 모델

(1) IL-1β, IL-6, TNF-α 생성량 측정  
JGTG 투여군은 20 g Balb/c계 생쥐를 기준으로 검액 9.6 mg을 생리식염수 0.2 ml에 용해시켜 oral zonde를 이용하여 하루에 1회씩 7일간 경구 투여하였

다. 7일 후 LPS를 1 mg/kg을 복강에 주사한 후 90분 후에 ethyl ether로 마취하고 심장 천자법으로 채혈하였다. 채혈 후 혈청을 분리하여 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  생성량을 ELISA로 측정하였다. 각 well에 생쥐의 혈청 100  $\mu$ l (1/100 dilution) 씩 분주한 후 antibody cytokine-biotined conjugated 100  $\mu$ l를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 2시간 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 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 간과 비장 조직에서의 정량적 중합 효소 연쇄 반응

LPS로 유도된 실험 생쥐의 비장 및 간조직 0.1 g과 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 (CHCl<sub>3</sub>) 50  $\mu$ l를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 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 $^{\circ}$ C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

9) 통계 처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean  $\pm$  S.E로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's t-test 분석 방법을 이용하여 결정하였다.

### III. 실험 성적

#### 1. 안전성 검사

1) 세포독성

mLFCs에서 대조군의 세포생존율은 100.0  $\pm$  6.5%로 나타난 반면, JGTG의 1, 10, 50, 100, 200  $\mu$ g/ml 농도에서는 각각 112.4  $\pm$  4.6, 94.5  $\pm$  5.4, 92.4  $\pm$  3.7, 88.5  $\pm$  4.0, 112.4  $\pm$  4.6%로 나타났다(Fig. 1).

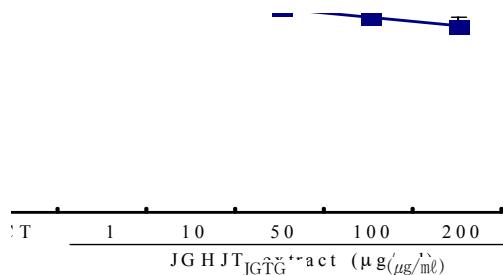


Fig. 1. Cytotoxicity of JGTG on Mouse Lung Fibroblast Cells (mLFCs).

mLFCs were treated with various concentration (200, 100, 50, 10, 1  $\mu$ g/ml) of the JGTG extract.

2) 간독성

간 기능 측정의 지표 성분인 GOT는 정상군이 153  $\pm$  31.6 IU/l, JGTG 투여군이 132.4  $\pm$  30.8 IU/l로 나타났다. GPT는 정상군이 50.2  $\pm$  7.0 IU/l, JGTG 투여군이 48.9  $\pm$  4.7 IU/l로 나타났다. JGTG 투여군의 GOT와 GPT의 수치가 정상 범위로 나타나 약물에 의한

간 독성은 발견되지 않았다(Fig. 2).

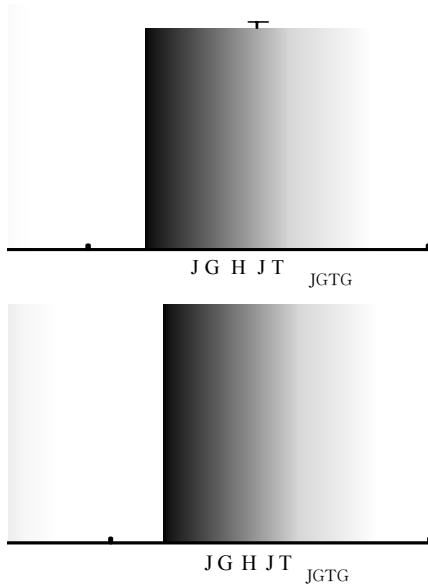


Fig. 2. Effect of JGTG on the GOT and GPT in rat .

Normal : oral administration of normal saline.  
JGTG : oral administration of 98.3 mg/200 g of JGTG extract.

## 2. 항산화 활성에 미치는 영향

### 1) DPPH 소거 활성능

DPPH의 소거 활성은 1000, 500, 250, 125, 62.5  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각 84.14  $\pm$  0.17, 79.31  $\pm$  1.82, 65.17  $\pm$  0.89, 43.41  $\pm$  0.36, 25.25  $\pm$  0.73%의 소거 활성 효과를 나타내었다(Fig. 3).

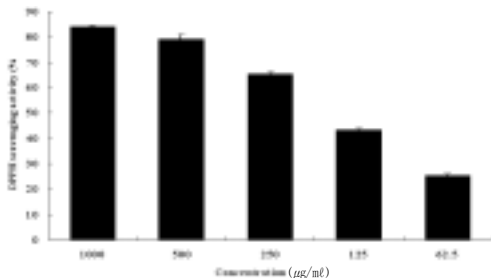


Fig. 3. Scavenging activity of JGTG on DPPH free radical.

JGTG 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 유사활성능

SOD의 유사활성은 1000, 500, 250, 125, 62.5  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각 52.60  $\pm$  3.94, 37.66  $\pm$  2.02, 27.59  $\pm$  2.12, 23.05  $\pm$  2.88, 23.05  $\pm$  4.09%의 유사활성을 나타내었다(Fig. 4).

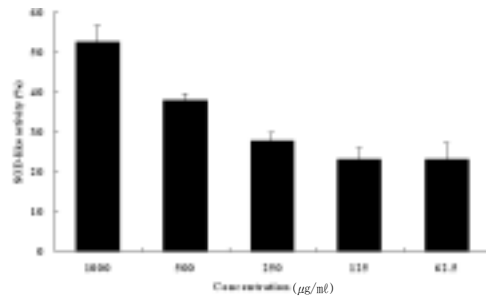


Fig. 4. Scavenging activity of JGTG on Superoxide dismutase.

JGTG 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.

### 3) SAR 소거 활성능

SAR의 유사활성은 1000, 500, 250, 125, 62.5  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각 53.36  $\pm$  1.87, 37.29  $\pm$  1.76, 28.20  $\pm$  0.35, 24.78  $\pm$  6.24, 9.53  $\pm$  0.76%의 소거 활성 효과를 나타내었다(Fig. 5).



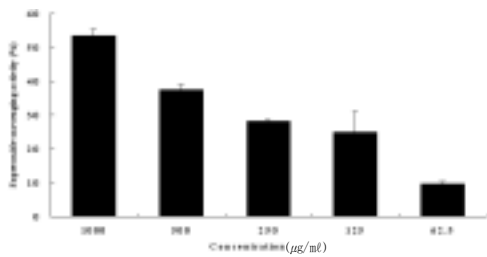


Fig. 5. Scavenging activity of JGTG on Superoxide anion radical.

JGTG 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 1 mM 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 cytokine 유전자 발현

#### 1) IL-1 $\beta$ 유전자 발현

RAW264.7 세포주에서 IL-1 $\beta$  유전자 발현 RQ 값은 정상군이  $0.086 \pm 0.029$ , 대조군이  $1.02 \pm 0.02$ 로 나타났으며, JGTG 100, 50, 10  $\mu\text{g/ml}$  농도 처리군에서는 각각  $0.313 \pm 0.103$ ,  $0.594 \pm 0.155$ ,  $1.104 \pm 0.111$  RQ 값을 나타내어, 대조군에 비해 100, 50  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 유의성 있는 (\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ ) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 6).

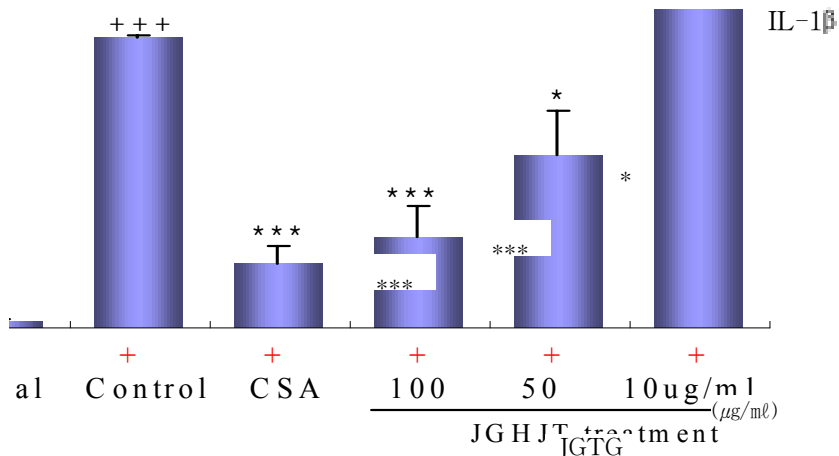


Fig. 6. Inhibitory effects of JGTG extract on IL-1 $\beta$  mRNA expression in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of JGTG extract (100, 50, and 10  $\mu\text{g/ml}$ ) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 2  $\mu\text{g/ml}$ ) for 6 hr. 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) 세포주에서 IL-6 유전자 발현

RAW264.7 세포주에서 IL-6 유전자 발현 RQ 값은 정상군이  $0.315 \pm 0.09$ , 대조군이  $1.073 \pm 0.073$ 로 나타났으며, JGTG 100, 50, 10  $\mu\text{g/ml}$  농도 처리군에

서는 각각  $0.622 \pm 0.104$ ,  $0.646 \pm 0.068$ ,  $0.886 \pm 0.101$  RQ 값을 나타내어, 대조군에 비해 100, 50  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 유의성 있는 (\*\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.01$ ) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 7).

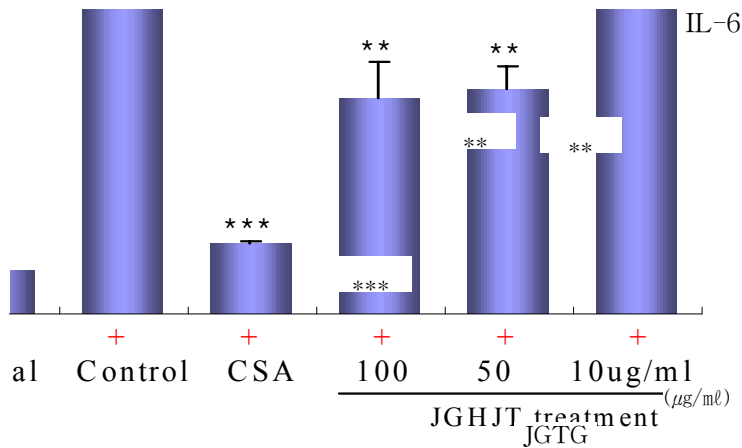


Fig. 7. Inhibitory effects of JGTG extract on IL-6 mRNA expression in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of JGTG 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 (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

### 3) TNF- $\alpha$ 유전자 발현

RAW264.7 세포주에서 TNF- $\alpha$  유전자 발현 RQ 값은 정상군이  $0.178 \pm 0.06$ , 대조군이  $1.043 \pm 0.043$ 로 나타났으며, JGTG 100, 50, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 투여군에

서는 각각  $0.259 \pm 0.097$ ,  $0.355 \pm 0.078$ ,  $0.933 \pm 0.088$ 의 RQ 값을 나타내어, 대조군에 비해 100, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 유의성 있는 (\*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 8).

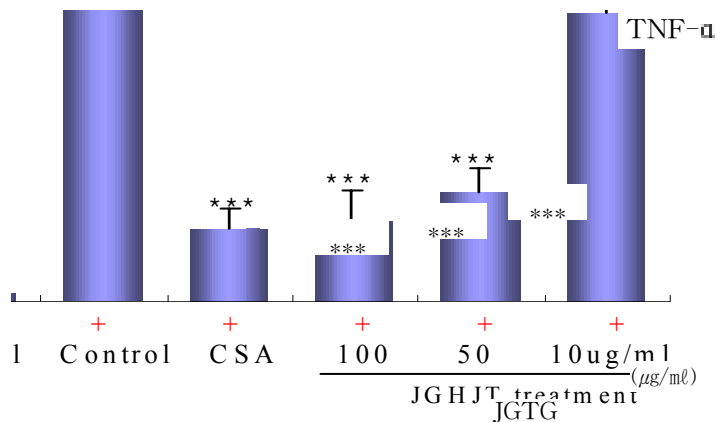


Fig. 8. Inhibitory effects of JGTG extract on TNF- $\alpha$  mRNA expression in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of JGTG 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 (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

4) COX-2 유전자 발현

RAW264.7 세포주에서 COX-2 유전자 발현 RQ 값은 정상군이  $0.272 \pm 0.043$ , 대조군이  $0.994 \pm 0.007$ 로 나타났으며, JGTG 100, 50, 10  $\mu\text{g/ml}$  농도 처리군에

서 각각  $0.3 \pm 0.064$ ,  $0.363 \pm 0.008$ ,  $0.501 \pm 0.095$ 의 RQ 값을 나타내어, 대조군에 비해 모든 농도에서 유의성 있는 ( $***p<0.001$ ,  $***p<0.001$ ,  $**p<0.01$ ) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 9).

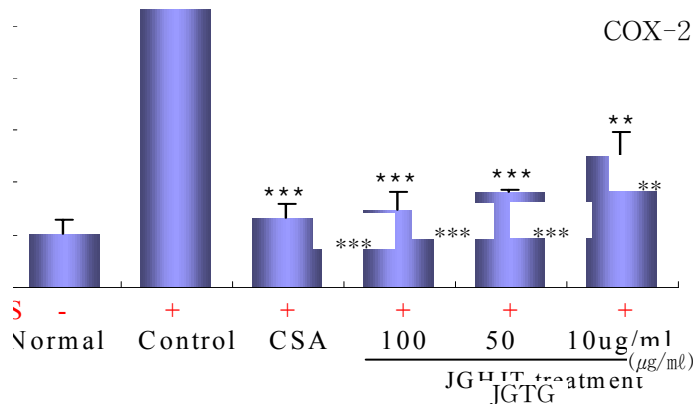


Fig. 9. Inhibitory effects of JGTG extract on COX-2 mRNA expression in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of JGTG 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. 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 발현 RQ 값은 정상군이  $0.038 \pm 0.017$ , 대조군이  $0.984 \pm 0.017$ 로 나타났으며, JGTG 100, 50, 10  $\mu\text{g/ml}$  농도 처리군에서는 각각  $0.705 \pm 0.064$ ,  $0.915 \pm 0.059$ ,  $1.085 \pm 0.166$  RQ 값을 나타내어 대조군에 비해 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 유의성 있는 ( $*p<0.05$ ) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 10).

은 정상군이  $38.5 \pm 18.2$   $\text{pg/ml}$ , 대조군이  $701.0 \pm 59.4$   $\text{pg/ml}$ , JGTG 100  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  투여군이 각각  $325.0 \pm 39.6$   $\text{pg/ml}$ ,  $543.0 \pm 29.4$   $\text{pg/ml}$ 로 나타나 대조군에 비하여 모든 실험 농도에서 유의성 있는 ( $**p<0.01, *p<0.05$ ) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 11).

2) IL-6 생성량

정상군이  $363.0 \pm 77.8$   $\text{pg/ml}$ , 대조군이  $6002.0 \pm 729.7$   $\text{pg/ml}$ , JGTG 100  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  투여군이 각각  $3284.0 \pm 452.5$   $\text{pg/ml}$ ,  $4063.5 \pm 282.1$   $\text{pg/ml}$ 로 나타나 대조군에 비하여 모든 농도에서 유의성 있는 ( $*p<0.05, *p<0.05$ ) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 12).

4. RAW264.7 세포주에서 염증 사이토카인 생성량

1) IL-1 $\beta$  생성량

RAW264.7 세포주에서 IL-1 $\beta$  생성량

3) TNF- $\alpha$  생성량  
 RAW264.7 세포주에서 TNF- $\alpha$  생성량은 정상군이  $272.5 \pm 81.3$  pg/ml, 대조군이  $3243.5 \pm 392.4$  pg/ml, JGTG 100  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml 투여군에서 각각  $1726.0 \pm 336.6$  pg/ml,

$2311.5 \pm 217.3$  pg/ml로 나타나, 대조군에 비하여 모든 실험 농도에서 유의성 있는 (\*p<0.05, \*\*p<0.01) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 13).

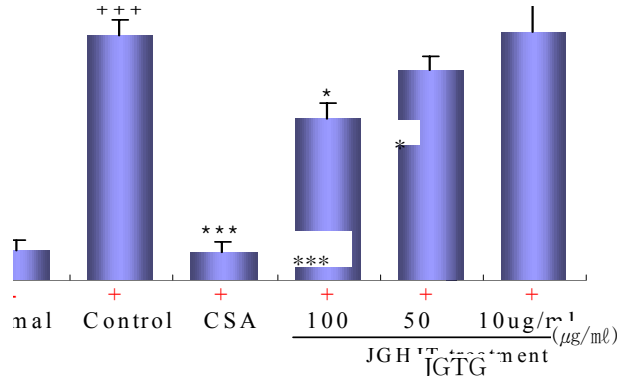


Fig. 10. Inhibitory effects of JGTG extract on NOS-II mRNA expression in RAW264.7 cell line.

RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of JGTG extract (100, 50, and 10  $\mu$ g/ml) in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS; 2  $\mu$ g/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).

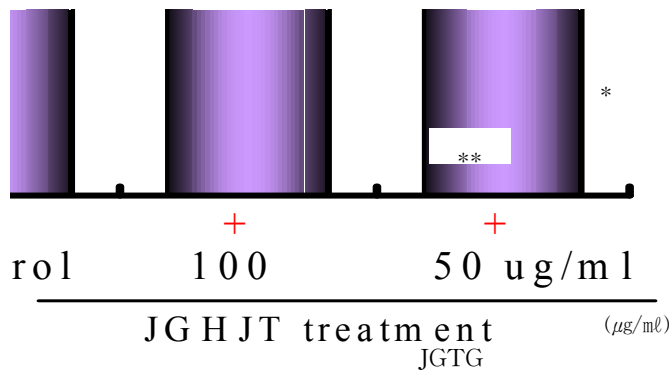


Fig. 11. Effect of JGTG extract on the levels of IL-1 $\beta$  in the RAW264.7 cell.

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°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, \*\*p<0.01).

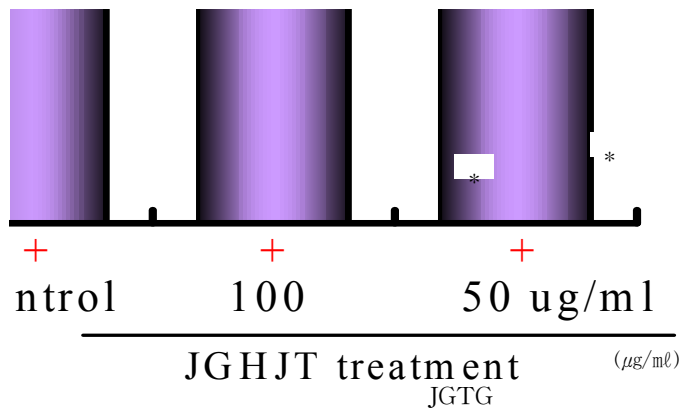


Fig. 12. Effect of JGTG extract on the levels of IL-6 in the RAW264.7 cell. RAW264.7 cell was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. The levels of IL-6 were determined using a 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 ( $*p<0.05$ ).

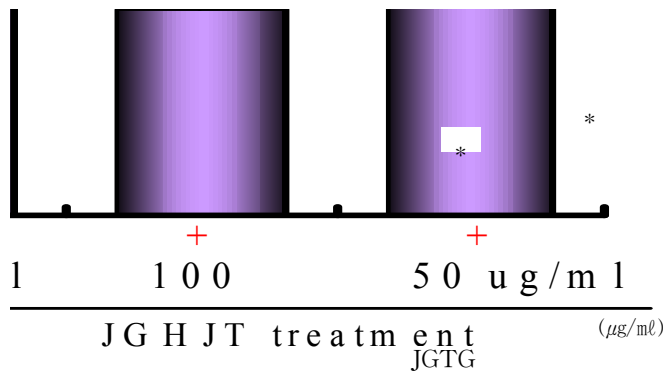


Fig. 13. Effect of JGTG extract on the levels of TNF- $\alpha$  in the RAW264.7 cell. RAW264.7 cell was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. The levels of TNF- $\alpha$  were 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 ( $*p<0.05$ ).

### 5. 급성 염증성 질환 생쥐 모델의 혈청 내 cytokine 변화에 미치는 영향

#### 1) IL-1 $\beta$ 생성량에 미치는 영향

혈청내 IL-1 $\beta$  생성량은 정상군이  $50.3 \pm 11.24$  pg/ml, 대조군이  $75.8 \pm 0.42$  pg/ml로 나타난 반면, JGTG 투여군에서는  $59.2 \pm 0.849$  pg/ml로 나타나 대조군에

비하여 유의성 있는 ( $***p<0.001$ ) 결과를 나타내었다(Fig. 14).

#### 2) IL-6 생성량에 미치는 영향

혈청내 IL-6 생성량은 정상군이  $153.0 \pm 23.1$  pg/ml, 대조군이  $497.0 \pm 0.849$  pg/ml로 나타난 반면, JGTG 투여군에서는  $384.0 \pm 14.3$  pg/ml로 나타나 대조군

에 비하여 유의성 있는 (\*\*\*) 결과를 나타내었다(Fig. 15).

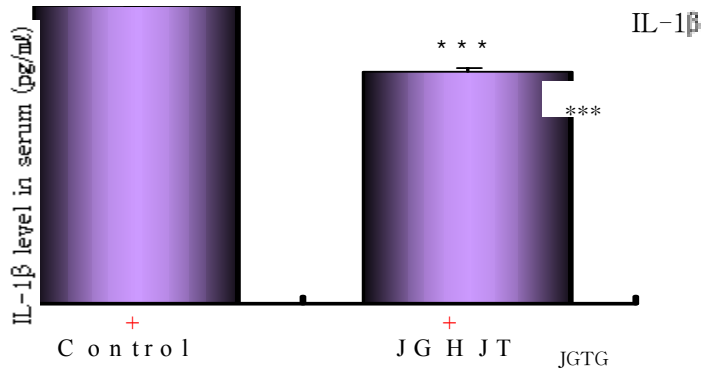


Fig. 14. The effect of JGTG extract on IL-1 $\beta$  production in sera following LPS co-treatment.

Female mice were co-treatment with JGTG extract (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<0.001)

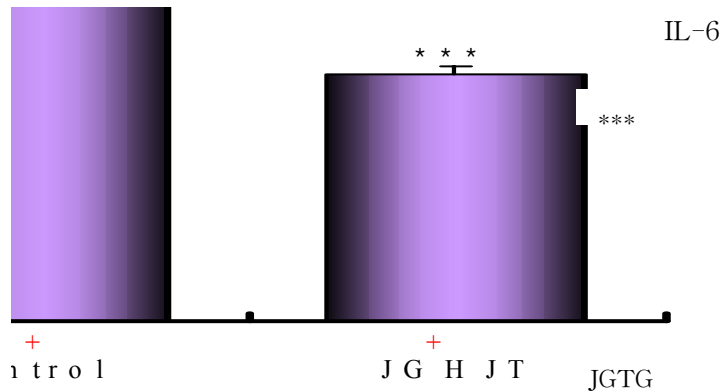


Fig. 15. The effect of JGTG extract on IL-6 production in sera following LPS co-treatment.

Female mice were co-treatment with JGTG extract (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)

3) TNF- $\alpha$  생성량에 미치는 영향  
 혈청내 TNF- $\alpha$  생성량은 정상군이 94.8  $\pm$  9.8 pg/ml, 대조군이 1687.0  $\pm$  83.11 pg/ml로 나타난 반면, JGTG 투여군에서는 161.0  $\pm$  126.3 pg/ml로 나타나 대조군

에 비하여 유의성 있는 (\*\*\*) 결과를 나타내었다(Fig. 16).

### 6. 급성 염증성 질환 생쥐 모델의 비장 및 간 조직내 cytokine 변화에 미치는 영향

1) IL-1 $\beta$  mRNA 발현량에 미치는 영향  
비장 및 간 조직내 IL-1 $\beta$  mRNA 생성량을 측정한 결과, 간조직에서는 정상군은  $0.088 \pm 0.014$  pg/ml, 대조군은  $1.066 \pm 0.006$  pg/ml로 나타난 반면, JGTG 투여군에서는  $0.893 \pm 0.119$  pg/ml

로 나타내었다. 비장조직에서는 정상군은  $0.064 \pm 0.010$  pg/ml, 대조군은  $0.995 \pm 0.006$  pg/ml로 나타난 반면, JGTG 투여군에서는  $0.824 \pm 0.040$  pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (\*p<0.05) 감소결과를 나타내었다(Fig. 17).

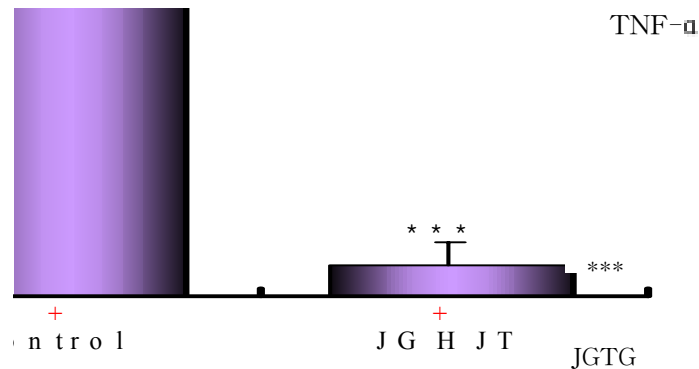


Fig. 16. The effect of JGTG extract on TNF- $\alpha$  production in sera following LPS co-treatment.

Female mice were co-treatment with JGTG extract (9.8 mg/20 g) and LPS (1 mg/kg). Total TNF- $\alpha$  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 )

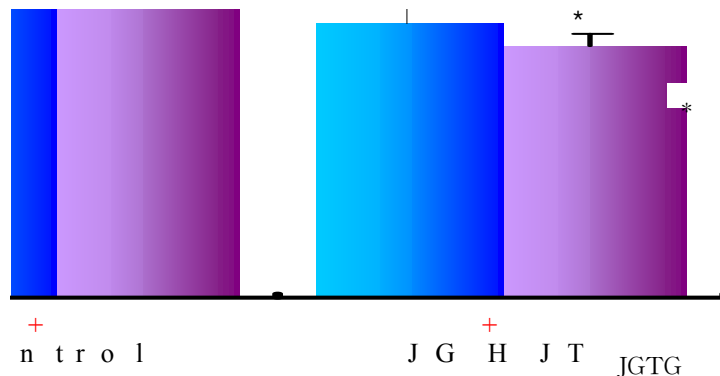


Fig. 17. Inhibitory effects of JGTG extract on IL-1 $\beta$  mRNA expression level in spleen and liver following LPS co-treatment.

Female mice were co-treatment with JGTG extract (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-1 $\beta$  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<0.05)

## IV. 고찰

염증은 생체 조직이 생물학적, 물리적, 화학적, 면역학적인 원인에 의하여 손상을 받았을 때, 이 손상을 국소화시키고 정상상태로 되돌리려는 면역과정의 일부 분이다<sup>18)</sup>. 최근의 다양한 연구에서는 순환장애로 일어나는 缺血, 鬱血, 혈전형성 및 水腫 등과 대사 장애로 일어나는 조직의 병리반응 및 細胞分化不良과 炎症으로 인한 조직의 삼출, 변성, 괴사, 위축 혹은 증식 등이 瘀血의 病態와 유사하다고 보고 있다<sup>1-3)</sup>.

“瘀血”에 대하여 漢代 張<sup>19)</sup>은 《金匱要略·驚悸吐下血胸滿瘀血病》에서 최초로 언급하면서 辨證 및 治療의 기초를 성립시켰고, 清代에 들어와 葉<sup>20)</sup>, 王<sup>21)</sup> 등은 瘀血의 病因, 病機, 症狀 및 治療에 대한 체계적인 理論을 확립시켰다. 瘀血로 인한 症狀는 다양하나 일반적으로 固定性 刺痛, 病理的腫塊, 出血後 瘀斑, 血管異常, 月經色黑, 口蓋粘膜炎狀, 神經全身症狀, 口潮渴, 小腹部壓痛, 脈澀 등이 나타난다<sup>22)</sup>.

그러므로 炎症性 疾患은 한의학적으로 瘀血, 濕熱 등으로 인하여 起因되는 病症과 유사한 것으로 보며<sup>23-25)</sup>, 瘀血의 대표적인 증상인 刺痛, 出血, 腫塊 등<sup>26)</sup>과 매우 유사한 연관성을 보여준다. 따라서 韓醫學에서 活血祛瘀, 清熱除濕의 효능을 가진 處方은 현대의학에서 일컫는 염증성질환에 대한 효과를 나타낼 것이라고 사료된다.

調肝湯은 清代 傅<sup>5)</sup>의 《傅青主女科》에 “平調肝氣, 既能轉逆氣, 又善止鬱癢, 經後之症, 以此方調理最佳” 라 하여 經

後腹痛을 치료할 목적으로 立方되었으며, 이후 임상에서 肝腎虧損으로 인한 월경통과 무월경 등에 응용되고 있다<sup>6)</sup>.

調肝湯加減方은 補腎養血, 調肝緩痛의 효능이 있는 調肝湯에서 山藥, 阿膠, 甘草를 去하고 續斷, 杜沖, 烏藥, 川棟子, 鬱金, 鷄血藤, 熟地黃, 益母草를 가한 처방으로, 구성약물의 효능을 살펴보면, 當歸는 補血活血, 白芍藥은 涼血補血, 柔肝緩急止痛, 山茱萸는 益精氣 養肝腎, 續斷은 補腎, 固衝任, 杜沖은 溫補腎陽, 補益腎精, 烏藥은 理氣行滯, 巴戟은 溫腎益衝任, 川棟子는 柔肝理氣, 鬱金은 理氣開鬱, 去風濕, 鷄血藤은 清熱除濕, 消瘀止痛, 養血柔筋, 熟地黃은 保養精血, 補血滋陰, 益母草는 清內熱, 理氣行滯止痛하는 효능을 가지고 있다<sup>8-11,27,28)</sup>. 이상으로 보아 調肝湯加減方은 補血滋陰, 清熱除濕, 散瘀止痛의 효능이 있어, 임상에서 瘀血, 濕熱 등으로 변증되는 炎症性 疾患에 효과가 있을 것으로 판단된다.

이에 저자는 調肝湯加減方의 抗炎症 효과를 구명하기 위하여 본 연구에 착수하였다.

먼저 안전성 검사로 약물 투여후 세포 독성과 간독성에 대하여 조사해본 결과 세포독성 부분에서는 mLFCs에서 대조군의 세포생존율은  $100.0 \pm 6.5\%$ 로 나타난 반면, JGTG의 200, 100, 50, 10, 1  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 각각  $84.7 \pm 3.8$ ,  $88.5 \pm 4.0$ ,  $92.4 \pm 3.7$ ,  $94.5 \pm 5.4$ ,  $112.4 \pm 4.6\%$ 로 나타났다(Fig. 1).

간독성 부분에서는 JGTG 투여군이 GOT는  $132.4 \pm 30.8$  IU/l, GPT는  $48.9 \pm 4.7$  IU/l로, GOT와 GPT의 수치가 정상 범위로 나타나 약물에 의한 간 독성은 발견되지 않았다(Fig. 2).



체내산화(Oxidative stress)란 말 그대로 생체 내에서 일어나는 산화 작용을 말한다. 인체에서 산소와 영양물질이 반응하여 에너지를 만드는 대사과정 중에 나오는 유해물질을 활성산소라 하는데 체내산화에 수반되는 활성 산소종(reactive oxygen species; ROS)으로는 oxygen ( $^1O_2$ ), superoxide( $O_2^-$ ), hydroxy radical( $HO^\cdot$ ), hydrogen peroxide( $H_2O_2$ ) 등이 있으며, 이러한 활성 산소종들은 염증 반응에 관여한다<sup>29)</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, 細胞의 괴사, 그리고 DNA에 대한 세포손상을 유발시켜 생체의 기능을 약화시킨다. 인체 내에는 활성산소의 독성으로부터 조직을 보호하고 항상성을 유지하려는 방어계로는 selenium, Vitamine C, E 등의 비효소계와 SOD와 catalase, peroxidase등과 같은 효소계가 존재한다<sup>30,31)</sup>. 특히 SOD는 세포내에 생성된  $O_2^-$ 를  $H_2O_2$ 로 전환시키는 효소로서 알려져 있다<sup>32,33)</sup>.

이에 抗酸化활성에 미치는 영향을 실험적으로 입증하고자 DPPH radical 소거 활성, SOD 유사활성, superoxide anion radical(SAR) 소거활성을 측정 한 결과 염증작용과 관계가 있는 항산화 활성에 미치는 영향에서도 JGTG 투여군 1000, 500, 250, 125, 62.5  $\mu g/ml$  농도에서 DPPH 소거 활성 효과, SOD의 유사 활성 및 SAR의 소거 활성 효과를 나타냈다(Fig. 3-5).

염증반응에서의 유해자극은 직접 국소에 작용해 손상을 주기도 하지만, 대부

분 내인성 화학전달물질을 통해 간접적으로 국소의 혈관이나 세포에 전달된다<sup>34)</sup>.

염증반응의 주요 화학전달 매개물질로는 크게 즉시형 혈관투과성 항진에 관여하는 amine류(histamine, serotonin 등)와 kinin류(bradykinin 등), 지연형 반응에 주로 작용하는 cytokine류와 prostaglandin과 leukotriene류 등의 4군으로 분류된다. 지연형 반응에 주로 작용하는 cytokine은 30kD이하의 분자량을 가진 당단백으로 소량( $10^{-10} \sim 10^{-15}M$ )으로도 수용체와 결합해 강력하게 염증반응과 면역반응을 조절 한다<sup>35)</sup>. Cytokine중 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18 및 TNF- $\alpha$ 는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 cytokine으로, 이중 특히 TNF- $\alpha$ 는 대식세포와 비만세포 등에서 분비되어 IL-1과 유사한 염증유발 작용과 세포의 증식과 분화를 조절하고 중성구를 자극하여 탐식작용과 탈과립 등을 증가시켜 염증반응에서 중요한 역할을 하여 최근에는 TNF- $\alpha$ 를 차단하는 약물들이 염증의 치료제로 연구되고 있다<sup>36,37)</sup>.

JGTG의 항염증 효과에 대한 연구에서 대표적인 염증성 cytokines인 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 유전자 발현에 미치는 영향을 평가한 결과 IL-1 $\beta$ 과 TNF- $\alpha$ 에서는 대조군에 비해 100, 50  $\mu g/ml$  농도에서 유의성 있는 감소효과를(Fig. 6, 8), IL-6에서는 모든 농도에서 농도의존적으로 유의성 있는 감소효과를 보여 주었다(Fig. 7).

Prostaglandin(PG)은 세균의 감염에서 유래한 LPS 혹은 arachidonic acid로부터 만들어진다. Arachidonic acid는 cyclooxygenase(이하 COX) 효소의 작용을 받아 PG를 합성하는데, PGE<sub>2</sub>와

PGI<sub>2</sub>은 혈관 투과성 향진에 작용을 하고, tromboxane은 백혈구 유주에 관여하는 등 PG는 염증과 가장 관련이 깊은 것으로 알려져 있다.

오래전부터 發熱, 發赤, 疼痛 등을 치료하는데 널리 사용되어온 aspirin은 COX의 작용을 억제시키기 때문인 것이다. COX-1은 위장관 보호, 신장의 혈류 조절, 혈소판 응집 등 우리 몸의 정상적인 기능 유지에 중요한 작용을 하는 house keeping enzyme인 반면, 외부 자극에 의해 발현이 유도되는 COX-2는 염증과 암 등의 각종 퇴행성 질환에 중요한 역할을 한다<sup>38-40</sup>. 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 LPS가 있으며 IL-2와 IL-10에 의해 억제된다<sup>41</sup>.

RAW264.7 세포주에서 COX-2 유전자 발현 RQ 값은 모든 농도에서 유의성 있는 감소 효과를 나타내었다(Fig. 9).

Nitric Oxide(NO)는 생체내 혈관에서 강력한 혈관확장 작용을 하며 혈소판 응집을 저해하고 중성구나 혈소판이 혈관 내피세포에 부착하는 것을 막는 등의 역할을 한다. 생체내에서 NO의 전구물질은 L-arginine으로서 Nitric Oxide Synthesis (NOS)의 작용으로 L-arginine이 산화되면 L-citrulline과 NO를 생성하게 된다. 혈관내피세포성 NOS, 신경세포성 NOS는 활성화하는데 칼슘과 calmodulin이 필요하며 지속적으로 분비되는 반면 iNOS는 칼슘과 무관하게 활성화되며 염증성 cytokine이나 LPS등에 반응하여 분비된다<sup>42</sup>.

NO와 PG 그리고 이들과 관련된 두 효소, NOS와 COX-2는 염증반응의 단계에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.

RAW264.7 세포주에서 NOS-II 유전자 발현 RQ 값도 100  $\mu$ g/ml 농도에서 유의성 있는 감소 효과를 나타내었다(Fig. 10).

급성 염증성 질환 생쥐 모델의 혈청내 cytokines 변화에 미치는 영향에서, 혈청내 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 생성량을 측정된 결과 혈청 중 IL-1 $\beta$  생성량, IL-6 생성량, TNF- $\alpha$  생성량 모두 대조군에 비하여 유의성 있는 결과를 나타내었다(Fig. 14-16).

또한 급성 염증성 질환 생쥐 모델의 비장 및 간 조직내 cytokines 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 IL-1 $\beta$  mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보았다. 脾臟 組織에서의 IL-1 $\beta$  mRNA의 발현 정도를 측정된 결과 대조군에 비하여 JGTG 투여군에서 유의성 있게 감소하였다(Fig. 17).

이상의 실험적 연구 결과를 종합하여 볼 때, 調肝湯加減方(JGTG)은 抗炎症 효과가 인정되므로, 肝腎虧損을 겸한 여성의 炎症性 疾患에 다양하게 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 결 론

調肝湯加減方の 抗炎症 작용의 기전을 究明하기 위하여 실험한 결과는 다음과 같다.

1. 調肝湯加減方은 세포독성과 간독성을 나타내지 않았다.

2. 調肝湯加減方は DPPH 소거 활성 효과, SOD의 유사 활성 및 SAR의 소거 활성 효과를 나타내었다.
3. 調肝湯加減方は RAW 264.7 세포주에서 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , NOS-II, COX-2, IL-6의 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다.
4. 調肝湯加減方は RAW 264.7 세포주에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 생성을 대조군에 비해 유의성 있게 억제 하였다.
5. 調肝湯加減方は 급성 염증유발 생쥐의 혈청내 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 생성을 유의성 있게 억제하였다.
6. 調肝湯加減方は 비장의 IL-1 $\beta$  mRNA의 발현정도를 유의성 있게 감소시켰다.

이상의 실험 결과로 보아 調肝湯加減方(JGTG)은 抗炎症 효과가 인정되므로, 瘀血과 濕熱로 인한 여성의 骨盤炎症性疾患에 광범위하게 應用될 수 있을 것으로 사료된다.

- 투 고 일 : 2008년 4월 25일
- 심 사 일 : 2008년 4월 29일
- 심사완료일 : 2008년 5월 10일

## 참고문헌

1. 大韓病理學會. 病理學 II. 서울: 高文社. 1995;71-104, 112-120, 540-542.
2. 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.
3. 전국한의과대학 병리학 교실編. 동의 병리학. 서울: 一中社. 1999;152-165, 272-274, 424-426.
4. 홍원식. 정교황제내경영추. 동양의학 연구원출판사. 1985;346.
5. 傅靑主. 傅靑主女科. 서울: 大成文化社. 券上. 1984;97.
6. 한의부인과학 편찬위원회. 한의부인과학(상). 서울: 정담출판사. 2002;67, 164, 271-280.
7. 上海中醫學院. 中草藥學. 上海: 商務印書館香港分館. 1983;140-142, 154-155, 205, 238, 392, 418.
8. 新編中藥大辭典(上篇). 臺灣. 新文豐出版公司. 1982;851.
9. 顏正華 등. 中藥學. 北京: 人民衛生出版社. 1989;197-199.
10. 李時珍. 本草綱目. 北京: 中國中醫藥出版社. 1996;486.
11. 李梴. 編註醫學入門. 서울: 大星出版社. 1994;408, 462, 477, 501.
12. 송미선 등. 康寧湯의 經口와 直腸投與의 抗炎症效果 比較研究. 대한한방부인과학회지. 2003;16(3):147-161.
13. 민병호 등. RAW 264.7 세포주와 염증 생쥐모델에서 抗炎症作用에 대한 行經紅花湯의 效果. 대한한방부인과학회지. 2005;18(4):36-53.
14. 한충희 등. RAW 264.7 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.
15. 김호민. 清熱消毒飲이 실험적 염증 및 혈전에 미치는 영향. 동의병리학회지. 1995;10:267-293.
16. 홍지우 등. 秘方奪命散의 항염증효과 및 항응고작용에 대한 연구. 대한동의병리학회지. 1998;12(2):63-72.
17. 李相洙 등. 少腹逐瘀湯이 항혈전 및

- 소염, 진통에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 1996;9(1):81-96.
18. 송계용 등. 핵심 병리학. 서울: 고려의학. 1998;62-94.
  19. 張景岳. 景岳全書. 上海: 上海科學技術出版社. 1984;19, 29.
  20. 葉桂. 臨證指南醫案. 서울: 輪成社. 1985;513, 596.
  21. 王清任. 醫林改錯. 서울: 宿昌德書店. 1961;44, 61-62, 77.
  22. 언덕성. 活血化瘀療法臨床實踐. 中國: 雲南出版社. 1980;3-43.
  23. 康舞洙. 韓醫學에서 瘀血에 대한 개념. 大韓韓醫學會誌. 1984;5(1):138-140.
  24. 홍지선. 桃紅飲이 collagen 등으로 유발된 혈전 및 혈액점도에 미치는 영향에 대한 연구. 방제학회지. 1998;6(1):199-214.
  25. 崔昇勳. 瘀血의 病理에 관한 文獻의 考察 4. 1985;399-406.
  26. 文濬典, 安圭錫, 崔昇勳. 東醫病理學. 서울: 高文社. 1990;74-76.
  27. 강병수 등. 本草學. 서울: 영림사. 1998;355, 377, 414, 422, 445, 549, 557, 579, 580, 581.
  28. 신민교 등. 中藥大辭典. 서울: 정담. 1998;287, 325, 1159, 1450, 2179, 2667, 3201, 3348, 3995, 4237, 4453, 5766.
  29. McCord, J. M.. Free radicals and inflammation, protection of synorial fluid by superoxide dismutase. Science. 1974;185:529-531.
  30. 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.
  31. Halliwell B.. Free radical and antioxidant: A personal view, Nurt. Review. 1994;52(8):253-265.
  32. Asayama K, Janco R. L., Burr I. M.. Selective induction of manganous superoxide dimutase in human monocytes. Am. J. Physiol.. 1985; 249:393-397.
  33. Fridovich I.. Superoxide dismutase, Adv. Enzymol, 1986;57:61-97.
  34. 김세종. 면역학길라잡이. 서울: 고려의학. 2000;65-68.
  35. 김영태 등. 한국 여성 자궁경부 종양에서의 항산화체계 및 산화적 스트레스. 대한산부인과학회지. 2002;45(1):145-152.
  36. 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.
  37. 문태철 등. 천연물로부터 사이클로옥시게나제-2 저해제 검색. 약학회지. 1998;42:214-219.
  38. Denizot F, Lang R.. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, Immunol. Methods. 1986;89:271-277.
  39. 서영준. 발암과정에 있어서 Cyclooxygenase-2의 역할 및 그 저해를 통한 화학 예방. 분취세포생물학뉴스. 2002;13:8-17.

40. 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.
41. 지병철, 문신용. Nitric Oxide가 인간 황체화 과립막세포의 apoptosis에 미치는 영향. *대한산부인과학회지*. 2002 ;45(5):766-773.
42. Carla Biondi, et al. Interactions between the nitric oxide and prostaglandin E2 biosynthetic pathways in human amnion-like WISH cells. *Journal of Reproductive Immunology*. 2003;60(1):35-52.