

## 加減清上防風湯의 항염증 효과에 대한 실험적 연구

서은성·황충연·김남권  
원광대학교 한의과대학 한방안이비인후피부과교실

### Experimental study of *Gagam-Cheongsang BangPungTang* on the anti-inflammatory effects

Eun-Sung Seo · Chung-Yeon Hwang · Nam-Kwen Kim

**Background and Object:** This study was carried out to investigate the effects of GCSBPT (*Gagam-Cheongsang BangPungTang*) on the in vitro and in vivo anti-inflammatory reactions.

**Methods:** Vascular permeability and Cyclooxygenase inhibition assay are examined *in vitro* and nitric oxide inhibition assay, radical scavenging activity test, TNF- $\alpha$ , COX-2 inhibition test are examined *in vivo*.

**Results:** GCSBPT showed inhibitory effects on vascular permeability and leukocyte migration in animal test. In cyclooxygenase 2 inhibition assay, an ethanol extract of GCSBPT inhibited prostaglandin E2 generation at a concentration of 10 $\mu$ g/ml. Among the herbal ingredients of GCSBPT, ethanol extracts of *Nepetae Spica* exhibited potent inhibitory activities. Ethanol extract of GCSBPT inhibited the release of nitric oxide and the gene expression of inducible nitric oxide synthase in RAW 246.7 cells stimulated by lipopolysaccharide. Ethanol extract of GCSBPT exhibited radical scavenging activity of 54% at 100 $\mu$ g/ml. Among the herbal ingredients of GCSBPT.

**Conclusions:** According to the above results, I expected that GCSBPT was a potent anti-inflammatory prescription.

**Key words:** *Cheongsang BangPungTang*, anti-inflammatory, COX-2, TNF- $\alpha$

### 1. 緒 論

清上防風湯은 明대 龔<sup>1)</sup>의 《古今醫鑑》에 처음 收錄되어 있는 處方으로 頭面部 瘡癤과 風熱毒의

治療에 사용된다고 하였으며, 이후 여러 醫家들<sup>2-5)</sup>에 의해 風熱로 인한 面疱疾患에 사용된다고 하였다.

面疱는 肺風粉刺<sup>2)</sup>, 粉刺<sup>5)</sup>, 등의 異名으로 기록되어 왔으며, 얼굴과 흉배부에 面疱, 丘疹, 膿疱, 囊腫 등의 증상이 나타난다고 하였고, 현대의학의 매우 흔한 염증성 피부질환인 여드름에 해당한다고 하였다<sup>3,6)</sup>.

교신저자: 김남권, 원광대학교 한의과대학 한방안이비인후피부과교실  
(Tel. : 031-390-2671, E-mail : drkim@wonkwang.ac.kr)  
• 접수 2008/07/21 • 수정 2008/07/28 • 채택 2008/08/04

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 실험 재료

#### 1) 加減淸上防風湯의 처방 내용 및 검액의 제조

실험에 사용된 加減淸上防風湯의 처방내용은 Table 1과 같다. 실험에 사용된 약제는 圓光大學 校 光洲韓方病院에서 입수하여 사용하였으며, 1첩 분량을 2,000ml의 증류수에 1시간동안 침지시킨 후, 2시간30분 동안 전탕하였다. 전탕액은 여과포로 여과한 후 감압농축기를 이용해 250ml로 농축하여 *in vivo* 실험에 사용하였다.

加減淸上防風湯 추출액은 1첩 분량을 한약재 분쇄기를 이용해 100-200메쉬 크기로 분쇄시킨 후 ethanol을 1:10 weight/volume으로 가하여 5일간 냉침하여 추출하였다. 추출한 약제는 Whatman filter paper No. 4를 사용해 고형분을 제거한 후 rotary evaporator를 이용해 감압 농축시켰다. 모든 실험에서는 농축시킨 加減淸上防風湯 추출액을 70% ethanol을 이용해 실험농도로 희석해 *in vitro* 실험에 사용하였다.

Table 1. Prescription of Gagam-CheongSangBangPungTang (hence forth GCSBPT) per Pack.

한약명	학 명	1첩분량(g)
고 삼	<i>Radix Sophore flavescentis</i>	50 g
형 개	<i>Herba Schizonepetae</i>	50 g
방 풍	<i>Radix Ledebouriellae</i>	50 g
백 지	<i>Radix Angelicae Dahuricae</i>	35 g
감 초	<i>Radix Glycyrrhizae</i>	35 g
박 하	<i>Herba Menthae</i>	25 g
선 태	<i>Periostracum Cicadae</i>	25 g
Total		270 g

#### 2) 실험동물

加減淸上防風湯의 염증억제력 평가를 위한 실험

염증은 균의 감염, 열, 외상, 항원 항체반응 등 생체조직의 기질변화를 초래하는 침습에 대한 생체 방어기전 이라고 정의하고 있으며, 발적, 발열, 동통, 종창, 기능장애 등의 5대 징후가 발생한다고 하였다<sup>7)</sup>.

최근 항염증약의 개발에 대한 연구로, 유기합성 및 천연물질을 대상으로 한 혈관투과성, 백혈구 유주, amine류, kinin류, cytokine류, prostaglandin 류 등의 억제 효과를 밝히려는 실험이 활발히 진행되고 있다<sup>8)</sup>.

韓藥을 이용한 항염증 효과에 대한 연구로는, 유 등<sup>9)</sup>의 當歸, 防風, 銀杏葉, 竹鹽과, 문 등<sup>8)</sup>의 金銀花, 노 등<sup>10)</sup>의 苦蔘 추출물, 박 등<sup>11)</sup>의 白屈菜에 대한 실험 보고가 있다. 淸上防風湯에 대한 임상 연구로는 채<sup>12)</sup>의 3주 이상 加味淸上防風湯을 복용한 환자의 치료 효과에 대한 보고가 있으며, 실험 연구로는 김 등<sup>13)</sup>의 항부종, 종창억제, 항히스타민 효과 등에 관한 보고와, 조 등<sup>14)</sup>의 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균 효과 보고 등이 있으나, 복합 처방과 구성약재를 이용하여 염증 발생 기전과 염증 유도물질, 염증 유발 미생물들에 대한 전반적인 실험 보고는 없었다.

이에 著者는 龔 등<sup>1-5)</sup>이 염증의 치료에 응용할 수 있다고 기록한 淸上防風湯의 主藥인 荊芥, 防風, 白芷, 甘草, 薄荷에, 辛 등<sup>15-17)</sup>이 淸熱 透疹 등의 효능이 있어 風疹 瘡疥 등의 피부질환을 치료한다고 알려진 苦蔘, 蟬蛻를 가미한 加減淸上防風湯의 항염증 효과를 실험적으로 규명하고자, 모세혈관 투과성 억제력, 백혈구 유주 억제력 등을 *in vivo* 실험으로, 항산화력, NO 생성억제력, iNOS 및 TNF- $\alpha$  유전자 발현 억제력, COX-2 활성억제력, 항산화력 등을 *in vitro* 실험으로 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

을 위해 생후 5주령된 ICR mouse(대한실험동물, 한국)를 구입해 사용하였다. 실험동물의 사육조건은 온도  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도  $55 \pm 5\%$ , 조명 12시간 cycle(07:00-19:00), 조도 200-250Lux의 조건에서 고형사료(조단백질 22.5% 이상, 조지방 3.5% 이상, 조섬유 7.0% 이상, 조회분 10.0% 이상, 칼슘 0.7% 이상, 인 0.5% 이상 : 제일사료, 한국)와 물을 자유 섭취토록 하여 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후, 체중의 변화 등에 이상 증상이 없는 동물만을 실험에 사용하였다.

### 3) 미생물 균주

피부질환 관련 미생물에 대한 항균력 평가를 위해 사용한 표준균주로는 *Propionibacterium acnes*(ATCC 6919), *Staphylococcus aureus*(ATCC 6538), *Corynebacterium xerosis*(ATCC 7711), *Pityrosporum ovale*(ATCC 14521), *Trichophyton mentagrophytes*(KCTC 6077), *Candida albicans*(ATCC 10231) 등을 사용하였다.

### 4) 시약 및 기기

Nitric oxide를 비롯한 본 실험에 이용한 실험 시약으로는 Dulbeccos modified Eagle medium (DMEM), fetal bovine serum(FBS), antibiotic-antimycotic(penicillin G sodium, streptomycin sulfate, amphotericin B), trypsin-EDTA(이상 Gibco BRL, U.S.A.), sodium bicarbonate, lipopolysaccharide(LPS), GRIESS reagent, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol)-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide], DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hyrazyl), butylated hydroxytoluene(BHT), guanidinium thiocyanate, sodium acetate, sarcosine, mercaptoethanol, ethidium bromide, glacial acetic acid, phenol, chloroform, isopropanol(이상 Sigma, U.S.A.), M-MLV reverse transcriptase, recombinant RNasin ribonuclease

inhibitor, deoxynucleotide triphosphates(dNTPs), random hexamer, Taq polymerase(이상 Promega, U.S.A.), Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay(ELISA) kit(Amersham, U.S.A.) 등을 사용하였다. 항균력 실험에는 brain heart infusion (BHI), potato dextrose agar, peptone, glucose, yeast extract, ox bile(이상 Difco, U.S.A.), glycerol, glycerol monostearate, tween 60(이상 Sigma, U.S.A.) 등을 사용하였다. 본 실험에 이용한 초자로는 tissue culture plate, tissue culture dish(이상 Falcon, U.S.A.), eppendorf tube (Sarstedt, Germany), micro amp reaction tube, micro amp caps(Applied Biosystems, U.S.A.) 등을 사용하였다. 본 연구에 사용된 기기로는 rotary evaporator system(BÜCHI, Switzerland), CO2 Incubator(Forma, U.S.A.), inverted microscope, microscope(이상 Nikon, Japan), clean bench(수공양행, 한국), autoclave(Hirayama, Japan), spectrophotometer(Beckman, U.S.A.), ELISA reader(BioTek, U.S.A.), refrigerated microcentrifuge, microcentrifuge(이상 한일과학, 한국), GeneAmp PCR system(PERKIN ELMER, U.S.A.), polaroid camera(Polaroid, U.K.), image master(Pharmacia Biotek, U.S.A.), electrophoresis system(Hoefer, U.S.A.), transilluminator(Vilber Lourmat, France), micropipit(Gilson, France) 등을 사용하였다.

## 2. 실험 방법

### 1) 모세혈관 투과성 억제 실험

생후 5주령의 ICR mouse를 실험에 사용하였다. 음성대조군은 생리식염수, 실험군(n=6)은 加減湯上防風湯 농축액, 양성대조군(n=6)은 aminopyrine을 존대를 이용해 1일 1회, 주 5회 경구 투여하였다.

마지막 시료투여 30분 후 생리식염수에 녹인 evans blue용액을 실험동물 10g당 0.1ml의 용량으로 정맥주사하고, 20분 후 생리식염수에 희석한 0.6% acetic acid를 실험동물의 체중 10g당 0.1ml의 용량으로 복강 주사하였다. 20분 후 경추탈골법으로 실험동물을 도태시킨 후 개복하고 생리식염수 5ml을 복강에 가한 후, 복강 내로 용출된 evans blue를 취해 원심분리(2,000rpm/1분)하였다. 모세혈관 투과성은 원심분리한 용출액의 상층액을 취해 ELISA reader로 630nm에서 흡광도를 측정해 대조군과 비교해 평가하였다<sup>18)</sup>.

## 2) 백혈구 유주 억제 실험

생후 5주령의 ICR mouse를 실험에 사용하였다. 음성대조군은 생리식염수, 실험군(n=6)은 加減淸上防風湯 농축액, 양성대조군(n=6)은 aminopyrine을 하루 1회, 주 5회 경구 투여하였다. 마지막 시료투여 30분 후, 인산염완충액으로 1mg/ml로 제조한 zymogen 1ml을 복강주사하고, 6시간 후 경추탈골법으로 실험동물을 도태시킨 후, 개복하여 4℃ 생리식염수 2ml을 복강에 가하였다. 복강을 가볍게 마사지 한 후, 복강 내로 삼출된 백혈구를 취하여 coulter counter로 백혈구 수를 측정하고 대조군과 비교해 평가하였다<sup>19,20)</sup>.

## 3) 항산화력평가

항산화력은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hyrazyl)법을 이용해 평가하였다. 무수에탄올로 0.01%와 0.001%로 희석한 加減淸上防風湯 혹은 구성약재 추출액 1ml에 0.1mM DPPH용액 1ml을 가하고, 37℃에서 30분간 반응시킨 후, 반응물의 흡광도를 spectrophotometer를 이용해 516nm에서 측정하였다<sup>21)</sup>. 양성대조군으로는 butylated hydroxytoluene (BHT)을, 음성대조군으로는 무수에탄올을 사용하였다.

## 4) Nitric oxide (NO) 형성 억제력 평가

RAW 264.7 세포주 (ATCC number: CRL-2278)를 이용한 GRIESS 법으로 NO 형성억제력 실험을 실시하였다. 10% FBS가 첨가된 DMEM으로 전배양한 RAW 264.7 cell을 24 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/ml의 농도로 seeding하여 5% CO2 incubator에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 인산염완충용액으로 2회 세척한 후, phenol red를 첨가되지 않은 DMEM에 희석한 加減淸上防風湯 혹은 구성약재 추출액을 50µg/ml과 5µg/ml의 농도로 가해 1시간 동안 처리하였다.

Lipopolysaccharide를 1µg/ml의 농도로 가하여 48시간 배양한 후, 상층액을 100µl씩 취해 96 well plate에 옮기고, GRIESS reagent를 100µl씩 가해 상온에서 5분간 반응시키고, ELISA reader로 540nm에서의 흡광도를 측정하였다<sup>22,23)</sup>. NO형성 억제력은 아래의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{억제율(\%)} = [1 - (\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) / (\text{Abs}_{\text{LPS}} - \text{Abs}_{\text{blank}})] \times 100$$

Abs<sub>sample</sub> : 시험물질 처리군의 흡광도,

Abs<sub>blank</sub> : Blank의 흡광도

Abs<sub>LPS</sub> : LPS처리군의 흡광도

## 5) Inducible nitric oxide synthase (iNOS), Interleukin(IL)-1β, Interleukin(IL)-6 및 tumor necrosis factor-α (TNF-α) 유전자발현 억제력 평가 (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction : RT-PCR)

RAW 264.7 세포를  $1 \times 10^5$  cells/ml의 농도로 60 mm 세포배양용기에 넣어 80% 정도까지 성장할 때까지 배양한 후, phenol red가 첨가되지 않은 DMEM배지로 희석한 加減淸上防風湯 추출액을 dish당 10µl씩 가하여 3시간동안 처리하였다. 이때 대조군으로는 70% ethanol을 사용하였다.

① Total RNA 분리

Guanidinium thiocyanate-phenol chloroform법<sup>23)</sup>에 준하여 실시하였다. 즉 시료를 처리한 배지를 제거한 후 RNA Solubilizing Solution (Denaturing Solution: Phenol: 2M Sodium Acetate = 1 volume: 1 volume: 0.1 volume) 1ml을 가하여 녹인 후 micropipet으로 잘 섞고 eppendorf tube로 옮겼다. Chloroform을 200 $\mu$ l 가하여 1분간 세차게 흔든 후 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 방치하고 원심분리 (14,000rpm, 15분, 4 $^{\circ}$ C)하고, 상층액을 취하여 새 eppendorf tube에 옮겼다. Isopropanol을 700 $\mu$ l 가하여 -20 $^{\circ}$ C에서 1시간 방치시킨 후 원심분리 (14,000rpm, 15분, 4 $^{\circ}$ C)하여 상층액을 버리고 침전물을 75% ethanol로 1회 세척한 후, DEPC처리된 이온교환수 20 $\mu$ l을 가하여 녹였다. 이중 일부를 취하여 spectrophotometer로 260과 280nm에서 흡광도를 측정해 total RNA를 정량하였다.

\* Denaturing solution : 4M guanidinium thiocyanate, 25mM sodium citrate, pH7.0, 0.5% sarcosine, 0.1M 2-mercaptoethanol

② RT-PCR

분리한 total RNA 4 $\mu$ g를 eppendorf tube에 넣고 random hexamer (10pmol/20 $\mu$ l)를 첨가하여 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후 얼음물에 넣어 RNA의 이차구조를 풀어주었다. 여기에 반응액 (1X

buffer, 100 $\mu$ M dNTPs, 200unit RTase)을 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 후, 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 처리하여 reverse transcription 반응을 종료시켰다.

Polymerase chain reaction은 PCR tube에 상기한 RT반응액과 PCR반응액 (PCR buffer, 200 $\mu$ M dNTPs, primer 20pmol, Taq polymerase 2.5 units)을 가하여 PCR machine에서 94 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분의 조건으로 30회씩 증폭하였다. 이때 PCR반응에 사용된 primer들의 염기서열은 Table 2와 같다. RT-PCR 결과는 1.5% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 후, UV illuminator 위에서 polaroid camera를 이용해 사진 촬영하였으며, 그 결과는 densitometer를 이용해 판정하였다.

6) COX-2 활성억제력

96 well plate에 RAW 264.7 세포주를 10<sup>5</sup> cell/well의 농도로 seeding하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 4시간 배양하여 부착시켰다. 배양액을 제거하고, PBS로 세척한 후 3% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지를 well당 200 $\mu$ l씩 첨가하고, arachidonic acid가해 18시간 배양하였다. 대식세포를 활성화시키는 lipopolysaccharide(1 $\mu$ g/ml)와 한약재추출물(10 $\mu$ g/ml)을 첨가하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 18시간 배양한 후, 세포용해액과 상

Table 2. Nucleotide Sequence of the Primers and Expected Size of PCR Products.

	Primer	Sequence	Size
iNOS	Sense	5'-TGG TGG TGA CAA GCA CAT TT-3'	643
	Anti-sense	5'-GCA GCC TCT TGT CT T TGA CC-3'	
L-1 $\beta$	Sense	5'-TCT TTG AAG TTG ACG GAC CC-3'	486
	Anti-sense	5'-AGG CCA CAG GTA TTT TGT CG-3'	
IL-6	Sense	5'-CCG GAG AGG AGA CTT CAC AG-3'	500
	Anti-sense	5'-TGG TCT TGG TCC TTA GCC AC-3'	
IL-6	Sense	5'-AGT TCT ATG GCC CAG ACC CT-3'	484
	Anti-sense	5'-CGG ACT CCG CAA AGT CTA AG-3'	

층액을 취해 ELISA Kit를 이용해 prostaglandin E2를 정량하였다<sup>24)</sup>.

### 7) 피부질환관련 미생물에 대한 항균력

#### ① Agar diffusion method에 의한 한약재추출물의 항균력 평가

-70℃에서 냉동보관중인 균주들을 실험개시 3일 전 액상배지에 접종한 후 *P. acnes*의 경우 37℃ anaerobic chamber에서, *S. aureus*, *C. xerosis*, *P. ovale*의 경우 37℃ incubator에서, *T. mentagropytes*, *C. albicans*의 경우 30℃ incubator에서 전 배양하였다. 이때 사용한 성장배지로는 *P. acnes*, *S. aureus*, *C. xerosis*의 경우 brain heart infusion(BHI), *P. ovale*의 경우 L&N agar(Bacteriological peptone 10g, Glucose 5g, Yeast extract 0.1g, Ox bile 4g, Glycerol 1ml, Glycerol monostearate 0.5g, Tween 60 0.5ml, 전지분유 2%), *T. mentagropytes*와 *C. albicans*의 경우 potato dextrose agar를 사용하였다. 전 배양한 균액은 각 균주마다 동일한 액상배지를 이용해 1/100로 희석한 후 0.5ml을 취해 agar가 포함된 고체 성장배지에 각각 도포 하였다. 加減淸上防風湯 추출물의 항균력 평가는 加減淸上防風湯 추출물 5% 용액을 40μl씩 8mm paper dish 위에 가하고 clean bench에서 수분을 날려 보낸 후, 준비한 고체 성장배지에 올려놓고 1-3일간 배양하며, paper disk 주변에 생긴 균의 성장억제 영역의 지름을 측정하여 평가하였다<sup>25)</sup>.

#### ② Minimum Inhibition Concentration(MIC) 측정

MIC 측정은 microtitre plate assay<sup>26)</sup>를 이용해 실시하였다. 70% ethanol을 이용해 성장배지를 이용해 추출물을 1/10로 한 다음 액상배지(각 배지 조성에서 agar 성분을 제외한 것)를 이용하여 순차적으로 1/2배씩 10회 희석하여 96-well microplate의 각 well에 100μl씩 loading 하였다. 각 시험균

의 전배양액을 세균의 경우  $10^{5-6}$  colony forming unit/ml 으로 맞춘 후 위의 각 well에 시료액과 동일한 부피인 100 μl씩 loading 해 배양한 후 colorimetric growth indicator인 Alamar Blue를 각 well에 20 μl씩 점적한 다음 추가적으로 배양을 하면서 색의 변화를 관찰한다. 이때 색의 변화가 없는 경우(blue) 시험균이 성장하지 못했고, 핑크색으로 변했을 때 각 시험균의 성장한 것으로 판단한다. 최소성장억제농도인 MIC는 blue color를 유지하는 well중 최소농도로 선정하였다.

### 8) 세포독성 평가

V-79 세포주(ATCC CCL-93)를 이용해 MTT법으로 세포독성을 평가하였다. 10% FCS가 첨가된 DMEM으로 전 배양한 V-79 cell을 96 well plate에  $5 \times 10^5$  cells/ml의 농도로 seeding하고 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 FCS를 첨가하지 않은 배지에 0.1%-0.001%로 희석한 加減淸上防風湯 혹은 구성약재 추출물을 첨가하고 24시간 배양시킨 후, 배지를 제거하고 MTT용액을 1μg/ml의 농도로 가하여 37℃에서 3시간 반응시켰다. 미반응된 MTT를 제거하고 ethanol 100μl를 가해 형성된 반응물을 용해시키고, ELISA reader로 550nm에서의 흡광도를 측정해 세포독성을 확인하였다<sup>27)</sup>.

### 9) 통계처리

실험결과는 SPSS 프로그램을 이용하였으며, 모든 측정값은 Mean ± standard error로 나타내었고, 유의성은 p<0.05로 하였다. 加減淸上防風湯의 효과를 판정하기 위한 통계학적 분석은 Student's t-test로 하였다.

### Ⅲ. 實驗結果

#### 1. 항염 효과

##### 1) 모세혈관 투과성 억제력 평가

加減清上防風湯 농축액을 ICR mouse에 5회 투여한 결과, 모세혈관 투과성을 41.1% 억제시키는 것으로 평가되어 양성대조군인 aminopyrine의 48.2% 보다는 약간 떨어지지만, 음성대조군보다는 유의하게 억제시키는 것으로 평가되었다(Table 3).

##### 2) 백혈구 유주 억제 평가

加減清上防風湯 농축액을 ICR mouse에 5회 반

복 투여한 결과 백혈구유주를 7.0% 억제시키는 것으로 평가되었으나 통계적 유의차는 없었다(Table 4).

##### 3) 항산화력 평가

DPPH 법으로 측정된 加減清上防風湯 추출물의 radical scavenging activity는 0.01% 농도에서 53.5%로 항산화력을 지닌 것으로 평가되었으며 (Table 5, Fig. 3), 加減清上防風湯에 처방된 모든 성분 한약재 추출물의 항산화력을 평가한 결과, 박하와 선태 추출물이 0.01%의 농도에서 90% 이상의 유의성 있는 radical scavenging activity를 보였고, 감초 추출물은 80% 이상의 항산화력을 보였다 (Table 6).

Table 3. Inhibitory Effect of GCSBPT on Vascular Permeability.

Groups	Mean ±SD	Reduction Rate
Negative Control(Saline)	0,56±0,10	-
Positive Control(Aminopyrine)	0,29±0,10*	48,2 %
GCSBPT	0,33±0,09*	41,1 %

\* P < 0,05

Table 4. Inhibitory Effect of GCSBPT on Leukocyte Migration.

Groups	Mean ±SD	Reduction Rate
Negative Control(Saline)	6,97±0,86	-
Positive Control(Aminopyrine)	5,75±1,11	17,5%
GCSBPT	6,48±0,91	7,0%

Table 5. Radical Scavenging Activity of GCSBPT Extract.

Group	Concentration	Absorbance516	Radical Scavenging Activity
Control		0,4751±0,0031	-
B H T	0,01%	0,0804±0,0040	83,1 %
	0,001%	0,3502±0,0029	26,3 %
GCSBPT Extract	0,01%	0,2210±0,0095	53,5 %
	0,001%	0,4310±0,0040	9,3 %

Table 6. Radical Scavenging Activities of Herbal Extracts.

Herbal Extracts	Concentration	Radical Scavenging Activity
고 삼( <i>Sophorae Radix</i> )	0.01%	26%
	0.001%	6%
형 개 ( <i>Nepetae Spica</i> )	0.01%	38%
	0.001%	-1%
방 풍( <i>Saposhnikoviae Radix</i> )	0.01%	8%
	0.001%	0%
백 지( <i>Angelicae Dahuricae Radix</i> )	0.01%	21%
	0.001%	4%
감 초( <i>Glycyrrhizae Radix</i> )	0.01%	86%
	0.001%	16%
박 하( <i>Menthae Herba</i> )	0.01%	94%
	0.01%	14%
선 태 ( <i>Cicadidae Periostracum</i> )	0.01%	93%
	0.001%	19%

Table 7. Inhibition of COX 2 Activities by Herbal Extracts.

Herbal Extract	COX 2 Inhibition (%)
고 삼 ( <i>Sophorae Radix</i> )	64.0%
형 개 ( <i>Nepetae Spica</i> )	81.1%
방 풍 ( <i>Saposhnikoviae Radix</i> )	14.9%
백 지 ( <i>Angelicae Dahuricae Radix</i> )	27.0%
감 초 ( <i>Glycyrrhizae Radix</i> )	69.9%
박 하 ( <i>Menthae Herba</i> )	47.5%
선 태 ( <i>Cicadidae Periostracum</i> )	66.6%
GCSBPT Extract	70.7%

4) Cyclooxygenase 2 (COX-2) 활성 억제력 평가

加減清上防風湯 추출물이 COX-2 효소의 활성을 억제시키는지의 여부를 평가한 결과 荊芥 추출물이 10 $\mu$ g/ml에서 COX-2 효소의 활성을 80% 이상 억제시키는 매우 유의성 있는 효능을 지닌 것으로 평가되었고, 甘草, 蟬蛻 및 苦參 추출물은 60% 이

상의 유의성 있는 효능을 지닌 것으로 평가되었다. 그리고 이들 한약제가 처방된 加減清上防風湯 추출물의 COX-2 활성 억제력은 70.7%로 우수한 것으로 평가되었다 (Table 7).

5) Nitric oxide (NO) 생성 억제력 평가

RAW 264.7 세포를 이용해 GRIESS법으로 加減清上防風湯 추출물의 NO 생성억제력을 평가한 결과, 50 $\mu$ g/ml과 5 $\mu$ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 각각 43.5%와 5.4% 억제시켜 NO 생성억제 효과를 지닌 것으로 조사되었다 (Table 8, Fig. 5). 加減清上防風湯의 모든 구성 약재를 대상으로 NO 형성 억제력을 평가한 결과는, 50 $\mu$ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 80%이상 억제시키는 우수한 한약재 추출물은 없었으나, 白芷와 甘草 추출물이 50% 이상, 防風과 蟬蛻 추출물이 40%의 효능을 지닌 것으로 평가되는 등 처방에 사용된 많은 약재들이 NO형성 억제력을 지닌 것으로 평가되었다 (Table 9).



Table 8. Inhibitory Effect of Nitric Oxide Synthesis by *GCSBPT* Extract.

Sample	Concentration	Absorbance (Average±SD)	Reduction Rate
Control <sup>1)</sup>		0,215±0,019	-
Lipopolysaccharides <sup>2)</sup>		0,624±0,021	-
<i>GCSBPT</i> Extract <sup>3)</sup>	50 µg/ml	0,446±0,016*	43,5 %
	5 µg/ml	0,602±0,022*	5,4 %

1) Non-treated group

2) Lipopolysaccharide(LPS) treated group

3) DCT treated group

\* P < 0,05

Table 9. Inhibitory Effects of Nitric Oxide Synthesis by Herbal Extracts.

Herbal Extracts	Concentration	Inhibition (%)
고삼( <i>Sophorae Radix</i> )	50 ppm	ND
	5 ppm	10%
형개( <i>Nepetae Spica</i> )	50 ppm	7%
	5 ppm	-16%
방풍( <i>Saposhnikoviae Radix</i> )	50 ppm	46%
	5 ppm	12%
백지( <i>Angelicae Dahuricae Radix</i> )	50 ppm	51%
	5 ppm	10%
감초( <i>Glycyrrhizae Radix</i> )	50 ppm	56%
	5 ppm	22%
박하( <i>Menthae Herba</i> )	50 ppm	16%
	5 ppm	-12%
선태( <i>Cicadidae Periostracum</i> )	50 ppm	43%
	5 ppm	9%

ND : Not determined because of cytotoxicity

6) Inducible nitric oxide synthase (iNOS) 과 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 유전자발현 억제력 평가 (RT-PCR)

Nitric oxide형성 억제실험에서 43.5%의 억제효과를 보인 加減清上防風湯 추출물이, RAW 264.7 세포에서 lipopolysaccharide의 자극을 받아 활성화 되는 iNOS와 TNF- $\alpha$ 의 유전자 발현에 어떻

한 영향을 미치는지를 RT-PCR로 평가하였다. 그 결과 加減清上防風湯 추출물은 iNOS 유전자 발현을 50µg/ml에서 66% 억제시키고 농도의존적인 억제효과를 지닌 것으로 나타났으나, 염증의 발증과정과 밀접한 관련이 있는 cytokine인 TNF- $\alpha$ 의 유전자 발현에는 별다른 영향을 주지 못하는 것으로 조사되었다(Table 10, Fig. 1-2).

Table 10. Inhibition of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Inducible Nitric Oxide Synthase(NOS) mRNA Expression in RAW 264.7 cell by Cinnamyl Aldehyde

	Density of mRNA Expression	
	iNOS	TNF- $\alpha$
Control	68	85
Lipopolysaccharide	726	558
50 $\mu\text{g/ml}$	292 (66%) <sup>A</sup>	529 (6%)
5 $\mu\text{g/ml}$	741 (-2%)	582 (-5%)

A : Inhibition rate=1-(Density<sub>sample</sub>-Density<sub>Control</sub>)/(Density<sub>LPS</sub>-Density<sub>Control</sub>)

Table 11 . Antimicrobial Activities of GCSBPT Extract,

	Agar Diffusion Method(mm)	Minimum Inhibition Concentration( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>Propionibacterium acnes</i> (ATCC 6919)	12	1,600
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	-	100
<i>Corynebacterium xerosis</i> (ATCC 7711)	12	800
<i>Pityrosporum ovale</i> (ATCC 14521)	-	ND
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (KCTC6077)	9	100
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	-	ND

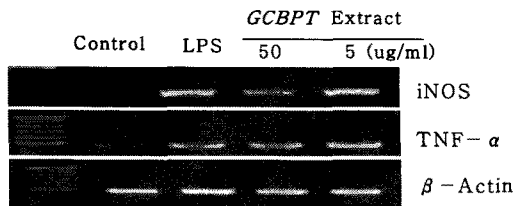


Fig. 1. Effects of GCSBPT Extract on the mRNA level of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- $\alpha$  in cultured RAW 264.7 cells by RT-PCR.

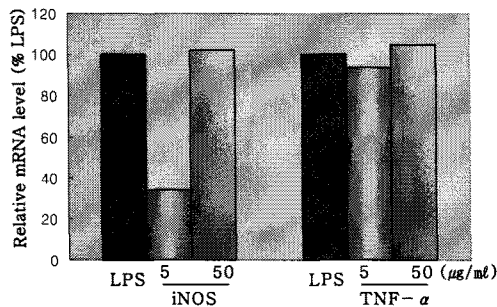


Fig. 2. Inhibition of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Inducible Nitric Oxide synthase(iNOS) mRNA Expression in RAW 264.7 cells by Cinnamyl Aldehyde.

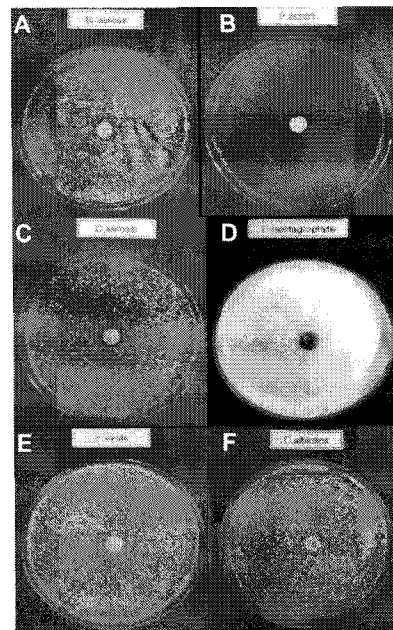


Fig. 3. Antimicrobial activity of GCSBPT extract by disc diffusion method, (A) *Trichophyton mentagrophytes*, (B) *Corynebacterium xerosis*, (C) *Propionibacterium acnes*, (D) *Staphylococcus aureus*, (E) *Candida albicans*, and (F) *Pityrosporum ovale*.

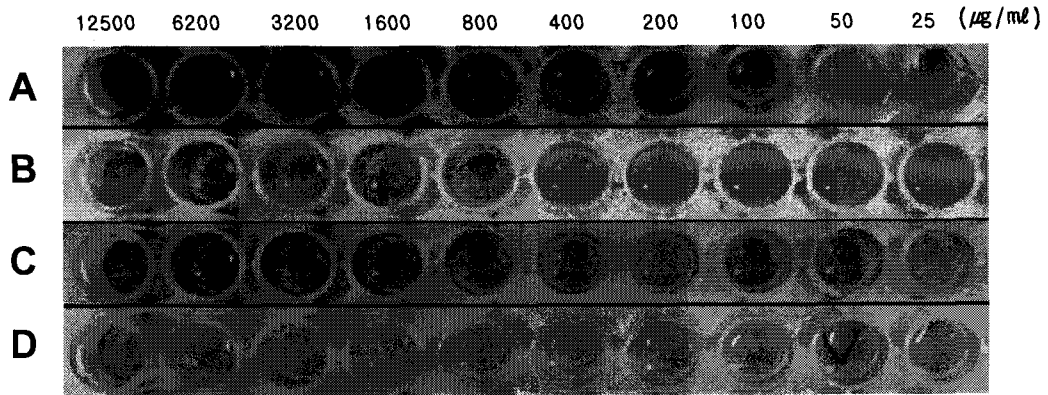


Fig. 4. Antimicrobial activity of GCSBPT extract by microtitre plate assay. (A) *Staphylococcus aureus*, (B) *Propionibacterium acnes*, (C) *Corynebacterium xerosis*, and (D) *Trichophyton mentagrophytes*.

Table 12. Cytotoxicities of Herbal Extracts.

Herbal Extract	MTT <sub>50</sub> (µg/ml)
고 삼 ( <i>Sophorae Radix</i> )	50
형 개 ( <i>Nepetae Spica</i> )	150
방 풍 ( <i>Saposhnikoviae Radix</i> )	180
백 지 ( <i>Angelicae Dahuricae Radix</i> )	150
감 초 ( <i>Glycyrrhizae Radix</i> )	100
박 하 ( <i>Menthae Herba</i> )	190
선 태 ( <i>Cicadidae Periostracum</i> )	180
GCSBPT Extract	110

## 2. 피부질환관련 미생물에 대한 항균력 평가

피부질환 유발 미생물 6종에 대한 항균력을 평가한 결과, 加減清上防風湯 추출물은 *T. mentagrophytes*(성장저지환, 9mm; MIC, 100µg/ml), *S. aureus*(MIC, 100µg/ml)에 유의성 있는 항균력을 지닌 것으로 평가되었으며, *P. acnes*(성장저지환, 12mm; MIC, 1,600µg/ml), *C. xerosis*(성장저지환, 12mm; MIC, 800µg/ml) 균에도 약간의 항균력을 지닌 것으로 확인되었다(Table 11, Fig. 3-4).

## 3. 세포독성 평가

V79-4 세포를 이용한 MTT법으로 加減清上防風

湯 및 구성 약재 추출물의 세포독성을 평가한 결과, 荊芥를 비롯한 대부분의 구성약재 추출물이 100~200µg/ml의 세포독성을 지닌 것으로 평가되었으며, 또 이들 한약재가 처방된 加減清上防風湯 추출물의 세포독성(MTT<sub>50</sub>)은 110µg/ml이었다 (Table 12).

## IV. 考 察

面皰는 현대의학에서 여드름에 해당하는데, androgen에 자극받아 성숙된 피지선의 존재하에 모낭에 상주하는 *Propionibacterium acnes*가 분비하는 효소에 의해 변성된 피지와 세균이 모낭벽 상피세포를 자극하여 각질세포 생성이 증가되고 동시에 정체과각화가 이루어져 면포를 이루고 지속적인 각질과 피지의 분비로 모낭벽이 파괴되어 모낭 내용물이 진피로 유리되어 염증을 일으킨다고 하였다<sup>6)</sup>. 그러나, 정확한 발생기전은 밝혀지지 않았으며, 중요한 네 가지 요소로 모낭각화의 비정상적 증가, 피지분비 증가, 피지 내 세균 증식, 염증 유발 등을 들 수 있다고 하였고, 임상적으로, 발병 시기와 형태, 원인 등에 따라 심상성, 응괴성, 전격성, 월경전, 사춘기전, 직업성, 그람음성균,

켈로이드성, 약물성 여드름 등으로 분류할 수 있다<sup>6,28</sup>). 여드름의 현대의학적 치료는 이상각화와 염증을 억제하는 약물을 국소적 전신적으로 사용하지만 아직 완전한 치료법이 없는 염증성 피부질환 중의 하나라고 하였다<sup>6</sup>). 염증(inflammation)은 균의 감염, 열, 외상, 항원항체반응 등 생체조직의 기질변화를 초래하는 침습에 대한 생체의 방어 기전이라고 정의된다. 염증이라는 용어가 불같은 상태'라는 어원에서 유래된 것과 같이 염증이 발생한 부위는 발적, 발열, 동통, 종창, 기능장애와 같은 염증의 5대 징후가 발생된다. 이러한 염증을 병리조직학적으로 볼 때에는 혈관 투과성 항진과 과립구 및 대식세포와 같은 세포의 침윤이 커다란 특징이라고 할 수 있다<sup>7</sup>). 염증의 경과는 크게 혈관의 투과성이 항진되는 1기, 백혈구가 주로 작용하는 2기, 그리고 조직의 재생 수복시기인 3기로 구분할 수 있으며<sup>7</sup>), 염증반응을 유도하는 주요 화학 전달 매개물질로는 크게 즉시형 혈관투과성 항진에 관여하는 amine류(histamine, serotonin 등)와 kinin류(bradykinin 등), 지연형 반응에 주로 작용하는 cytokine류, prostaglandin(PG)과 leukotriene류 등의 4군으로 분류할 수 있다<sup>29</sup>). PG은 세균의 감염에서 유래한 lipopolysaccharide(LPS) 혹은 외부 자극에 의해 세포막 지질 성분이 phospholipase A2에 의해 생성되는 arachidonic acid(AA)로부터 만들어진다. 또, AA는 cyclooxygenase(COX) 효소의 작용을 받아 PG를 합성하는데, PGE2와 PGI2는 혈관 투과성 항진에 작용을 하고, thromboxane은 백혈구 유주에 관여하는 등 PG는 염증과 가장 관련이 깊은 것으로 알려져 있다. 이는 오래 전부터 발열, 발적, 동통 등을 치료하는데 널리 사용되어온 aspirin이 이러한 PG을 합성하는데 핵심적인 작용을 하는 COX의 작용을 억제시키기 때문인 것에서 확인할 수 있다. COX는 1형과 2형의 2가지 isoform이 존재한다. COX-1은 위장관 보호, 신장의 혈류조절, 혈소판 응집 등 인체의 정상적인 기

능을 유지하는데 중요한 작용을 하는 house keeping enzyme인 반면, 외부 자극에 의해 발현이 유도되는 COX-2는 염증과 암 등의 각종 퇴행성 질환에 중요한 역할을 한다<sup>7,31</sup>). 따라서 항염증제의 개발을 위해 COX-2의 활성을 억제시키는 물질의 탐색에 많은 연구자들이 힘을 쏟고 있다<sup>29,30</sup>).

면역과 염증에 관련된 여러 cytokine중 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 cytokine으로 보고되고 있다. 이중 특히 TNF- $\alpha$ 는 염증이 발생된 부위에는 높은 농도로 존재하며, 또한 최근에는 TNF- $\alpha$ 를 차단하는 약물들이 염증의 치료제로 연구되고 있기도 하다<sup>32-34</sup>).

Nitric oxide(NO)는 nitric oxide synthase(NOS)효소에 의해 만들어지며, 체내의 염증과정에서는 과량의 NO가 만들어져 관절염을 비롯한 각종 급성 혹은 만성 염증 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NOS는 I형, II형, III형의 3종류가 있는데, 이중 생체에서 항상성과 관련해 중요한 역할을 담당하는 I형이나 III형과 달리 II형은 inducible NOS(iNOS)로 cytokine이나 세균 등에서 분비되는 lipopolysaccharide 등에 의해 일부 세포에서 생성되며, 생성된 iNOS는 과량의 NO를 생성해 각종 염증질환에 작용하는 것으로 알려져 있다<sup>32-34</sup>). 따라서 관절염을 비롯한 각종 염증의 발생억제와 치료를 위해서는 iNOS의 활성을 억제시키는 것이 중요하다<sup>35</sup>). 활성산소는 인체 내의 정상 세포의 대사과정 중의 여러 산화반응의 부산물로 만들어지며, 식세포에 의해 만들어져 감염반응을 조절하는 긍정적인 역할을 하는 반면, 이온화 방사선, 자외선, 환경공해, 심한운동을 할 경우에도 만들어져 생체조직을 공격해 각종 염증질환과 암, 간장장애, 동맥경화, 위염등 많은 질병과 노화를 일으키는 원인의 하나로 알려져 있다<sup>7</sup>). 또, 염증을 일으키는 원인균은, 일반적인 피부상재균 중 피부에 염증을 유발하는 균주로서 염증성 피부질환의 발생과정에서 핵심적인 역할을 하는데, *Trichophyton*

*mentagrophytes*는 무좀<sup>36)</sup>, *Pityrosporum ovale*는 비듬<sup>37)</sup>, *Propionibacterium acnes*는 여드름<sup>38)</sup>, *Corynebacterium xerosis*는 액취증<sup>39)</sup>, *Staphylococcus aureus*는 농가진, 여드름, 아토피<sup>14)</sup>, *Candida albicans*는 칸디다증<sup>36)</sup>의 원인균으로 보고 되어 있다.

清上防風湯은 명대 龔<sup>1)</sup>의 《古今醫鑑》에 처음 收錄된 이래 여러 醫家들<sup>2-5)</sup>에 의해 頭面部 瘡癤과 風熱毒의 治療에 사용되어 왔으며, 본 研究에서는 荊芥, 防風, 白芷, 薄荷, 甘草 등의 主 構成 藥材에 清熱 透疹 등의 效能으로 風疹 瘡疥 등의 皮部疾患을 치료한다고 알려진<sup>15,16)</sup> 苦蔘, 蟬蛻를 가미해서 加減清上防風湯 處方을 구성하여 실험에 사용하였다. 加減清上防風湯을 구성하는 각 藥物의 效能을 살펴보면, 荊芥는 祛風解表 宣毒透疹 止血하는 效能이 있어 感冒風熱 瘡瘍寒熱 등을 치료하고, 防風은 祛風解表 勝濕解癢 止瀉止血하는 效能이 있어 感冒風寒 破傷風 崩漏 등을 치료하고, 白芷는 祛風解表 消腫止痛 排膿 通鼻止帶의 效能이 있어 感冒風寒 瘡瘍腫痛 癰腫 등을 치료하고, 薄荷는 疏散風熱 清利咽喉 透疹의 效能이 있어 感冒風熱 咽喉痛 麻疹未發 등을 치료하고, 甘草는 補脾益氣 清熱解毒 潤肺止咳 調和諸藥 등의 效能이 있어 脾胃 虛弱 瘡瘍腫毒 咳嗽 腹痛 등을 치료한다고 하였다. 또, 苦蔘은 清熱燥濕 祛風殺蟲 利水 작용이 있어 濕熱痢疾 瘡疥 麻風 小便不利 등을 치료하고, 蟬蛻는 散風熱 透疹 利咽喉 退翳目 解癢의 效能이 있어 風疹 皮膚癢痒 發癩不眠 咽喉腫痛 小兒驚風 등을 치료한다고 하였다<sup>15,16)</sup>.

한약을 이용한 항염증 효과에 대한 연구로, 유 등<sup>8)</sup>은 항염증제 효력검색법 6가지를 이용하여 當歸, 防風, 銀杏葉, 竹鹽의 효과를 발표하였고, 문 등<sup>9)</sup>은 金銀花의 플라보노이드 성분에 대한 항염증 작용을 확인하였다. 또, 노 등<sup>10)</sup>은 苦蔘 추출물의 모발성장촉진과 면포억제효과를, 박 등<sup>11)</sup>은 白屈菜의 RAW 264.7 대식세포에서의 항염증 효과를 보

고하였으며, 최근 국내외 에서는 항염증약의 개발에 대한 연구로, 유기합성 및 천연물질을 대상으로 한 혈관투과성, 백혈구 유주, amine류, kinin류, cytokine류, prostaglandin류 등의 억제 효과를 밝히려는 실험이 활발히 진행되고 있다<sup>9)</sup>. 清上防風湯에 대한 임상 연구로는 채<sup>12)</sup>의 3주 이상 加味清上防風湯을 복용한 환자의 치료 효과에 대한 보고가 있으며, 실험 연구로는 김 등<sup>13)</sup>의 항부종, 종창억제, 항히스타민 효과 등에 관한 보고와, 조 등<sup>14)</sup>의 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균 효과 보고 등이 있으나, 복합 처방과 구성약재를 이용하여 염증 발생 기전과 염증 유도물질, 염증 유발 미생물들에 대한 전반적인 실험 보고는 없었다. 이에 저자는 加減清上防風湯의 항염증 효과를 실험적으로 규명하기 위하여 모세혈관 투과성 억제력, 백혈구 유주 억제력 등을 *in vivo* 실험으로, 항산화력, NO 생성억제력, iNOS 및 TNF- $\alpha$  유전자 발현 억제력, COX-2 활성억제력, 항산화력 등을 *in vitro* 실험으로 검증하였으며, *Trichophyton mentagrophytes*, *Pityrosporum ovale*, *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium xerosis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* 등의 염증유발 원인균에 대한 항균실험을 Agar diffusion method와, Minimum Inhibition Concentration(MIC)측정을 통해 평가하였으며, MTT법에 의해 세포독성을 평가하였다.

실험 결과, 加減清上防風湯은 모세혈관 투과성을 41.1%, 백혈구유주를 7.0% 억제시키는 것으로 평가되었으며, 이 결과는 양성대조군으로 실험한 aminopyrine의 효능보다는 다소 떨어지지만 염증의 2가지 특징이라 할 수 있는 혈관 투과성 항진과 백혈구 유주억제에 유효할 것으로 사료된다.

DPPH법을 이용한 radical scavenging activity 평가에서는, 加減清上防風湯 추출물의 0.01%에서 53.5%로 항산화력을 지닌 것으로 평가되었으며, 구성약재의 항산화력은, 薄荷와 蟬蛻 추출물이 0.01%의 농도에서 90% 이상의 우수한 결과를 보

였고, 甘草 추출물은 80% 이상의 항산화력을 보이는 것으로 확인되어, 이들 약재들이 加減淸上防風湯의 우수한 항산화력을 제공한 것으로 사료된다.

加減淸上防風湯추출물이 COX-2 효소의 활성을 억제 여부를 평가한 결과, 10 $\mu$ g/ml에서 COX-2 효소의 활성을 70.7% 유의성 있게 억제시키는 것으로 나타났으며, 加減淸上防風湯의 구성약재를 대상으로 한 COX-2 억제 실험에서는, 荊芥 추출물이 10 $\mu$ g/ml에서 80% 이상 활성을 매우 유의성 있게 억제시키는 것으로 평가되었고, 甘草, 蟬蛻 및 苦參 추출물은 60% 이상의 유의성 있는 효능을 지닌 것으로 평가되어 이들 한약재들이 加減淸上防風湯의 COX-2 억제효과를 제공하는 약재임을 확인하였으며, 향후 荊芥, 甘草, 蟬蛻, 苦參 등은 항염효과를 위한 다양한 처방에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

加減淸上防風湯추출물이 lipopolysaccharide(LPS)에 의해 유도되는 NO의 생성을 억제시키는 지의 여부를 평가한 결과, 50 $\mu$ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 NO 생성을 43.5% 억제시키는 효과를 지닌 처방인 것으로 조사되었으며, 구성약재를 대상으로 실험한 결과는 50 $\mu$ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 80%이상 억제시키는 유의성 있는 한약재 추출물은 없었으나, 白芷와 甘草 추출물이 50%이상, 防風과 蟬蛻 추출물이 40%의 효능을 지닌 것으로 평가되는 등 처방에 사용된 많은 약재들이 NO형성 억제력을 지닌 것으로 평가되었다. 또한 RT-PCR를 이용한 iNOS의 유전자 발현에 미치는 영향을 평가한 결과, 加減淸上防風湯추출물은 50 $\mu$ g/ml의 농도에서 iNOS 유전자 발현을 66% 억제시키는 것으로 나타나, NO 생성 억제는 iNOS의 유전발현 억제를 통해 이루어진 것으로 사료된다.

TNF- $\alpha$ 의 유전자 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 평가한 결과, 加減淸上防風湯추출물은 50 $\mu$ g/ml의 농도에서 이 유전자의 발현에 별다른 영향을 주지 못하는 것으로 나타났다.

加減淸上防風湯 추출물의 피부질환미생물을 억제 효과를 agar diffusion method와 MIC분석을 통해 평가한 결과, *T. mentagrophytes*(성장저지환, 9mm; MIC, 100 $\mu$ g/ml), *S. aureus*(MIC, 100 $\mu$ g/ml)에 유의성 있는 항균력을 지닌 것으로 평가되었으며, *P. acnes*(성장저지환, 12mm; MIC, 1,600 $\mu$ g/ml), *C. xerosis*(성장저지환, 12mm; MIC, 800 $\mu$ g/ml) 균에도 약간의 항균력을 지닌 것으로 평가되었다.

MTT법으로 加減淸上防風湯 추출물 및 구성약재의 세포독성을 평가한 결과, 荊芥를 비롯한 대부분의 구성약재가 100~200 $\mu$ g/ml의 세포독성을 지닌 것으로 나타났으며, 加減淸上防風湯추출물의 세포독성(MTT50)은 110 $\mu$ g/ml인 것으로 나타났다.

이상의 결과, 加減淸上防風湯은 백혈구 유주억제력과 모세혈관투과성억제력, 우수한 COX-2 활성억제력과 항산화력, 그리고 NO생성억제력과, 피부질환 미생물에 대한 항균력 등을 지닌 것으로 나타나, 여드름에 의한 피부염증 뿐만 아니라 무좀, 농가진과 아토피, 액취증 등의 치료와 예방에도 사용할 수 있을 것으로 사료되고, 그밖에 일반적인 염증 발생 기전의 억제효과를 기대할 수 있으며, 이에 대한 차후의 임상 및 실험 연구가 필요할 것으로 사료된다.

#### IV. 結 論

加減淸上防風湯이 염증반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 모세혈관 투과성 억제력, 백혈구 유주 억제력, 항산화력, NO 생성억제력, iNOS 및 TNF- $\alpha$  유전자 발현 억제력, COX-2 활성억제력, 항산화력, 항균력과 세포 독성을 *in vivo*와 *in vitro*등으로 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 加減淸上防風湯 농축액을 ICR mouse에 5회 반

복 투여한 결과 모세혈관 투과성을 41.1% 억제시켰다.

2. 加減清上防風湯 농축액을 ICR mouse에 5회 반복 투여한 결과 백혈구유주를 7.0% 억제시켰다.
3. DPPH 법으로 측정된 加減清上防風湯 추출물의 radical scavenging activity는 0.01% 농도에서 53.5%이었다. 구성약제 중에는 선대 추출물이 0.01% 의 농도에서 90% 이상의 유의성 있는 항산화력을 보였고, 감초 추출물은 80% 이상의 항산화력을 보였다
4. 加減清上防風湯 추출물은 10 $\mu$ g/ml에서 COX-2 효소활성을 70.7% 유의성 있게 억제시켰으며, 加減清上防風湯에 처방된 모든 원료한약재를 실험에서는 荊芥 추출물이 10 $\mu$ g/ml에서 COX-2 효소의 활성을 80% 이상 억제시키는 매우 유의성 있는 효능을 지닌 것으로 평가되었고, 甘草, 蟬蛻 및 苦蓼 추출물은 60% 이상의 유의성 있는 효능을 지닌 것으로 평가되었다.
5. 加減清上防風湯 추출물이 lipopolysaccharide에 의해 유도되는 NO의 생성에 미치는 영향을 RAW264.7를 이용한 평가한 결과, 50 $\mu$ g/ml의 농도에서 43.5%억제시켰다.
6. 加減清上防風湯 추출물이 lipopolysaccharide의 자극에 의해 RAW 264.7 세포에서 활성화 되는 iNOS와 TNF- $\alpha$  유전자 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 평가한 결과 50 $\mu$ g/ml의 농도에서 iNOS 유전자 발현을 66% 억제시켰으나, TNF- $\alpha$ 의 유전자 발현에는 별다른 영향을 주지 못했다.
7. 加減清上防風湯 추출물이 인체피부질환 유발균으로 보고된 6종의 미생물에 미치는 영향을 평가한 결과, T. mentagrophytes(MIC, 100 $\mu$ g/ml)와 S. aureus(MIC, 100 $\mu$ g/ml)에 유의성 있는 항균력을 지닌 것으로 평가되었다.
8. V79-4 세포를 이용한 MITT법으로 측정된 加減清上防風湯 추출물의 세포독성(MIT<sub>50</sub>)은 110 $\mu$ g/ml이었다.

## 參考文獻

1. 龔信. 古今醫鑑. 南昌:江西科學技術出版社, 1990: 23.
2. 蔡炳允. 漢方外科. 서울:高文社. 1978:91, 92, 310.
3. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:大星文化社, 1992:284.
4. 黃度淵. 方藥合編. 서울:南山堂. 1985:236.
5. 龔廷賢. 萬病回春. 북경:人民衛生出版社. 1988: 265.
6. 대한피부과학회간행위원회. 皮膚科學. 서울:麗文閣. 1994:383-8.
7. 박광균. 구강생화학. 서울:군자출판사. 1999: 318-25.
8. 문태철 외. 금은화 플라보노이드성분의 항염증 작용. 약학회지.1999;43(1):117-23.
9. 유태무 외. 천연물의 항염증작용에 관한 연구. 응용약물학회지. 1998;6(1):269-75.
10. 盧鉉贊 외. 苦蓼추출물이 모발성장 촉진 및 먼포억제에 미치는 영향. 대한안이비인후피부과학회지.2002;15(1):96-126.
11. 박동천 외. 白屈菜藥針液이 LPS로 誘導된 RAW 264.7 大食細胞에서의 抗炎症效果.경락경혈학회지. 2004;21(2):125-37.
12. 蔡炳允. 面疱에 대한 임상적 연구. 大韓外官科學會誌. 1998;11(1):251-68.
13. 金民洙 외. 面疱에 應用되는 清上防風湯의 效能에 關한 實驗的 研究. 慶熙醫學. 1992;8(3): 265-75.
14. 조희창 외. 清上防風湯 및 구성약물의 Staphylococcus aureus에 대한 항균효과에 관한 연구. 대한본초학회지. 2003;18(2):37-47.
15. 신민교. 원색 임상본초학. 서울:남산당. 175-7, 314-5, 506-7, 521-3, 529-31.
16. 林炳謀 외. 蟬蛻가 알레르기 豫防에 미치는 影響. 동의병리학회지. 1993;8(1):225-34.

17. 朴涌基, 葛花와 鬱金 및 苦參의 抗酸化作用에 關한 比較研究. 大韓本草學會誌. 2001;16(1): 41-53.
18. 이은방 외. 산수유 에텔분획물의 약리작용에 관한 연구. 약학회지. 1985;29(1):1-10.
19. Doherty NS, Poubelle P, Borgeat P, Beaver TH, Westrich GL, Schrader NL. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. J. Prostaglandins, 1985; 30:769-89.
20. Doherty NS, Beaver TH, Chan KY, Coutant JE, Westrich GL. : The role of prostaglandins in the nociceptive response induced by intraperitoneal injection of zymosan in mice, Br.J.Pharmacol, 1987;91: 39-47.
21. Bloss, M.S., Antioxidant determination by the use of stable free radical. Nature. 1985;181:1199.
22. Wadsworth T.L, Koop D.R., Effects of Ginkgo biloba extract and quercetin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. Chem Biol Interact. 2001;137:43-58.
23. Hinz B, Brune K, Rau T, Pahl A., Flurbiprofen enantiomers inhibit inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. Pharm.Res. 2001;18:151-6.
24. 노민수 외. 리포폴리사카라이드에 의해 유도되는 대식세포의 프로스타글란딘 생합성을 저해하는 천연물의 탐색. 약학회지. 1998;42:558-66.
25. 이진집 외. 진단미생물학(3판). 서울:고려의학. 1999:322-3, 359-74.
26. Schmidt A, Rühl-Hörster B., In vitro susceptibility of Malassezia furfur. Drug Research,1996;46:442-4.
27. 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;89:271-7.
28. 이승헌, 여드름. 대한의학협회지. 1993;36:591-6.
29. 문태철 외. 천연물로부터 사이클로옥시게나제-2 저해제 검색. 약학회지. 1998;42:214-9.
30. 노민수 외. 리포폴리사카라이드에 의해 유도되는 대식세포의 프로스타글란딘 생합성을 저해하는 천연물의 탐색. 약학회지. 1998;42:558-66.
31. 서영준. 발암과정에 있어서 Cyclooxygenase-2의 역할 및 그 저해를 통한 화학 암 예방. 분자세포생물학뉴스.2001;13:8-17.
32. 김세중. 면역길라잡이. 서울:고려의학..2000:65-8.
33. Aeberli D., Oertle S., Mauron H., Reichenbach S., Jordi B., Villiger P., Inhibition of the TNF-pathway;use of infliximab and etanercept as remission-inducing agents in case of therapy-resistant chronic inflammatory disorders. Swiss Med. Wkly. 2002;132:414-22.
34. Feldman M., Taylor P., paleolog E., Brennan F.M., Maini R.N., 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;30:4126-7.
35. 김룡규 외. 넵취 정유의 murine macrophage Raw 264.7 세포에서의 in vitro 항암효과. 약학회지. 2002;46:343-7.
36. 유윤정 외. 구강미생물학. 서울: 군자출판사. 2001:155-66.
37. 전현주 외. 비듬에 대한 통계적 관찰 및 진균학적 성상. 서울: 대한피부과학회지. 1993;31:



- 164-74.
38. 최승만 외. *Propionibacterium acnes*에 대한 천연물의 항균효과. 약학회지. 1998;42:89-94.
39. 국정표 외. 액취증 환자에서의 액와부 피부표면의 미생물학적 연구와 유전적 관찰. 대한피부과학회지. 1990;28:559-64.