

龍膽瀉肝湯加味方 3種의 염증관련 인자 억제에 관한 연구

원광대학교 한의과대학 부인과학교실

이승준, 조한백, 김송백, 장윤정, 이수정, 오광우, 최창민

ABSTRACT

Suppressive Effect of *Yongdamsagantanggambang* on the Inflammatory Factors

Seung-Jun Lee, Han-Baek Cho, Song-Baeg Kim, Yun-Jeong Jang,
Su-Jeong Lee, Kwang-Woo O, Chang-Min Choe
Dept. of Oriental Obstetric and Gynecology,
college of Oriental Medicine, Wonkwang University

Purpose: The purpose of this study is to investigate the anti-inflammatory effects of three types of *Yongdamsagantanggambang*(YSTG) which has been medicated the patient with inflammatory disease of female genitourinary system.

Methods: To verify the anti-inflammatory mechanism of YSTGs, expressions of IL-1 β , IL-6, MCP-1, COX-2 and TNF- α mRNA in THP-1 cells were examined. And we investigated the production levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in mouse following LPS co-treatment.

Results:

1. YSTG1, YSTG2 and YSTG3 extract did not show any cytotoxic effect on human fibroblast cells at any of the concentrations evaluated(500, 250, 125, 62.5, 37.25 μ g/ml)
2. YSTG1, YSTG2 and YSTG3 extract showed scavenging activity on DPPH free radical and SOD-like activity.
3. YSTG1, YSTG2 and YSTG3 extract decreased production levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α and MCP-1 in LPS-treated THP-1 cells.
4. YSTG1, YSTG2 and YSTG3 extract decreased expressions of IL-1 β , IL-6, MCP-1, COX-2 and TNF- α mRNA in LPS-treated THP-1 cells.
5. YSTG1, YSTG2 and YSTG3 extract decreased production levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in serum of LPS-treated mouse.

Conclusion: Based on results above, it is revealed three types of YSTG have the anti-inflammatory effect, and may be effective in the treatment for inflammatory disease of female genitourinary system.

Key words: *Yongdamsagantanggambang*(YSTG), anti-inflammation, inflammatory cytokine, herbal medicine.

“이 논문은 2008년도 원광대학교 교내 연구비 지원에 의하여 연구됨.”
“This research was supported by Wonkwang Univ. Research Fund. 2006”

I. 緒 論

염증은 살아있는 혈관을 가진 조직에서 세포손상을 일으키는 자극으로 인하여 발생하는 생체반응으로 염증반응 그 자체는 세포손상을 일으키는 원인을 제거하거나 희석하기 위한 생체 방어이지만 발현과 수복과정에서 숙주에 해로운 영향을 미칠 수도 있으므로¹⁾ 약물 등을 사용하여 염증에 대한 적극적인 치료를 행하고 있다.

비뇨생식기계염증은 환자들이 부인과 외래진료를 받는 가장 흔한 질환 중 하나로 질염, 자궁경관염, 골반염증성질환, 골반결핵 등 다양한 형태로 나타난다²⁾. 한의학에서는 帶下, 熱入血室, 陰痛, 陰瘡, 陰痒, 陰挺 등의 비뇨생식기계 염증관련질환에 대하여 다양한 방법으로 그 치료가 이루어지고 있다³⁾.

龍膽瀉肝湯은 《醫宗金鑑》⁴⁾에 수록된 處方으로 瀉肝膽實火 清下焦濕熱하여 纏腰火丹이나 小便淋濁 또는 陰痒, 帶下 등 여성 비뇨생식기계의 각종 炎症性 疾患에 널리 쓰이고 있고⁵⁻⁶⁾ 임상에서 다양하게 가감하여 활용되고 있다⁷⁾.

龍膽瀉肝湯과 그 加味方の 항염증효능에 대한 실험적 연구로는 宋 등⁸⁻¹⁰⁾의 연구가 있으나, 李⁷⁾의 龍膽瀉肝湯加味方 3종에 대한 실험적 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 현재 임상에서 음부소양, 외음부종통, 음창, 대하 등의 여성생식기계 염증성 질환에 활용되는 龍膽瀉肝湯加味方の 항염증 효과를 실험적으로 밝히고자 hFCs의 세포독성에 미치는 영향, THP-1 세포에 LPS로 유발한 염증반응에서 염증성 cytokine 생성량에 미치는

영향과 그 유전자에 미치는 영향, LPS로 BALB/c계 생쥐에 유발한 급성염증성 질환 생쥐 모델의 혈청 내 cytokine 생성량에 미치는 영향 등을 실험 평가하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗 方法

1. 재 료

1) 실험동물

실험동물은 대한실험동물센터에서 구입한 BALB/c계 생쥐를 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22 ± 2 °C, 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, 항생제 무첨가, 삼양사)와 물을 충분히 공급하였다.

2) 약 물

본 실험에 사용한 龍膽瀉肝湯加味方 (Yongdamsagantanggamibang, 이하 YSTG로 표기)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원을 통해 구입하여 정선하여 사용하였고, 한 첩 용량은 다음과 같다.

Table 1. The Compositions of Yongdamsagantanggambang1(YSTG1)

韓藥名	生藥名	用量 (g)
草龍膽	<i>Gentianae Scabrae Radix</i>	4
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	4
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	4
木通	<i>Akebiae Caulis</i>	2
車前子	<i>Plantaginis Semen</i>	2
生地黃	<i>Rehmanniae Radix</i>	2
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	2
梔子	<i>Gardeniae Fructus</i>	2
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	2
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2
玄參	<i>Scrophulariae Radix</i>	10
白鮮皮	<i>Dictamni Radicis Cortex</i>	10
榆根皮	<i>Ulmi Pumilae Cortex</i>	10
total		56

Table 2. The Compositions of Yongdamsagantanggambang2(YSTG2)

韓藥名	生藥名	用量 (g)
草龍膽	<i>Gentianae Scabrae Radix</i>	4
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	4
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	4
木通	<i>Akebiae Caulis</i>	2
車前子	<i>Plantaginis Semen</i>	2
生地黃	<i>Rehmanniae Radix</i>	2
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	2
梔子	<i>Gardeniae Fructus</i>	2
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	2
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2
玄參	<i>Scrophulariae Radix</i>	10
白鮮皮	<i>Dictamni Radicis Cortex</i>	10
榆根皮	<i>Ulmi Pumilae Cortex</i>	10
芡仁	<i>Euryales Semen</i>	4
荊芥	<i>Schizonepetae Spica</i>	4
羌活	<i>Osterici Radix</i>	4
total		68

Table 3. The Compositions of Yongdamsagantanggambang3(YSTG3)

韓藥名	生藥名	用量 (g)
草龍膽	<i>Gentianae Scabrae Radix</i>	8
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	6
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	6
木通	<i>Akebiae Caulis</i>	2
車前子	<i>Plantaginis Semen</i>	2
生地黃	<i>Rehmanniae Radix</i>	2
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	2
梔子	<i>Gardeniae Fructus</i>	2
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	2
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2
榆根皮	<i>Ulmi Pumilae Cortex</i>	8
棉花子	<i>Gossyph Semen</i>	6
total		48

3) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 Dulbecco's phosphate buffered saline, Hank's balanced salt solution, 3.8% sodium citrate, lipopolysaccharide(LPS), diethyl pyrocarbonate (DEPC), dithiothreitol (DTT), dulbecco's minimum essential medium (DMEM), collagenase A, penicillin, streptomycin, amphotericin, antibody avidin-HRP, complete adjuvant, chloroform, isopropanol, RNAzolB acid, magnesium chloride (MgCl₂)은 Sigma (Sigma Co., U.S.A.) 제품을, dNTP mix, hexanucleotides, RNase inhibitor는 Takara (Takara, Co., Japan) 제품을, M-MLV RT는 Promega (Promega Co., U.S.A.) 제품을, normal saline은 중외제약 제품을, fetal bovine serum (FBS)은 Hyclone (Hyclone Logan, U.S.A.) 제품을, RNase는 Pharmingen (Torreyana, U.S.A.) 제품을, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , COX-2, MCP-1 ELISA kit는 Biosource (U.S.A.) 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 특급 시약을 사용

하였다.

2. 방 법

1) 검액의 조제

YSTG1, YSTG2 그리고 YSTG3 각 2첩을 약탕기 (대용 1800)에 넣고 증류수 1,500 ml를 가한 후, 3시간 가열 추출하여, 침전물을 filter paper를 이용하여, 3회 여과하고, 이 여과액을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. Round flask에 농축된 용액을 -80 °C deep freezer에서 4시간 동안 방치하고, 24시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하여 YSTG1은 1첩 당 7.46 g, YSTG2는 1첩 당 8.11 g, YSTG3는 1첩 당 7.25 g의 분말을 얻어서 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 세포독성검사

세포독성 측정은 MTT assay로 하였다. Human fibroblast cell (hFCs)을 96 well plate에 2×10⁴ cells 씩 분주한 후 배양하고, 24시간 후 YSTG1, YSTG2 그리고 YSTG3를 500, 250, 125, 62.5, 31.25 (μg/ml)의 농도로 투여하였다. 다시 48시간 배양 후 부유액을 제거하고, 각 well에 MTT solution 100 μl 씩 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 부유액을 제거하고 각 well에 100 μl의 DMSO를 첨가하여 37 °C CO₂ 배양기에서 30분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 사용하여 wave length 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 염증관련 cytokine 분석

THP-1 세포주는 24 well plate에 1×10⁶ cells 로 분주하였다. 여기에 YSTG1, YSTG2 그리고 YSTG3 (100, 50 μg/ml)를 처리하고 1시간 후 LPS 2 μg/ml를

각각의 well에 첨가하고 3시간 배양하였다. 배양 후, 세포배양 상층만을 취하여 IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, MCP-1의 분비량을 ELISA kit을 이용하여 흡광도 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 염증관련 유전자 분석

(1) THP-1 세포에서 RNA 분리

먼저 THP-1 세포주는 24 well plate에 1×10⁶ 세포로 분주하여 안정화 시켰다. 여기에 YSTG1, YSTG2 그리고 YSTG3 (100, 50 μg/ml)를 처리하고 1시간 후 LPS 2 μg/ml를 각각의 well에 첨가한 후 24시간 배양하고 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고, 여기에 RNazolB 500 μl를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 μl를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 μl의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μl와 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 μl의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

(2) 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μg을 DNase I (10 U/μl) 2 U/tube를 37°C heating block에서 30분간 반응한 후 75°C에서 10분 동안 변성시키고, 이에 2.5 μl 10 mM dNTPs mix, 1 μl random sequence hexanucleotides

(25 pmole/ 25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l RNase inhibitor (20 U/ μ l), 1 μ l 100 mM DTT, 4.5 μ l 5 \times RT buffer (250 mM, Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RT (200 U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심 침강하여 37 $^{\circ}$ C heating block에

서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

(3) 정량적 증합 효소 연쇄 반응

Real time quantitative PCR은 Quantitative real-time PCR (Corbett, Co., USA)를 이용하여 수행하였으며, 사용된 primers는 아래와 같다.

IL-1 β	Forward Primer 5' CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG 3' Reverse Primer 5' GATCCACACTCTCCAGCTGCA 3'
IL-6	Forward Primer 5' TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC 3' Reverse Primer 5' GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG 3'
TNF- α	Forward Primer 5' TTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCC 3' Reverse Primer 5' GTATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG 3'
COX-2	Forward Primer 5' TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA 3' Reverse Primer 5' TGGCTCTGCAGGATTTTCATG 3'
MCP-1	Forward Primer 5' ATGCAGGTCTCTGTTCACG 3' Reverse Primer 5' CTTCTGGACCCATTCCTTATTGG 3'

Real time PCR의 조건은 다음과 같다 : 50 $^{\circ}$ C에서 2분, 94 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응하여 pre-denaturation 시킨 뒤, 95 $^{\circ}$ C에서 15초, 60 $^{\circ}$ C에서 1분간 반응하여 40회 반복 수행하였다. YSTG1, YSTG2, YSTG3 투여군과 대조군은 internal standard로 G3PDH를 사용하여 아래의 수식으로 target group의 Quantitative PCR을 정량하여 RQ (relative quantitative)값을 측정하였다.

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

x = starting quantity

y = yield

n = number of cycles

e = efficiency

5) Lipopolysaccharide (LPS)로 유도된 염증 생쥐 모델

(1) IL-1 β , IL-6, TNF- α 생성량 측정
YSTG 투여군은 20 g BALB/c계 생쥐를 기준으로 검액 9.6 mg을 생리식염수 0.2 ml에 용해시켜 oral zonde를 이용하여 하루에 1회씩 7일간 경구 투여하였다. 7일 후 lipopolysaccharide (LPS) 1 mg/kg을 복강에 주사한 후 90분 후에 ethyl ether로 마취하고 심장천자법으로 채혈하였다. 채혈 후 혈청을 분리하여 IL-1 β , IL-6, TNF- α 생성량을 ELISA로 측정하였다. 각 well에 생쥐의 혈청 100 μ l

(1/100 dilution)씩 분주한 후 antibody cytokine-biotined conjugated 100 μ l를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 100 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) 통계처리

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

III. 實驗 結果

1. 세포독성에 미치는 영향

세포독성을 관찰한 결과 hFCs에서는 대조군의 세포생존율 100.0 \pm 0.8(%)에 대하여 500, 250, 125, 62.5, 31.25 (μ g/ml) 농도에서 YSTG1은 83.5 \pm 2.4, 89.6 \pm 1.7, 90.4 \pm 0.3, 96.8 \pm 2.3, 101.9 \pm 1.4(%)의 세포생존율을 나타내었고, YSTG2는 86.5 \pm 0.5, 87.8 \pm 1.4, 92.3 \pm 1.0, 97.2 \pm 1.8, 102.8 \pm 1.6(%)의 세포생존율을 나타내었으며, YSTG3는 83.2 \pm 3.2, 85.8 \pm 1.3, 91.8 \pm 2.1, 95.3 \pm 0.7, 100.5 \pm 1.7(%)의 세포생존율을 나타내었다.

2. THP-1 세포주에서 염증 cytokine 생성량에 미치는 영향

1) IL-1 β 생성량

THP-1 세포주에서 IL-1 β 생성량은 정상군은 42.4 \pm 8.3 pg/ml, 대조군은 418.5

\pm 7.4 pg/ml로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($p < 0.001$) 증가를 나타냈으며, YSTG1은 100, 50 μ g/ml 투여에서 각각 182.0 \pm 3.7*** pg/ml와 293.7 \pm 3.7** pg/ml로, YSTG2는 100, 50 μ g/ml 투여에서 각각 157.9 \pm 13.8*** pg/ml와 242.8 \pm 22.1** pg/ml로, YSTG3은 100, 50 μ g/ml 투여에서 각각 191.1 \pm 1.8*** pg/ml와 291.8 \pm 4.6** pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 각 군에서 유의성 있는 감소를 나타내었다.(*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$)

2) IL-6 생성량

THP-1 세포주에서 IL-6 생성량은 정상군은 24.6 \pm 0.6 pg/ml, 대조군은 160.2 \pm 5.1 pg/ml로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($p < 0.001$) 증가를 나타냈으며, YSTG1은 100, 50 μ g/ml 투여에서 각각 82.6 \pm 4.1** pg/ml와 91.2 \pm 1.2** pg/ml로, YSTG2는 100, 50 μ g/ml 투여에서 각각 78.7 \pm 3.4** pg/ml와 96.1 \pm 5.9** pg/ml로, YSTG3은 100, 50 μ g/ml 투여에서 각각 73.4 \pm 6.8** pg/ml와 99.9 \pm 13.0* pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 각 군에서 유의성 있는 감소를 나타내었다.(** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

3) IL-8 생성량

THP-1 세포주에서 IL-8 생성량은 정상군은 119.6 \pm 11.0 pg/ml, 대조군은 488.7 \pm 27.5 pg/ml로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 ($p < 0.001$) 증가를 나타냈으며, YSTG1은 100, 50 μ g/ml 투여에서 각각 244.3 \pm 16.3** pg/ml와 338.5 \pm 11.9* pg/ml로, YSTG2는 100, 50 μ g/ml 투여에서 각각 219.8 \pm 23.7** pg/ml와 358.6 \pm 12.3* pg/ml로, YSTG3은 100, 50 μ g/ml 투여에서 각각 207.5 \pm 9.2*** pg/ml와 298.3 \pm 6.6** pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 각 군에서 유의성 있는 감소를 나타내었다.(*** $p < 0.001$,

**p<0.01, *p<0.05)

4) TNF- α 생성량

THP-1 세포주에서 TNF- α 생성량은 정상군은 163.8 \pm 2.5 pg/ml, 대조군은 1203.0 \pm 26.3 pg/ml로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (p<0.001) 증가를 나타냈으며, YSTG1은 100, 50 μ g/ml 투여에서 각각 802.2 \pm 68.7* pg/ml와 951.6 \pm 25.5* pg/ml로, YSTG2는 100, 50 μ g/ml 투여에서 각각 705.6 \pm 37.3** pg/ml와 928.8 \pm 98.4 pg/ml로, YSTG3은 100, 50 μ g/ml 투여에서 각각 863.4 \pm 58.8* pg/ml와 973.2 \pm 15.3* pg/ml로 나타나 YSTG2 50 μ g/ml 투여군을 제외한 각 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(**p<0.01, *p<0.05)

5) MCP-1 생성량

THP-1 세포주에서 MCP-1 생성량은 정상군은 136.7 \pm 13.0 pg/ml, 대조군은 769.8 \pm 18.9 pg/ml로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (p<0.001) 증가를 나타냈으며, YSTG1은 100, 50 μ g/ml 투여에서 각각 363.4 \pm 57.7* pg/ml와 459.4 \pm 10.4** pg/ml로, YSTG2는 100, 50 μ g/ml 투여에서 각각 318.6 \pm 26.4** pg/ml와 485.1 \pm 15.6** pg/ml로, YSTG3은 100, 50 μ g/ml 투여에서 각각 398.3 \pm 86.3* pg/ml와 444.6 \pm 10.4** pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 각 군에서 유의성 있는 감소를 나타내었다(**p<0.01, *p<0.05)

3. THP-1 세포주에서 염증관련 유전자에 미치는 영향

1) IL-1 β 유전자 발현

THP-1 세포주에서 IL-1 β 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이 0.06 \pm 0.01, 대조군이 1.01 \pm 0.02로 나타나 정상군에 비하

여 유의성 있는 (+++p<0.001) 증가를 나타냈으며, YSTG1은 100, 50 μ g/ml 투여에서 각각 0.47 \pm 0.06 RQ값과 0.83 \pm 0.11 RQ값으로, YSTG2는 100, 50 μ g/ml 투여에서 각각 0.40 \pm 0.10 RQ값과 0.58 \pm 0.07 RQ값으로, YSTG3은 100, 50 μ g/ml 투여에서 각각 0.83 \pm 0.06 RQ값과 0.89 \pm 0.01 RQ값으로 나타나 YSTG1 100 μ g/ml 투여군과 YSTG2 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는(**p<0.01, *p<0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 1).

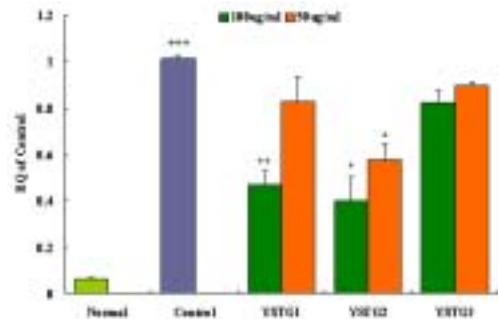


Fig. 1. Inhibitory effects of YSTG1, YSTG2 and YSTG3 extract on IL-1 β mRNA expression in THP-1 cells treated with LPS.

THP-1 cells were pretreated with various concentrations (100, 50 μ g/ml) of YSTG1, YSTG2 and YSTG3 in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS; 2 μ g/ml) for 24 hrs. IL-1 β 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<0.05).

2) IL-6 유전자 발현

THP-1 세포주에서 IL-6 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이 0.09 \pm 0.03, 대조군이 0.99 \pm 0.01로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++p<0.001) 증가를 나타냈으며, YSTG1은 100, 50 μ g/ml 투여에

서 각각 0.76 ± 0.06 RQ값과 0.85 ± 0.02 RQ값으로, YSTG2는 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 투여에서 각각 0.58 ± 0.03 RQ값과 0.79 ± 0.06 RQ값으로, YSTG3은 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 투여에서 각각 0.89 ± 0.11 RQ값과 0.98 ± 0.07 RQ값으로 나타나 대조군에 비하여 YSTG1과 YSTG2에서 유의성 있는 (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) 감소를 나타내었다(Fig. 2).

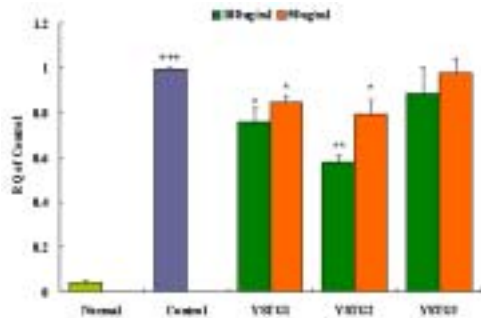


Fig. 2. Inhibitory effects of YSTG1, YSTG2 and YSTG3 extract on IL-6 mRNA expression in THP-1 cells treated with LPS.

THP-1 cells were pretreated with various concentrations (100, 50 $\mu\text{g/ml}$) of YSTG1, YSTG2 and YSTG3 in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS; 2 $\mu\text{g/ml}$) for 24 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 (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

3) MCP-1 유전자 발현

THP-1 세포주에서 MCP-1 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이 0.09 ± 0.03 , 대조군이 1.02 ± 0.02 로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++ $p < 0.001$) 증가를 나타냈으며, YSTG1은 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 투여에서 각각 0.22 ± 0.06 RQ값과 0.49 ± 0.10 RQ값으로, YSTG2는 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 투여에서 각각 0.11 ± 0.00 RQ값과 0.38 ± 0.06

RQ값으로, YSTG3은 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 투여에서 각각 0.36 ± 0.08 RQ값과 0.58 ± 0.01 RQ값으로 나타나 대조군에 비하여 각 군에서 유의성 있는 (*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) 감소를 나타내었다(Fig. 3).

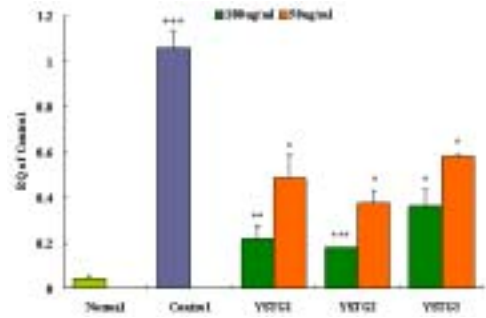


Fig. 3. Inhibitory effects of YSTG1, YSTG2 and YSTG3 extract on MCP-1 mRNA expression in THP-1 cells treated with LPS.

THP-1 cells were pretreated with various concentrations of (100, 50 $\mu\text{g/ml}$) of YSTG1, YSTG2 and YSTG3 in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS; 2 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hrs. MCP-1 mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. Statistically significant value compared with normal by *t*-test (+++ $p < 0.001$). Statistically significant value compared with control by *t*-test (*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

4) COX-2 유전자 발현

THP-1 세포주에서 COX-2 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이 0.05 ± 0.01 , 대조군이 1.03 ± 0.04 로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++ $p < 0.001$) 증가를 나타냈으며, YSTG1은 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 투여에서 각각 0.47 ± 0.08 RQ값과 0.61 ± 0.08 RQ값으로, YSTG2는 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 투여에서 각각 0.36 ± 0.07 RQ값과 0.61 ± 0.04 RQ값으로, YSTG3은 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 투여에서 각각 0.52 ± 0.09 RQ값과 0.73 ± 0.07 RQ값으로 나타나 대조군에 비하여 각

군에서 유의성 있는 (**p<0.01, *p<0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 4).

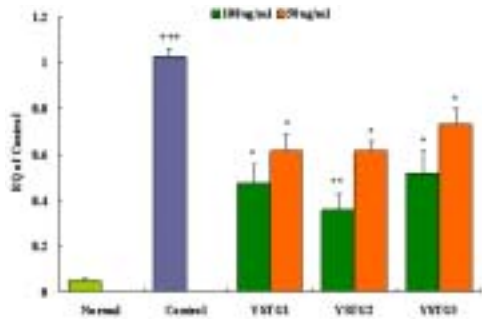


Fig. 4. Inhibitory effects of YSTG1, YSTG2 and YSTG3 extract on COX-2 mRNA expression in THP-1 cells treated with LPS.

THP-1 cells were pretreated with various concentrations (100, 50 μg/ml) of YSTG1, YSTG2 and YSTG3 in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS; 2 μg/ml) for 24 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<0.05).

5) TNF-α 유전자 발현

THP-1 세포주에서 TNF-α 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이 0.16±0.06, 대조군이 1.06±0.08로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+++p<0.001) 증가를 나타냈으며, YSTG1은 100, 50 μg/ml 투여에서 각각 0.51±0.06 RQ값과 0.63±0.01 RQ값으로, YSTG2는 100, 50 μg/ml 투여에서 각각 0.37±0.06 RQ값과 0.67±0.10 RQ값으로, YSTG3은 100, 50 μg/ml 투여에서 각각 0.38±0.062 RQ값과 0.72±0.09 RQ값으로 나타나 YSTG2 50 μg/ml 투여군과 YSTG3 50 μg/ml 투여군을 제외한 각 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (*p<0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 5).

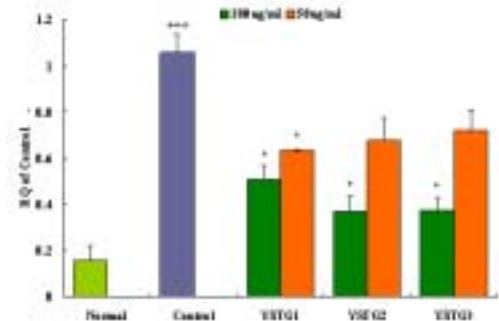


Fig. 5. Inhibitory effects of YSTG1, YSTG2 and YSTG3 extract on TNF-α mRNA expression in THP-1 cells treated with LPS.

THP-1 cells were pretreated with various concentrations (100, 50 μg/ml) of YSTG1, YSTG2 and YSTG3 in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS; 2 μg/ml) for 24 hrs. TNF-α 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).

4. 급성 염증성 질환 생쥐 모델의 혈청 내 cytokine 생성량에 미치는 영향

1) IL-1β 생성량

혈청 내 IL-1β 생성량을 측정한 결과, 정상군은 14.9±3.3 pg/ml, 대조군은 401.6±14.4 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (+++p<0.001) 증가한 반면, YSTG1은 400 mg/kg, 200 mg/kg 투여군에서 각각 133.8±9.8 pg/ml와 192.1±65.7 pg/ml로, YSTG2는 400 mg/kg, 200 mg/kg 투여군에서 각각 148.6±22.9 pg/ml와 154.1±36.7로, YSTG3은 400 mg/kg, 200 mg/kg 투여군에서는 각각 139.4±6.4 pg/ml와 297.2±23.6 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 각 군에서 유의성 있는 (**p<0.001, *p<0.01, *p<0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 6).

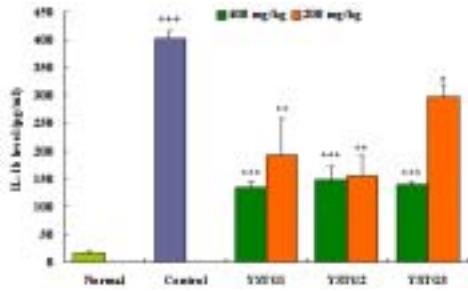


Fig. 6. Effects of YSTG1, YSTG2 and YSTG3 on IL-1 β production in serum of LPS-treated mice.

Female mice were co-treated with YSTG1, YSTG2 and YSTG3 (400, 200 mg/kg/day/a week) and LPS (1 mg/kg). Total IL-1 β levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. Statistically significant value compared with normal by *t*-test (****p*<0.001). Statistically significant value compared with control by *t*-test (****p*<0.001, ***p*<0.01, **p*<0.05).

2) IL-6 생성량

혈청 내 IL-6 생성량을 측정한 결과, 정상군은 20.5 \pm 8.3 pg/ml, 대조군은 641.6 \pm 24.4 pg/ml로 나타나 대조군은 정상군에 비하여 유의성 있게 (****p*<0.001) 증가한 반면, YSTG1은 400 mg/kg, 200 mg/kg 투여군에서 각각 435.4 \pm 61.9 pg/ml와 597.5 \pm 64.0 pg/ml로, YSTG2는 400 mg/kg, 200 mg/kg 투여군에서 각각 269.1 \pm 18.5 pg/ml와 583.9 \pm 77.7로, YSTG3은 400 mg/kg, 200 mg/kg 투여군에서는 각각 365.3 \pm 3.4 pg/ml와 475.5 \pm 7.3 pg/ml로 나타나 YSTG1 200 mg/kg 투여군과 YSTG2 200 mg/kg 투여군을 제외한 각 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (****p*<0.001, ***p*<0.01, **p*<0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 7).

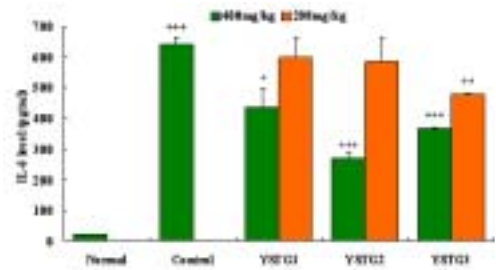


Fig. 7. Effects of YSTG1, YSTG2 and YSTG3 on IL-6 production in serum of LPS-treated mice.

Female mice were co-treated with YSTG1, YSTG2 and YSTG3 (400, 200 mg/kg/day/a week) and LPS (1 mg/kg). Total IL-6 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. Statistically significant value compared with normal by *t*-test (****p*<0.001). Statistically significant value compared with control by *t*-test (****p*<0.001, ***p*<0.01, **p*<0.05).

3) TNF- α 생성량

혈청 내 TNF- α 생성량을 측정한 결과, 정상군은 188.2 \pm 14.0 pg/ml, 대조군은 1690.4 \pm 221.4 pg/ml로 나타나 대조군은 정상군에 비하여 유의성 있게 (****p*<0.001) 증가한 반면, YSTG1은 400 mg/kg, 200 mg/kg 투여군에서 각각 1120.2 \pm 31.2 pg/ml와 1533.5 \pm 228.9 pg/ml로, YSTG2는 400 mg/kg, 200 mg/kg 투여군에서 각각 864.0 \pm 98.4 pg/ml와 1112.5 \pm 72.9 pg/ml로, YSTG3은 400 mg/kg, 200 mg/kg 투여군에서는 각각 902.5 \pm 53.1 pg/ml와 1137.9 \pm 28.7 pg/ml로 나타나 YSTG1 200 mg/kg 투여군을 제외한 각 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 (***p*<0.01, **p*<0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 8).

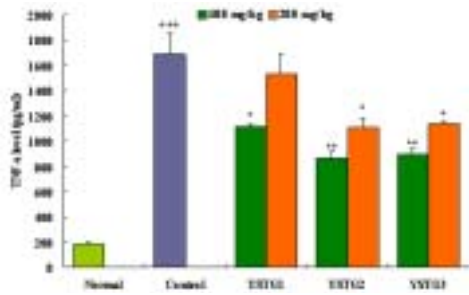


Fig. 8. Effects of YSTG1, YSTG2 and YSTG3 on TNF- α production in serum of LPS-treated mice.

Female mice were co-treated with YSTG1, YSTG2 and YSTG3 (400, 200 mg/kg/day/a week) and LPS (1 mg/kg). Total TNF- α levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. Statistically significant value compared with normal by *t*-test (+++*p*<0.001). Statistically significant value compared with control by *t*-test (***p*<0.01, **p*<0.05).

IV. 考 察

염증은 조직에 가해진 손상을 회복하기 위한 일련의 과정으로 생명체가 외부 자극에 대한 자기보호를 목적으로 혈관, 신경, 체액 및 세포를 이용하여 손상을 국소화시키고 제거하는 것을 의미하며¹¹⁾, 보다 넓은 의미에서는 손상에 대한 즉각적인 반응으로부터 손상부위가 완전히 치유되어 수복될 때까지의 전과정을 뜻한다¹⁾.

조직손상 후에 일어나는 변화는 손상에 의하여 유리된 일종의 공통성 물질에 의한 것으로 추측하고 그것이 염증반응의 궁극적인 원인일 것이라고 믿고 있는데, 이러한 물질을 염증반응의 화학적 매개체(chemical mediator)라고 하는데¹⁾, 염증이거나 알러지 증상을 일으킬 수 있는 어떤 자극을 주었을 경우 생체반응의 결과로 만들어지는 것으로, 염증반응

을 발생 또는 진전시키는 작용을 가진 물질을 말한다. 화학적 매개체는 혈장, 세포, 그리고 손상된 조직으로부터 유리되는데 이를 분류하면 vasoactive amines, plasma protease, PG, leukotriene, oxygen-derived free radicals, Platelet Activating Factor, cytokine 등이 있다^{1,11,12)}.

본 연구에서는 임상에서 활용되는 龍膽瀉肝湯의 加味方 3종을 선정하여 (YSTG1, YSTG2, YSTG3) 연구를 수행하였다. 임상에서 YSTG1은 龍膽瀉肝湯에 玄參, 白鮮皮, 榆根皮 각 10 g을 加味한 처방으로 (Table 1) 肝經의 濕熱이 鬱滯되어 오는 外陰部 炎症 初期에 사용하고, YSTG2는 YSTG1에 芡仁, 荊芥, 羌活 각 4 g을 加味한 처방으로 (Table 2) 바르톨린腺에서 帶下가 분비될 때 사용하며, YSTG3는 龍膽瀉肝湯에서 草龍膽을 8 g, 柴胡와 澤瀉를 각각 6 g으로 增量하고 榆根皮 8 g, 棉花子 6 g을 加味한 처방으로 (Table 3) 濕熱로 數脈이 나타나는 子宮 炎症의 경우에 사용한다⁷⁾.

이에 상기한 龍膽瀉肝湯加味方 3종의 추출물에 항염효능이 있는지를 확인하기 위한 실험을 진행하였다.

우선 YSTG1, YSTG2, YSTG3의 독성 여부를 평가하기 위해 hFCs에 대하여 MTT법을 이용한 세포독성 평가를 실시한 결과, 각 실험군에서 80% 이상의 세포생존율을 나타내었으므로 YSTG1, YSTG2, YSTG3는 모두 세포독성이 없는 것으로 평가할 수 있다.

세포 및 생체에서의 염증 발현을 위해서는 LPS(Lipopolysaccharide)를 활용하였다. LPS는 그람 음성균의 세포벽을 구성하는 주요성분으로 내독소(endotoxin)라고도 부르며, 염증을 일으키는 가장

강력한 물질 중 하나이다¹³⁻¹⁵). 이러한 LPS는 염증유발 목적으로 세포 및 실험 동물에 널리 사용되고 있고¹⁶⁻¹⁹) 본 연구에서도 염증 유발을 위하여 THP-1 세포와 BALB/c계 생쥐에 LPS를 투여하여 실험을 진행하였다.

cytokine이란 면역반응에 관여하는 림프계 세포, 염증 세포, 그리고 이외 조혈계 세포들에서 분비되는 분자량이 작은 단백활성물질로서, 그 중 T림프구에서 분비되어 다른 세포들의 상호 작용을 조절하는 기능을 가진 cytokine을 림포카인(lymphokine) 또는 인터루킨(interleukin, IL)이라고 부른다²⁰⁻²¹).

염증반응과 관련된 여러 cytokine 중 주로 단핵 탐식세포에서 생산되고 감염성 병원체에 대한 반응으로 감염 혹은 손상과 관련된 전신성 급성기 반응을 유도하는 전염증성(pro-inflammatory) cytokine에는 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등이 속하고¹), 특수한 백혈구 유형에 대하여 운동과 화학주성을 자극하는 작은 질량의 cytokine을 지칭하는 케모카인(chemokine)에는 IL-8, MCP-1 등이 속한다^{1,22}).

IL-1은 활성화된 단핵식균세포, 상피세포, 혈관내피세포 등에 의해 만들어지고, 염증과정에서 부착분자를 발현시켜 호중구와 대식세포의 이주를 향진하고, 발열 등의 증세를 유발하며, 간 급성기 단백질(hepatic acute phase protein)의 생성을 증가시키는 등 급성기 반응(acute phase response)을 일으킨다^{20,22-24}).

IL-6은 IL-1과 TNF- α 에 의해 분비가 촉진되는 급성 조절단백으로서, 면역작용과 조혈작용, 감염 및 염증반응 등에서 다양한 기능을 한다²²⁻²⁵).

IL-8은 활성화된 대식세포, 혈관내피

세포 및 기타 세포 등에서 분비되어 급성염증반응에서 중성구, 단핵구, T cell의 유주 활성화에 관여하며 중성구가 내피세포에 부착하도록 유도한다^{22,24}).

TNF- α 는 항원에 의해 활성화된 대식세포, 비만세포 등에서 분비되며 감염부위로 호중구와 단핵구의 보충을 자극시키고, 이 세포들로 하여금 미생물을 제거하게 한다. 특히 TNF- α 는 염증이 발생한 부위에 높은 농도로 존재하며, 최근에는 TNF- α 를 차단하는 약물들이 염증의 치료제로 연구되고 있다²⁶⁻²⁸).

MCP-1은 TNF- α , IL-1 β 혹은 LPS 자극에 의해 분비되는 화학유인물질로, 염증부위로 단핵세포 및 대식세포, NK cell 등을 동원하고 T cell과 NK cell 등으로부터 과립분비를 유도하여 염증반응을 촉진시킨다²²).

먼저 세포단위에서의 항염효과를 확인하기 위하여 LPS로 급성염증을 유발시킨 THP-1 세포에서의 염증성 cytokine 생성량에 미치는 영향에 대해 살펴 본 결과 YSTG2 50 μ g/ml 투여시 유의성은 없지만 TNF- α 생성량이 감소되었으며, 나머지 YSTG 투여군에서는 THP-1 세포의 IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1 생성량이 유의성 있게 감소된 것으로 나타났다.

COX는 아라키돈산(arachidonic acid)으로부터 PG를 생성하는 과정에 작용하는 효소로, COX-2는 오직 염증반응에 관련된 효소로 정상 휴지기 상태의 조직에서는 대개 발현되지 않으나 IL-1, IL-6, TNF- α 와 같은 cytokine이나 mitogen 또는 다양한 성장인자와 LPS등 여러 가지 염증성 자극이 있을 때 발현이 유도되어 PG의 생산을 자극하여 염증반응을 일으

키게 된다. 따라서 아스피린이나 인도메타신과 같은 비스테로이드성 소염제(NSAIDs)를 포함하는 COX 억제제가 항염증 치료제로 활용되고 있으며, 최근의 항염증 연구에 있어서도 COX-2 효소에 대한 관심이 높아지고 있다¹⁾.

LPS로 급성염증을 유발시킨 THP-1 세포에서의 염증성 cytokine 유전자 발현에 미치는 영향에 대해 살펴본 결과 YSTG1 50 µg/ml 투여 시와 YSTG3 50 µg/ml 투여 시의 IL-1β, YSTG3 투여 시의 IL-6, YSTG2 50 µg/ml 투여 시와 YSTG3 50 µg/ml 투여 시의 TNF-α에 대해 유의성은 없으나 유전자 발현이 감소되었으며, 그 외의 YSTG 투여군에서는 THP-1 세포에서의 IL-1β, IL-6, MCP-1, COX-2, TNF-α 유전자 발현을 유의성 있게 감소시킨 것으로 나타났다(Fig. 1-5). 따라서 YSTG1, YSTG2, YSTG3는 in vitro에서 항염효과가 있음을 알 수 있다.

또한 실험동물에서의 항염효과를 확인하기 위하여 LPS로 급성 염증을 유발시킨 생쥐 모델에서의 cytokine 생성량에 미치는 영향에 대해 살펴본 결과 YSTG1 200 mg/kg 투여 시와 YSTG2 200 mg/kg 투여 시의 IL-6, YSTG1 200 mg/kg 투여 시의 TNF-α에 대해 유의성은 없으나 혈청 내 생성량을 감소시켰고, 나머지 YSTG 투여군에서는 혈청 내 IL-1β, IL-6, TNF-α 생성량을 유의성 있게 감소시킨 것으로 나타났다(Fig. 6-8).

이상의 실험 결과로 보아 龍膽瀉肝湯加味方 3종은 모두 세포독성이 없는 안전한 처방으로 평가할 수 있고, 항산화효능은 물론 항염효능이 인정되므로, 부인과 영역에서의 각종 염증성 질환의 치

료에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 結 論

龍膽瀉肝湯加味方 3종(YSTG1, YSTG2, YSTG3)의 항염효능을 규명하고자 일련의 연구를 진행한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. YSTG1, YSTG2, YSTG3 추출물은 hFCs에 대한 세포독성 평가에서 세포독성이 나타나지 않았다.
2. YSTG1, YSTG2, YSTG3 추출물은 DPPH 소거능 및 SOD 유사활성이 모두 농도의존적으로 증가하여 항산화효능이 인정되었다.
3. YSTG1, YSTG2, YSTG3 추출물은 LPS로 유도된 THP-1세포에서의 IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, MCP-1의 생성량을 감소시키는 효과가 나타났다.
4. YSTG1, YSTG2, YSTG3 추출물은 LPS로 유도된 THP-1세포에서의 IL-1β, IL-6, MCP-1, COX-2, TNF-α의 유전자 발현을 억제하는 효과가 나타났다.
5. YSTG1, YSTG2, YSTG3 추출물은 LPS로 급성 염증을 유발시킨 생쥐 모델에서 혈청 내 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성량을 감소시키는 효과가 나타났다.

□ 투 고 일 : 2009년 7월 29일

□ 심 사 일 : 2009년 8월 3일

□ 심사완료일 : 2009년 8월 10일

參考文獻

1. 대한병리학회. 병리학 I. 서울:KMS. 2007:76-108.
2. 대한산부인과학회 교과서편찬위원회. 부인과학. 서울:도서출판 고려의학. 2007:147-61.
3. 한방여성의학 편찬위원회. 한방여성의학 I. 서울:도서출판 정담. 2007: 279-80, 282, 292, 313-4, 317, 320, 327, 352, 403.
4. 吳謙 등 지음, 윤석희 등 번역. 醫宗金鑑. 서울:지산출판사. 2008:386-7, 426-7, 656-7, 667-9, 682-6.
5. 金相贊 등. 方劑學. 서울:圖書出版 永林社. 1999:193-4.
6. 大田大學校 韓醫科大學 第12期 卒業準備委員會. 婦人科方劑學. 서울:도서출판 木과 土. 2000:128-9.
7. 李根春. 李家東醫臨床. 서울:도서출판 의성당. 2006.
8. 宋炳基. 龍膽瀉肝湯과 銀花瀉肝湯의 抗炎症, 解熱, 鎮痛, 利尿 및 抗菌效果. 경희대학교 대학원 박사학위논문. 1980.
9. 文大煥. 龍膽瀉肝湯 및 茵陳五苓散이 膽道結紮로 誘發된 白鼠의 損傷肝에 미치는 影響. 원광대학교 대학원 박사학위논문. 1994.
10. 손성향 등. Combined Treatment of Colchicine and Herbal Medicines (Gamichunghyulbohyul-tang of Gamiyongdamsagan-tang) Attenuate the Behcet's Disease Symptoms in Mice. 대한한의학회지. 2001;22(2):102-8.
11. 고려대학교 의과대학 병리학교실. 병리학. 서울:신광출판사. 2001:28, 31.
12. 송계용 등. 핵심 병리학. 서울:고려의학. 1998:63.
13. 禹元洪 등. Lipopolysaccharide가 Lymphokine 생산에 미치는 영향에 관한 연구. 원광한의학. 1992;2(1):187-96.
14. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. Journal of Endotoxin Research. 2001;7(3):167-202.
15. 한기정 등. Lipopolysaccharide, Dexamethasone 및 N-Nitro-L-Arginine Methyl Ester 가 흰쥐 간 조직의 프리라디칼 발생과 제거에 미치는 영향. 中央醫大誌. 2003;28(1):77-88.
16. 윤용갑 등. 금은화 수용성 추출물의 LPS 유도 염증매개물 억제 효과. 대한본초학회지. 2007;22(3):117-25.
17. 조은호 등. LPS에 의해 유발된 염증 스트레스에 대한 황련과 부자의 효과. 대한본초학회지. 2006;21(2):77-85.
18. 최은미 등. LPS로 자극한 RAW264.7 대식세포주에서 회향 추출물에 의한 염증성 매개물의 생성 억제. 한국조리과학회지. 2004;20(3):505-10.
19. 윤원중 등. 큰비쭉(Artemisia fukudo) 추출물의 murine macrophage RAW 264.7 세포에서 in vitro 항염효과. 한국식품과학회지. 2007;39(4):464-9.
20. 김세종. 면역학 길라잡이. 서울:고려의학. 2000:65-8.
21. 홍천수 譯. Pathology로 이해하는 내과학. 서울:도서출판 정담. 2002:10-2.
22. E Braunwald 등 저, 대한내과학회 해리슨내과학 편집위원회 역. HARRISON'S 내과학 II. 서울:도서출판 MIP. 2003:1870-4.
23. 권명상 등. 임상면역학. 서울:고려의학.

- 학. 1998;163-74.
24. 강영희 등. 생명과학대사전. 서울:도서출판 아카데미서적. 2008;1254-5, 1397.
25. 이정수, 정화순. 전신성홍반성낭창과 류마티스양관절염에서의 IL-6의 의의. 梨花醫大誌. 1999;22(2):131-7.
26. Abbas AK et al. Cellular and molecular immunology. Philadelphia:W B Saunders. 1994:245-51.
27. Aeberli D et al. Inhibition of the TNF-pathway: use of infliximab and etanercept as remission-inducing agents in cases of therapy-resistant chronic inflammatory disorders. Swiss Med Wkly. 2002;132:414-22.
28. 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 diseases. Transplantation Proceedings. 1998;30(8):4126-7.