

凉膈散火湯의 抗炎症 효과에 대한 연구

탁미진^{1,2)} · 탁명림²⁾ · 강경화³⁾ · 고우신²⁾ · 윤화정²⁾

¹⁾버드나무 한의원

²⁾동의대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

³⁾동의대학교 한의과대학 한방생리학교실

The Inhibitory Effects of Yang Geouk San Hwa-Tang on LPS-stimulated inflammation in RAW264.7 macrophage cells

Mi-Jin Tak · Myoung-Rim Tak · Kyoung-Hwa Kang · Woo-Shin Ko · Hwa-jung Yoon

Objective: Yang Geouk San Hwa - Tang (YGSHT) has been widely used in Sasang Constitutional Medicine of Korea for treatment of acute inflammatory symptom, such as palatine tonsillitis, polydipsia, headache, papule, pimple however, the mechanism of its anti-inflammatory activity has not been clarified. In this study, therefore, we investigated the mechanism of the inhibitory effect of YGSHT on LPS-induced inflammation.

Materials and methods: The effect of YGSHT was analyzed by ELISA, RT-PCR and Western blotting in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

Results: We found that YGSHT suppressed not only the production of pre-inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α), the generation of nitric oxide (NO) and prostaglandin E (PGE)2, but also the mRNA expression of pre-inflammatory cytokines, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and cyclooxygenase (COX)-2. Furthermore, YGSHT was shown to inhibit the phosphorylation of ERK1/2 and JNK1/2 and the activation and translocation of NF-kB from cytosol to nuclear in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

Conclusions: These results suggest that YGSHT exerts an anti-inflammatory effect through the regulation of the ERK1/2 and JNK1/2 pathway and NF-kB pathway, thereby decreasing production of pre-inflammatory cytokines, NO, and PGE2.

Key words : YGSHT(Yang Geouk San Hwa - Tang), Sasang, anti-inflammatory activity

Ⅰ. 緒 論

교신저자 : 윤화정, 부산광역시 부산진구 양정 2동 산45-1
동의대학교 부속한방병원 한방안이비인후피부과
(Tel : 051-850-8658, E-mail : yhj1226@deu.ac.kr)
• 접수 2010/03/11 • 수정 2010/03/28 • 채택 2010/03/30

여드름은 만성 염증 피부질환의 하나로 주로 열

굴, 목, 등의 부위에 발생하며, 발병시기는 대부분 사춘기에 발병하여 젊은 층에서 장년층으로 갈수록 점차 감소하는 경향을 보이지만 40대까지 지속되는 경우도 있어 육체적, 정신적으로 고통 받고 있으며, 사회 활동에 제한을 받는 경우도 많은 실정이다^{1,2)}.

여드름은 한의학적으로 瘰癧, 面疱, 肺風粉刺 등과 의미가 유사하며 원인으로는 肺熱, 血熱, 脾胃濕熱, 脾虛濕痰등이 제시되고 있다³⁾.

지금까지 한의학적으로 보고된 여드름에 대한 처방으로는 加味活血湯⁴⁾, 加減枇杷清肺飲⁵⁾, 加味當歸芍藥湯⁶⁾, 白附子散⁷⁾과 連翹敗毒散加味⁸⁾ 등이 있다.

최근 저자는 체질에 따른 여드름 치료효과에 관한 연구에서 四象處方을 복용시켜 81명 환자의 여드름을 치료한 후에 전체 환자의 여드름 등급이 개선되었고, 81명 환자의 체질 감별 결과 少陽人이 74명, 少陰人 5명, 太陰人 2명으로 少陽人이 압도적으로 많은 것으로 나타났다. 또한 사용된 소양인 처방은 凉膈散火湯 (Yang Geouk San Hwa - Tang, YGSHT) 48.1%, 陽毒白虎湯 40.7%로 YGSHT이 가장 많이 사용되었음을 보고하였다⁹⁾.

YGSHT는 少陽人 胃受熱裏熱病에서 上消證이나 纏喉風, 脣腫의 輕症등에 사용하는 처방으로 大腸清陽이 胃局까지는 상승하고 있으나 胃局에서 頭面四肢로의 상승이 충족지 못하여 발생하는 上消證에 胃局에 鬱滯된 熱을 풀어서 凉膈-散火시키는 작용을 하게 된다¹⁰⁾.

YGSHT에 관한 실험적 연구로는 뇌혈류 및 뇌혈 손상에 관한 연구¹¹⁻¹³⁾, 당뇨병에 관한 연구^{14,15)}, 심진도 변화에 관한 연구¹⁶⁾, 뇌경색에 관한 연구^{17,18)}, 비만에 관한 연구¹⁹⁾, 항 스트레스효과에 관한 연구²⁰⁾, 알러지성 접촉피부염에 미치는 연구²¹⁾, 항 allergy작용에 관한 연구²²⁾ 등이 있었으나 YGSHT의 항염증 작용을 실험적으로 연구하여 여드름에 치료효과가 있음을 보고한 연구는 없었다.

이에 저자는 임상에서 소양인 여드름 치료에 많

이 활용되고 있는 YGSHT의 항염증 효과를 알아 보기 위하여 LPS로 유도된 RAW264.7 cells 염증 모델을 이용하여 YGSHT의 효과를 조사하여 有意한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

1) 凉膈散火湯 (YGSHT)의 추출

본 실험에 사용된 약제는 동의대학교 부속 한방병원에서 구입하였으며, YGSHT 960 g을 증류수로 水洗하여 3 l의 증류수를 加하여 3 시간 동안 가열 추출하였다. 추출된 용액을 원심분리를 통하여 상층액을 분리하고, 0.2 mm 여과지에서 여과하여 rotary evaporator로 200 ml이 되도록 減壓濃縮한 후 냉동 건조하여 110.9 g의 抽出物을 얻었다. -20℃에 보관하였다가 실험직전 생리식염수나 배지에 희석하여 0.2 μm syringe filtering 후 실험에 사용하였다(Table 1).

2) 세포주

RAW264.7 (mouse macrophage cell line)은 한국세포주은행 (Korea Cell Line Bank, KCLB, No. 40071)(Seoul, Korea)에서 분양받아 배양하였다.

3) 시약

본 실험에 사용된 LPS (*Escherichia coli* O55: B5), HEPES, Igepal CA-630, sodium deoxycholate, NaCl, Tris-HCl, sodium pyrophosphate, NaVO₄, NaF, leupeptin, Phenylmethylsulfonyl fluoride는 Sigma로부터, FBS, penicillin, streptomycin, DMEM 및 trypsin-EDTA solution은 Gibco BRL로부터, MTT, TRizol 및 DMSO는 Amresco로부터, IL-1b와 TNF-a kit는 BD Biosciences Pharmingen으로부터, PGE2 kit는 R&D Systems

로부터, reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) kit (AccuPower RT/PCR PreMix)는 Bioneer로부터, anti-phospho-ERK, anti-ERK, anti-phospho-JNK, anti-JNK, anti-phospho-p38, anti-p38, anti-p65 및 anti- β -actin primary antibody는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)으로부터, HRP-conjugated secondary antibody는 KPL (USA)로부터 구입하여 사용하였다.

Table 1. The Composition of YGSHT Prescription

| Korean | Chinese | Latin | Dosage (g) |
|--------------|---------|------------------------|------------|
| 생지황 | 生地黃 | Rehmaniae Radix crudus | 8 |
| 인동등 | 忍冬藤 | Lonicerae Folium. | 8 |
| 연교 | 連翹 | Forsythiae Fructus. | 8 |
| 치자 | 梔子 | Gardeniae Fructus. | 4 |
| 박하 | 薄荷 | Menthae Herba. | 4 |
| 지모 | 知母 | Gypsum | 4 |
| 석고 | 石膏 | Nepetae Herba. | 4 |
| 형개 | 荊芥 | Ledebouriellae Radix | 4 |
| 방풍 | 防風 | | |
| Total amount | | | 48 |

2. 方法

1) 세포 배양

RAW264.7 cells는 한국세포주은행 (Korea Cell Line Bank, KCLB, No. 40071) (Seoul, Korea)에서 분양받았으며 세포의 배양을 위하여 10% heat-inactivated FBS (Gibco BRL, USA)과 1% penicillin 및 streptomycin (Gibco BRL, USA)을 포함한 DMEM (Gibco BRL, USA) 배양액에서 배양하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였고, 2일마다 배지를 교환하였으며, 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 계대 배양하였다.

2) MTT assay

RAW264.7 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 96 well plate (Corning, USA)에 2×10^4 cells/ml의 세포수가 되도록 분주하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한다. YGSHT를 농도별 (0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 및 4 mg/ml)로 처리한 후 4시간동안 반응시켰다. 배양액을 제거 한 후 5 mg/ml의 MTT를 각 well에 넣고 잘 섞어 준 후 4시간동안 37°C incubator에서 배양한 후 tetrazolium bromide salt를 제거하고 DMSO를 200 μ l씩 분주하여 well에 생성된 formazin이 잘 녹을 수 있게 충분히 흔들어 모두 녹인 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 3 회의 측정으로 그에 대한 평균값과 표준 편차를 구하였다.

3) Cytokine assay

RAW264.7 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 24 well plate (Corning, USA)에 5×10^5 cells/ml의 세포수가 되도록 분주하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 24시간동안 배양하였다. 새로운 DMEM배지로 교환한 후 YGSHT를 농도별 (0, 2 및 4 mg/ml)로 세포에 처리하여 1시간동안 배양한 후 자극제 LPS (1 μ g/ml)을 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어 처리하고 3시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 후에 상층액을 분리하여 5,000 rpm에서 2분동안 원심분리하여 분리된 상층액을 -70°C에 보관하였다가 IL-1 β , IL-6, and TNF- α ELISA kit (BD Biosciences Pharmingen, USA)를 사용하여 측정하였다. Microplate reader (Molecular Devices, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 누출된 cytokine의 양을 계산하였다.

4) Nitric oxide assay

RAW264.7 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 24 well plate (Corning, USA)에 5×10^5 cells/ml의 세포수가 되도록 분주하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 새로운 DMEM배지로 교환한 후 YGSHT를 농도별 (0, 2 및 4 mg/ml)로 세포에 처리하여 1시간 동안 배양한 후 자극제 LPS (1 µg/ml)를 처리하고 24시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 후에 상층액을 분리하여 5000 rpm에서 2분동안 원심분리하여 분리된 상층액을 -70°C에 보관하였다가 세포 배양액과 Griess 용액을 5분동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, NaNO₂ standard 값을 이용하여 계산하였다.

5) PGE2 assay

RAW264.7 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 24 well plate (Corning, USA)에 5×10^5 cells/ml의 세포수가 되도록 분주하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 새로운 DMEM배지로 교환한 후 YGSHT를 농도별 (0, 2 및 4 mg/ml)로 세포에 처리하여 1시간동안 배양한 후 자극제 LPS (1 µg/ml)를 처리하고 24시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 후에 상층액을 분리하여 5000 rpm에서 2분동안 원심분리하여 분리된 상층액을 -70°C에 보관하였다가 PGE2 ELISA kit (R&D Systems, USA)를 사용하여 측정하였다. Microplate reader (Molecular Devices, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 누출된 PGE2의 양을 계산하였다.

6) RT-PCR

RAW264.7 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 6 well plate (Corning, USA)에 5×10^5 cells/ml의 세포수가 되도록 분주하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다.

새로운 DMEM배지로 교환한 후 YGSHT (0, 2 및 4 mg/ml)로 세포에 처리하여 1시간 동안 배양한 후 자극제 LPS (1 µg/ml)를 처리하고 24시간동안 배양하였다. 상층액을 제거한 후 TRizol을 넣고 2분동안 방치한 후 chloroform을 넣고 10초동안 vortexing하고 12,000 rpm에서 15분동안 원심분리한 후, 상층액을 취하여 동량의 isopropanol을 혼합하여 흔들어 주었다. 12,000 rpm에서 10분동안 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellet은 DEPC (diethyl pyrocarbonate)-DW에 녹여 사용하였다.

RT-PCR kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 45°C에서 30분, 94°C에서 5분동안 반응시킨 후 94°C에서 30초동안 denaturation시키고, 55~62°C에서 30초동안 annealing시킨 다음, 72°C에서 1분동안 extension시키는 cycle을 30~35회 반복한 뒤, 마지막 extension은 72°C에서 5분동안 PCR machine (GeneAmp, PCR system 9700, USA)에서 수행하였다. 각 PCR products는 2% agarose gel에 loading하여 100V 조건에서 전기영동을 통하여 분석하였다. 각각의 primer의 염기서열은 다음과 같다(Table 2).

Table 2. The Primers for RT-PCR Analysis

| Target gene | Oligonucleotide sequences (5'to3'direction) | Expected size |
|-------------|--|---------------|
| IL-1β | AAGCTCTCCACCTCAATGGACAG GTCTGCTCATTACGAAAAGGGA | 453 |
| TNF-α | TTCTGTCTACTGAACCTCGGGGTGATCGGTCC GTATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG | 354 |
| iNOS | CTGCAGCACTTGGATCAGGAACCTG GGGAGTAGCCTGTGTGCACCTGGAA | 311 |
| COX-2 | TTGAAGACCAGGAGTACCGC GGTACAGTCCCATGACATCG | 588 |
| 18S | GTAACCCGTTGAACCCATT CCATCCAATCGGTAGTAGCG | 140 |

7) Nuclear/cytosol extraction

RAW264.7 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 100mm cell culture dishes (Corning, USA)에 5×10^5 cells/ml의 세포수가 되도록 분주하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 새로운 DMEM배지로 교환한 후 YGSHT (0, 2 및 4 mg/ml)로 세포에 처리하여 1시간동안 배양한 후 자극제 LPS를 처리하고 배양하였다. MAPK와 NF- κ B 활성을 측정하기 위하여 LPS로 각각 15분과 1시간동안 자극하였다. 반응 후 cells는 cold PBS로 2번 washing한 다음, 0°C에서 low salt buffer를 첨가하여 부드럽게 pipetting하고 15분동안 ice위에 방치한 후 10% Igepal CA-630을 첨가하여 강하게 vortexing하였다. 그 후 4°C, 3,000 rpm에서 10분동안 원심분리하여 새 e-tube에 상층액을 옮긴 후 다시 4°C, 13,000 rpm에서 30분동안 원심분리하여 cytosol 분획을 분리하였다. Nuclear pellet에 low salt buffer를 첨가하여 4°C, 3,000 rpm에서 10분동안 원심분리하여 상층액을 제거 한 후 high salt buffer를 첨가하여 30분동안 4°C에서 lysis한다. 그 후 4°C, 13,000 rpm에서 30분동안 원심분리하여 nuclear 분획을 분리하였다.

8) Western blot

Cell lysates는 4°C, 13,000 rpm에서 30분동안 원심분리하여 상층액을 분리한 후 protein content를 Bradford법으로 정량하였다. 20-50 μ g의 단백질을 10% SDS-PAGE 로 분리하고, Hybond-PVDF membrane (Amersham Pharmacia Biotech)으로 transfer하였다. Transfer된 membrane은 Tris-buffered saline Tween-20 (TBST) (20 mM Tris, pH 7.6, 136 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에 용해된 5% skim milk에 1시간동안 실온에서 blocking한 후 anti-phospho-ERK와 anti-ERK, anti-phospho-JNK와 anti-JNK, anti-phospho-p38

과 anti-p38 MAP kinase, anti-p65와 β -actin primary antibody (1 : 1000 dilution)로 4°C에서 overnight 반응한 후 TBST로 3회 washing하고, HRP-conjugated secondary antibody (1 : 1000 dilution)로 1시간동안 실온에서 반응시켰다. TBST로 3 회 세척한 후 ECL system (Amersham)을 이용하여 발색시켰다.

9) 統計 분석

成績은 SPSS 17.0K for Windows 통계 프로그램 패키지를 사용하여 평균치 \pm 표준오차로 나타내었고 유의수준은 P < 0.05로 하였다. 각 실험군 간의 통계학적 분석은 one way-ANOVA와 Dunnett test 검정을 실시하였다.

III. 結果

1. 세포생존률에 미치는 영향

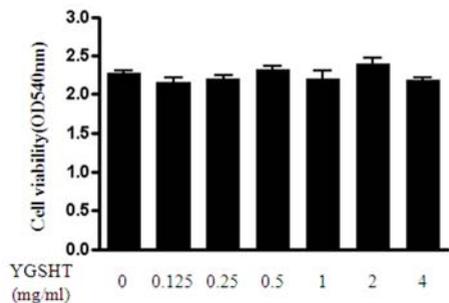


Fig. 1. Effects of YGSHT on the cell viability of RAW264.7 cells.

RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations (0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, and 4 mg/ml) of YGSHT for 4 hrs. Cell viability was evaluated using a colorimetric assay based on MTT assay. Vertical bar represents as the mean \pm S.D.. The absorbance was measured at 540 nm using ELISA reader.

RAW264.7 cells의 생존률에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 아무런 처리를 하지 않은 대조군에서 2.37 ± 0.18 의 흡광

도를 나타내었으며, YGSHT (0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, and 4 mg/ml)의 농도를 처리한 세포에서 각각 2.35 ± 0.35 , 2.48 ± 0.46 , 2.54 ± 0.37 , 2.40 ± 0.43 및 2.32 ± 0.26 의 흡광도를 나타내어 모든 농도에서 정상세포에 비해 유의한 영향을 보이지 않았다(Fig. 1).

2. IL-1 β 분비에 미치는 영향

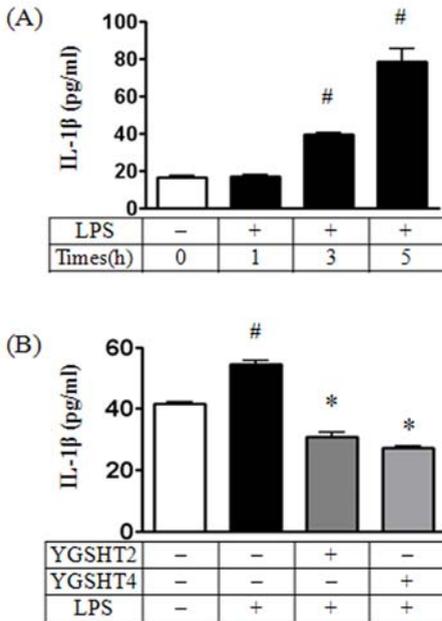


Fig. 2. Effects of YGSHT on the IL-1 β production in LPS-stimulated RAW264.7 cells

RAW264.7 cells were exposed by LPS(1 $\mu\text{g/ml}$), and incubated for 0, 1, 3, and 5 hrs(A). YGSHT(2 and 4 mg/ml) was pretreated for 1hr prior to LPS exposure for 3 hrs in the RAW264.7 cells (B). IL-1 β production was measured from cell supernatant using ELISA method. Vertical bar represents as the mean \pm S.D.. The absorbance was measured at 450 nm using ELISA reader.

$p < 0.05$; significantly different from the vehicle group

* $p < 0.05$; significantly different from the LPS stimulated group

LPS 자극 후 시간별 분비되는 IL-1 β 의 양을 조사한 결과 LPS로 자극하지 않은 RAW264.7 cells에서 IL-1 β 의 양은 16.48 ± 1.76 pg/ml이었으며, LPS(1 $\mu\text{g/ml}$)로 자극한 후 시간별(1, 3, and 5 hrs) 분비되는 IL-1 β 의 양은 각각 16.96 ± 1.92 pg/ml, 39.33 ± 2.44 pg/ml, 78.52 ± 13.50 pg/ml으로 자극시간에 비례하여 유의한 증가를 보였다(Fig. 2A).

YGSHT를 농도별로 1 시간동안 전처리 후 LPS(1 $\mu\text{g/ml}$)를 3 시간동안 자극한 후 분비되는 IL-1 β 의 양을 조사한 결과 아무런 처치를 하지 않은 세포에서 IL-1 β 의 양은 41.53 ± 1.31 pg/ml이었으며, LPS로 자극한 세포에서 54.53 ± 2.61 pg/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 증가를 보였다. 반면 YGSHT (2 and 4 mg/ml)을 전처리하고 LPS로 자극한 세포에서 각각 35.30 ± 0.94 pg/ml과 27.30 ± 0.86 pg/ml로 모든 농도에서 LPS로 자극한 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 감소를 보였다(Fig. 2B).

3. TNF- α 분비에 미치는 영향

LPS 자극 후 시간별 분비되는 TNF- α 의 양을 조사한 결과 LPS로 자극하지 않은 RAW264.7 cells에서 TNF- α 의 양은 14.55 ± 1.46 ng/ml이었으며, LPS(1 $\mu\text{g/ml}$)로 자극한 후 시간별(1, 3, and 5 hrs) 분비되는 TNF- α 의 양은 각각 41.86 ± 5.10 ng/ml, 126.20 ± 18.89 ng/ml, 137.40 ± 17.91 ng/ml으로 자극시간에 비례하여 유의한 증가를 보였다(Fig. 3A).

YGSHT를 농도별로 1시간동안 전처리 후 LPS(1 $\mu\text{g/ml}$)를 3시간동안 자극한 후 분비되는 TNF- α 의 양을 조사한 결과 아무런 처치를 하지 않은 세포에서 TNF- α 의 양은 3.94 ± 0.97 ng/ml이었으며, LPS로 자극한 세포에서 8.59 ± 1.02 ng/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 증가를 보였다. 반면 YGSHT (2

and 4 mg/ml)을 전처리하고 LPS로 자극한 세포에서 각각 6.31 ± 0.70 ng/ml과 3.97 ± 0.87 ng/ml로 모든 농도에서 LPS로 자극한 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 감소를 보였다(Fig. 3B).

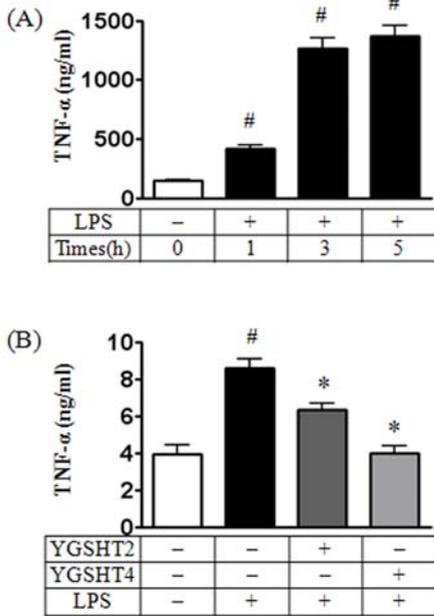


Fig. 3. Effects of YGSHT on the TNF- α production in LPS-stimulated RAW264.7 cells

RAW264.7 cells were exposed by LPS(1 μ g/ml), and incubated for 0, 1, 3, and 5 hrs (A). YGSHT (2 and 4 mg/ml) was pretreated for 1 hr prior to LPS exposure for 3 hrs in the RAW264.7 cells (B). TNF- α production was measured from cell supernatant using ELISA method. Vertical bar represents as the mean \pm S.D.. The absorbance was measured at 450 nm using ELISA reader.

$p < 0.05$; significantly different from the vehicle group

* $p < 0.05$; significantly different from the LPS stimulated group

4. NO 분비에 미치는 영향

LPS 자극 후 시간별 분비되는 NO의 양을 조사한 결과 LPS로 자극하지 않은 RAW264.7 cells에서 NO의 양은 103.80 ± 3.22 μ M이었으며, LPS(1

μ g/ml)로 자극한 후 시간별(6, 18, and 24 hrs) 분비되는 NO의 양은 각각 186.00 ± 58.33 μ M, 595.10 ± 42.95 μ M, 792.80 ± 34.19 μ M로 자극 시간에 비례하여 유의한 증가를 보였다(Fig. 4A).

YGSHT를 농도별로 1 시간동안 전처리 후 LPS(1 μ g/ml)를 24시간동안 자극한 후 분비되는 NO의 양을 조사한 결과 아무런 처치를 하지 않은 세포에서 NO의 양은 135.10 ± 25.75 μ M이었으며, LPS로 자극한 세포에서 775.10 ± 105.20 μ M로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의

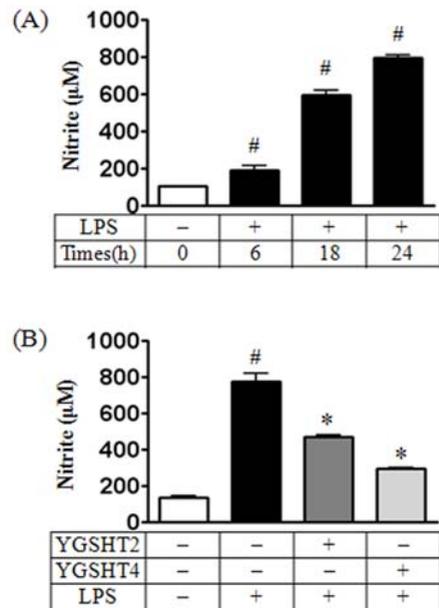


Fig. 4. Effects of YGSHT on the NO production in LPS-stimulated RAW264.7 cells

RAW264.7 cells were exposed by LPS (1 μ g/ml), and incubated for 0, 6, 18, and 24 hrs (A). YGSHT (2 and 4 mg/ml) was pretreated for 1hr prior to LPS exposure for 24 hrs in the RAW264.7 cells (B). Nitrite production was determined by measuring the culture medium with Griess reagent. Vertical bar represents as the mean \pm S.D.. The absorbance was measured at 540 nm using ELISA reader.

$p < 0.05$; significantly different from the vehicle group

* $p < 0.05$; significantly different from the LPS stimulated group

한 ($p < 0.05$) 증가를 보였다. 반면 YGSHT (2 and 4 mg/ml)을 전처리하고 LPS로 자극한 세포에서 각각 $468.90 \pm 20.78 \mu M$ 과 $291.40 \pm 16.82 \mu M$ 로 모든 농도에서 LPS로 자극한 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 감소를 보였다(Fig. 4B).

5. PGE2 분비에 미치는 영향

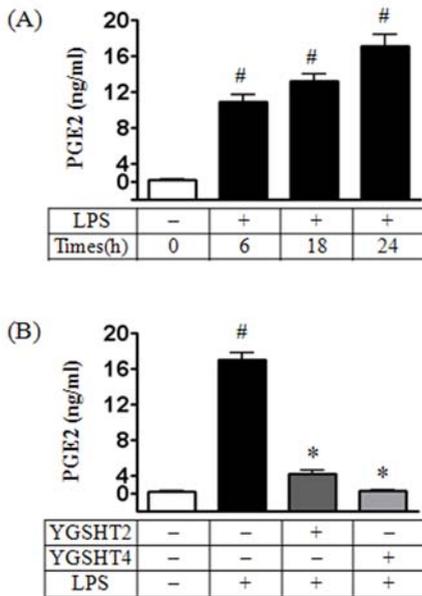


Fig. 5. Effects of YGSHT on the PGE2 production in LPS-stimulated RAW264.7 cells

RAW264.7 cells were exposed by LPS (1 $\mu g/ml$), and incubated for 0, 6, 18, and 24 hrs (A). YGSHT (2 and 4 mg/ml) was pretreated for 1hr prior to LPS exposure for 24 hrs in the RAW264.7 cells (B). PGE2 production was measured from cell supernatant using ELISA method. Vertical bar represents as the mean \pm S.D.. The absorbance was measured at 450 nm using ELISA reader.

$p < 0.05$; significantly different from the vehicle group

* $p < 0.05$; significantly different from the LPS stimulated group

LPS 자극 후 시간별 분비되는 PGE2의 양을 조사한 결과 LPS로 자극하지 않은 RAW264.7 cells에서 PGE2의 양은 $0.16 \pm 0.21 ng/ml$ 이었으며,

LPS (1 $\mu g/ml$)로 자극한 후 시간별(6, 18, and 24 hrs) 분비되는 PGE2의 양은 각각 $10.86 \pm 1.59 ng/ml$, $13.16 \pm 1.58 ng/ml$, $17.04 \pm 2.61 ng/ml$ 으로 자극시간에 비례하여 유의한 증가를 보였다(Fig. 5A).

YGSHT를 농도별로 1 시간동안 전처리 후 LPS (1 $\mu g/ml$)를 24시간동안 자극한 후 분비되는 PGE2의 양을 조사한 결과 아무런 처치를 하지 않은 세포에서 PGE2의 양은 $0.16 \pm 0.21 ng/ml$ 이었으며, LPS로 자극한 세포에서 $17.01 \pm 1.53 ng/ml$ 로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 증가를 보였다. 반면 YGSHT (2 and 4 mg/ml)을 전처리하고 LPS로 자극한 세포에서 각각 $4.14 \pm 0.95 ng/ml$ 과 $0.25 \pm 0.27 ng/ml$ 로 모든 농도에서 LPS로 자극한 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 감소를 보였다(Fig. 5B).

6. IL-1b와 TNF-a mRNA발현에 미치는 영향

RAW264.7 cells에서의 IL-1b와 TNF-a의 mRNA의 발현에 대해 조사한 결과, 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 LPS (1 $\mu g/ml$)로 자극한 세포에서 mRNA의 발현량이 현저하게 증가하였으며, YGSHT (2 and 4 mg/ml)을 전처리하고 LPS로 자극한 세포에서 IL-1b와 TNF-a의 mRNA 모든 유전자의 발현이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 6).

7. iNOS와 COX-2 mRNA 발현에 미치는 영향

RAW264.7 cells에서의 iNOS와 COX-2의 mRNA의 발현에 대해 조사한 결과, 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 LPS (1 $\mu g/ml$)로 자극한 세포에서 mRNA의 발현량이 현저하게 증가하였으며, YGSHT (2 and 4 mg/ml)을 전처리하고 LPS로 자극한 세포에서 iNOS와 COX-2의 mRNA 모든 유전자의 발현이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 7).

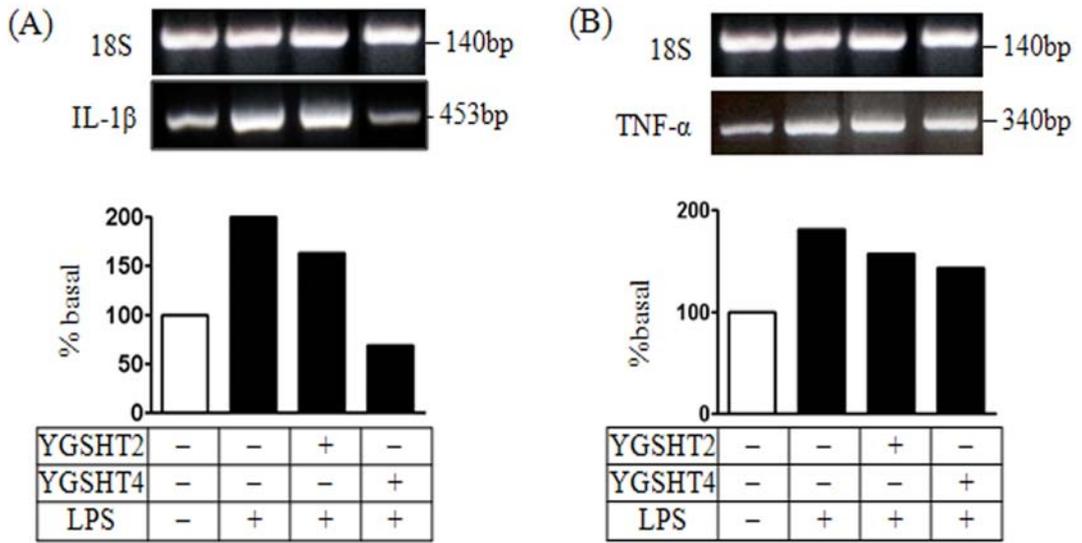


Fig. 6. Effects of YGSHT on the induction of the IL-1 β and TNF- α mRNA expression in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

Expression of the cytokines IL-1 β (A) and TNF- α (B) mRNA was induced by LPS stimulation in RAW264.7 cells. YGSHT (2 and 4 mg/ml) was pretreated for 1 hr prior to LPS exposure for 3 hrs in the RAW264.7 cells. Detection of pro-inflammatory cytokines mRNA was examined by RT-PCR analysis. 18S was used as internal control genes.

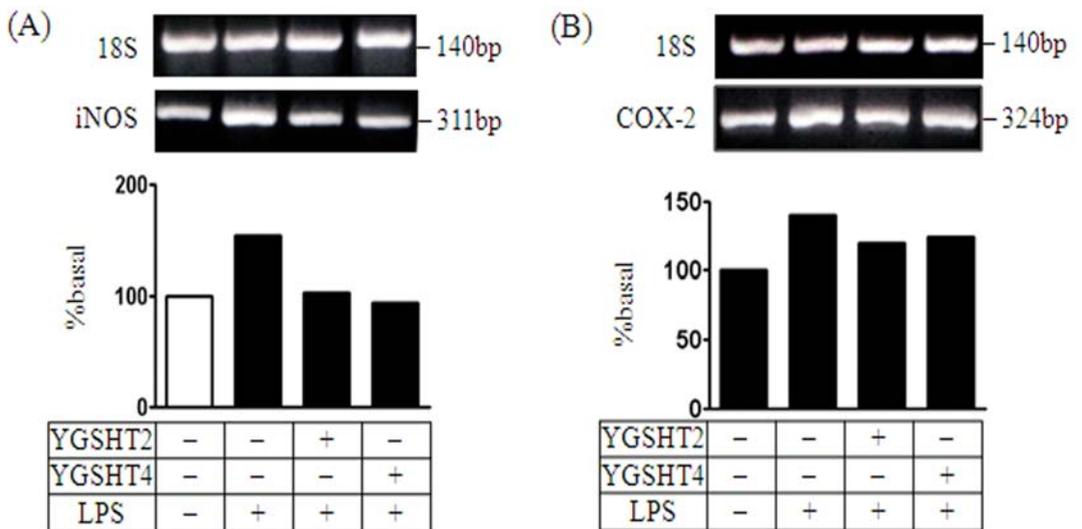


Fig. 7. Effects of YGSHT on the induction of the iNOS and COX-2 mRNA expression in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

Expression of the cytokines iNOS (A) and COX-2 (B) mRNA was induced by LPS stimulation in RAW264.7 cells. YGSHT (2 and 4 mg/ml) was pretreated for 1hr prior to LPS exposure for 24 hrs in the RAW264.7 cells. Detection of iNOS and COX-2 mRNAs was examined by RT-PCR analysis. 18S was used as internal control genes.

8. Phospho-ERK1/2와 ERK1/2 발현에 미치는 영향

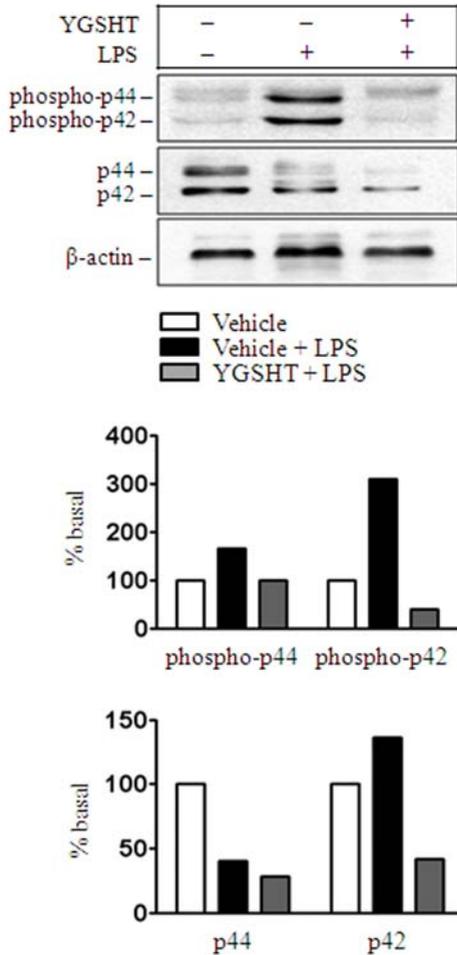


Fig. 8. Effects of YGSHT on the ERK1/2 activation in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

YGSHT (2 mg/ml) was pretreated for 1 hr prior to LPS exposure for 15 min in the RAW264.7 cells. The phosphorylation of ERK1/2 and ERK1/2 were assayed by western blot analysis.

LPS로 자극한 RAW264.7 cells에서 YGSHT (2 mg/ml)의 전처리가 ERK1/2의 인산화에 미치는 영향을 살펴본 결과 LPS (1 µg/ml)로 자극한 세포에서 phospho-ERK1/2의 발현이 현저히 증가하였고

YGSHT 전처리 후 LPS로 자극한 세포에서 phospho-ERK1/2의 발현을 억제하는 것으로 보아 YGSHT이 ERK1/2의 인산화를 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 8).

9. Phospho-JNK1/2와 JNK1/2 발현에 미치는 영향

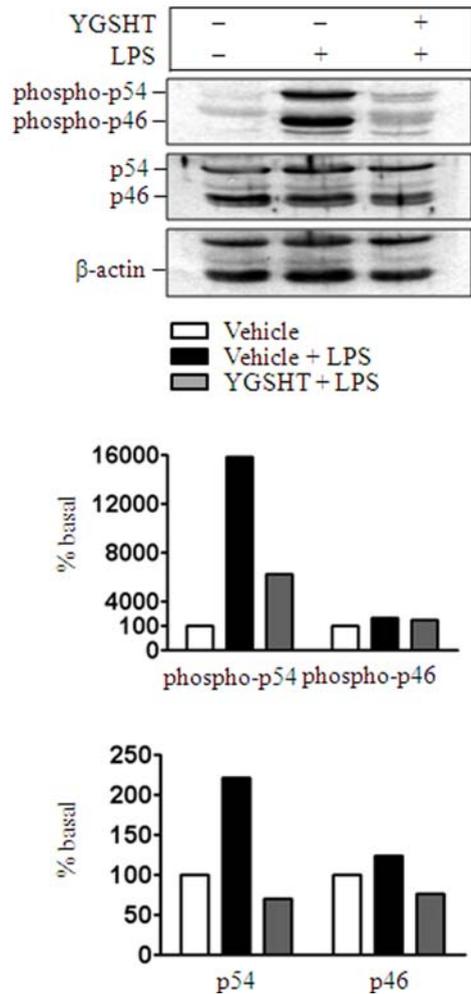


Fig. 9. Effects of YGSHT on the JNK1/2 activation in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

YGSHT (2 mg/ml) was pretreated for 1 hr prior to LPS exposure for 15 min in the RAW264.7 cells. The phosphorylation of JNK1/2 and JNK1/2 were assayed by western blot analysis.

LPS로 자극한 RAW264,7 cells에서 YGSHT (2 mg/ml)의 전처리가 JNK1/2의 인산화에 미치는 영향을 살펴본 결과 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)로 자극한 세포에서 phospho-JNK1/2의 발현이 현저히 증가하였고 YGSHT 전처리 후 LPS로 자극한 세포에서 phospho-JNK1/2의 발현을 억제하는 것으로 보아 YGSHT이 JNK1/2의 인산화를 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 9).

10. Phospho-p38과 p38 발현에 미치는 영향

LPS로 자극한 RAW264,7 cells에서 YGSHT (2 mg/ml)의 전처리 p38의 인산화에 미치는 영향을 살펴본 결과 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)로 자극한 세포에서 phospho-p38의 발현이 증가하였고 YGSHT 전처리 후 LPS로 자극한 세포에서 phospho-p38의 발현이 현저하게 억제되지 않는 것으로 보아 YGSHT이 p38의 인산화를 현저하게 억제하지 않는 것으로 나타났다(Fig. 10).

11. NF- κ B 발현에 미치는 영향

LPS로 자극한 RAW264,7 cells에서 YGSHT (2 mg/ml)의 전처리 p65의 활성화와 핵내 이동에 미치는 영향을 살펴본 결과 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)로 자극한 세포의 세포질과 핵내의 p65의 발현이 증가하였고 YGSHT 전처리 후 LPS로 자극한 세포에서 세포의 세포질과 핵내의 p65의 발현이 현저하게 억제되지 않는 것으로 보아 YGSHT이 p65의 활성화와 핵내 이동을 현저하게 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 11).

IV. 考 察

여드름은 모낭 피지선의 만성염증성 질환으로 비염증성 병변인 면포와 염증성 병변인 구진, 농포 및 결절 등의 다양한 형태로 나타난다. 정확

한 원인은 알려져 있지 않으나 비정상적으로 증가된 모낭각화, 피지분비증가, 피지내 *Propionibacterium acnes*의 증식 및 염증유발로 요약되는 다인적 원인으로 발생하며 여러 인자의 상호 작용에 의하여 임상 증상이 나타난다²³⁾. 또한 최근에는 유전적 요인, 스트레스, 화장품성분, 여드름 원인균의 항생제 내성, 부신 피질호르몬제, 직업으로 인한 기름왁스

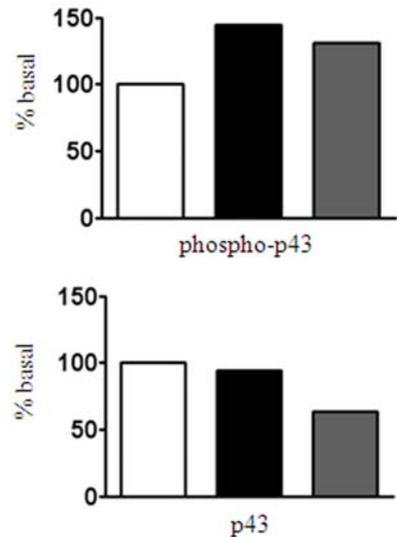
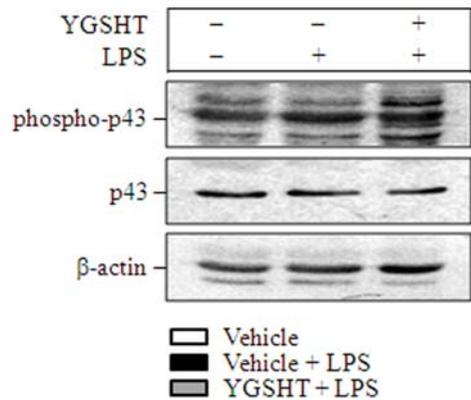


Fig. 10. Effects of YGSHT on the p38 activation in LPS-stimulated RAW264,7 cells.

YGSHT (2 mg/ml) was pretreated for 1 hr prior to LPS exposure for 15 min in the RAW264,7 cells. The phosphorylation of p38 and p38 were assayed by western blot analysis.

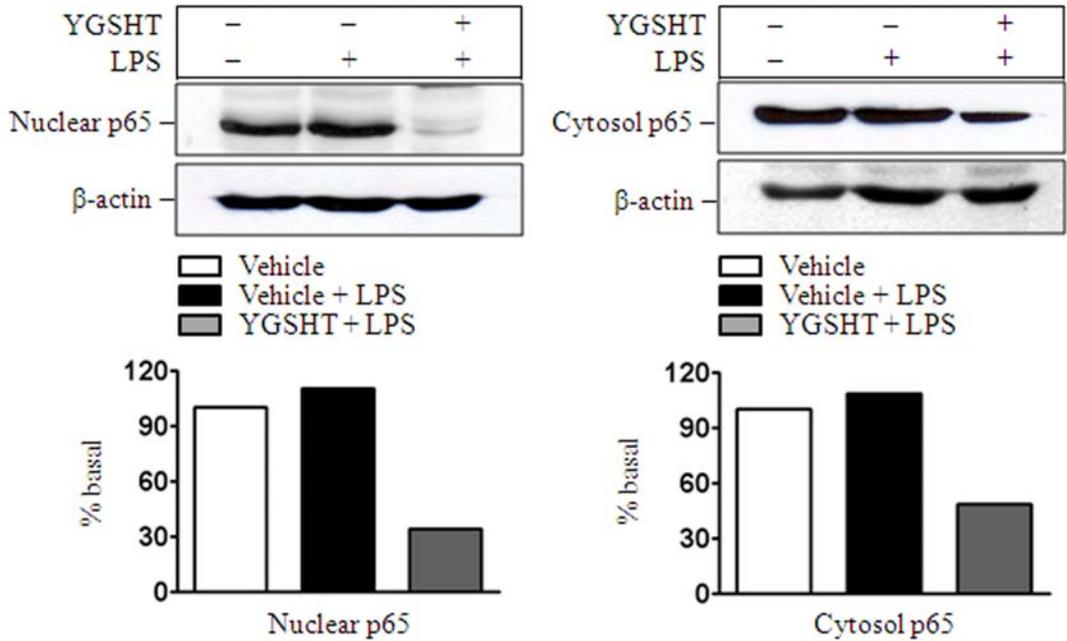


Fig. 11. Effects of YGSHT on the activation and translocation of the p65 from cytosol to nuclear in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

YGSHT (2 mg/ml) was pretreated for 1 hr prior to LPS exposure for 1 hr in the RAW264.7 cells. The expression of nuclear p65 and cytosol p65 were assayed by western blot analysis.

의 사용, 과도한 세제나 비누의 사용, 강한 자외선 등과 모낭 내에 상주하는 균에 의해 발생한다고 알려져 있다²⁴⁾.

발생연령은 대다수가 12-25 세로 사춘기와 젊은 연령에 흔하지만, 30-40 대에서도 적지 않은 빈도로 나타나며 중년까지 지속적으로 발생할 수 있으며²⁵⁾, Goulden 등은 여드름의 발생연령이 높아지고 있고, 특히 성인 여성의 경우 임상적으로 의미 있는 여드름 유병률이 12%로 성인기 여드름의 발생 빈도가 증가함을 보고하였다²⁶⁾. 여드름의 호발 부위는 얼굴, 등, 어깨, 목이며 특히 안면에 잘 발생하여 반흔을 남길 수 있고 그로 인하여 환자에게 수치심, 자신감 저하, 우울과 불안 등을 야기하여 정신적, 사회적 활동을 위축시키고 삶의 질을 저하시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다²³⁾.

한의학적으로 여드름은 痤瘡, 面癩 등이 유사한

질환이며²⁷⁾, 원인은 六淫 중에서 風, 熱, 濕, 寒, 火와 관련되며 내부적 요인으로는 肺熱血熱, 腸胃濕熱, 脾虛濕痰, 血熱 등이 있고 肺, 脾, 胃가 밀접하게 관련되어 있다. 치료에 있어서는 주로 外因으로 인한 것에는 祛風清熱, 利濕, 散寒위주로 하며 內因으로 인한 것에는 建脾, 清胃, 瀉肺, 清熱滋陰, 活血化癥, 化痰, 解毒위주로 하여 清肺枇杷飲, 清胃散, 清上防風湯, 升麻黃連湯, 清胃湯, 調胃承氣湯, 六君子湯 등의 내복약과 西氏玉容散, 顛倒散 등의 외용약을 사용하였다²⁸⁾. 최근 저자는 체질에 따른 여드름 치료효과에 관한 연구에서 四象處方を 복용시켜 81명 환자의 여드름을 치료한 후에 전체 환자의 여드름 등급이 개선되었고, 81명 환자의 체질 감별 결과 少陽인이 압도적으로 많은 것으로 나타났다. 또한 사용된 소양인 처방은 YGSHT이 가장 많이 사용되었음을 보고하였다⁹⁾.

임상에서 여드름으로 인해 내원한 환자가 체질적으로 少陽人이 현저히 많은 것은 여드름이 대개 熱로 인해 발병하는데 少陽人은 保命之主인 陰清之氣가 부족하고 火熱이 病證이 되는 체질적 특성에서 기인한 것으로 사료된다¹⁰⁾.

여드름에 임상적으로 多用되는 YGSHT은 四象醫學을 창시한 東武 李濟馬가 『東醫壽世保元』의 少陽人胃受熱裏熱病에 처음 소개한 四象 處方이다. 東武 李濟馬는 『東醫壽世保元』·「四象人辨證論」에 “明知其人而 又明知其證則 應用之藥 必無可疑”라 하여 체질과 병의 증을 정확히 알고 체질에 따라 치료하는 하는 것을 중요시 하였고²⁹⁾, 또한 四象人은 喜怒哀樂의 네 가지 性情에 대한 반응이 다르고, 性情에는 逆動하고 順動하는 기능이 있기 때문에 이에 따라 질병이 발생하기도 하고 치유되기도 한다고 하였다. 그러므로 『東醫壽世保元』에서는 四象人의 체질에 따라 병증도 각각 다르게 나타나고 동일한 약물에 대한 반응도 각기 다르기 때문에 같은 병이라고 해도 체질에 따라 치료법이 다르며 신중하게 치료해야 함을 강조 하고 있다³⁰⁾.

본 연구에 사용된 YGSHT는 少陽人胃受熱裏熱病의 胸膈熱證에 대한 清陽上升을 목적으로 사용되며, 纏喉風, 脣腫의 輕症등에 사용하는 처방으로 大腸 清陽이 胃局까지는 상승하고 있으나 胃局에서 頭面四肢로의 상승이 충족되지 못하여 발생하는 上消證에 胃局에 鬱滯된 熱을 풀어서 涼膈-散火시키는 작용을 한다¹⁰⁾. YGSHT는 生地黃, 忍冬藤, 連翹, 山梔子, 薄荷, 知母, 石膏, 防風, 荊芥 등으로 구성되어 있는데²⁹⁾, 臟腑積熱을 치료하고 三焦六經諸火를 瀉하는 『和劑局方』의 涼膈散에서 瀉火之劑인 大黃, 芒硝, 黃芩과 補脾胃하는 甘草를 除去하고, 瀉胃火生津하는 石膏, 補腎水滋陰하는 生地黃, 知母, 清熱解毒하는 忍冬, 祛風濕 清利頭目咽喉하는 荊芥, 防風을 加한 것이다³¹⁻³⁴⁾. 『東醫壽世保元』에서는 上消, 纏喉風과 脣腫之輕症에 사용하였고, 實熱이 있고 心火가 上盛하거나 中焦에

燥實하여 多渴, 頭暈, 目赤, 面發毒熱, 喉閉, 吐血, 衄血, 頰腫, 大小便秘, 發斑, 譫語등에 쓴다고 하였다³³⁾.

염증은 조직손상과 병원균의 침입으로부터 인체를 방어하는 가장 중요한 기전중의 하나로, 점진적으로 조직의 구조와 기능이 정상적으로 회복하게 된다. 정상적인 염증반응은 조절기능이 있어 전구염증단백질의 발현을 감소시키고 항염증 단백질의 발현을 증가시키며 초기 면역세포 보충을 촉진시키기 위한 혈관의 변화를 복구하는 등의 조절이 일어난다^{35,36)}. 그러나 감염 병원균에 대항하는 급성염증반응이 인체방어의 과정으로 일어나는 반면, 만성염증반응은 궁극적으로 만성피부질환, 류마티스 관절염, 기관지염, 위염, 다발성 경화증, 염증성 장질환 등의 염증질환으로 발전할 수 있으므로 적절한 치료가 요구된다³⁷⁾.

YGSHT는 실험적으로 清熱解毒, 除煩解鬱, 勝濕解癢하는 효능이 있으며, 임상적으로 소양인의 胸痞, 手足痺, 運動 障礙, 手足 麻木, 上熱感, 吐血, 發狂 등의 증상과 實熱로 인한 피부 질환 치료에 사용되는 것으로 보고되었다^{31,32)}. 본 연구에서는 이러한 YGSHT의 항염증 작용에 대하여 실험 연구하여 여드름 치료 효과에 대하여 유의한 결과를 얻었다.

본 연구는 RAW264.7, murine macrophage cell line을 사용하여 YGSHT이 여드름 등의 만성염증질환에 임상적으로 유효한 치료효과가 있음을 뒷받침하는 실험적 근거와 기전을 밝히기 위해 항염증 효과를 시험하였다.

염증의 병리기전은 사이토카인 상호작용과 많은 전구염증 유전자의 유도에 의해 조절되는 복잡한 과정이다. Macrophages는 인체전반에 걸쳐 분포하고 있고, 염증과정에서 백혈구 유주에 앞서 병원체에 대항하는 즉각적인 방어를 제공함으로써 중요한 역할을 담당하며, LPS는 macrophages에서 interleukins (ILs), TNF-a, iNOS, COX-2와 같은

염증매개인자의 생산을 촉진한다^{38,39}. LPS로 유도된 염증 매개인자들의 약리학적 감소는 macrophages의 활성화에 의해 야기되는 염증반응을 포함하는 여러 가지 증상을 완화시키는 효과적인 방법으로 간주되고 있다.

본 연구에서 RAW264.7 cells의 생존률과 증식을 저해하지 않는 YGSHT의 농도를 조사한 결과 최대 4 mg/ml의 농도에서 YGSHT이 정상세포와 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 1). 따라서 이 농도를 초과하지 않는 범위의 YGSHT (2 and 4 mg/ml)를 사용하여 항 염증효과를 조사하였다.

전구 염증 매개 사이토카인인 IL-1b와 TNF-a의 생산은 RAW264.7 cells에서 LPS 자극시간에 비례하여 증가하였고, YGSHT의 전처리가 LPS 자극에 의해 증가된 IL-1b와 TNF-a의 생산을 억제하였다(Fig. 2 and 3). 이러한 결과는 전구 염증 매개 사이토카인 유전자의 발현을 살펴본 결과 YGSHT의 전처리가 LPS 자극에 의해 증가된 IL-1b와 TNF-a mRNA 발현의 억제를 통해 생산을 감소시킨다는 것을 알 수 있었다(Fig. 6).

NO는 생리·병리적으로 중요한 조절분자로, 자율신경계와 중추신경계의 macrophages를 포함하는 몇몇 계통에서 세포간 소통의 중요한 매개인으로 알려져 있다⁴⁰.

적당한 NO의 생산은 평활근 이완, 혈소판 억제, 신경전달, 면역조절과 혈관 확장에 필요하지만 지속적인 NO의 생산은 관절염, 기관지염, 위염, 다발성 경화증과 같은 염증성 질환을 포함하는 병리적 상황과 관련된다. NO는 척추동물에서 NO synthase(NOS)에 의해 Larginine에 의해 생산되는데, endothelial NOS (eNOS)와 neuronal NOS (nNOS)는 지속적으로 발현되는 반면 inducible NOS (iNOS)는 주로 자극된 macrophages에 의해 생산되어 NO의 염증 조건을 제공한다. 특히 macrophages에서 과도한 NO 생산이 세포독성, 염증, 암 발생, 자가면역질환들을 초래할 수 있다

는 점에서 NO 생산과 iNOS 발현의 억제가 염증 질환을 예방할 수 있다는 것을 뒷받침하고 있다^{41,42}.

PGE2 또한 주요 염증매개인자로서 혈관투과성을 증가시켜 염증부위의 열, 부종과 통증을 유발할 수 있다. Cyclooxygenase (COX) family는 prostacyclin과 thromboxanes 뿐만 아니라 PGs의 형성에 역할을 담당하고 있다. COX는 arachidonic acid를 PGs로 전환하는 효소로 COX-1과 COX-2로 존재하는데 COX-2의 억제는 염증과 통증의 증상을 감소할 수 있다⁴³.

본 연구에서 전구 염증 매개 효소인 NO와 PGE2 생산은 RAW264.7 cells에서 LPS 자극시간에 비례하여 증가하였고, YGSHT의 전처리가 LPS 자극에 의해 증가된 NO와 PGE2 생산을 억제하였다(Fig. 4 and 5). 이러한 결과는 전구 염증 매개 효소 유전자의 발현을 살펴본 결과 YGSHT의 전처리가 iNOS와 COX-2 mRNA 발현의 억제를 통해 감소시킨다는 것을 알 수 있었다(Fig. 7).

전구염증매개인자의 생성은 염증반응의 주조인자인 NF-kB에 의해 조절되어지고⁴⁴, NF-kB의 활성화는 MAPK의 인산화와 Iκ-B에 의해 조절된다. MAPK는 세포 성장과 분화의 조절, 사이토카인과 stress에 대한 세포 반응의 조절에 중요한 역할을 한다⁴⁵. MAPK 신호전달경로는 진화적으로 보존되어왔고 세포의 환경으로부터 세포질을 통해 핵으로 정보를 전달하는데 중요한 역할을 하고 있으며, 최소 3가지의 신호전달경로가 있다⁴⁶. ERK 신호전달경로에서 활성화된 ERK는 다양한 전사인자를 인산화할 수 있다. ERK가 자극인자에 의해 광범위하게 활성화되는 반면, p38과 JNK는 stress 반응경로의 부분을 구성하며 염증성 사이토카인같은 인자에 의해 유도된 세포스트레스에 의해 활성화된다⁴⁷.

본 연구에서 MAPK 신호전달경로와 NF-kB 신호전달경로에 미치는 영향을 조사한 결과 YGSHT

가 RAW264.7 cells에서 LPS로 유도된 ERK1/2와 JNK1/2의 인산화를 억제하고 세포질과 핵내의 NF-kB 발현을 억제하는 것을 관찰하였다(Fig. 8, 9, 10 and 11). 이러한 결과는 YGSHT가 ERK1/2와 JNK1/2 활성화와 관련된 MAPK 신호 전달경로의 억제와 NF-kB 신호전달경로 억제를 통해 항염증 작용을 발휘하는 것으로 보인다.

이상의 연구결과로 YGSHT가 LPS로 자극한 RAW264.7 cells에서 세포내 ERK1/2와 JNK1/2 활성화와 관련된 MAPK 신호전달경로와 NF-kB 신호전달경로를 억제하고 전구 염증 매개인자들의 유전자 발현을 억제함으로써 염증반응을 촉발하는 전구 염증 매개인자들의 생산을 감소시키는 것으로 사료된다. 이는 YGSHT이 임상에서 염증질환을 예방하고 초기단계에 효과적으로 제어할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 結 論

Yang Geouk San Hwa - Tang(YGSHT)이 염증반응에 미치는 영향에 대해 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. RAW264.7 cells에서 YGSHT는 세포생존률에 영향을 미치지 않았다.
2. RAW264.7 cells에서 IL-1b와 TNF-a의 생산을 억제하였다.
3. RAW264.7 cells에서 NO와 PGE2의 분비를 억제하였다.
4. RAW264.7 cells에서 IL-1b와 TNF-a mRNA의 발현을 감소시켰다.
5. RAW264.7 cells에서 iNOS와 COX-2 mRNA의 발현을 감소시켰다.
6. RAW264.7 cells에서 ERK1/2, JNK1/2의 인산화를 감소시켰다.

7. RAW264.7 cells에서 NF-kB의 발현과 핵내 전이를 감소시켰다.

參 考 文 獻

1. Strauss JS, Thiboutot DM. Diseases of sebaceous glands. In: Freedberg MI, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, Fitzpatrick TB, editors. *Dermatology in general medicine*. 5. New York: McGraw Hill Co; 1999:769-84.
2. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, et al. *Dermatology*. 2. Berlin: Springer-Verlag; 2001.
3. 정혜운, 지선영. 여드름에 대한 동서의학적 고찰. *동서의학*. 1997;22(4):51-3.
4. 윤홍진, 채병윤. 면포효능에 관한 加味活血湯의 실험적 연구. *경희의학*. 1991;7(3):312-21.
5. 임희선. 加減枇杷清肺飲이 면포에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. *대한외관학회지*. 2000; 13(1):1-21.
6. 노삼웅, 채병윤. 면포에 응용되는 加味當歸芍藥湯의 효능에 관한 실험적 연구. *동의학회지*. 2000;4(1):33-52.
7. 노현찬. 白附子散이 면포에 미치는 실험적 연구. *대전대학교대학원 석사논문*. 1998.
8. 김성범, 김경준. 連翹敗毒散加味方이 염증상태의 면포에 미치는 영향. *대한안이비인후피부과학회지*. 2002;15(1):50-62.
9. 탁미진, 탁명립, 윤화정, 고우신. 사상 처방으로 치료한 여드름 환자 81례의 임상보고. *한방안이비인후피부과학회지*. 2009;22(2):210-22.
10. 송일병 외. *개정증보 사상의학*. 서울. 집문당. 2005;397-8.
11. 신민규, 송일병, 손상곤. 양격산화탕이 뇌혈류

- 및 뇌허혈 손상에 미치는 영향. 사상의학회지. 2001;13(2):165-176.
12. 부일권, 김연섭. 당뇨병쥐의 국소뇌허혈에 대한 양격산화당의 면역조직화학적 연구. 동의생리병리학회지. 2007;21(3):741-747.
 13. 박은경, 신정원, 손영주. 노령흰쥐의 뇌허혈손상시 양격산화당이 뇌해마의 신경세포 및 HSP72발현에 미치는 영향. 2003;17(3):791-797.
 14. 김의중, 김연섭. 양격산화당이 실험적 당뇨병에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2007;21(2):474-478.
 15. 김의중, 김연섭. 양격산화당이 당뇨병쥐의 전 뇌허혈에 미치는 영향. 2009;22(2):321-327.
 16. 박혜선, 김형순, 김경요. 양격산화당이 심전도 변화에 미치는 영향. 사상체질의학회지. 2002;14(3):85-96
 17. 김경요, 권덕윤. 양격산화당이 소양인 뇌경색증 환자의 세포활성물질 생성조절에 미치는 영향. 사상체질의학회지. 2000;12(2):153-161.
 18. 오경환, 이원철. 양격산화당이 고지혈증 흰쥐의 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌경색에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2006;27(4):915-926.
 19. 박재형, 김경요, 전병훈. 양격산화당이 Gold thioglucose로 유발된 백서의 비만증에 미치는 효과. 대한한의학회지. 1996;17(2):145-160.
 20. 이승엽, 최애련, 하진호. 소양인 형방도적산과 양격산화당의 항스트레스효과에 관한 실험적연구. 2008;20(3):151-163.
 21. 조세왕. 양격산화당이 Allergy성 접촉피부염에 미치는 영향. 대한한방피부미용학회지. 2005;1(1):16-40.
 22. 이수근. 소양인 양격산화당 및 양독백호당의 항 Allergy작용. 우석대학교대학원 석사학위논문. 2001.
 23. 이상훈, 조한석, 송나르, 정석준, 김철우, 조희진, 김광호, 김광중. 여드름 환자의 삶의 질. 대한피부과학회지. 2006;44(6):688-95.
 24. 안봉균 외. 여드름의 병인. 한국피부장벽학회지. 2002;4(1):62-70.
 25. 강민정, 함정희. 청소년기와 성인기 여드름의 임상 양상 및 여드름에 관한 인식도의 비교 분석. 대한피부과학회지. 2000;38(5):589-599.
 26. Goulden V, Stables GI, Cunliffe WJ. Prevalence of facial acne in adults. *J Am Acad Dermatol*. 1999;41:577-80.
 27. 최인화. 여드름에 관한 임상적 연구. 대한외관과학회지. 2000;13(2):140-51.
 28. 이정숙, 노석선. 좌창(여드름)에 관한 문헌적고찰. 대전대체화의학. 1993;1(2):155-7.
 29. 전국 한의과대학 사상의학교실. 사상의학. 집문당. 2004.
 30. 金昌玟, 柳順燮. 東醫四象精解. 아카데미서적. 2000:3-23.
 31. 金鎭成. 凉膈散火湯의 효능에 관한 실험적 연구. 사상의학회지. 1989;1(1):113-23.
 32. 朴性植, 金智鎔, 崔載永. 凉膈散火湯 활용에 대한 임상적 연구. 사상의학회지. 1998;10(2):456-471.
 33. 朴爽彦. 東醫四象大典. 의도한국사. 1977:281-5.
 34. 서웅, 송정모. 소양인 신정처방의 형성과정에 대한 고찰. 사상의학회지. 1997;9(1):213-43.
 35. Lawrence T., Willoughby D. A., Gilroy D. W., Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation *Nat. Rev. Immunol.* *Nat. Rev. Immunol.* 2002;2:787-95.
 36. Kaplanski G., Marin V., Montero-Julian F., Mantovani A., Farnarier C., IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol.* 2003;24:25-9.

37. Kaplanski G., Marin V., Montero-Julian F., Mantovani A., Farnarier C., IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol.*, 2003;24:25-29.
38. Hinz B., Brune K., Cyclooxygenase-2--10 years later. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002;300:367-75.
39. Molloy R. G., Mannick J. A., Rodrick M. L., Cytokines, sepsis and immunomodulation. *Br. J. Surg.* 1993;80:289-97.
40. Koyanagi M., Egashira K., Kubo-Inoue M., Usui M., Kitamoto S., Tomita H., Shimokawa H., Takeshita A., Role of transforming growth factor-beta1 in cardiovascular inflammatory changes induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Hypertension*, 2000;35: 86-90.
41. Kim K. W., Ha K. T., Park C. S., Jin U. H., Chang H. W., Lee C. S., Kim C. H., Polygonum cuspidatum, compared with baicalin and berberine, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions in RAW 264.7 macrophages. *Vascul. Pharmacol.* 2007;47: 99-107.
42. Förstermann U., Kleinert H., Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1995;352: 351-64.
43. Masferrer, J., Zweifel B. S., Manning, P. T., Hauser, S. D., Leahy, K. M., Smith, W. G., Isakson, P. C. and Seibert, K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 *in vivo* is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994;91:3228-32.
44. Isomura I., Morita A., Regulation of NF-kappaB signaling by decoy oligodeoxynucleotides. *Microbiol. Immunol.* 2006;50:559-63.
45. Johnson G. L., Lapadat R., Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, 2002;298:1911-2.
46. Robinson M. J., Cobb M. H., Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997;9:180-6.
47. Wang X., Martindale J. L., Liu Y., Holbrook N. J., The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem. J.* 1998;333: 291-300.