

## 二妙散과 構成藥材의 效能 비교(急性 胰臟炎을 중심으로)

임영환, 국윤범  
상지대학교 한의과대학 방제학교실

### ABSTRACT

## The Comparison Between Single And *Yimyosan* in Acute Pancreatitis : *Atractylodes chinensis*(AC) and *Phellodendron amurense* Ruprecht(PAR)

Young-Hwan Lim, Yoon-Bum Kook  
Dept. of Formula Science, College of Oriental Medicine, Sang-Ji University

Objectives : *Atractylodes chinensis*(AC) and *Phellodendron amurense* Ruprecht(PAR) have been used as anti-inflammatory medicines. However, the effects of AC, PAR and *Yimyosan* on AP were not examined. To prove this, We decocted the dried prescription of AC and PAR with boiling distilled water and freeze-dried to be powdered. AC, PAR and *Yimyosan* was administrated intra-peritoneally.

Methods : 1h after administration, cerulein was injected hourly six times. 6hrs after last cerulein injection, mice were sacrificed, then the pancreas and blood were harvested. Serum amylase and lipase, neutrophil infiltration, pancreatic cytokines were used as the parameter of severity of AP.

Results : As a result of assessment the parameters of AP, AC alone treatment did not inhibit the severity of AP, however PAR treatment inhibited the severity of AP significantly. *Yimyosan*

- 
- 교신저자 : 국윤범
  - 강원도 원주시 우산동 660번지 상지대학교 한의과대학 방제학교실
  - Tel : 033-730-0661 E-mail : kook@sangji.ac.kr
  - 접수 : 2011/ 11/ 16 수정 : 2011/ 11/ 23 채택 : 2011/ 12/ 02

also showed the protective effects against AP at lower doses, however AC alone plus PAR alone extract did not show the protective effects significantly.

Conclusions : In conclusion, PAR extract has a protective effects on AP, and the effects could be increased by co-treatment with AC.

Key word : *Attractylodes chinensis*(AC), *Phellodendron amurense* Ruprecht(PAR), cerulein, *Yimyosan*

## 1. 緒 論

二妙散은 황백과 창출이 等分으로 구성된 처방으로 『丹溪心法』에 濕熱을 치료하는 처방으로 수록된 이래 많은 후대 의가들에 의해서 사용된 방제이다. 이러한 二妙散은 濕熱走注에 의한 筋骨疼痛, 濕熱下注에 의한 足痿軟無力 足膝紅腫熱痛, 濕熱帶下에 의한 下部濕瘡를 주로 治療하므로 濕熱에 의한 염증성 질환을 치료한다고 할 수 있다<sup>1)</sup>.

二妙散의 구성약물인 창출과 황백 기원 식물과 효능에 대하여 내용을 살펴보면 蒼朮은 菊花科에 속한 多年生 草本인 가는잎삼주(茅蒼朮) *Attractylodes lancea* DC. 또는 만주삼주(北蒼朮) *A. chinensis* Koidzumi의 根莖으로 봄과 가을에 채취하여 햇볕에 말려 사용한다. 性은 溫하고 味는 辛苦하며, 脾, 胃, 肝으로 歸經한다. 燥濕健脾, 祛風散寒, 明目하는 효능이 있어 腕腹脹滿, 泄瀉, 水腫, 脚氣痿躄, 風濕痺痛, 風寒感冒, 夜盲 등을 치료하였고<sup>2)</sup>, 黃柏은 芸香科에 속한 落葉喬木인 황벽나무 *Phellodendron amurense* Ruprecht의 주피를 벗긴 樹幹皮로서, 3~6월에 채취하여 주피를 제거하고 曬乾한다. 性은 寒하고 味는 苦하며, 腎, 膀胱, 大腸으로 歸經한다. 淸熱燥濕, 瀉火解毒, 退虛熱하는 효능이 있어 濕熱瀉痢, 黃疸, 帶下, 熱淋, 脚氣, 痿躄, 骨蒸勞熱, 盜

汗, 遺精, 瘡瘍腫毒, 濕疹瘙癢 등을 치료하였다<sup>2)</sup>.

二妙散에 대한 실험적 연구로는 류마티스 관절염 억제효과<sup>3)</sup>와 골관절염에 미치는 영향<sup>4)</sup>을 통해 주로 관절부위의 염증에 대해 연구 되어있으나 마우스 대식세포인 RAW 264.7에 대한 二妙散 메탄올 추출물의 항염증 효과<sup>5)</sup>를 통해 관절부위 이외의 염증치료에 대한 가능성이 있음을 논한 바 있으나 韃場염에 대한 二妙散의 연구는 현재까지는 없는 실정이다.

臍臟炎은 臍臟의 염증 질환으로 임상 경과에 따라 急性과 慢性으로 분류하는데, 急性은 기능이 대부분 정상으로 회복되지만, 慢性은 기능 손상이 영구적으로 남는다. 急性 臍臟炎은 담석, 음주, 고지혈증, 약물 등 다양한 원인에 의해 외분비 소화 효소가 활성화되어 臍臟 및 인접 조직으로 자가 소화 과정이 진행된 질환이다. 急性 臍臟炎의 임상양상은 급격한 심한 복통이 특징이며 등을 대고 바로 누운 자세에서 더 심해진다. 대부분의 경우 음식과 보존치료로 호전되나 일부 중증의 경우 심각한 합병증(국소 합병증의 경우 韃場성 韃場염, 韃場 농양, 韃장의 가성낭종, 韃장성 복수와 韃장성 흉수, 가성 동맥류, 전신성 합병증의 경우 신부전, 호흡부전)을 보이면서 높은 치사율을 보이고 있다<sup>6-8)</sup>.

急性 臍臟炎은 六種心痛 중 脾心痛과 類似한데,

文獻에 따르면 “脾心痛은 명치가 갑자기 아픈 것이다.”, “痛症이 針으로 心臟을 찌르는 듯하여 心痛이 심한 것을 脾心痛이라한다.”라 하여 急性 脾臟炎 발생 시의 痛症이 나타나는 部位와 症狀이 유사함을 알 수 있다.

急性 脾臟炎의 원인에 대해서는 현재까지 많은 연구가 진행되어 왔으나, 질환의 발생과 동반된 역학적 배경의 과정을 확인하는 데는 아직까지 많은 제한점이 있으며, 또한 발생기전도 명확하지 않아 정설이 없다<sup>6-8)</sup>. 치료는 항생제<sup>9-10)</sup>나 천연 항염증 물질, 항산화 물질<sup>11)</sup> 등을 이용하고 있지만, 임상에서 효과적인 연구 결과는 아직 보고되고 있지 않다.

이에 본 연구에서는 蒼朮(AC)과 黃柏(PAR), 二妙散(AC+PAR), 蒼朮 추출물과 黃柏 추출물을 혼합한 추출물(ACPAR)을 이용하여 急性 脾臟炎 억제 효과를 알아보기 위해 cerulein으로 유도된 急性 脾臟炎 동물 모델을 사용하여 그 효과를 살펴본 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 재 료

#### 1) 실험 약제

본 실험에 사용한 蒼朮(*Atractylodes chinensis*), 黃柏(*Phellodendron amurense* Ruprecht)은 옴니허브(대구, 대한민국)에서 구입한 후 尙志大學校 方劑學 教室에서 정선하여 사용하였다.

#### 2) 실험 동물

본 실험에 사용한 C57BL/6 Mouse(체중 15-20g, female)는 오리엔트 바이오(성남, 경기도, 대한민국)에서 구입하여 환경 적응을 위해 일주일 후 실험을 진행하였다.

#### 3) 실험 시약

Cerulein, 10% Formalin, Xylen, Ethanol, Triton X-100, hexadecyltrimethylam monium bromide는

Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, TriZol, DEPC treated water, cDNA synthesis kit는 Invitrogen(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. LightCycler taqman master mix는 Roche (Basel, Switzerland)에서 구입하였다.

### 2. 방 법

#### 1) 검액 제조

蒼朮 100g, 黃柏 100g, 蒼朮 50g plus 黃柏 50g을 각각 증류수 1L에 2시간 정도 끓인 다음 추출물을 여과한 후, 동결 건조하여 각각 건조분말 25.26g(회수율 25.26%), 19.21g(회수율 19.21%), 17.30g(회수율 17.30%)을 얻었으며, 실험을 위하여 4°C에 보관했다. 엑스 분말은 생리식염수에 녹여 필터링하여 사용하였다.

#### 2) Cerulein 으로 유도한 急性 脾臟炎의 실험모델

脾臟炎을 유발시키기 위해 18시간 동안 금식시킨 후에 실험군에 약물을 복강 주사하였다. 1시간 후 cerulein(50 $\mu$ g/kg)을 1시간 단위로 6번 복강주사하였다. 대조군은 약물 대신에 생리 식염수를 복강주사하고 脾臟炎을 유발시키기 위해 cerulein(50 $\mu$ g/kg)을 1시간 단위로 6번 복강주사 하였다. Cerulein을 마지막으로 주사하고 나서 6시간 후에 회복하여 혈액과 脾臟을 채취하였다.

#### 3) 혈청 분리

Cerulein을 마지막으로 주입하고 나서 6시간 후에 마우스를 마취시켜 회복하였다. Syringe를 이용하여 심장에서 혈액을 채취했으며 혈액은 3,000rpm, 4°C에서 20분간 원심분리하여 혈청만 분리하였다. 분리한 혈청으로 소화효소인 아밀라아제, 리파아제를 정량하였다.

#### 4) Serum amylase와 lipase 측정

Serum amylase의 측정은 ADIVA 1650(BAYER, USA) system으로 하였고 Serum lipase의 측정은 Cobas-mira(Rochs, USA) system으로 하였다.

#### 5) mRNA 측정

조직에 TriZol 1ml를 넣고 간 후 Chloroform

200 $\mu$ l를 넣고 vortexing한 후 12,000rpm, 4°C에서 15분 동안 원심분리한 후 상층액을 분리하여, -20°C에 보관된 isopropanol 500 $\mu$ l를 넣은 뒤 상온에서 30분 동안 놓아두었다. 이를 12,000rpm, 4°C에서 10분 동안 원심분리하여 용액을 버리고 80% ethanol 1ml을 넣은 후 7,500rpm, 4°C에서 5분 동안 원심분리하였다. ethanol을 버리고, DEPC treated water에 녹인 후 fluorometer를 이용하여 정량하였다. 동량의 mRNA를 cDNA로 합성 하였다. cDNA를 가지고 Taqman 방식으로 염증성 활성 물질을 측정하였다. 각 primer와 probe는 다음과 같다. for mouse TNF- $\alpha$ (forward, 5'-TCT CTT CAA GGG ACA AGG CTG-3'; reverse, 5'-ATA GCA AAT CGG CTG ACG GT-3'; probe, 5'-CCC GAC TAC GTG CTC CTC ACC CA-3'), for mouse IL-1 $\beta$  (forward, 5'-TTG ACG GAC CCC AAA AGA T-3'; reverse, 5'-GAA GCT GGA TGC TCT CAT CTG-3'; universal probe, M15131.1-Roche applied science), for mouse IL-6(forward, 5'TTC ATT CTC TTT GCT CTT GAA TTA GA-3'; reverse, 5'-GTC TGA CCT TTA GCT TCA AAT CCT-3'; universal probe, M20572.1-Roche applied science).

#### 6) Myeloperoxidase(MPO) assay

膵臟과 폐의 호중구 침습(neutrophil infiltration)은 조직의 MPO(Myeloperoxidase) 활성도를 측정하여 검사하였다. 50mM phosphate buffer(pH 6.0)와 0.5% Hexadecyl Trimethyl-Ammonium Bromide (HTAB) 용액에 조직을 담가 0°C에서 45초 동안 분쇄한 후 10,000rpm, 4°C로 20분간 원심분리 하였다. 96well에 supernatant, 0.5% HTAB, O-dianisidine (0.68 mg/ml), 0.003% hydrogen peroxide를 각 50  $\mu$ l씩 넣은 후 reader를 이용, 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 7) 통계학적 분석

모든 자료의 결과는 mean  $\pm$  SEM으로 나타냈고, 통계분석은 SPSS 12.0 (software)을 사용했으며, 평균치는 One-way ANOVA 등을 통해 분석했다.

## III. 結 果

### 1. 二妙散(AC+PAR), 蒼朮(AC) 및 黃柏(PAR)의 독성 측정

蒼朮(AC) 및 黃柏(PAR), 二妙散(AC+PAR) 등을 마우스 복강에 주사를 하여 藥材의 毒性을 측정하였다. 약물을 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1g/kg 을 복강에 주사한 후 마우스의 생존을 측정하여 그 毒性을 파악하였다. 蒼朮을 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1g/kg로 투여한 결과, 蒼朮은 마우스에서 毒性을 전혀 보이지 않았다. 黃柏을 투여한 마우스에서는, 1g/kg의 黃柏을 투여한 집단에서는 마우스가 12시간 안에 사망하였다. 1g/kg 이하의 농도에서 黃柏은 毒性을 보이지 않았다. 二妙散을 복강 투여하였을 때에는, 黃柏 단독 추출물 보다 더 강한 毒性을 보여주었다. 0.5, 1g/kg의 二妙散을 투여하였을 때, 마우스가 12시간 안에 사망하였다. 0.01, 0.05, 0.1g/kg의 二妙散은 마우스에게 毒性을 보이지 않았다. 황백, 창출 혼합물(ACPARe)을 1:1로 혼합하여 복강에 투여했을 때에는, 1g/kg에서는 毒性을 보여서 마우스가 사망하였지만, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5의 농도에서는 毒性을 보이지 않았다. 이 결과를 바탕으로 蒼朮 및 黃柏, 二妙散의 농도를 설정하여 실험을 시행하였다.

### 2. 蒼朮(AC)에 의한 急性 膵臟炎 억제 효과

蒼朮 물 추출물(0.1, 0.5, 1g/kg)을 急性 膵臟炎 유발 1시간 전에 복강 주사하였다. 대조군으로 蒼朮 대신 생리 식염수(saline)를 주사하여, 蒼朮이 아닌 용매(saline)의 효과를 배제하였다. 蒼朮 혹은 생리 식염수 주입 1시간 후 cerulein을 1시간 마다 6번 복강주사하여 急性 膵臟炎을 유발하였다. 마지막 주사 후 6시간 뒤에 膵臟과 혈청을 분리하였다. 膵臟은 포르말린을 이용하여 고정된 후, H & E 염색을 통해 조직의 손상 및 염증 정도를 파악하였다. 분석 결과 蒼朮 투여군은 膵臟炎을 유발한 대조군에 비해서 유의성 있는 효과

및 변화를 보여주지 못했다(Fig. 1A). 胰臟에서는 急性 胰臟炎이 유발되었을 때 부종이 일어난다. 따라서 胰臟의 부종 및 염증의 정도가 胰臟炎의 지표가 될 수 있다. 조직학적 분석 시, 조직 사이의 간격이 증가함을 척도로 부종의 정도를 파악할

수 있고, 조직 간격 사이로 일어난 염증성 세포들의 침윤으로 염증의 정도를 파악할 수 있다. 부종과 염증의 정도를 조직학적으로 분석한 결과 蒼朮을 투여한 군에서는 대조군에 비해서 유의성 있는 억제 효과를 보여주지 못했다(Fig. 1B).

Table 1. The mice survival rate after drug administration. The number of mice used in this experiment is 10 per group  
Mice survival rate (%)

Dose(g/kg) \ Drug	蒼朮(AC)	黃芩(PAR)	이묘산 (AC+PAR)	蒼朮, 黃芩 추출물 (ACPARe)	Saline
0.01	100	100	100	100	100
0.05	100	100	100	100	100
0.1	100	100	100	100	100
0.	100	100	0	100	100
1	100	0	0	0	100

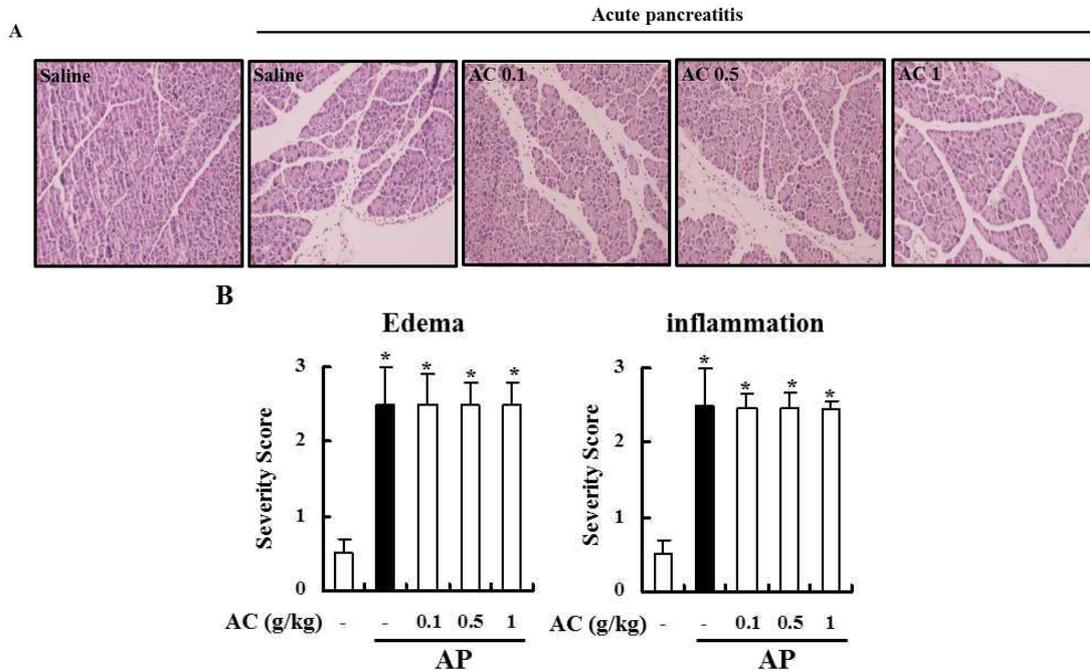


Fig. 1. The effects of AC on cerulein-induced AP.

Mice were pre-treated with AC(0.1, 0.5, 1g/kg) or saline for 1 h, then cerulein(50 $\mu$ g/kg) was injected hourly six times. 6 hrs after last cerulein injection, mice were sacrificed, then pancreas and blood were harvested. Histologic sections of pancreas were scored from 0(normal) to 3(severe) for edema and inflammation. Data are represented as mean  $\pm$  SEM for 6 mice for each group. \* $P < 0.05$  vs. saline-treated group or † $P < 0.05$  vs. cerulein treatment alone were considered significant. The results were similar in 3 additional experiments. Original magnification  $\times 100$ .

### 3. 蒼朮(AC)의 소화 효소 분비 및 호중구 침윤에 대한 효과

急性 膵臟炎 유발 시, 膵臟에서 소화 효소인 아밀라아제와 리파아제의 활성이 증가되어 분비된다. 분비된 소화 효소는 혈액으로 유입된다. 따라서 혈액 내 아밀라아제, 리파아제의 양을 急性 膵臟炎의 지표로 활용한다. 蒼朮 혹은 생리 식염수를 복강으로 주사하여 膵臟炎을 유발하고, 유발 후 6시간 뒤 혈액을 채취하였다. 아밀라아제와 리파아제

를 측정된 결과, 蒼朮을 투여한 실험군과 식염수를 투여한 대조군 사이에서 유의성이 없었다(Fig. 2A). 염증 유발 시 호중구의 유입이 증가하며, 호중구 침윤의 지표로 myeloperoxidase(MPO)를 사용한다. 본 실험에서 호중구 침윤에 미치는 蒼朮의 영향을 조사한 결과, 蒼朮 투여군은 생리 식염수 투여군과 비교하였을 때 유의성 있는 변화가 없었다. 이는 蒼朮이 호중구 침윤을 억제하지 못해서 膵臟炎 완화 효과가 없음을 보여준다(Fig. 2B).

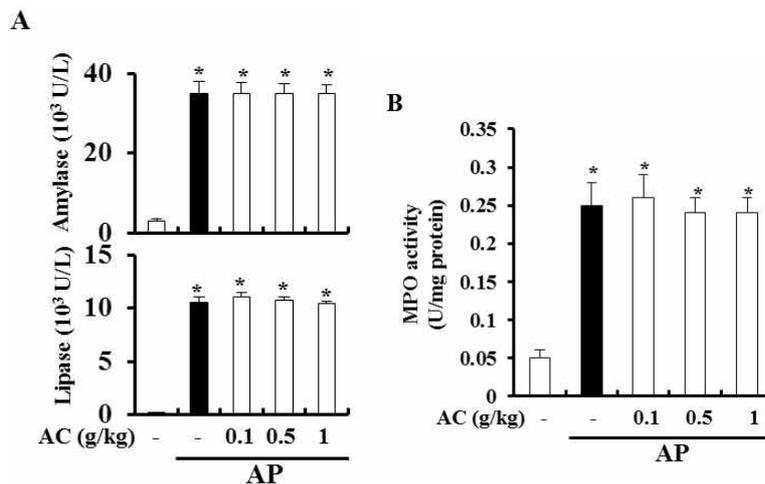


Fig. 2. The effects of AC on the production of digestive enzymes and MPO activity.

Mice were pre-treated with AC(0.1, 0.5, 1g/kg) or saline for 1 h, then cerulein(50 $\mu$ g/kg) was injected hourly six times. 6 hrs after last cerulein injection, mice were sacrificed, then pancreas and blood were harvested. (A) The serum was used for the detection of amylase and lipase, (B) the pancreas was used for MPO activity estimation. Data are represented as mean  $\pm$  SEM for 6 mice for each group. \* $P < 0.05$  vs. saline-treated group or † $P < 0.05$  vs. cerulein treatment alone were considered significant. The results were similar in 3 additional experiments.

### 4. 蒼朮(AC)의 전염증성 사이토카인 발현에 대한 효과

염증 시에는 인터루킨(interleukin) 1, 6, 혹은 종양괴사인자(TNF)와 같은 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokines)이 관여한다. 따라서 인터루킨 및 종양괴사인자의 발현을 측정하면 염증의 정도를 파악할 수 있다. 이를 측정하기 위해

서 정량적 중합 효소 반응(quantitative real time RT-PCR) 방법을 시행하였다. 생리 식염수 투여 후, 膵臟炎을 유발한 군에서는 膵臟에서 전염증성 사이토카인 발현이 증가하였다. 전염증성 사이토카인 발현의 증가는 蒼朮에 의해서 감소되지 않았고, 이는 蒼朮이 急性 膵臟炎 시 전염증성 사이토카인의 발현에 영향을 미치지 않음을 보여준다(Fig. 3).

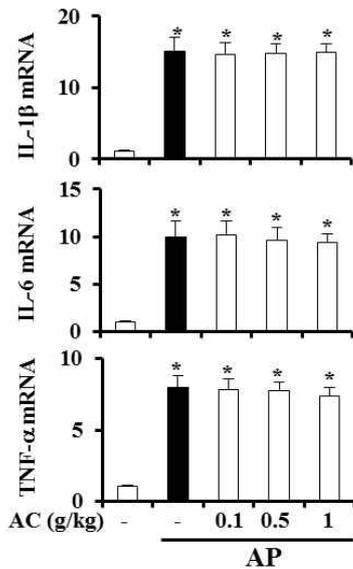


Fig. 3. The effects of AC on the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in pancreas.

Mice were pre-treated with AC(0.1, 0.5, 1g/kg) or saline for 1 h, then cerulein(50µg/kg) was injected hourly six times. 6 hrs after last cerulein injection, mice were sacrificed, then pancreas was harvested. The mRNA levels of cytokines in pancreas were measured by quantitative real time RT-PCR. Data are represented as mean ± SEM for 6 mice for each group. \* $P < 0.05$  vs. saline-treated group or † $P < 0.05$  vs. cerulein treatment alone were considered significant. The results were similar in 3 additional experiments.

### 5. 黃柏(PAR)에 의한 急性 膵臟炎 억제 효과

黃柏 물 추출물(0.05, 0.1, 0.5g/kg)을 急性 膵臟炎 유발 1시간 전에 복강 주사하였다. 대조군으로 黃柏 대신 생리 식염수(saline)를 주사하였다. 黃柏 혹은 생리 식염수 주입 1시간 후 cerulein을 1시간 마다 6번 복강주사하여 急性 膵臟炎을 유발

하였다. 마지막 투여 후 6시간 뒤에 膵臟과 혈청을 분리하였다. 膵臟 조직을 고정하여 H & E 염색을 통해 조직의 손상 및 염증 정도를 파악하였다. 黃柏 투여 후 膵臟炎을 유발한 실험군에서는 대조군에 비해서 유의성 있는 急性 膵臟炎 억제 효과를 보여주었다(Fig. 4A). 또한, 急性 膵臟炎 유발 시 발생하는 膵臟의 부종 및 염증의 정도를 분석한 결과, 黃柏을 투여한 군에서는 대조군에 비해서 유의성 있는 억제 효과를 보여주었다(Fig. 4B).

### 6. 黃柏(PAR)의 소화 효소 분비 및 호중구 침윤에 대한 효과

黃柏 혹은 생리 식염수를 복강으로 주사하고 膵臟炎을 유발하여, 유발 후 6시간 뒤 혈액을 분리하였다. 아밀라아제와 리파아제를 측정한 결과, 黃柏을 투여한 실험군은 식염수를 투여한 대조군과 비교해서 유의성 있는 감소를 보여주었다(Fig. 5A). 호중구 침윤에 黃柏이 미치는 효과를 조사한 결과, 黃柏 투여군은 생리 식염수 투여군과 비교하였을 때, 유의성 있는 감소를 보여주었다(Fig. 5B).

### 7. 黃柏(PAR)의 전염증성 사이토카인 발현에 대한 효과

膵臟에서의 전염증성 사이토카인의 발현을 측정하기 위해 정량적 중합 효소 반응(quantitative real time RT-PCR) 방법을 시행하였다. 黃柏 물 추출물 투여 후, 膵臟에서의 전염증성 사이토카인 발현은 대조군에 비해서 농도 의존적으로 유의성 있는 감소를 보여주었다(Fig. 6).

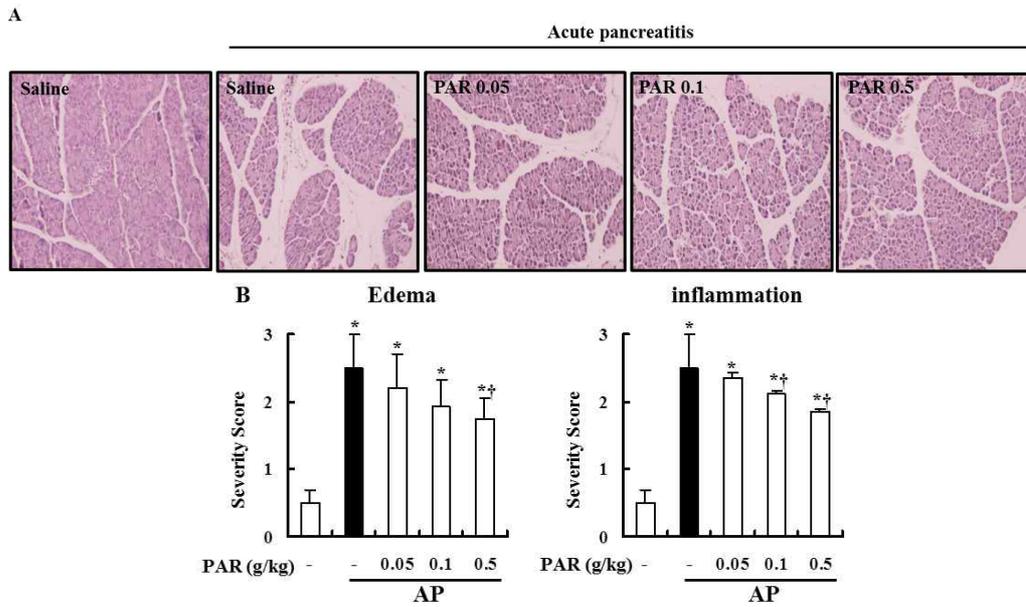


Fig. 4. The effects of PAR on cerulein-induced AP.

Mice were pre-treated with PAR(0.05, 0.1, 0.5g/kg) or saline for 1 h, then cerulein(50 $\mu$ g/kg) was injected hourly six times. 6 hrs after last cerulein injection, mice were sacrificed, then pancreas and blood were harvested. Histologic sections of pancreas were scored from 0(normal) to 3(severe) for edema and inflammation. Data are represented as mean  $\pm$  SEM for 6 mice for each group. \* $P$  < 0.05 vs. saline-treated group or † $P$  < 0.05 vs. cerulein treatment alone were considered significant. The results were similar in 3 additional experiments. Original magnification  $\times$  100.

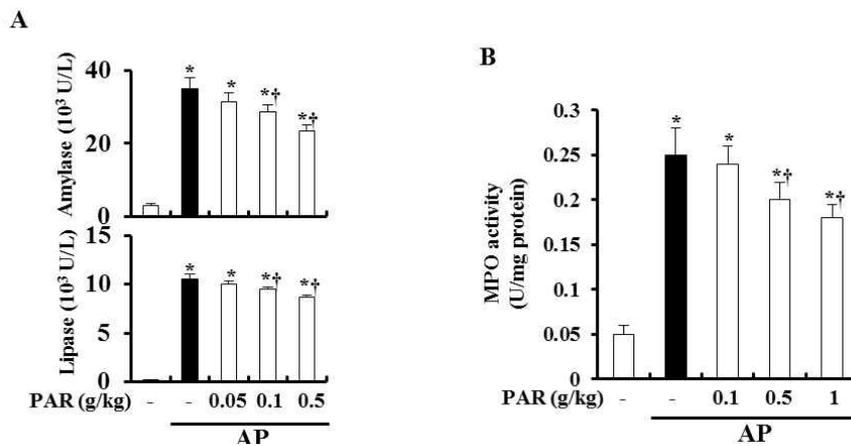


Fig. 5. The effects of PAR on the production of digestive enzymes and MPO activity.

Mice were pre-treated with PAR(0.05, 0.1, 0.5g/kg) or saline for 1 h, then cerulein(50 $\mu$ g/kg) was injected hourly six times. 6 hrs after last cerulein injection, mice were sacrificed, then pancreas and blood were harvested. (A) The serum was used for the detection of amylase and lipase, (B) the pancreas was used for MPO activity estimation. Data are represented as mean  $\pm$  SEM for 6 mice for each group. \* $P$  < 0.05 vs. saline-treated group or † $P$  < 0.05 vs. cerulein treatment alone were considered significant. The results were similar in 3 additional experiments.

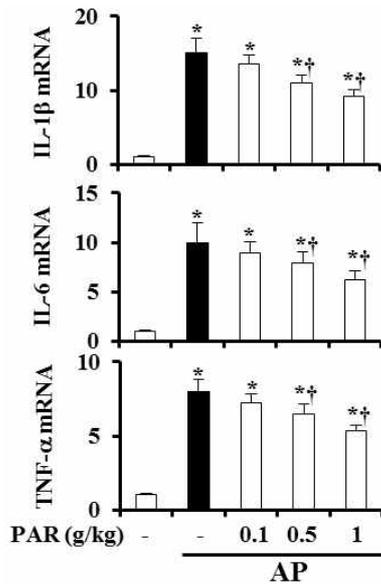


Fig. 6. The effects of PAR on the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in pancreas.

Mice were pre-treated with PAR(0.05, 0.1, 0.5g/kg) or saline for 1 h, then cerulein(50µg/kg) was injected hourly six times. 6 hrs after last cerulein injection, mice were sacrificed, then pancreas was harvested. The mRNA levels of cytokines in pancreas were measured by quantitative real time RT-PCR. Data are represented as mean ± SEM for 6 mice for each group. \* $P < 0.05$  vs. saline-treated group or † $P < 0.05$  vs. cerulein treatment alone were considered significant. The results were similar in 3 additional experiments.

8. 急性 膵臟炎에 있어서 黃柏과 蒼朮 추출 혼합물(ACPARe)과 二妙散(AC+PAR)의 비교

蒼朮과 黃柏 단독 추출물의 急性 膵臟炎에 있어서의 효과를 관찰한 결과 蒼朮은 유의성 있는 효과를 보여주지 못했지만, 黃柏은 유의성 있는 膵臟炎 억제 효과를 보여주었다. 이에 蒼朮과 黃柏을 동시에 전탕하여, 膵臟炎에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 二妙散의 방제학적 효과를 관찰하기 위해, ACPARe와 비교하였다. 二妙散(0.01, 0.05, 0.1g/kg)을 투여한 실험군에서는 黃柏 단일 추출물보다 저농도에서 유의성 있는 急性 膵臟炎 억제 효과를 보여주었다(Fig. 7). ACPARe는 急性

膵臟炎 억제 효과를 보이지 않았다(Fig. 7).

9. 黃백,창출 추출 혼합물(ACPARe)과 二妙散(AC+PAR)의 急性 膵臟炎 조직 분석 지표에서 미치는 영향

二妙散은 조직 형태학상 急性 膵臟炎 억제 효과를 보였다. 하지만 ACPARe는 急性 膵臟炎 억제 효과를 보이지 않았다. 이를 다시 조직학적으로 분석하여 그 지표들을 조사한 결과, 二妙散이 부종이나 염증을 유의성 있게 억제하였지만, ACPARe는 부종과 염증을 억제하지 못했다(Fig. 8).

10. 黃백,창출 추출 혼합물(ACPARe)과 二妙散(AC+PAR)의 소화 효소 분비 및 호중구 침윤에 대한 효과

二妙散 혹은 ACPARe를 투여한 후, 아밀라아제와 리파아제를 측정하였다. 二妙散을 투여한 실험군은 식염수를 투여한 대조군에 비해서 아밀라아제 및 리파아제의 활성을 억제하였으나, ACPARe는 유의성 있는 효과를 보이지 않았다(Fig. 9A).

膵臟에서 호중구 침윤을 조사한 결과, 二妙散 투여는 생리 식염수 투여군과 비교하였을 때, 유의성 있는 감소를 보여주었으나, ACPARe는 유의성 있는 감소를 보여주지 못하였다(Fig. 9B).

11. 黃백,창출 추출 혼합물(ACPARe)과 二妙散(AC+PAR)의 전염증성 사이토카인 발현에 대한 효과

二妙散 혹은 ACPARe를 복강으로 주사하고, 膵臟炎을 유발하여 6시간 뒤 膵臟을 얻었다. 膵臟으로부터 RNA를 채취하여 膵臟에서의 전염증성 사이토카인의 발현을 관찰하였다. 그 결과, 二妙散을 투여한 실험군은 식염수를 투여한 대조군에 비해서 유의성 있는 감소를 보여주었다(Fig. 10). 하지만 ACPARe는 유의성 있는 효과를 보여주지 못하였다(Fig. 10).

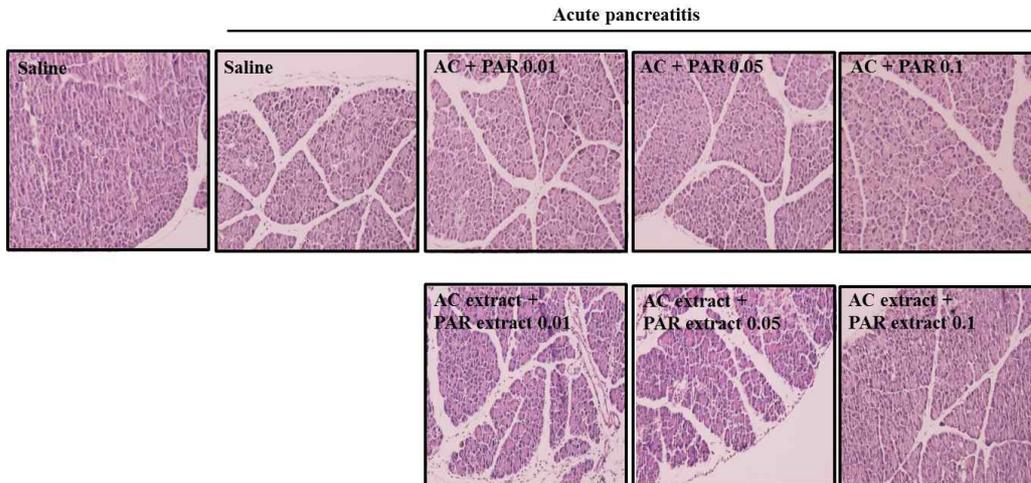


Fig. 7. The effects of AC plus PAR on cerulein-induced AP.

Mice were pre-treated with *Yimyosan*(AC+PAR)(0.01, 0.05, 0.1g/kg), ACe+PARe(1:1) or saline for 1 h, then cerulein (50 $\mu$ g/kg) was injected hourly six times. 6 hrs after last cerulein injection, mice were sacrificed, then pancreas and blood were harvested. Upper panel indicates *Yimyosan*, low panel indicates ACPARE. Histological data of pancreas are represented as mean  $\pm$  SEM for 6 mice for each group. \* $P$  < 0.05 vs. saline-treated group or † $P$  < 0.05 vs. cerulein treatment alone were considered significant. The results were similar in 3 additional experiments. Original magnification  $\times$  100.

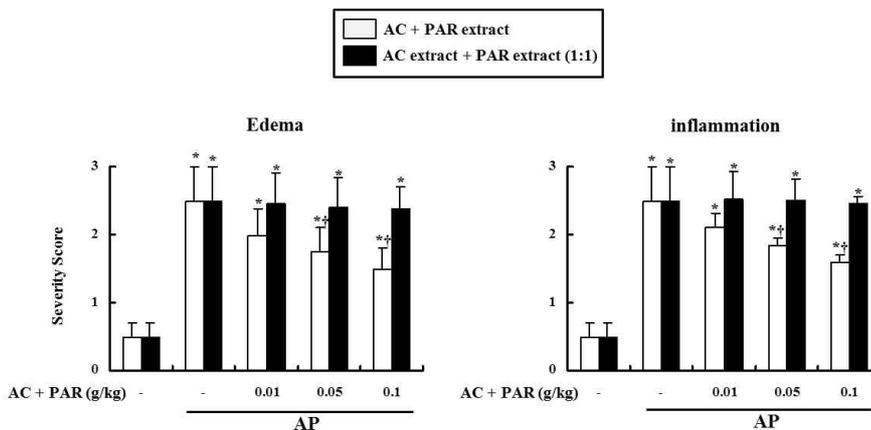


Fig. 8. The histological analysis of pancreas; effects of AC plus PAR on cerulein-induced AP.

Mice were pre-treated with *Yimyosan*(0.01, 0.05, 0.1g/kg), ACPARE(1:1) or saline for 1 h, then cerulein(50 $\mu$ g/kg) was injected hourly six times. 6 hrs after last cerulein injection, mice were sacrificed, then pancreas were harvested. Histologic sections of pancreas were scored from 0(normal) to 3(severe) for edema and inflammation. Data of pancreas are represented as mean  $\pm$  SEM for 6 mice for each group. \* $P$  < 0.05 vs. saline-treated group or † $P$  < 0.05 vs. cerulein treatment alone were considered significant. The results were similar in 3 additional experiments. Original magnification  $\times$  100.

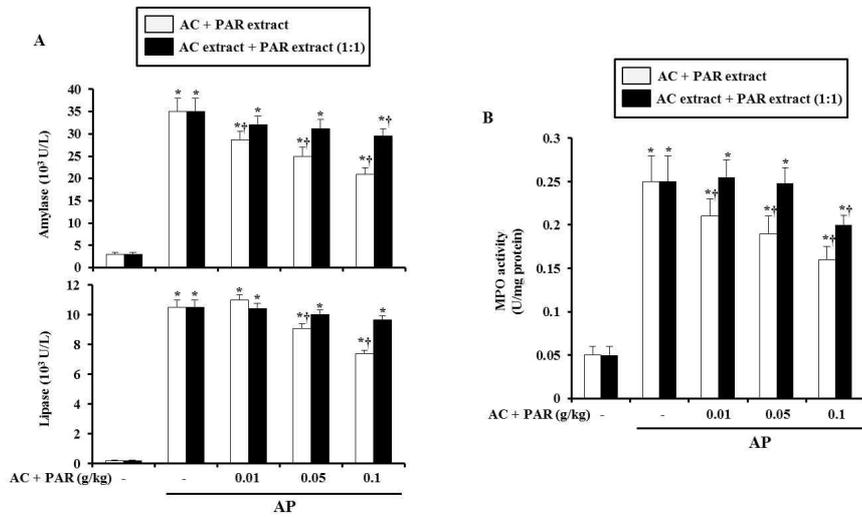


Fig. 9. The effects of AC plus PAR on the production of digestive enzymes and MPO activity.

Mice were pre-treated with *Yimyo-san*(AC+PAR)(0.01, 0.05, 0.1g/kg), ACPARE(1:1) or saline for 1 h, the cerulein(50µg/kg) was injected hourly six times. 6 hrs after last cerulein injection, mice were sacrificed, then pancreas and blood were harvested. (A) The serum was used for the detection of amylase and lipase, (B) the pancreas was used for MPO activity estimation. Data are represented as mean ± SEM for 6 mice for each group. \* $P < 0.05$  vs. saline-treated group or † $P < 0.05$  vs. cerulein treatment alone were considered significant. The results were similar in 3 additional experiments.

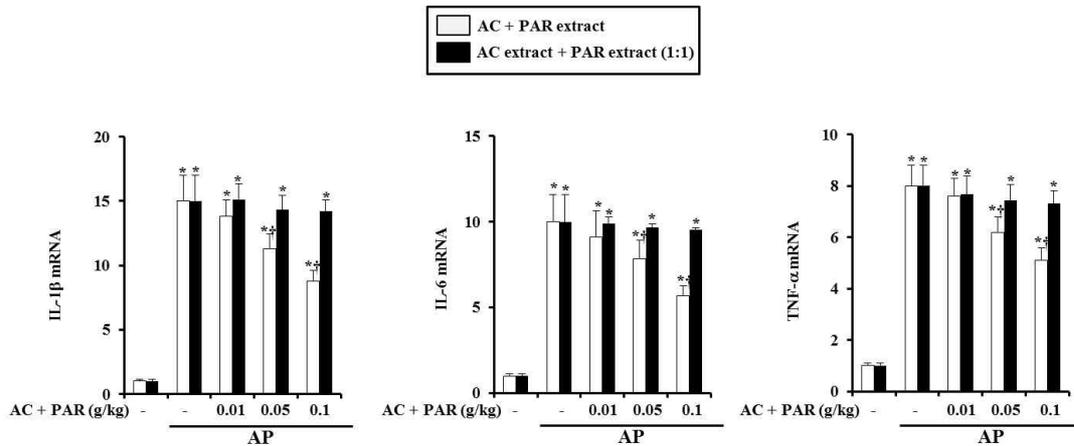


Fig. 10. The effects of AC plus PAR on the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in pancreas.

Mice were pre-treated with *Yimyo-san*(AC+PAR)(0.01, 0.05, 0.1g/kg), ACPARE(1:1) or saline for 1 h, then cerulein(50 µg/kg) was injected hourly six times. 6 hrs after last cerulein injection, mice were sacrificed, then pancreas was harvested. The mRNA levels of cytokines in pancreas were measured by quantitative real time RT-PCR. Data are represented as mean ± SEM for 6 mice for each group. \* $P < 0.05$  vs. saline-treated group or † $P < 0.05$  vs. cerulein treatment alone were considered significant. The results were similar in 3 additional experiments.

#### IV. 考 察

膵臟은 위의 바로 밑에 위치하여 평행하게 놓여 있으며, 내부 구조가 타액선과 유사한 복합선이다.膵臟은 음식의 3가지 주요 형태인 단백질, 탄수화물, 지방을 소화시키기 위한 효소들을 포함하고 있다. 또 많은 양의 bicarbonate ion을 포함하고 있으며, 위에서 십이지장으로 흘러 들어가는 acid chyme을 중화시키는 데 중요한 역할을 한다.膵臟의 중요한 단백질 분해효소로는 trypsin, chymotrypsin, carboxypolypeptidase 등이 있다. 이러한 효소들 중에서 trypsin과 chymotrypsin은 소화된 단백질을 다양한 크기의 peptide로 분해시키지만 개별적인 아미노산으로 분해시키지는 못한다. 그러나 carboxypolypeptidase는 몇몇의 peptide를 각각의 아미노산으로 분해시킨다. 따라서 특정 단백질들은 아미노산 형태로 분해되어 단백질 소화의 전 과정을 완료하게 된다. 탄수화물을 분해하는膵臟효소인 pancreatic amylase는 전분과 glycogen과 다른 대부분의 탄수화물을 disaccharide나 trisaccharid로 가수 분해시킨다. 지방 소화에 있어서 중요한 효소인 pancreatic lipase는 중성 지방을 지방산과 monoglyceride로 가수 분해시키고 phospholipase는 phospholipd를 지방산으로 분해시킨다<sup>6-8,13)</sup>.

蒼朮(AC)은 菊花科에 속한 多年生 草本인 가는 잎삼주(茅蒼朮) *Atractylodes lancea* DC. 또는 만주삼주(北蒼朮) *A. chinensis* Koidzumi의 根莖으로 性은 溫하고 味는 辛苦하며, 脾, 胃, 肝으로 歸經하여 燥濕健脾, 祛風散寒, 明目하므로 腕腹脹滿, 泄瀉, 水腫, 脚氣痿躄, 風濕痺痛, 風寒感冒, 夜盲 등을 치료한다<sup>2)</sup>.

黃柏(PAR)은 芸香科에 속한 落葉喬木인 황벽나무 *Phellodendron amurense* Ruprecht의 주피를 벗긴 樹幹皮로서 性은 寒하고 味는 苦하며, 腎, 膀胱, 大腸으로 歸經하여 清熱燥濕, 瀉火解毒, 退虛熱하므로 濕熱瀉痢, 黃疸, 帶下, 熱淋, 脚氣, 痿躄, 骨蒸勞熱,

盜汗, 遺精, 瘡瘍腫毒, 濕疹瘙癢 등을 치료한다<sup>2)</sup>.

蒼朮(AC)과 黃柏(PAR)을 等分으로 配合한 處方이 二妙散(AC+PAR)인데 두 가지 藥材의 조합으로 濕熱走注에 의한 筋骨疼痛, 濕熱下注에 의한 足痿軟無力 足膝紅腫熱痛, 濕熱帶下에 의한 下部濕瘡를 치료하므로 두 가지 藥材를 단독으로 사용하는 것에 비해서 濕熱에 의한 염증성 질환을 더 효과적으로 치료한다고 할 수 있다<sup>1)</sup>.

Cerulein은 急性 膵臟炎을 유발한다<sup>6-8,14-6)</sup>. 본 실험에서 黃柏(PAR) 및 二妙散(AC+PAR)은 膵臟 부종 및 염증 물질을 억제하여 急性 膵臟炎을 억제하였다. 또한, 二妙散(AC+PAR)은 黃柏(PAR) 단독 추출물보다 저농도에서 膵臟炎 억제 효과를 보였다. 이러한 결과는 조직손상 정도, 아밀라아제와 리파아제의 활성 억제 및 전염증성 사이토카인의 생성 억제 결과로 알 수 있었다. 하지만, 蒼朮(AC) 추출물 및 ACPAR은 억제효과를 보여주지 못하였다. 또한 ACPAR을 투여한 군에서는 조직손상, 아밀라아제와 리파아제 활성 및 전염증성 사이토카인의 생성을 억제 하지 못했다. 이러한 결과는 黃柏(PAR) 및 二妙散(AC+PAR)가 急性 膵臟炎에 효과가 있음을 시사하며, 단순한 약제 하나의 사용 보다는 두 가지 약제의 조합에 의해서 그 효과가 증대됨을 보여준다. 그러나 개별 약제 전당물의 혼합은 효과가 미미하고 동시에 전당했을 때 그 효과가 있음을 알 수 있었다.

아밀라아제와 리파아제 수치는 急性 膵臟炎을 예측할 수 있는 중요한 지표 중 하나로서 急性 膵臟炎이 발생한 경우 수치가 올라가는 데<sup>6-8,4,17)</sup>, 黃柏(PAR) 및 二妙散(AC+PAR)을 투여한 군에서는 아밀라아제와 리파아제 수치를 농도 의존적으로 유의성 있게 억제하였다. 이러한 결과는 黃柏(PAR)이 急性 膵臟炎을 유발할 때에 혈청의 아밀라아제와 리파아제 수치를 낮추는 데 중요한 기능을 할 수 있음을 시사하고, 蒼朮(AC)과의 배합이 그 기능을 강화시킬 수 있음을 보여준다.

Cerulein으로 유도한 急性 膵臟炎에서는 전염증성

사이토카인(pro-inflammatory cytokine)인 TNF- $\alpha$ ·IL-1 $\beta$ ·IL-6의 수치가 올라가는 것으로 알려져 있는데<sup>18-23</sup>, 이러한 전염증성 사이토카인은 조직의 감염을 매개하는 것으로 알려져 있다<sup>20</sup>. 急性 脾臟炎이 발생하게 되면 脾臟 내 대식세포(macrophage)는 전염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ ·IL-1 $\beta$ ·IL-6를 분비하여 이들 사이토카인이 염증세포의 순환, 脾臟의 부종 및 脾臟조직 파괴에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다<sup>14,24-5</sup>. TNF- $\alpha$ ·IL-1 $\beta$ ·IL-6는 急性 脾臟炎의 중증도와 관련이 있으며<sup>26</sup>, 원격 장기에 대한 기능부전과 이에 따른 사망을 초래한다. TNF- $\alpha$ 는 주로 대식세포에서 유래되는 사이토카인으로, 急性 脾臟炎에서 백혈구에 의해 脾臟 내에서 생산되며<sup>19-23</sup>, 急性 脾臟炎에 의해 발생하는 뇌 손상을 줄여주는 역할을 한다<sup>27</sup>. TNF- $\alpha$ 도 急性 脾臟炎의 중증도와 관련되어 있지만<sup>27-9</sup>, TNF- $\alpha$ 는 C-reactive protein(CRP)보다 민감도가 떨어지는 것으로 알려져 있다<sup>31</sup>. IL-1 $\beta$ 는 TNF- $\alpha$ 와 마찬가지로 대식세포에서 유리되는 전염증성 사이토카인으로<sup>32</sup> 강력한 염증 반응과 함께 폐손상<sup>33-6</sup>, 발열반응, 중성구 활성화, 저혈압 및 shock을 초래하며 IL-6, IL-8, granulocyte-macrophage colony stimulating factor(GM-CSF)와 같은 다른 종류의 사이토카인 분비를 촉진한다<sup>19,31,37-8</sup>. IL-6는 급성기 반응의 중요한 매개자로서 활성화된 mononuclear phagocytes에서 유리되며<sup>38</sup> 중증도 진단에 유용한 지표로 사용되는데, CRP<sup>39</sup>보다 急性 脾臟炎의 초기 중증도 진단에 더 민감한 것으로 알려져 있다<sup>21,25,39</sup>. 이 연구에서는 黃柏(PAR) 및 二妙散(AC+PAR)은 急性 脾臟炎 유발 시 TNF- $\alpha$ ·IL-1 $\beta$ ·IL-6 조절에 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다.

결론적으로 黃柏(PAR)을 투여했을 때 cerulein으로 유도된 急性 脾臟炎에 대한 방어 효과가 있음을 확인하였고, 이는 蒼朮(AC)의 배합에 의해서 그 효과가 증가할 수 있음을 알 수 있었다. 그러나 이것은 단순한 煎湯液의 혼합보다는 동시에 전탕했을 때 유의한 효능을 가져올 수 있었다. 이러한 효과들은

혈액 내 소화효소, 호중구 침윤, 전염증성 사이토카인 등이 억제됨으로서 나타난 결과로 생각되며, 앞으로 약리 기전에 대한 규명이 더 이루어지면 정확한 임상 응용 근거를 밝힐 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 結 論

蒼朮(AC) 및 黃柏(PAR)과 蒼朮(AC), 黃柏(PAR)의 혼합에 따른 急性 脾臟炎 억제 효과 조사 및 비교를 위해 cerulein으로 유도된 急性 脾臟炎에서 脾臟의 조직 상태, 아밀라아제와 리파아제 수치 변화, MPO 활성도에 따른 호중구 침윤의 변화, 전염증성 사이토카인 발현을 생리식염수 투여군과 비교 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 蒼朮(AC) 투여군은 대조군에 비해 急性 脾臟炎 억제 효과를 보이지 않았다.
2. 黃柏(PAR) 투여군은 대조군에 비해 脾臟의 조직 염증 상태를 유의성 있게 억제시켰다.
3. 黃柏(PAR) 투여군 아밀라아제와 리파아제 수치 및 MPO 활성도를 유의성 있게 감소시켰다.
4. 黃柏(PAR) 투여군은 대조군에 비해 전염증성 사이토카인의 발현을 유의성 있게 감소시켰다.
5. 二妙散(AC+PAR)은 黃柏(PAR) 단독 투여보다 탁월한 急性 脾臟炎 억제 효과 및 독성을 보여주었다.
6. ACPARe 투여군은 유의성 있는 脾臟炎 억제 효과를 보이지 않았다.

이상의 결과에서 黃柏(PAR) 및 二妙散(AC+PAR)은 아밀라아제와 리파아제 및 전염증성 사이토카인, MPO 활성을 감소시켜 急性 脾臟炎을 억제하는 것으로 나타나 임상에서 예방 및 치료에 활용할 수 있을 것으로 사료된다. 黃柏(PAR)은 蒼朮(AC)과의 배합을 통해 치료 효과가 증진되는데, 이는 개별 약재 전탕액 혼합이 아닌 처방에

의한 혼합 전탕에 의해 증진되므로 방제학적 유의성이 있다고 사료된다.

### 參考文獻

1. 尹用甲. 東醫方劑와 處方解說. 서울:의성당. 2007: 127-39.
2. 全國韓醫科大學 共同教材編纂委員會. 본초학. 서울:영림사. 2004:223-5, 334-5.
3. 배병찬. 이묘산의 Adjuvant유발 류마티스 관절염 억제효과. 대구한의대학교 석사학위논문. 2011.
4. 안희빈, 김순중, 서일복, 정수현. 二妙散이 흰쥐의 Monosodium Iodoacetate 유발 골관절염에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지. 2010;20(3): 13-26.
5. 이현우. 마우스 대식세포인 RAW 264.7에 대한 이묘산 메탄을 추출물의 항염증 효과. 동국대학교 박사학위논문. 2008.
6. 서울대학교의과대학 내과학 교실. 최신지견 내과학. 서울:고려의학. 2005:128-35.
7. 카톨릭의과대학 내과학 교실. Current Principles and Clinical Practice of Internal Medicine. 서울:군자출판사. 2005:466.
8. Harrison, Tinsley Randolph, Kasper, Dennis L. Braunwald, Eugene. Fauci, Anthony S. Hauser, Stephen L. Longo, Dan L. Jameson, J. Larry. Harrison's principles of Internal Medicine. New York:Mc Graw Hill, 2006:1891-906.
9. Oruc N, Ozutemiz AO, Yukselen V, Nart D, Ceilk HA, Yuce G, Batur Y. Infliximab : a new therapeutic agent in acute pancreatitis. Pancreas. 2004;28:D-e8.
10. Fantini L, Tomassassetti P, Pezzilli R. Management of acute pancreatitis : current knowledge and future perspectives. World J Emerg Surg. 2006; 1:16.
11. Lawinski M, Sledzinski Z, Kubasik-Juraniec J, Spodnik JH, Wozniak M, Boguslawski W. Does resveratrol prevent free radical-induced acute pancreatitis. Pancreas. 2005;31:43-7.
12. 上海中醫學院. 中醫內科學. 上海:常務印書館香港分館. 1977:407-12.
13. Arthur C. Guyton, John E. hall. 의학 생리학. 서울:정담. 2002:857-61.
14. Granger J, Remick D. Acute pancreatitis : models, markers, and mediators. Shock. 2005; 24 Suppl 1:45-51.
15. Wagner AC, Mazzucchelli L, Miller M, Camoratto AM, Göke B. CEP-1347 inhibits caerulein-induced rat pancreatic JNK activation and ameliorates caerulein pancreatitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2000;278(1):G165-72.
16. Frossard JL, Bhagat L, Lee HS, Hietaranta AJ, Singh VP, Song AM, Steer ML, Saluja AK. Both thermal and non-thermal stress protect against caerulein induced pancreatitis and prevent trypsinogen activation in the pancreas. Gut. 2002;50(1):78-83.
17. Heath DI, Cruickshank A, Gudgeon AM, Jehanli A, Shenkin A, Imrie CW. The relationship between pancreatic enzyme release and activation and the acute-phase protein response in patients with acute pancreatitis. Pancreas. 1995;10(4): 347-53.
18. Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. An J Surg. 1998;175:76-83.
19. Galloway SW, Kingsnorth AN. Reduction in circulating levels of CD-4 positive lymphocytes in acute pancreatitis : relationship to endotoxin, interleukin 6 and disease severity. Br J Surg. 1994;81:312.
20. Pessilli R, Billo P. Serum interleukin-6,

- interleukin-8 and beta 2 microglobulin in early assessment of severity of acute pancreatitis : comparison with serum C-reactive protein. *Dig Dis Sci*. 1995;40:2341-8.
21. Inagaki T, Hoshino M, Hayakawa T, Ohara H, Yamada T, Yamada H, Iida M, Nakazawa T, Ogasawara T, Uchida A, Hasegawa C, Miyaji M, Takeuchi T. Interleukin 6 is a useful marker for early prediction of the severity of acute pancreatitis. *Pancreas*. 1997;(1):1-8.
  22. Yang YL, Li JP, Li KZ, Dou KF. Tumor necrosis factor alpha antibody prevents brain damage of rats with acute necrotizing pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2004;10(19):2898-900.
  23. Grewal HP, Mohey EL, Din A, Gaber L, Kotb M, Gaber AO. Amelioration of the physiologic and biochemical changes of acute pancreatitis using an anti-TNF-alpha polyclonal antibody. *Am J Surg*. 1994;167(1):214-8.
  24. Brivet FG, Emilie D, Galanaud P. Pro- and anti-inflammatory cytokines during acute severe pancreatitis : an early and sustained response, although unpredictable of death. Parisian Study Group on Acute Pancreatitis. *Crit Care Med*. 1999;27(4):749-55.
  25. Mayer J, Rau B, Gansauge F, Beger HG. Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications. *Gut*. 2004;47(4):546-52.
  26. Norman JG, Fink GW, Denham W, Yang J, Carter G, Sexton C, Falkner J, Gower WR, Franz MG. Tissue-specific cytokine production during experimental acute pancreatitis. A probable mechanism for distant organ dysfunction. *Dig Dis Sci*. 1997;42(8):1783-8.
  27. Hughes CB, Grewal HP, Gaber LW, Kotb M, El-din AB, Mann L, Gaber AO. Anti-TNFalpha therapy improves survival and ameliorates the pathophysiological sequelae in acute pancreatitis in the rat. *Am J Surg*. 1996;171(2):274-80.
  28. Norman JG, Fink GW, Messina J, Carter G, Franz MG. Timing of tumor necrosis factor antagonism is critical in determining outcome in murine lethal acute pancreatitis. *Surgery*. 1996;120(3):515-21.
  29. Van Laethem JL, Marchant A, Delvaux A, Goldman M, Robberecht P, Velu T, Devière J. Interleukin 10 prevents necrosis in murine experimental acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 1995;108(6):1917-22.
  30. Norman JG, Fink GW, Franz MG. Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression. *Arch Surg*. 1995;130(9):966-70.
  31. Paahanen H, Laato M, Jaakkola M, Pulkki K, Niinikoski J, Nordback I. Serum tumour necrosis factor compared with C-reactive protein in the early assessment of severity of acute pancreatitis. *Br J Surg*. 1995;82(2):271-3.
  32. Schölmerich J. Interleukins in acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1996;219:37-42.
  33. Mozo G, del Olmo ML, Caro-Patón A, Reyes E, Manzano L, Belmonte A, Alvarez-Mon M. Lung changes and cytokine levels in a model of experimental acute pancreatitis. *Rev Esp Enferm Dig*. 2002;94(2):53-66.
  34. Norman J, Franz M, Messina J, Riker A, Fabri PJ, Rosemurgy AS, Gower WR Jr. Interleukin-1 receptor antagonist decreases severity of experimental acute pancreatitis. *Surgery*. 1995;117(6):648-55.
  35. Norman JG, Franz MG, Fink GS, Messina J, Fabri PJ, Gower WR, Carey LC. Decreased mortality of severe acute pancreatitis after

- proximal cytokine blockade. *Ann Surg.* 1995; 221(6):625-31.
36. Tanaka N, Murata A, Uda K, Toda H, Kato T, Hayashida H, Matsuura N, Mori T. Interleukin-1 receptor antagonist modifies the changes in vital organs induced by acute necrotizing pancreatitis in a rat experimental model. *Crit Care Med.* 1995;23(5):901-8.
37. Moshage H. Cytokine and the hepatic acute phase response. *J Pathol.* 1997;181:257-66.
38. Pooran N, Indaram A, Singh P, Bank S. Cytokines(IL-6, IL-8,TNF) : early and reliable predictors of severe acute pancreatitis. *J Clin Gastroenterol.* 2003;37(3):236-6.
39. Uhl W, Büchler M, Malfertheiner P, Martini M, Beger HG. PMN-elastase in comparison with CRP, antiproteases, and LDH as indicators of necrosis in human acute pancreatitis. *Pancreas.* 1991;6(3):253-9.