

반총산의 항산화, 항염증, 항소양증, 항균효능에 관한 실험 연구

동신대학교 한의과대학 한방부인과학교실
조은진, 조성희, 양승정

ABSTRACT

The Experimental Study on Antioxidant, Anti-inflammatory, Antipruritic and Antibacterial Effects of the *Banchong-san* (BCS)

Eun-Jin Cho, Seong-Hui Jo, Seung-Jeong Yang
Dept. of Korean Gynecology and Obstetrics, College of Korean Medicine, Dong-Shin University

Objectives: *Banchong-san* (BCS) is a herbal formula composed of 13 korean medicinal herbs and is traditionally used to treat inflammatory diseases and pain. The object of this study was to research the antioxidant, anti-inflammatory, antipruritic and antimicrobial effects of the BCS in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages.

Methods: In this experiment, effects of BCS on the following four were measured as follows: (1) Anti-oxidative effects were evaluated by 1,1 - diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) Radical scavenging activity, 2,2 - azino - bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) Radical scavenging activity. (2) Anti-inflammatory effects were evaluated by the production amount of Reactive oxygen species (ROS), Nitric oxide (NO), Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), Prostaglandin E2 (PGE₂), inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)(the previous two are "mRNA"), extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 mitogen-activated protein kinases (p38), inhibitor of nuclear factor kappa B (I κ B α), nuclear factor kappa B (NF- κ B) (the previous five are "Protein") in LPS-Stimulated RAW 264.7 cells. (3) Antipruritic effects were evaluated by the production amount of histamine, Leukotriene B4 (LTB4), LeukotrieneC4 (LTC4) Levels in phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)/ionomycin-stimulated MC/9 mast cell. (4) Anti-microbial effects were evaluated by the growth suppression of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Aspergillus niger*.

Results: The following results were obtained through each measurement: (1) DPPH Radical Scavenging Activity, ABTS Radical Scavenging Activity evoked a significant concentration-dependent increase. (2) ROS, NO, IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE₂ production amount, iNOS, COX-2 mRNA expression were significantly reduced in the BCS extraction group compared with the control group and significantly decreased the amount of ERK, JNK, p38, NF- κ B Protein expression. The amount of I κ B- α Protein Expression have increased significantly. (3) The amounts of histamine, LTB4, LTC4 were significantly decreased. (4) The antibacterial efficacy, BCS inhibited the growth of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* at concentrations of 5 μ g/ml, but did not suppress the growth of *staphylococcus aureus* and *aspergillus niger*.

Conclusions: The experimental results show that BCS has anti-oxidant, anti-inflammatory, antipruritic and antimicrobial properties.

Key Words: Antioxidants, Anti-inflammatory Agents, Antipruritics, Antibacterial Agents, *Banchong-san*

I. 서 론

골반염증성질환(Pelvic Inflammatory Disease, 이하 골반염)은 자궁목내구상부의 생식기에 미생물감염에 의한 염증이 발생한 질환으로, 자궁내막염, 자궁경관염, 복막염, 난소염, 자궁난소고름집을 포괄한다¹⁾. 발열이나 복통 등의 급성 증상부터 난임증이나 만성골반염, 만성골반통, 자궁외 임신 등의 후유증을 유발 할 수 있다¹⁾. 치료는 감염 가능한 여러 가지 세균을 치료할 수 있는 광범위 항생제를 경험적으로 사용하는데¹⁾ 항생제에 저항성을 갖는 균이 늘어나고 새로운 원인균이 출현함에 따라 불응성, 재발성 만성 골반염이 증가하고 있다²⁾. 만성골반염증성 질환은 동통 혹은 불임을 호소하는 환자에서 볼 수 있고, 미열, 백혈구 증가증과 적혈구 침강속도의 상승 등의 소견도 나타날 수 있다³⁾. 또한 임상적 경과가 만성적이고 난치의 경향이 있으며 재발이 흔하므로 항병능력을 높여서 질병을 이겨내도록 유도하여야 한다³⁾.

한의학에서 만성골반염증성 질환은 한의학의 '痛經', '帶下', '癥瘕', '不妊' 등의 범주로 볼 수 있고³⁾, 產後發熱, 崩漏, 婦人腹痛, 月經不調, 熱入血室 등에서 이 질환과 관련된 증상들을 볼 수 있다⁴⁾. 변증유형은 주로 濕熱과 血瘀가 결합된 형태가 주류를 이루며 肝腎不足, 脾腎虧虛, 肝鬱氣滯 등이 겹하여 변증유형을 형성하고 清熱解毒, 消腫排膿, 祛瘀止痛 등의 효능이 있는 약물들을 많이 사용한다³⁾.

반총산은 健脾溫中, 破積, 活血止痛의 효능으로⁵⁾ 胃腸, 小腹(下腹部), 前陰, 子宮 등 虛冷에서 오는 각종 통증성 증상

을 치료하는 처방으로⁶⁾ 부인과 질환에 많은 활용가능성을 가지고 있다.

임상에서 여성의 만성골반통의 한의학 적 치료에 반총산이 다용되는 연구⁷⁾가 보고되었고, 실험 연구로는 반총산 및 가미반총산이 담즙분비와 진통작용에 미치는 영향⁸⁾, 반총산 및 반총산가미방이 Trypsin 췌장염에 미치는 영향⁹⁾, 반총산이 자궁근종 세포의 사멸과 cell apoptosis에 미치는 영향¹⁰⁾ 등이 보고되었다. 반총산의 항산화, 항염, 항소양, 항균효능에 대한 연구는 보고되지 않아 이에 대한 실험연구를 설계했다.

이에 본 연구자는 *in vitro*에서 반총산의 항산화 효능, RAW 264.7 세포에서 항염증 효능, MC/9 mast cell에서 항소양증효능, 여러 균주에 대한 항균효능을 규명하기 위하여 연구를 진행하였다. 먼저 세포생존율을 측정하여 세포독성 여부를 판별한 후, 항산화 효능은 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) 및 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical 소거능 측정으로 평가하고, 항염증 효능은 Reactive oxygen species (ROS), Nitric oxide (NO), Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), Prostaglandin E2 (PGE₂)의 생성량, inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) 유전자 발현량, extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 mitogen-activated protein kinases (p38), inhibitor of nuclear factor kappa B (I κ B α), nuclear factor kappa B (NF- κ B) 단백질 발현량을 측정하여 평가하고, 항소양 효능은 histamine, Leukotriene B4 (LTB4), Leukotriene C4 (LTC4) 생성량을 측정하여 평가하고, 항균 효능은

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger*의 생장억제환 크기를 측정하여 평가하였다.

본 실험을 통해 반총산의 항산화, 항염, 항소양, 항균효능을 평가한 결과, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 시 료

본 실험에 사용한 반총산(*Banchong-san* 이하, BCS로 표기)의 구성약재 들은 대한한약국에서 구입하여 사용하였으며, 한첩의 내용 및 분량¹⁾은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Prescription of BCS

Herbal medicine name	Scientific name	Weight (g)
蒼朮	<i>Atractylodes lancea</i>	4
甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	4
三稜	<i>Sparganium stoloniferum</i>	2.8
蓬朮	<i>Curcuma zedoaria</i>	2.8
白茯苓	<i>Poria cocos</i>	2.8
青皮	<i>Citrus unshiu</i>	2.8
砂仁	<i>Amomum villosum</i>	2.0
丁香皮	<i>Eugenia caryophyllata</i>	2.0
檳榔	<i>Areca catechu</i>	2.0
玄胡索	<i>Corydalis yanhusuo</i>	1.2
肉桂	<i>Cinnamomum cassia</i>	1.2
乾薑	<i>Zingiber officinale</i>	1.2
蔥白	<i>Allium fistulosum</i>	0.8
Total amount		29.6

2) 시 약

사용된 시약은 1,1 - diphenyl-2-picryl-

hydrazyl(DPPH : Sigma-Aldrich, U.S.A.), dulbecco's modified eagle's medium(Gibco, U.S.A.), fetal bovine serum(Gibco, U.S.A.), penicillin-streptomycin(Gibco, U.S.A.), 2-mercaptoethanol(Gibco, U.S.A.), L-glutamine(Gibco, U.S.A.), T-stim(Corning, U.S.A.), lipopolysaccharide(LPS : Sigma-Aldrich, U.S.A.), trypan blue(Sigma-Aldrich, U.S.A.), trypsin-EDTA solution(Welgene, Korea), dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS : Welgene, Korea), EZ-cytox(Daeilab, Korea), NO assay kit(Intronbio, Korea), PGE₂ ELISA Kit(R&D systems, U.S.A.), immunology multiplex assay kit(Merck Co., U.S.A.) total RNA prep kit(Intronbio, Korea), accupower cyclescript RT premix(Bioneer, Korea), SYBR Green(Qiagen, Germany), Diethyl Pyrocarbonate-distilled water (DEPC-DW: Bioneer, Korea), pierceTM Bicinchoninic acid(BCA) protein assay Kit(Thermo Fisher, U.S.A), Radioimmunoprecipitation (RIPA) lysis and extraction buffer(Thermo Fisher, U.S.A.), protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, U.S.A.), phosphatase inhibitor cocktail 2(Sigma-Aldrich, U.S.A.), phosphatase inhibitor cocktail 3(Sigma-Aldrich, U.S.A.), bovine serum albumin(BSA : Gendepot, U.S.A.), miracle-starTM western blot detection system(Intron Biotechnology, Korea), primary antibody(Cell Signaling, U.S.A.), secondary antibody(Jackson immunoresearch, U.S.A.)을 사용하였다.

3) 기 기

사용된 기기는 rotary vacuum evaporator (EYELA FDU-540, Japan), freeze dryer (ilShinbiobase, Korea), CO₂ incubator(Sanyo, Japan), clean bench(Vision scientific, Korea),

autoclave(Sanyo, Japan), vortex mixer(Vision scientific, Korea), centrifuge(Vision scientific, Korea), deep-freezer(Sanyo, Japan), ice-maker (Vision scientific, Korea), plate shaker (Lab-Line, U.S.A.), luminex(Millipore, U.S.A.), micro plate reader(Molecular Devices, U.S.A.), nanodrop(Thermo Fisher, U.S.A.), alpha cyclor 1 PCRmax(PCRmax, U.K.) real time PCR(Qiagen, Germany), mini trans-Blot(Bio-RAD, U.S.A.), chemidoc fusion FX(Vilber Lourmat, France)을 사용하였다.

2. 방 법

1) 시료 추출

BCS 1첩 분량(29.6 g)에 500 ml의 증류수를 넣어 100°C에서 3시간 동안 추출하였으며, 추출물을 여과지로 여과한 후, rotary vacuum evaporator를 통해 감압 농축하고 freeze dryer를 사용하여 동결 건조를 진행하여 4.68 g(수득률 : 13.76%)의 분말을 얻었으며, -20°C에 보관하면서 사용하였다.

2) DPPH radical(1,1 - diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 소거능 측정

BCS의 최종 농도가 1, 10, 100, 1000 µg/ml의 농도로 될 수 있도록 희석시켰으며, 에탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 150 µl와 시료를 100 µl씩 혼합하여 30 분간 37°C에서 반응시켰다. 반응한 후 517 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 대조군은 증류수를 넣었으며, DPPH radical scavenging activity은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{소거능 (\%)} = \left(\frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 추가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

3) ABTS radical(2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) 소거능 측정

BCS의 최종 농도가 1, 10, 100, 1000 µg/ml의 농도로 될 수 있도록 희석시켰고, ABTS 용액은 7.4 mM ABTS(2,2-azino-bis)과 2.6 mM potassium persulphate을 제조한 후, 암소에 하루(24시간)동안 방치하여 양이온(ABTS+)을 형성시킨 후 732 nm에서 흡광도를 측정하고 흡광도 값이 1.5 이하가 나올 수 있게 희석시켰다. 희석된 ABTS+ 용액 95 µl와 시료를 5 µl씩 혼합하여 실온에서 10 분동안 반응시킨 후, 732 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 대조군은 증류수를 넣었으며, ABTS radical scavenging activity은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{소거능 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 추가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

4) 세포 배양

RAW 264.7 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin-streptomycin로 조성된 Dulbecco's Modification of Eagle's Medium(DMEM)배지를 사용하였으며, MC/9 세포는 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin, 0.055 mM 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, 10% T-Stim으로 구성된 DMEM배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C 조건이 유지되는 세포배양기에서 배양하였으며, 2~3일의 주기로 계대 배양하여 실험을 진행하였다.

5) 세포생존율 측정

RAW 264.7 세포를 96 well plate에 1×10⁵ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하고 BCS를 1, 2.5, 5 µg/ml 농도로 처리한 후, 다시 24시간 동안 배양하였다.

또한 MC/9 cell은 48 well plate에 2×10^5 cells/well으로 분주하여 24 시간 동안 배양하고 BCS를 1, 2.5, 5 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 후, 다시 48 시간 동안 배양하였다. 모든 배양 후 배양액 100 μl 당 10 μl 의 EZ-Cytox 용액을 추가하여 세포배양기에서 30분간 반응시켰다. 반응한 후 450 nm에서의 흡광도 변화를 측정해서 control group에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다.

6) Reactive oxygen species(ROS) 생성량 측정

RAW 264.7 세포를 12 well plate에서 1×10^6 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하고 1, 2.5, 5 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 BCS를 처리하고 1시간 후, 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 LPS를 처리하여 다시 24시간 동안 5% CO_2 , 37°C의 조건이 유지되는 세포 배양기에서 배양하였다. 배양 후 2000 rpm에서 5분 동안 원심분리해서 모은 세포를 차가운 Phosphate buffer saline(PBS)로 2회 세척한 후 10 μM 의 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)를 넣어 상온에서 15 분간 염색하였다. 염색한 후에 차가운 PBS를 넣어 1200 rpm에서 5 분동안 원심분리하여 상층액을 제거한 후, 다시 PBS 400 μl 을 넣어 세포를 부유시켜 유세포 분석기를 이용하여 측정하였다.

7) Nitric oxide(NO) 생성량 측정

RAW 264.7 세포를 12 well plate에 1×10^6 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하고 1, 2.5, 5 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 BCS를 처리하고 1시간 후, 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 LPS를 처리하여 다시 24시간 동안 5% CO_2 , 37°C의 조건이 유지되는 세포 배양기에 배양하였다. 배양 후 96 well plate에 상층액 100 μl 를 넣고 N1 buffer 50 μl 를 추가하

여 상온에서 10 분간 반응시켰으며, 반응한 후에 N2 buffer 50 μl 을 추가하여 상온에서 10 분간 반응시켰다. 반응 후 540 nm에서의 흡광도 변화를 측정하여 control group에 대한 생성량을 백분율로 표시하였다.

8) Cytokine 생성량 측정

RAW 264.7 세포를 12 well plate에서 1×10^6 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하고 1, 2.5, 5 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 BCS를 처리하고 1시간 후, 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 Lipopolysaccharide(LPS)를 처리하여 다시 24시간 동안 5% CO_2 , 37°C의 조건이 유지되는 세포 배양기에 배양하였다. 배양 후 96 well plate에 상층액과 magnetic bead mixture를 25 μl 씩 넣고 상온에서 18시간 반응시켰다. 반응 후 plate에 있는 시약은 버리고 washing buffer를 넣어 3회 세척한 후 detection antibody을 25 μl 씩 추가하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 plate에 streptavidin-phycoerythrin을 25 μl 씩 추가하여 상온에서 30 분 반응시켰다. 반응 후 plate를 3 회 세척하고 PBS를 125 μl 씩 각 well에 넣은 후 luminex를 통해 측정하였으며, 절대 값으로 표시하였다.

9) Prostaglandin E2(PGE₂) 생성량 측정

RAW 264.7 세포를 12 well plate에서 1×10^6 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하고 1, 2.5, 5 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 BCS를 처리하고 1시간 후, 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 LPS를 처리하여 다시 24시간 동안 5% CO_2 , 37°C의 조건이 유지되는 세포 배양기에 배양하였다. 배양 후 96 well plate에 상층액 150 μl 와 primary antibody 50 μl 를 넣고 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 conjugate

를 50 μ l씩 추가하여 상온에서 2시간 반응시켰다. plate에 있는 시약은 버리고 washing buffer를 넣어서 3회 세척하였다. 세척 후 substrate solution을 200 μ l씩 추가하여 상온에서 30분 반응시켰다. 반응 후 stop solution을 100 μ l씩 추가하여 microplate reader을 이용해서 450 nm에서의 흡광도를 측정하였으며, 절대값으로 표시하였다.

10) Real-time PCR(polymerase chain reaction)

RAW 264.7 세포를 12 well plate에서 1×10^6 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하고 1, 2.5, 5 μ g/ml 농도의 BCS를 처리하고 1시간 후, 1 μ g/ml의 LPS를 처리하여 다시 24시간 동안 5% CO₂, 37°C의 조건이 유지되는 세포 배양기에서 배양하였다. 배양 후, cell을 PBS로 세척하고 cell lysis buffer을 1 ml씩 넣어서 세포를 용해시켰으며, chloroform을 200 μ l씩 추가하여 혼합하였다. 이를 13000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 400 μ l 상층액을 회수해서 binding buffer을 400 μ l씩 넣어서 혼합하여 column에 주입해서 원심분리 하였다. column에 washing buffer A을 700 μ l씩 넣어서 원심분리 하고, washing buffer B을 700 μ l씩 넣어서 원

심분리한 후 elution buffer 50 μ l를 넣어 원심분리해서 RNA를 추출하였다. 역전사(reverse transcription) 반응은 RT premix (reverse transcriptase, reaction buffer, dNTPs, dT20 primer, stabilizer)에 total RNA를 1 μ g 추가하고 diethyl pyrocarbonate(DEPC) 처리된 증류수를 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하여 추가하였다. 이 혼합액을 섞은 다음 2000 rpm에서 5 초 원심 침강하고 45°C 실험용고온반응기(heating block)에서 1시간 동안 반응시켜서 first-strand cDNA을 합성하였다. 이를 다시 95°C로 5분간 반응시켜서 Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase(M-MLV RT)을 불활성화 시킨 다음 합성이 완료된 cDNA을 PCR에 사용했다. 이렇게 합성이 완료된 cDNA을 증폭시키기 위해 real-time PCR를 진행했으며, real-time 전용 tube에 cDNA 1 μ l, 각 primer 2 μ l, SYBR Green 10 μ l, DEPC-DW 5 μ l씩을 넣은 후 95°C에서 5 초 동안 denaturation을 일으킨 다음 62.5°C, 30 초 동안 primer의 annealing 및 신장 단계를 수행하였다. 이 후의 유전자 발현량은 대조군(heating block)에 비하여 계산했으며, 이 실험에 사용한 primer는(Table 2)와 같다.

Table 2. The Sequences of Primers for Real-Time Polymerase Chain Reaction

Primer	F/R*	Sequences	Size (bp)
COX-2 [†]	F	AACCGCATTGCCTCTGAAT	130
	R	CATGTTCCAGGAGGATGGAG	
iNOS [‡]	F	CGAAACGCTTCACTTCCAA	51
	R	TGAGCCTATATTGCTGTGGCT	
ACTIN	F	AGGGAAATCGTGCGTGACAT	95
	R	TCCAGGGAGGAAGAGGATGC	

* F : forward, R : reverse, [†] COX-2 : cyclooxygenase-2, [‡] iNOS : inducible nitric oxide synthase.

11) Western blot

RAW 264.7 cell을 6 well plate에 2×10^6 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하고 1, 2.5, 5 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 BCS를 처리하고 1시간 후, 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 LPS를 처리하여 다시 24시간 동안 5% CO_2 , 37°C의 조건이 유지되는 세포 배양기로 배양하였다. 배양 후, RIPA buffer 또는 NE-PERTM nuclear and cytoplasmic extraction reagents에 protease inhibitor cocktail I, phosphatase inhibitor II, III를 넣어서 lysis 진행 하여 단백질을 추출을 진행하였다. 10% gel에 Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) 진행 후 Polyvinylidene Fluoride(PVDF) membrane에 transfer 진행 후 ERK, JNK, p38는 first anti-body(1:1000 dilution), I κ B α , NF- κ B는 first anti-body(1:500 dilution)로 4°C에서 overnight 반응한 후, 상온에서 secondary anti-body(1:8000 dilution), enhanced chemi-luminescence(ECL) detection reagent으로 항원 항체 반응을 확인하였으며, chemidoc fusion FX를 통해 단백질 발현량을 분석하였다.

12) Histamine 생성량 측정

MC/9 cell을 12 well plate에서 2×10^5 cells/well으로 분주해서 24시간 동안 배양하고 1, 2.5, 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도의 BCS와 50 ng/ml Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), 0.5 μM ionomycin을 처리하여 다시 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 96 well plate에 상층액 100 μl 를 넣고 37°C에서 2시간 반응시켰다. plate에 있는 시약은 버리고 washing buffer를 넣어서 3회 세척 작업을 진행하였다. 세척 후 biotin-conjugate를 100 μl 를 추가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음, 다시 세척을 진행하

여 streptavidin-Horseradish Peroxidase(HRP)을 100 μl 씩 추가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 마지막 세척을 진행한 후 substrate solution를 100 μl 씩 넣어서 37°C에 15분 동안 반응시켰다. 반응시킨 후에 stop solution 50 μl 를 추가하여 microplate reader을 이용해서 450 nm에서의 흡광도를 측정하였으며, 절대 값으로 표시하였다.

13) Leukotriene B₄(LTB₄), Leukotriene C₄(LTC₄) 생성량 측정

MC/9 cell을 12 well plate에서 2×10^5 cells/well으로 분주해서 24시간 동안 배양하고 1, 2.5, 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도의 BCS와 50 ng/ml PMA, 0.5 μM ionomycin을 처리하여 다시 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 96 well plate에 상층액 100 μl 를 넣고 37°C에서 2시간 반응시켰다. plate에 있는 시약은 버리고 washing buffer를 넣어서 3회 세척 작업을 진행하였다. 세척 후 biotin-conjugate 100 μl 추가하여 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 다음, 다시 세척을 진행하여 streptavidin-HRP을 100 μl 씩 넣어서 37°C로 1시간 반응시켰다. 마지막으로 세척을 진행한 후 substrate solution를 100 μl 씩 넣어서 37°C에 10분간 반응시켰다. 반응 후 stop solution 100 μl 를 추가하여 microplate reader을 이용하여 450 nm에서의 흡광도를 측정하였으며, 절대 값으로 표시하였다.

14) 항균 효능 측정

식약처 공시 균주인 *Escherichia coli*(*E. coli*, 대장균), *Pseudomonas aeruginosa*(*P. aeruginosa*, 그람 음성균), *Aspergillus niger*(*A. niger*, 진균), *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*, 그람 양성균)를 사용하여 항균 효능을 측정하였다. *E. coli*, *P. aeruginosa*,

*S. aureus*은 nutrient agar(NA)배지를 사용했으며, *A. niger*는 YM배지를 사용해서 배양하였고, 배양한 균을 각 고체배지에서 10^7 CFU/ml으로 도말하였다. Paper disc에 1, 2.5, 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 BCS를 30 μl 씩 접종해서 건조한 후에 각 균주가 도말된 배지 위에 올려놓은 후 37°C의 배양기에 24시간 동안 배양해서 성장억제환의 크기를 측정하였다.

3. 통계처리

실험 결과는 SPSS 21.0(IBM, NY, USA)를 이용하여 $\text{mean} \pm \text{SD}$ (standard deviation)으로 나타내었으며, ANOVA를 사용하여 다중 비교하였고 Tukey's HSD test을 통해 $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 의 수준에서 유의성을 검정하였다.

II. 실험 결과

1. 세포생존율

1) RAW 264.7 세포

세포생존율을 측정한 결과, BCS투여군은 5 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 95% 이상의 세포생존율을 나타냈다(Fig. 1).

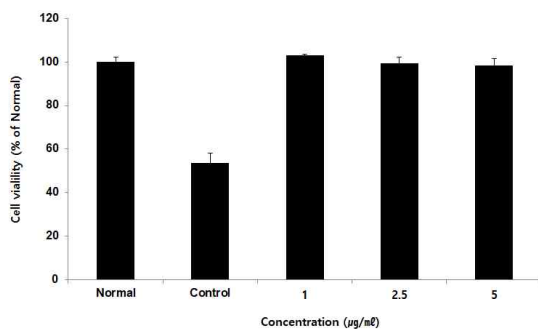


Fig. 1. Cell viability of BCS in RAW 264.7 cell.

2) MC/9 세포

세포생존율을 측정한 결과, BCS투여군은 5 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 95% 이상의 세포생존율을 나타냈다(Fig. 2).

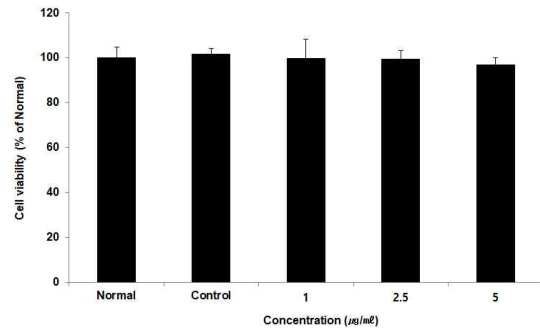


Fig. 2. Cell viability of BCS in MC/9 cell.

2. 항산화 효능

1) DPPH radical 소거능

DPPH radical 소거능을 측정한 결과, BCS투여군은 농도 의존적인 증가를 나타냈다(Fig. 3).

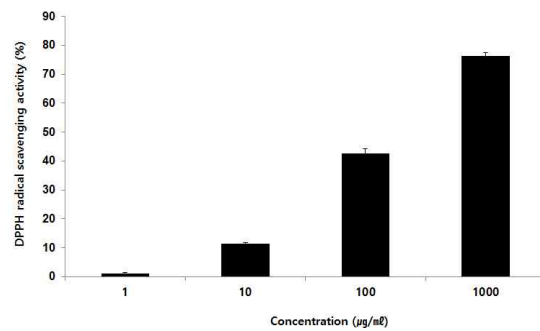


Fig. 3. DPPH radical scavenging activity of BCS.

2) ABTS radical 소거능

ABTS radical 소거능을 측정한 결과, BCS투여군은 농도 의존적인 증가를 나타냈다(Fig. 4).

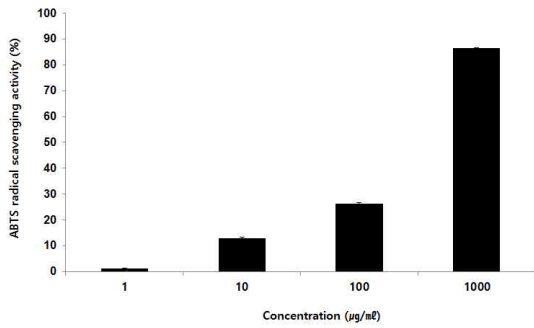


Fig. 4. ABTS radical scavenging activity of BCS.

3. 항염증 효능

1) Reactive oxygen species(ROS)

ROS 생성량을 측정한 결과, BCS투여군은 모든 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.001$) (Fig. 5).

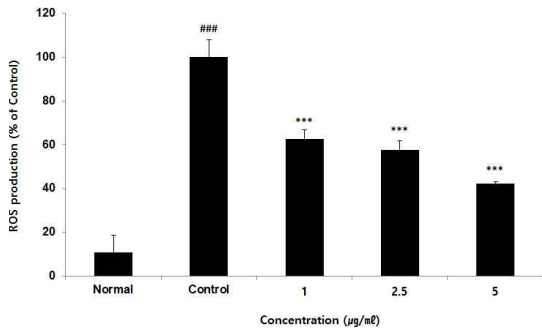


Fig. 5. The effects of BCS on ROS production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

$p < 0.001$ compared with the normal group and *** $p < 0.001$ compared with the control group.

2) Nitric oxide(NO)

NO 생성량을 측정한 결과, BCS투여군은 모든 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.001$) (Fig. 6).

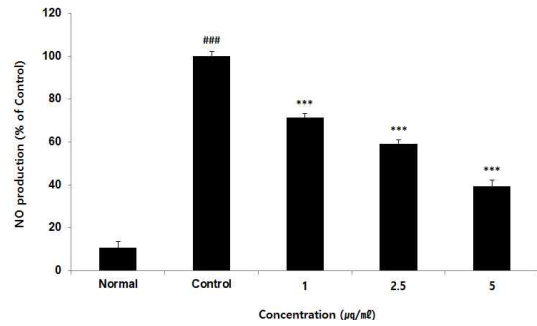


Fig. 6. The effects of BCS on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

$p < 0.001$ compared with the normal group and *** $p < 0.001$ compared with the control group.

3) Cytokine

(1) IL-1 β (Interleukin-1 β)

IL-1 β 생성량을 측정한 결과, BCS투여군은 모든 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.001$) (Fig. 7).

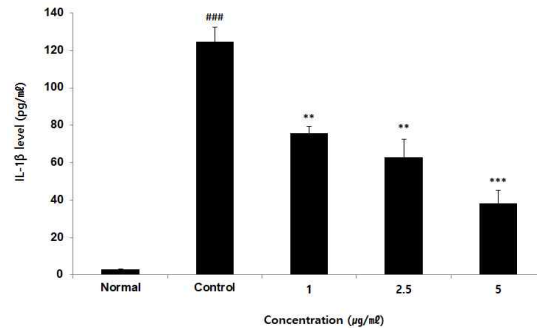


Fig. 7. Effects of BCS on IL-1 β level in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

$p < 0.001$ compared with the normal group. And *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared with the control group.

(2) IL-6(Interleukin 6)

IL-6 생성량을 측정한 결과, BCS투여군은 모든 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.001$) (Fig. 8).

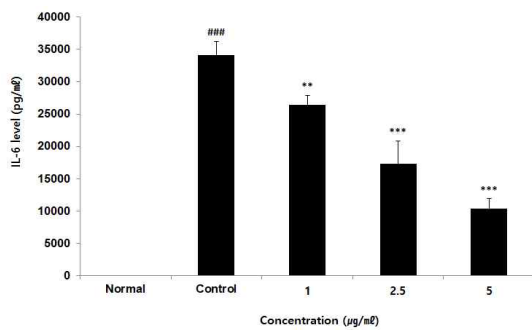


Fig. 8. Effects of BCS on IL-6 level in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. ### $p < 0.001$ compared with the normal group. And *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ compared with the control group.

(3) TNF- α (tumor necrosis factor- α)

TNF- α 생성량을 측정 한 결과, BCS투여군은 모든 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.001$)(Fig. 9).

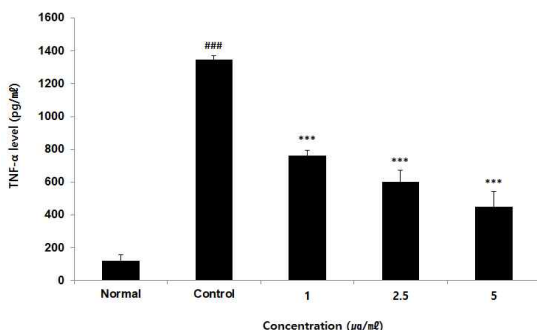


Fig. 9. The effects of BCS on TNF- α level in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. ### $p < 0.001$ compared with the normal group and *** $p < 0.001$ compared with the control group.

(4) PGE₂ (prostaglandin E2)

PGE₂ 생성량을 측정 한 결과, BCS투여군은 2.5 µg/ml이상의 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈다 ($p < 0.001$)(Fig. 10).

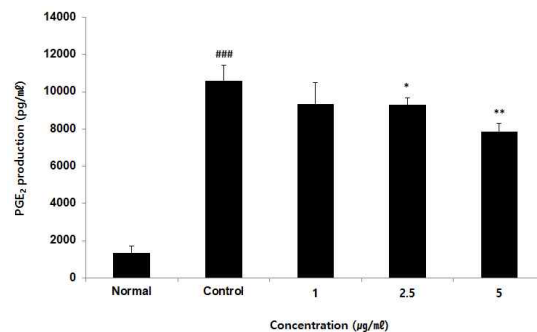


Fig. 10. The effects of BCS on PGE₂ production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. ### $p < 0.001$ compared with the normal group and ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared with the control group.

4) mRNA expression

(1) iNOS(inducible nitric oxide synthase)

iNOS mRNA 발현량을 측정 한 결과, BCS투여군은 모든 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.05$)(Fig. 11).

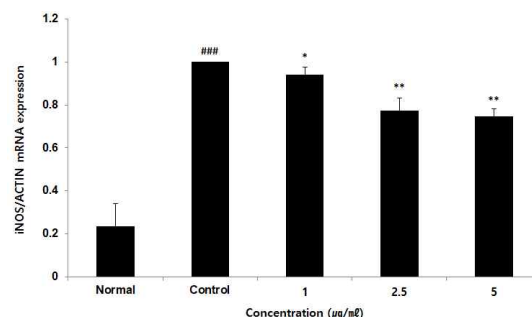


Fig. 11. Effects of BCS on iNOS mRNA expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. ### $p < 0.05$ compared with the normal group and ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ compared with the control group.

(2) COX-2(cyclooxygenase-2)

COX-2 mRNA 발현량을 측정 한 결과, BCS투여군은 5 µg/ml의 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈다 ($p < 0.001$)(Fig. 12).

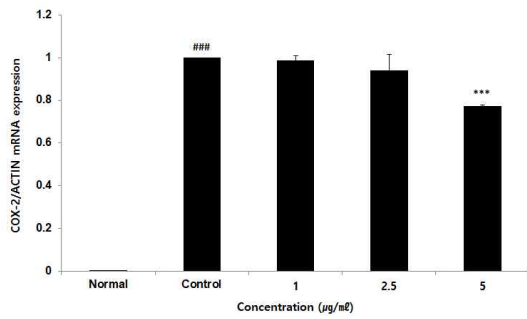


Fig. 12. Effects of BCS on COX-2 mRNA expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

$p < 0.001$ compared with the normal group and *** $p < 0.001$ compared with the control group.

5) Protein expression

(1) ERK(extracellular signal-regulated kinase)

ERK 단백질 발현량을 측정한 결과, BCS투여군은 2.5 µg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.001$)(Fig. 13).

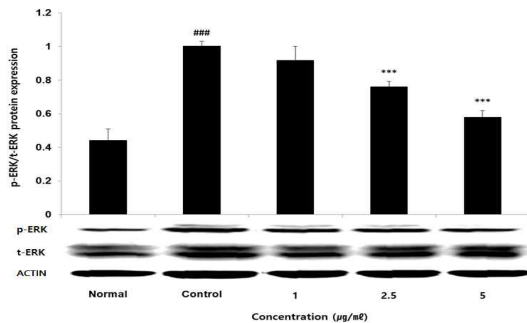


Fig. 13. The effects of BCS on ERK protein expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

$p < 0.01$ compared with the normal group and *** $p < 0.001$ compared with the control group.

(2) JNK(c-Jun N-terminal kinase)

JNK 단백질 발현량을 측정한 결과, BCS투여군은 2.5 µg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.001$)(Fig. 14).

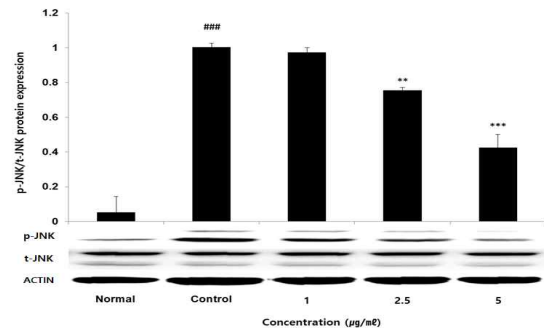


Fig. 14. The effects of BCS on JNK protein expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

$p < 0.001$ compared with the normal group and *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ compared with the control group.

(3) p38(p38 mitogen-activated protein kinases)

p38 단백질 발현량을 측정한 결과, BCS 투여군은 2.5 µg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.001$)(Fig. 15).

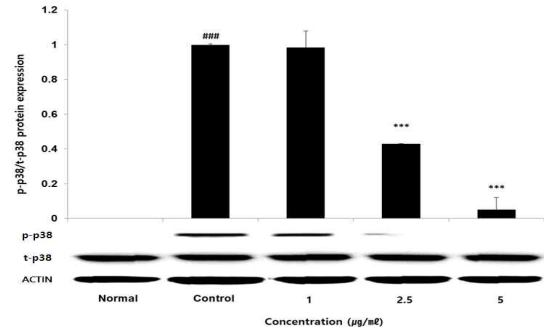


Fig. 15. The effects of BCS on p38 protein expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

$p < 0.001$ compared with the normal group and *** $p < 0.001$ compared with the control group.

(4) IκBa(inhibitor of nuclear factor kappa B)

IκBa 단백질 발현량을 측정한 결과, BCS 투여군은 모든 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 나타냈다($p < 0.001$)(Fig. 16).

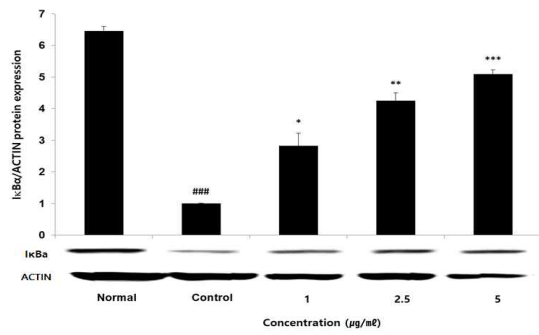


Fig. 16. The effects of BCS on IkBa protein expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

$p < 0.001$ compared with the normal group and *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared with the control group.

(5) NF-κB(nuclear factor kappa B)

NF-κB 단백질 발현량을 측정한 결과, BCS투여군은 모든 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.001$) (Fig. 17).

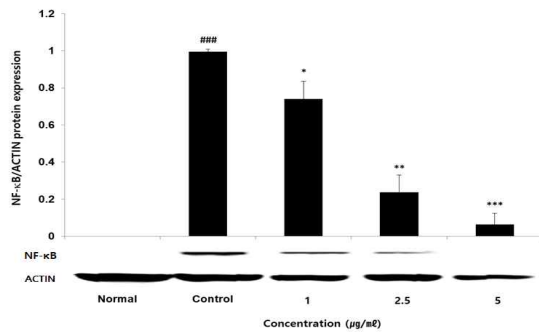


Fig. 17. The effects of BCS on NF-κB protein expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

$p < 0.001$ compared with the normal group and *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared with the control group.

3. 항소양증 효능

1) Histamine

Histamine 생성량을 측정한 결과, BCS 투여군은 2.5 µg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.001$) (Fig. 18).

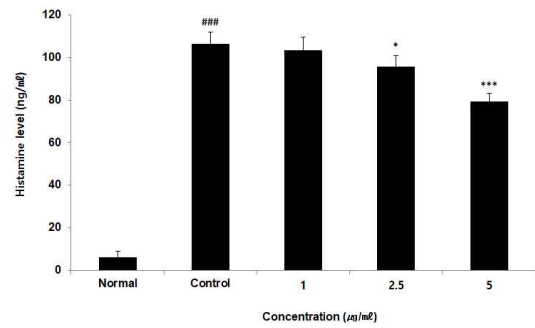


Fig. 18. The effects of BCS on histamine level in PMA/ionomycin-stimulated MC/9 cell.

$p < 0.001$ compared with the normal group and *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ compared with the control group.

2) LTB₄

LTB₄ 생성량을 측정한 결과, BCS투여군은 2.5 µg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.001$) (Fig. 19).

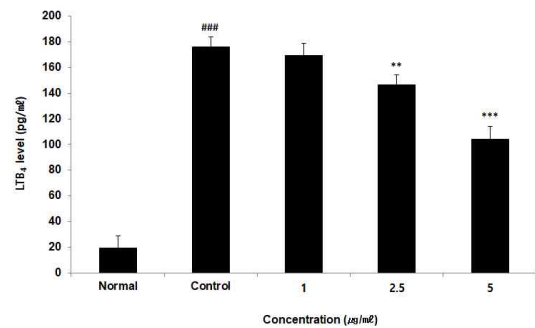


Fig. 19. The effects of BCS on LTB₄ level in PMA/ionomycin-stimulated MC/9 cell.

$p < 0.001$ compared with the normal group and *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ compared with the control group.

3) LTC₄

LTC₄ 생성량을 측정한 결과, BCS투여군은 2.5 µg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈다($p < 0.001$) (Fig. 20).

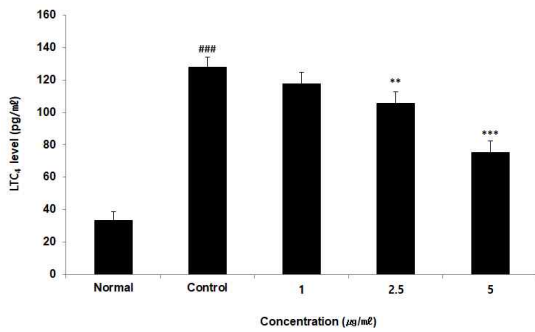


Fig. 20. The effects of BCS on LTC₄ level in PMA/ionomycin-stimulated MC/9 cell. ###p<0.001 compared with the normal group and ***p<0.001, **p<0.01 compared with the control group.

4. 항균 효능

1) *Escherichia coli*

Escherichia coli 생장억제환 크기를 측정한 결과, BCS투여군은 5 μg/ml 에서 생장을 억제하는 효능을 나타냈다(Fig. 21).

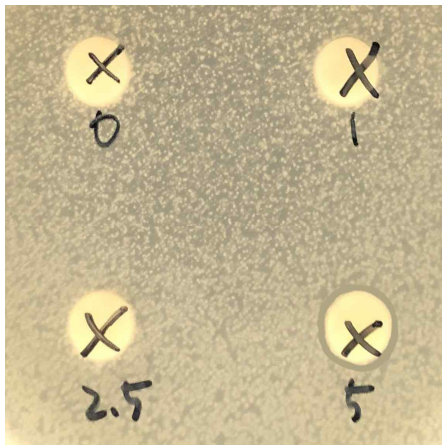


Fig. 21. The inhibition effects of BCS on *Escherichia coli* growth.

2) *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa 생장억제환 크기를 측정한 결과, BCS투여군은 5 μg/ml 이상에서 생장을 억제하는 효능을 나타냈다(Fig. 22).

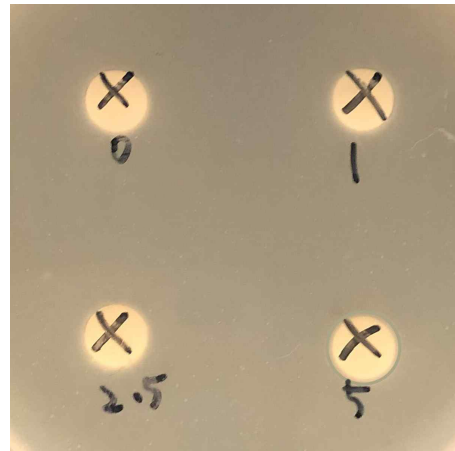


Fig. 22. The inhibition effects of BCS on *Pseudomonas aeruginosa* growth.

3) *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus 생장억제환 크기를 측정한 결과, BCS투여군은 모든 농도에서 생장을 억제하는 효능을 나타내지 않았다(Fig. 23).

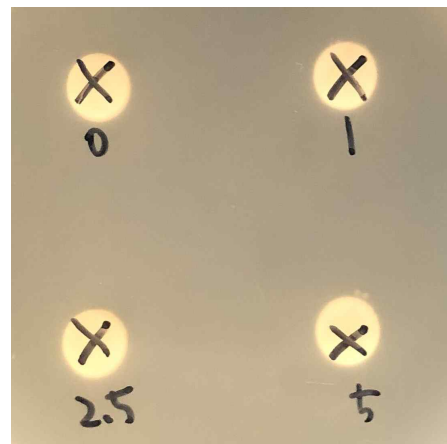


Fig. 23. The inhibition effects of BCS on *Staphylococcus aureus* growth.

4) *Aspergillus niger*

Aspergillus niger 생장억제환 크기를 측정한 결과, BCS투여군은 모든 농도에서 생장을 억제하는 효능을 나타내지 않았다(Fig. 24).

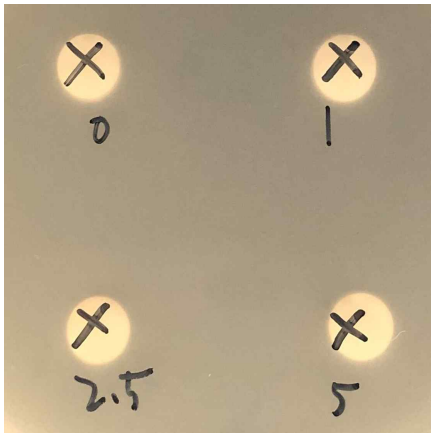


Fig. 24. The inhibition effects of BCS on *Aspergillus niger* growth.

IV. 고찰

반총산은 《太平惠民和劑局方 卷之三》에 “治男子, 婦人脾胃虛冷, 攻築心腹, 連脇肋刺痛, 胸膈痞悶, 背膊連項拘急疼痛, 不思飲食, 時或嘔逆, 霍亂轉筋, 腹冷泄瀉, 膀胱氣刺, 小腸及外腎腫痛, 及治婦人血氣攻刺, 癥瘕塊硬, 帶下赤白, 或發寒熱, 胎前產後惡血不止, 臍腹疼痛. 應一切虛冷, 不思飲食, 并宜服之.”¹²⁾라고 수록된 처방으로 虛冷에서 오는 각종 통증성 증상을 치료하는 처방이다.

반총산을 구성하는 약물의 효능을 살펴보면 蒼朮은 燥濕健脾하고, 三稜, 蓬朮, 青皮는 破積消痞하고, 砂仁, 檳榔은 理氣하고, 玄胡索은 心腹冷氣를 제거하며 活血止痛하고, 丁香皮는 溫中降逆하고, 肉桂, 乾薑은 祛寒溫中하고, 白茯苓은 滲濕導氣하고, 甘草는 和諸藥和中하고, 蔥白은 通陽理血한다. 총괄하면 健脾溫中, 破積, 活血止痛의 효능으로⁵⁾ 脾胃虛冷, 心腹攻刺, 連胸脇膀胱, 小腸腎氣作痛 등의 증상^{13,14)}을 치료하는데 임상적으로는 胃腸, 小腹(下腹部), 前陰, 子宮 등 虛冷에

서 오는 각종 통증성 증상을 치료하여⁶⁾ 여성 질환 치료에 다용되고 있다.

한의학에서 만성골반염증성 질환은 ‘痛經’, ‘帶下’, ‘癥瘕’, ‘不妊’ 등의 범주로 볼 수 있고³⁾, 產後發熱, 崩漏, 婦人腹痛, 月經不調, 熱入血室 등에서 관련된 증상들을 볼 수 있다⁴⁾. 변증유형은 濕熱과 血瘀가 주를 이루고 肝腎不足, 脾腎虧虛, 肝鬱氣滯 등이 결합된 형태를 이루며, 清熱解毒, 消腫排膿, 祛瘀止痛의 효능이 있는 敗醬草, 紅藤, 赤芍藥, 蒲公英, 丹蔘 등의 약물을 사용하며, 清熱利濕, 祛瘀散結의 효능을 지닌 紅藤敗醬散, 復方紅藤敗醬散 등의 처방에 가감하여 치료한다³⁾.

임상에서 여성의 만성골반통의 한의학적 치료에 반총산이 다용되는 연구⁷⁾가 보고되었고, 실험 연구로는 반총산 및 가미반총산이 담즙분비와 진통작용에 미치는 영향⁸⁾, 반총산 및 반총산가미방이 Trypsin 췌장염에 미치는 영향⁹⁾, 반총산이 자궁근종 세포의 사멸과 cell apoptosis에 미치는 영향¹⁰⁾ 등이 보고되었다.

반총산을 구성하는 약물의 효능을 살펴보면 蒼朮은 燥濕健脾하고, 三稜, 蓬朮, 青皮는 破積消痞하고, 砂仁, 檳榔은 理氣하고, 玄胡索은 心腹冷氣를 제거하며 活血止痛하고, 丁香皮는 溫中降逆하고, 肉桂, 乾薑은 祛寒溫中하고, 白茯苓은 滲濕導氣하고, 甘草는 和諸藥和中하고, 蔥白은 通陽理血한다^{13,14)}. 총괄하면 健脾溫中, 破積, 活血止痛의 효능으로⁵⁾ 脾胃虛冷, 心腹攻刺, 連胸脇膀胱, 小腸腎氣作痛 등의 증상을 치료¹³⁾하는데 임상적으로는 胃腸, 小腹(下腹部), 前陰, 子宮 등 虛冷에서 오는 각종 통증성 증상을 치료⁶⁾하여 여성 질환 치료에 다용되고 있다.

한의학에서 만성골반염증성 질환은 ‘痛

經', '帶下', '癥瘕', '不妊' 등의 범주로 볼 수 있고³⁾, 產後發熱, 崩漏, 婦人腹痛, 月經不調, 熱入血室 등에서 관련된 증상들을 볼 수 있다⁴⁾. 변증유형은 濕熱과 血瘀가 주를 이루고 肝腎不足, 脾腎虧虛, 肝鬱氣滯 등이 결합된 형태를 이루어며, 清熱解毒, 消腫排膿, 祛瘀止痛의 효능이 있는 敗醬草, 紅藤, 赤芍藥, 蒲公英, 丹蔘 등의 약물을 사용하며, 清熱利濕, 祛瘀散結의 효능을 지닌 紅藤敗醬散, 復方紅藤敗醬散 등의 처방에 가감하여 치료한다³⁾.

임상에서 여성의 만성골반통의 한의학적 치료에 반총산이 다용되는 연구⁷⁾가 보고되었고, 실험 연구로는 반총산 및 가미반총산이 담즙분비와 진통작용에 미치는 영향⁸⁾, 반총산 및 반총산가미방이 Trypsin 췌장염에 미치는 영향⁹⁾, 반총산이 자궁근종 세포의 사멸과 cell apoptosis에 미치는 영향¹⁰⁾ 등이 보고되었다.

골반염증성 질환은 여성 상부생식기에 발생하는 감염성 질환으로 여러 균 감염의 특징을 지니며 성생활이 왕성한 젊은 가임연령에서 주로 발생하며 자궁내막염, 난관염, 골반복막염, 난관난소고름집 등으로 구성된다¹⁾. 이 질환은 급성기 증상 뿐만 아니라 난관인자 불임증, 자궁외임신, 만성 골반통 등의 후유증을 남길 수 있어서 임상적으로 중요하다¹⁵⁾. 대부분 임균(*Neisseria gonorrhoea*)와 클라미디아(*Chlamydia trachomatis*)의 감염에 의해 발생하며, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*와 같은 박테리아의 감염에 의해 발생하기도 한다¹⁶⁾. 치료는 광범위 항생제 투여로 이루어지며 급성 증상 완화와 감염 및 염증 반응의 결과로 발생하는 장기 후유증을 예방하는 것이다¹⁵⁾. 골반염의

임상적 완치율은 외래 통원 치료는 79.4%, 입원 치료의 경우 81.6%로 나타났다¹⁵⁾고 장기 추적한 결과 재발, 만성 골반통, 불임, 자궁외임신, 난관 폐쇄 등의 후유증이 발생하여 여성 건강관리 측면에서 많은 어려움이 있다¹⁵⁾.

본 연구에서는 *in vitro*에서 반총산의 항산화 효능, RAW 264.7 세포에서 항염증 효능, MC/9 세포에서 항소양증 효능, 여러 균주에 대한 항균 효능을 규명하기 위한 실험을 진행하였다.

반총산의 세포독성을 알아보기 위해 세포생존율을 측정된 결과, 생쥐 유래 대식세포인 RAW 264.7 세포와 생쥐 유래 비만세포인 MC/9 세포에 반총산을 처리하였을 때, 5 µg/ml 이하 농도에서 95% 이상의 세포생존율을 나타내었다. 이러한 결과는 세포독성이 없는 조건에서 BCS투여군이 대식세포 및 비만세포 활성억제능을 가질 수 있을 가능성을 보여 주는 것이다.

산화적 스트레스는 생체내 radical 생산 및 소거의 균형이 무너진 상태로, 약제, 방사선, 허혈 등의 여러 가지 요인으로 발생할 수 있다. 이로 인해 DNA 돌연변이, 세포사(apoptosis)유도, 염증반응 및 지질 과산화를 포함한 세포상해 등의 다양한 결과가 나타나서, 다양한 급성 및 만성 질환을 야기한다¹⁷⁾.

항산화 효능을 측정된 결과 BCS투여군은 DPPH radical 소거능에서 농도의존적인 증가가 나타났고, ABTS radical 소거능 또한 농도 의존적인 증가가 나타났다. DPPH radical은 화학적으로 안정화된 free radical을 가지고 있는 수용성 물질로 515 nm ~ 520 nm 부근에서 최대 흡광도를 가지며, 항산화 활성이 있는

물질과 만나면 전자를 내어주면서 radical (DPPH)이 소멸 되고 색깔이 노랗게 변한다. ABTS radical은 짙은 청록색이며 항산화물질과 반응하면 하늘색(거의 투명흰색에 가까운)이 된다. DPPH radical 소거능 및 ABTS radical 소거능이 농도의존적으로 증가한 실험결과로 반총산의 항산화 효과를 확인하였다.

반총산의 항염증 효능을 평가하기 위하여 LPS로 유도된 RAW 264.7세포 모델을 이용하였으며, 산화적 손상시험인 ROS와 NO, 염증성단백질분석을 위해 IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE₂ 생성량을 검사하였고, iNOS, COX-2 유전자 발현량 및 ERK, JNK, p38, I κ B α , NF- κ B 단백질 발현량을 측정하였다. 유전자 발현은 Real-Time PCR로, 단백질 발현은 western blot으로, 사이토카인이나 다른 물질들은 항원항체 반응을 이용하여 발색이나 흡광을 보는 방식(면역분석법)으로 측정하였다.

활성산소(ROS)는 화학적으로 반응성이 뛰어난 산소 원자를 포함하는 분자이다. 세포 내 활성산소 물질이 생성과 분해 과정의 불균형으로 인해 일시적으로 또는 지속적으로 과하게 많아지는 상태를 산화적 스트레스(oxidative stress)라고 부른다¹⁸⁻⁹⁾. 과량의 활성산소(ROS)는 산화적 스트레스로 인해 생체내에서 DNA, 세포막 등에 작용하여 산화적 손상을 일으킴으로써 만성염증성 질환을 일으키게 된다²⁰⁾.

산화질소(NO)는 반응성이 높은 생체 생성 라디칼로 신경전달이나 혈관 이완, 세포매개성 면역등에서 중요한 역할을 하며 NOS(nitric oxide synthase)에 의해 L-arginine과 O₂로부터 생성되고¹⁷⁾, ROS

처럼 산화되어 활성 NO로 변화된다. 활성 NO는 단백질과 지질의 과산화를 유도하고 세포독성을 야기하는 강력한 산화제인 peroxyxynitrite(ONOO-)를 생산한다. 염증매개물질에 노출된 세포에 의해 생성된 NO는 다양한 염증성 질환 시 증가된다²¹⁾.

염증매개물질인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 염증단계에서 중추적 역할을 한다고 알려져 있는데, 이러한 cytokine들은 서로 상호작용이 있는 것으로 알려져 있으며 LPS등의 염증자극물질에 의해 생성이 유도된다고 보고 되었다²²⁾. IL-1 β 는 염증반응의 핵심 중재자로, 만성 질환과 급성 조직 손상 시 손상을 악화시킨다²³⁾. IL-6는 자가면역질환 또는 감염성질환 환자에 발열을 유도하며 염증 초기에 생성된다²⁴⁻⁵⁾. TNF- α 는 tumour cell에 세포독성을 나타내며, 만성 염증성 반응과 관련되어 있다²⁶⁾.

iNOS, COX-2의 발현에 관여하는 것으로 알려진 대표적인 전사조절인자는 NF- κ B로, NF- κ B는 세포자멸의 억제, 세포주기 조절, 종양 형성 등과도 관련이 있으며, virus나 bacteria 감염 시에 유도되는 염증반응으로 활성화되어 iNOS나 TNF- α 의 유전자 발현에 관련된다. NF- κ B가 LPS등에 의해 자극되어 NF- κ B 신호 캐스케이드가 활성화되고 I- κ B가 degradation되면서 NF- κ B가 핵으로 translocation하여 COX-2나 iNOS등의 전사를 유도한다. I- κ B protein 종류 중 세포에서 가장 풍부한 NF- κ B의 억제성 단백질은 I κ B α 이다²⁷⁻⁸⁾.

COX-2는 염증매개물질인 PGE₂ 생성을 촉매하는 효소로서 iNOS와 마찬가지로 염증반응에 중요한 역할을 한다¹⁷⁾.

PGE₂는 프로스타글란딘 계통의 신호 분자로서 염증과 관련된 광범위한 생물학적 효과를 도출하는 생체 활성 물질이다. PGE₂는 세포증식, 세포사멸, 혈관신생, 염증, 면역감시에 다양한 영향을 미친다²⁹⁾.

항염증 효능을 측정한 결과, BCS투여군에서 ROS, NO, IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE₂ 생성량은 대조군에 비하여 유의성 있는 감소가 나타났으며, 또한 iNOS, COX-2 유전자 발현량과 NF- κ B 단백질 발현량은 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다. IkBa 단백질 발현량은 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다.

Mitogen-activated protein kinase(MAPK) 신호전달체계는 염증, 세포 응력 반응, 세포의 분화·분열·증식, 신진대사, 운동성 및 세포사멸 등과 같은 많은 세포 과정을 조절하는 데 중요하며, 포유류 세포에서 MAPK 연쇄반응은 ERK, JNK 및 p38 kinase가 포함된다³⁰⁾.

MAPKs는 세포의 성장과 분화 및 cytokine과 스트레스 제어에 중요한 역할을 한다. 따라서 BCS의 염증 억제 메커니즘이 MAPKs를 경유하는지 알아보기 위해서 ERK, JNK, p38 인산화를 Western blot을 통하여 확인한 결과, LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 cell에 BCS를 처리한 경우 ERK, JNK, p38 인산화를 2.5 μ g/ml 이상의 농도에서부터 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였다.

항소양증 효능을 확인하기 위해 MC/9 cell을 가지고 Histamine, LTB₄, LTC₄ 생성량을 측정하였다. 골반염의 증상 중 帶下(외음질염증)시 동반하는 소양증이 있기 때문에 항소양증을 확인하고자 하

였으며, MC/9 cell은 알레르기 반응을 매개하는 중요한 세포로 자극원에 의해 활성화되면 arachidonic acid 대사물질과 염증반응성 cneutroptokine를 분비해서 염증반응을 촉진할 뿐만 아니라 histamine과 같은 소양감을 유발하는 물질을 방출한다³¹⁾. LTB₄는 5-lipoxygenase, 5-lipoxygenase-activator Protein, LeukotrieneA4 hydrolase의 순차적 활동을 통해 arachidonic acid에서 생성되는 전염증성 지질 매개체로, 조직 염증을 증가시키고 연장시키는 능력을 나타내는 다수의 염증성 cytokine과 매개체의 생산을 자극하여 염증의 발생에 중요한 역할을 한다^{32,33)}. LTC₄에 의해서는 강력한 기도나 혈관평활근의 수축작용, 기도점막분비작용, 혈관 투과성 항진작용이 있다. 아나필락시스 때 지연반응물질(SRS-A)의 주체를 이루는 물질로 생각하고 있다³⁴⁾. Histamine, LTB₄, LTC₄ 생성량을 측정한 결과, 모두에서 BCS투여군은 2.5 μ g/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해서 유의성 있는 감소가 나타났다.

항균효능을 평가하기 위해서 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*의 성장억제환의 크기를 측정하였다. 이들은 인체의 피부 점막에 상재하며 쉽게 이환되는 균종들로 특히 외음부 및 질의 염증을 일으키는 원인균들 중 일부이며³⁵⁾, 세균(bacteria)은 바이러스 다음으로 흔한 인체 감염 원인이다³⁶⁾. 측정결과 그람양성균인 포도알균(*Staphylococcus aureus*)과 사상균인 흑국균(*Aspergillus niger*)은 모든 농도에서 성장을 억제하지 못하였으나, 그람음성균인 대장균(*Escherichia coli*)과 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)은 5 μ g/ml

에서 생장을 억제하는 효능이 나타났다.

이상의 결과로 반총산은 항산화, 항염증, 항소양증, 항균효과가 있다는 것이 실험적으로 확인되었으며, 향후 추가적인 연구가 이루어진다면 여성질환 중 만성골반염을 포함한 다양한 염증성 통증의 치료에 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

반총산의 항산화, 항염증, 항소양증, 항균효능을 검증하기 위하여 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세포생존율을 측정된 결과, 생쥐 유래 대식세포인 RAW 264.7 cell과 생쥐 유래 비만세포인 MC/9 cell에 BCS를 처리하였을 때, 5 µg/ml 이하 농도에서 95% 이상의 세포생존율을 나타내었다.
2. 항산화효능을 측정된 결과, BCS투여군은 DPPH 및 ABTS radical 소거능을 농도 의존적으로 증가시켰다.
3. 항염증 효능을 측정된 결과, BCS투여군은 ROS, NO, IL-1β, IL-6, TNF-α, PGE₂의 생성량이 대조군에 비해 유의하게 감소시켰으며, 또한 iNOS, COX-2 유전자 발현량과 ERK, JNK, p38, NF-κB 단백질 발현량이 대조군에 비해서 유의하게 감소시켰다. IκBa 단백질 발현량은 대조군에 비해서 유의하게 증가시켰다.
4. 항소양증 효능을 측정된 결과, BCS투여군은 histamine, LTB₄, LTC₄ 생성량이 대조군에 비해서 유의하게 감소

시켰다.

5. 항균 효능을 측정된 결과, BCS투여군은 5 µg/ml 농도에서 *escherichia coli*, *pseudomonas aeruginosa*의 생장을 억제하였으나, *staphylococcus aureus* 와 *aspergillus niger*의 생장은 억제하지 못하였다.

Received : Jul 16, 2021

Revised : Jul 19, 2021

Accepted : Aug 27, 2021

References

1. Korean Society of Obstetrics & Gynecology. Gynecology. 5th rev. ed. Seoul:Korea Medical Book Publishing Company. 2015:154-6.
2. Cho MK. Update on The Management of Pelvic Inflammatory Disease. J Korean Obstet Gynecol. 2010;53(11):961-6.
3. The Society of Korean Medicine Obstetrics & Gynecology. Korean Medicine Obstetrics and Gynecology(下). 3rd rev. ed. Seoul: Uiseongdang. 2016:331-44.
4. Kim JH, Lee TG. Literature review on pelvic inflammatory disease. J Korean Obstet Gynecol. 1994;7(1):31-46.
5. Yoon KY. Korean Medicine Clinical Herbal Formula Science. Seoul:Myeongbo Pubilsh. 1989:81.
6. Kee SJ, et al. Study on Applicable Pathology and Its Application for *Banchong-san*. Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine.

- 1998;12(2):27-32.
7. Moon HY, et al. A Review of the Clinical Study on Korean Medicine Treatment for Women with Chronic Pelvic Pain. J Korean Obstet Gynecol. 2018;31(3):50-60.
 8. Jang YH. Effect of *Banchong-san* and *Gamibanchong-san* on bile secretion and analgesic action. Herbal formula science. 1990;1(1):103-25.
 9. Kim KR, et al. Effects of *Banchong-san* and *Banchong-sankameebangs* on the Pancreatitis Evoked by Trypsin. The Journal of Kyung Hee University Medical Center. 1987;3(2):268-80.
 10. Kim Yu, et al. A study on the inhibitory effect of *Banchong-san* on the growth of Human uterine myomal cells, and Apoptosis. J Korean Obstet Gynecol. 2003;16(2):34-44.
 11. Heo J. Dongui bogam (東醫寶鑑). Hadong :Dongui bogam Publish. 2005:821.
 12. Liu JY. Taepyeonghyeminhwajegukbang (太平惠民和劑局方). Beijing:People's Medical Publishing House company. 1985:127-8.
 13. Whang DY. PangYakHapPyon(方藥合編). Seoul:Youngrim Publish. 2003:311.
 14. The Compilation Committee of the teaching materials for Korean college of oriental medicine. Herbal Medicine. 6th. Seoul:Youngrim Publish. 2005:387.
 15. The Korean Society of Gynecologic Endocrinology. Gynecologic Endocrinology. 1st. Seoul:Koonja Publish. 2012:781-4.
 16. Ljubin-Sternak S, Meštrovic T. Chlamydia trachomatis and Genital Mycoplasmas: Pathogens with an Impact on Human Reproductive Health. Journal of Pathogens. 2014;2014:183167.
 17. Oh YT, Kim SC, Lee BW. Estimation Study of the herbal formula's effects by the compositional herbal effects (Guideline of the herbal effects intensity). J Korean Medical Classics. 2008;21(2):49-57.
 18. Aldred EM. Pharmacology A Handbook for Complementary Healthcare Professionals. 1st. Amsterdam:Elsevier. 2009:41-52.
 19. Ray PD, Huang BW, Tsuji YS. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. Cell Signal. 2012;24(5):981-90.
 20. Anija Y, Naito A. Oxidative stress-induced activation of microsomal glutathione S-transferase in isolated rat liver. Biochem Pharmacol. 1993;45(1):37-42.
 21. Lim DG. Oxidative Stress; Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide. Korean Society of Critical Care Medicine. 2004;19(2):81-5.
 22. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. Annual Review of Immunology. 1996;14(1):397-440.
 23. Lopez-Castejon GR, Brough DV. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. Cytokine & Growth Factor Reviews. 2011;22(4):189-95.
 24. Tanaka TS, Narazaki MS, Kishimoto TM. IL-6 in Inflammation, Immunity,

- and Disease. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014;6(10):a016295.
25. Barner PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. J Clin Invest. 2008;18(11):3546-56.
26. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Production of tumor necrosis factor- α , interleukin 1- β , interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. Neuropeptides. 2003;37(6):355-61.
27. Lee AK, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by sauchinone effects on I- κ B α phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. Br J pharmacol. 2003;139(1):11-20.
28. Chen F, Castranova VC, Shi XG. New insights into the role of nuclear factor- κ B in cell growth regulation. Am J Pathol. 2001;159(2):387-97.
29. Xiong HZ, et al. Effects of taraxasterol on iNOS and COX-2 expression in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. J Ethnopharmacol. 2014;155(1):753-7.
30. Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology. Encyclopedia of Biochemistry. 1st. Seoul:Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology. 2019:123.
31. Church MK, Levi-Schaffer F. The human mast cell. J Allergy Clin Immunol. 1997;99(2):155-60.
32. Li PP, et al. LTB₄ causes macrophage-mediated inflammation and directly induces insulin resistance in obesity. Nat Med. 2015;21(3):239-47.
33. Crooks SW, Stockley RA. Leukotriene B₄. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 1998;30(2):173-8.
34. Kang YH. Encyclopedia of Life Science. 1st. Seoul:Academy books. 2008:504.
35. Lee KH, et al. Anti-Microbial and Anti-Wrinkle Effect of Kaempferol and Kaempferol Rhamnosides isolated from Hibiscus cannabinus L. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 2012;20(6):454-60.
36. The Korean society of pathologists. Textbook of pathology. 8th. Seoul:Komoonsa. 2017:176.