

LPS로 유도된 염증모델에 대한 청포죽어탕의 억제 효과

원광대학교 한의과대학 한방부인과학교실
홍가경, 이수형, 정현태, 김송백

ABSTRACT

Inhibitory Effects of *Cheongpochukeo-tang* on LPS-induced Inflammation Model

Ka-Kyung Hong, Soo-Hyung Lee, Hyun-Tae Jung, Song-Baek Kim
Dept. of OB&GY, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Objective: This study was performed to investigate the inhibitory effect of *Cheongpochukeo-tang* (CCT) on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation model.

Methods: RAW 264.7 cells were pre-treated with CCT and incubated with LPS (500 ng/ml) after 1 hour. Cell viability was measured by MTT assay to figure out cytotoxicity of CCT. The production of nitric oxide and mRNA expression of pro-inflammatory cytokine were measured. And the activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) were examined to figure out molecular mechanisms of CCT's anti-inflammatory effects. In addition, mice survival rate and cytokine levels of serum were observed after treated with CCT. And mice liver tissues were observed and their cytokines levels in liver tissue were measured.

Results: CCT did not have cytotoxic effect in RAW 264.7 cells. It inhibited LPS-induced nitric oxide (NO) production, but showed an increase in NO by itself at 2 mg/ml concentration. CCT inhibited mRNA expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α in a dose dependant and the activation of MAPKs and NF- κ B. In addition, CCT reduced mortality in the LPS-induced mouse model and inhibited production of cytokines in mouse serum and liver tissue.

Conclusion: The results suggest that CCT could reduce LPS-induced inflammation by inhibiting MAPKs and NF- κ B activation, NO production, and pro-inflammatory cytokines secretion. Thereby, CCT could be effective medicine for the inflammatory disease.

Key Words: *Cheongpochukeo-tang*, Inflammation, Lipopolysaccharide (LPS), RAW 264.7 cell, Cytokines

I. 서 론

염증은 바이러스, 미생물, 이물질, 외상이나 화학 약물 등에 의해 조직이 손상되었을 때 유발되는 일종의 면역 반응으로, 이 과정에서 발열, 동통, 부종, 발적 등의 증상이 나타나며 결과적으로 유해 자극의 제거와 조직 손상의 억제 및 회복을 가져 온다¹⁾. 그러나 과도한 염증 반응은 세포조직의 변화, 혈장이나 혈구의 비정상적인 삼출과 순환장애, 세포 증식²⁾을 통하여 조직손상을 지속 혹은 악화시킬 수 있고, 다양한 염증성 질환을 유발한다.

부인과 영역에서 주요 염증성 질환 중 하나인 골반염증성질환은 자궁경부 상부의 생식기에 박테리아 혹은 바이러스 감염에 의한 염증이 발생한 것으로, 자궁내막염, 난소주위염, 난관염, 난소농양, 골반내 복막염 등을 포함한다. 이 질환은 발열, 복통 등 급성 증상뿐만 아니라 장기적 후유증을 유발할 수 있는데, 특히 난관 및 복막 인자로 인한 난임의 주요 원인이 된다³⁻⁵⁾. 따라서 골반염증성질환의 치료는 난임 예방의 효과를 가져올 수 있다.

청포축어탕(淸胞逐瘀湯, *Cheongpochukeo-tang*, CCT)은 《韓方製劑解說集》⁶⁾에 수록된 처방으로 1980년대 초 아급성 내지 만성 골반생식기 질환을 치료하기 위해 만들어진 膈下逐瘀湯 가감방이다⁷⁾. 이 처방은 濕熱下注 및 瘀血氣滯로 인한 골반강내 질환, 특히 급·만성 골반염증성질환을 치료하는 것을 목적으로 한다⁶⁾. 임상에서는 하복통, 월경통, 골반통 등의 증상에 효과가 있다고 보고되었으며⁸⁾, 자

궁내막증으로 유발된 복강 내 유착에 인한 난임⁹⁾, 만성 골반염¹⁰⁻²⁾에 대한 치료 증례가 발표되었다.

청포축어탕에 관련된 기존의 연구로는 혈전증과 고점도혈증에 대한 효과⁷⁾, 소염, 해열, 진통, 항균, 항혈전에 대한 효과¹³⁾ 등이 보고된 바 있다. 그러나 청포축어탕의 항염증 효능에 대한 구체적인 기전과 효과에 대한 보고는 부족한 실정이다.

이에 본 연구에서는 청포축어탕의 항염증 효과를 실험적으로 규명하고자 in-vivo와 in-vitro에서 연구를 진행하였다. Lipopolysaccharide(LPS)로 염증 유도된 RAW 264.7 cell에서 염증 매개물질인 nitric oxide(NO) 및 염증성 cytokine의 생성에 청포축어탕이 미치는 영향을 관찰하고, 그 기전을 조사하기 위해 mitogen-activated protein kinases(MAPKs), nuclear factor kappa B(NF-κB)의 활성을 관찰하였다. 또한 LPS로 자극한 mouse의 생존율과 사이토카인 생성, 간 조직의 염증 반응에 대한 청포축어탕의 효과를 관찰하였으며, 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 약 재

본 실험에 사용된 청포축어탕은 《한방여성의학》⁴⁾에 수록된 내용에 의거하였으며, 약재는 원광대학교 전주한방병원에서 구입하여 정선한 것으로 사용하였다. 한 첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Composition of *Cheongpochukeo-tang*

Name of herb	Scientific name	Herbal name	Weight (g)
金銀花	<i>Lonicera japonica</i> Thunb	<i>Lonicerae Flos</i>	12
薏苡仁	<i>Coix lachryma-jobi var ma-yuen</i> Stapf	<i>Coicis Semen</i>	8
敗 醬	<i>Patrinia villosa</i> Thunb	<i>Patriniae Radix</i>	8
續 斷	<i>Phlomis umbrosa</i> Turcz	<i>Phlomidis Radix</i>	8
香附子	<i>Cyperus rotundus</i> Linne	<i>Cypen Rhizoma</i>	6
牛 膝	<i>Achyranthes bidentata</i> Blume	<i>Achyranthis Radix</i>	4
當 歸	<i>Angelica gigas</i> Nakai	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	4
赤芍藥	<i>Paeonia lactiflora</i> Pallas	<i>Paeoniae Radicis rubra</i>	4
川 芎	<i>Cnidium officinale</i> Makino	<i>Cnidii Rhizoma</i>	3
牡丹皮	<i>Paeonia suffruticosa</i> Andrews	<i>Moutan Radicis Cortex</i>	3
玄胡索	<i>Corydalis ternata</i> Nakai	<i>Corydalis Tuber</i>	3
五靈脂	<i>Trogopterus xanthipes</i> Milne-Edwards	<i>Trogopterorum Faeces</i>	3
枳 殼	<i>Citrus aurantium</i> Linne	<i>Aurantii Fructus Immaturus</i>	2
甘 草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	<i>Glycyrrhizae Radix et Rhizoma</i>	2
Total Amount			70

2) 시 약

세포 배양용 시약인 Fetal bovine serum (FBS), RPMI Medium 1640, penicillin-streptomycin 등은 Gibco BRL(Grand Island, USA)사에서 구입하였고, 시약 중 Chloroform, TRI-zol, Sodium dodesyl sulfate(SDS), Acrylamide, Tris-HCL, lipopolysaccharide(LPS) 등은 SIGMA (St. Louis, USA)사에서 구입하였다. 항체인 anti-phospho-extracellular signal-regulated protein kinase(ERK)1/2, anti-phospho-p38, anti-phospho-c-Jun amino-terminal kinases(JNK)는 Cell Signaling (MA, USA)사에서 구입하였고, Anti-I κ -Ba, Anti- β -actin, Anti-ERK, Anti-JNK, Anti-p38는 Santa Cruz(CA, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

3) 세포주

한국세포주은행(KCLB; 서울, 대한민국)에서 mouse의 대식세포주인 RAW

264.7 cell을 분양받았다. 세포배양은 10% Fetal bovine serum(FBS)과 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 RPMI-1640 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건 하에 시행하였다.

3) 실험동물

실험에 사용된 C57BL/6 mouse(weight 15~20 g, aged 6 weeks, female)는 오리엔트 바이오(성남, 경기도, 대한민국)에서 구입하였고, 일주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험을 시행하였다. 모든 실험은 원광대학교에서 정해놓은 동물관리규정을 준수하며 진행하였다.

2. 연구 방법

1) 약물 추출

실험에 사용된 약재는 물을 용매로 사용한 추출방법을 이용하여 본 실험에 사용하였다. 청포축어탕 2첩(140 g) 분량을 물 1 l와 함께 약탕기(대웅, 대한민국)에서 2시간 30분 전탕하여 430 cc를 얻은 후, 전탕한 액을 여과하고 -80°C에서 동결 건

조하였다. 동결 건조시킨 후 나온 분말 가루는 39.9 g으로 수율은 28.5%였고, 실험 시 분말가루를 3차 증류수에 희석하여 여과 후 실험에 필요한 농도로 사용하였다.

2) MTT assay¹⁴⁾

RAW 264.7 cell의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT) 환원을 활용하여 측정하였다. 세포들은 RPMI-1640 배지에서 2×10^5 /ml의 밀도로 현탁한 후, 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml의 농도로 CCT를 처리하였다. 이때 CCT 농도는 기존에 CCT를 사용한 in vitro 연구가 없었기에 본 연구에서 임의로 설정하였다. CCT 처리한 세포 배지를 24시간 동안 배양한 뒤, 다시 MTT용액을 첨가한 후 30분 동안 배양하였다. 상층액을 제거한 후 Dimethyl Sulfoxide(DMSO)를 첨가하여 formazan을 용해하고, 생성된 용해액을 96-well plate에 loading하였다. Spectrophotometer (MD, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정했다. 아무 처치도 하지 않은 군과의 비율로 세포의 생존율을 나타냈다.

3) Nitric Oxide 농도의 측정¹⁵⁾

Nitric Oxide(NO)의 농도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다. 그리스 시약(Griess reagent: 0.5%의 sulphanilamide, 2.5%의 phosphoric acid 및 0.5%의 naphthylethylendiamide)과 아질산염이 화학 반응하여 형성된 보라색의 아조염은 NO의 농도와 일치한다. 이를 이용해 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측

정하였다. 세포들은 RPMI-1640배지에서 2×10^5 의 밀도로 현탁하였고, 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml의 농도로 CCT를 처리하였다. LPS(500 ng/ml)로 자극한 후 24시간 동안 배양하고, 세포 상층액을 취해 96-well plate에 loading하였다. 100 μ l의 그리스 시약을 첨가한 뒤, spectrophotometer(MD, USA)를 사용해 540 nm에서 혼합물의 흡광도를 측정하였다.

4) RNA 분리 및 Quantitative Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Easy Blue(Intron Biotechnology, USA) 시약을 통해 Total RNA를 추출하였다. 우선 배양한 세포에 각각 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml 농도의 CCT를 1시간 전 처리한 뒤, LPS로 자극하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 이후 배양한 세포를 Phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세척하고, PBS 1 ml씩 가해 세포를 포집한 후, 원심분리를 하여 바닥에 남은 세포에 Easy Blue 용액을 1 ml 넣어 세포를 용해시켰다. 여기에 100 μ l의 chloroform 용액을 가한 뒤, 생성된 용액을 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 그 후 2-propanol과 1:1로 섞은 뒤 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액은 버리고, 남은 침전물을 80% ethanol로 2회 세척 후 건조시켰다. 마지막으로 침전물에 DEPC 처리한 증류수를 15 μ l씩 넣어 RNA를 용해시킨 뒤 정량하였다.

mRNA 발현을 정량적으로 표현하기 위해서 정량중합효소반응을 측정하였으며, 합성된 cDNA 1 μ l, Real time PCR aster mix 4 μ l(Roche, Switzerland), primer

및 probe를 넣고 PCR 조건으로 반응시켰다. PCR 조건은 92°C에서 30초, 60°C에서 45초, 72°C에서 30초를 40 cycle로 하였다. 정량 중합 효소 반응에 쓰인 forward(f)

와 reverse(r) primer 및 TaqMan probe는 Roche 社(Basel, Switzerland)에서 합성한 것을 사용하였다. 사용한 primer는 다음과 같다(Table 2).

Table 2. The Primer of IL-1 β , IL-6, TNF- α

Gene	Primer
IL-1 β *	5' -TTG ACG GAC CCC AAA AGA T-3' (forward)
	5' -GAA GCT GGA TGC TCT CAT CTG-3' (reverse)
	universal probe, M15131.1V (probe)
IL-6†	5' -TTC ATT CTC TTT GCT CTT GAA TTA GA-3' (forward)
	5' -GTC TGA CCT TTA GCT TCA AAT CCT-3' (reverse)
	universal probe, M20572.1V (probe)
TNF- α ‡	5' -TCT CTT CAA GGG ACA AGG CTG-3' (forward)
	5' -ATA GCA AAT CGG CTG ACG GT-3' (reverse)
	5' -CCC GAC TAC GTG CTC CTC ACC CA-3' (probe)

*IL-1 β : Interleukin-1 beta, †IL-6 : Interleukin-6, ‡TNF- α : Tumor necrosis factor-alpha

5) Western blot analysis

RAW 264.7 cell을 60 mm culture dish에 5×10^6 cells/dish로 세포를 배양하고 serum free media(RPMI 1640)로 12시간 starvation 시켰다. 이후 CCT(0.5 mg/ml)를 전처리 하고 LPS(500 ng/ml)로 자극하였다. 0, 15, 30, 60분 뒤에 cold PBS로 3회 세척한 후 세포를 획득하였다. 획득한 세포를 원심분리(5,000 rpm, 5 min)하여 그 상층액을 버리고 cell pellet을 수거하였다. RIPA lysis buffer(RIPA buffer 1 ml+phosphatase inhibitor 10 μ l +protase inhibitor 10 μ l)를 넣어 단백질을 용해시켜서 원심분리(15,000 rpm, 20 min)하여 찌꺼기를 가라앉힌 후 단백질을 정량하였다. 동일한 양의 단백질을 샘플링 버퍼(4X)를 같이 넣어 섞은 다음, 샘플을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)에 electrophoresis 한 후 membrane

에 옮기고 5% skim milk로 2시간 blocking 하였다. ERK, p38, JNK의 phosphorylation과 NF- κ B를 Enhanced Chemiluminescence (ECL) detection 용액(GE, USA)으로 확인하였다.

6) mouse 모델 실험군 설정

실험실 환경에 적응시킨 mouse들은 아무 처리도 하지 않은 정상군, LPS 처리한 대조군과 CCT 투여 농도에 따라 0.01 mg/kg 투여군, 0.1 mg/kg 투여군, 0.2 mg/kg 투여군 세 종류의 실험군으로 설정하였다. 대조군과 실험군을 실험 횟수별로 6마리, 6마리, 8마리로 나누어 총 3회, 군별 20마리씩 진행하였다. 연구에서 적용한 CCT 농도는 기존에 진행된 in-vivo 연구가 없기에 임의로 설정하였으며, 본 연구에서는 복강 주사로 실험하였기에 일반적으로 경구 투여로 진행되는 한약 추출물 in-vivo 실험의 투여량보다 낮은 농도로 설정하였다. in-vivo

실험에서 LPS 농도는 기존의 연구^{16,17)}를 참고하여 37.5 mg/kg 수준으로 모두 동일하게 복강 주사하였다. LPS 주사 1시간 전에 CCT를 세 실험군에 각각 0.01 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.2 mg/kg 복강주사 하였고, 주사 후 12시간 마다 mouse의 생존율을 조사하였다.

7) mouse 혈청의 cytokine 정량

Mouse 실험군을 세 그룹으로 나누어 CCT를 각각 0.01 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.2 mg/kg 복강 주사한 후, 1시간 뒤에 LPS (37.5 mg/kg)를 복강 주사하였다. 3시간 후에 mouse를 마취한 뒤 Syringe를 이용하여 심장에서 혈액을 채취하였다. 혈액은 3,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심 분리하여 혈청만 분리하였다. mouse 혈청 cytokine 은 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)법을 통해 측정하였다.

8) mouse 간 조직의 조직학적 관찰 및 간의 cytokine mRNA 정량

CCT 0.2 mg/kg를 복강 주사한 후 1시간 뒤 LPS(37.5 mg/kg)를 복강 주사하고, 3시간 뒤에 간 조직을 분리하였다. 분리한 간 조직을 10% formalin용액을 사용하여 고정시킨 다음, 일반적인 조직 표본 제작 방법으로 Hematoxylin & Eosin (H & E)염색을 시행하였다. 카메라 부착 광학현미경(OlympusBX51, Japan)으로 관찰한 후 사진을 촬영하였다. 조직 손상 정도는 면적을 통해 판단하였으며, 기존의 연구¹⁸⁾에서 사용한 조직학적 진단 기준을 참고하여 0=normal, absent; 1=uncommon, detectable; 2=multifocal, moderate; 3=extensive, severe로 설정한 후 세 명의 임상병리사의 blind test를 통해 평가하였다. 간 조직의 cytokine mRNA 는 정량중합효소반응을 통해 측정하였다.

3. 통 계

모든 실험 결과는 3회 실시하여 그 평균값을 기초로 Mean±S.D.로 나타내고, 실험 데이터는 student's t-test로 분석하였다. 분석한 데이터가 p-value<0.05 일 경우 유의한 것으로 판단하였다. 이상의 통계는 statistical package for the social sciences(SPSS) for windows 12.0을 사용하여 처리하였다.

III. 결 과

1. CCT의 RAW 264.7 cell에 대한 세포 독성

무처치군의 생존율을 100으로 설정하였을 때, CCT는 각각 농도 0.05 mg/ml 투여군에서 100.33±0.62%, 0.1 mg/ml 투여군에서 100.3±1.44%, 0.5 mg/ml 투여군에서 99.72±0.44%, 1 mg/ml 투여군에서 100.08±0.47%, 2 mg/ml 투여군에서 99.47±0.51% 생존율을 보여 세포 독성에 유의한 영향을 보이지 않았다(Fig. 1).

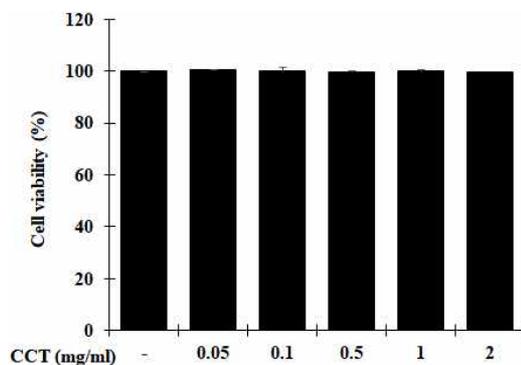


Fig. 1. The cytotoxicity of *Cheongpochukeo-tang* (CCT) in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were incubated with CCT as indicated concentration. After 24 h, cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data were given as means of values±SD from three independent experiments.

2. CCT가 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성에 미치는 영향

NO는 LPS 처리군에서 $14.63 \pm 0.24 \mu\text{M}$ 로 상승하였으나, CCT 0.1 mg/ml 투여군에서 $13.53 \pm 0.13 \mu\text{M}$, CCT 0.5 mg/ml 투여군에서 $7.63 \pm 0.15 \mu\text{M}$, CCT 1 mg/ml 투여군에서 $2.85 \pm 0.05 \mu\text{M}$ 로 감소하였다 ($P < 0.05$) (Fig. 2). 하지만 2 mg/ml 농도에서는 $7.55 \pm 0.28 \mu\text{M}$ 로 자체적인 NO 증가를 보였고, 1 mg/ml 군 대비 억제능력 감소를 나타냈다. 비록 세포 생존에는 영향을 주지 않았지만, 자체적인 NO 생성을 유도하여 세포에게 유해할 수 있어 추후 실험에는 배제하였다.

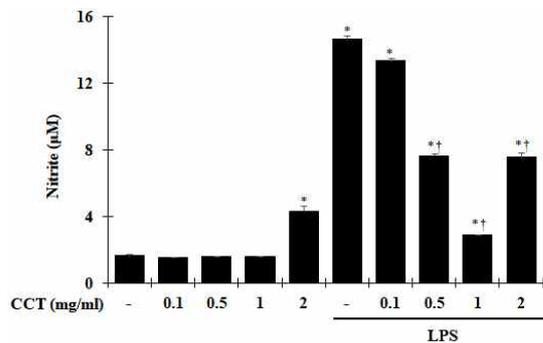


Fig. 2. Effects of *Cheongpochukeo-tang* (CCT) on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cell was treated with 0.1, 0.5, 1, 2 (mg/ml) of CCT and LPS (500 ng/ml) for 24 h. NO production was measured by using Griess reagent. Data were given as means of values \pm SD from three independent experiments.

* $P < 0.05$ as compared with saline.

† $P < 0.05$ as compared with only-LPS-treated group.

3. CCT가 mRNA 수준에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 생성에 미치는 영향

IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 mRNA 발현을 측정하였으며, 무처리군의 mRNA의 양을 1로 설정하여 기준으로 삼았다. IL-1 β 의 경우 LPS 처리군은 무처리군에 비해 mRNA 양이 5.75 ± 0.06 으로 증가한 것에 비해 CCT 0.1 mg/ml 투여군에서는 5.39 ± 0.12 , CCT 0.2 mg/ml 투여군에서는 3.9 ± 0.06 , CCT 0.5 mg/ml 투여군에서 3.11 ± 0.1 , CCT 1 mg/ml 투여군에서는 1.26 ± 0.05 로 각각 감소되는 것이 관찰되었다 ($P < 0.05$).

IL-6의 경우 LPS 처리군의 13.29 ± 0.27 에 비해 CCT 0.1 mg/ml 투여군에서 11.78 ± 0.39 , CCT 0.2 mg/ml 투여군에서 9.41 ± 0.37 , CCT 0.5 mg/ml 투여군에서 5.84 ± 0.21 , CCT 1 mg/ml 투여군에서 4.39 ± 0.29 로 각각 감소되었다 ($P < 0.05$).

TNF- α 의 경우 LPS 처리군의 25.94 ± 1 에 비해 CCT 0.1 mg/ml 투여군에서 25.34 ± 0.93 , CCT 0.2 mg/ml 투여군에서 14.78 ± 0.44 , CCT 0.5 mg/ml 투여군에서 12.61 ± 0.62 , CCT 1 mg/ml 투여군에서 5.88 ± 0.26 으로 각각 감소되었다 ($P < 0.05$).

IL-1 β , IL-6의 경우 CCT 0.1 mg/ml 이상의 농도에서 유의한 억제 효과를 보였고 ($P < 0.05$), TNF- α 의 경우 CCT 농도 0.2 mg/ml 이상에서 유의한 효과가 나타났다 ($P < 0.05$) (Fig. 3).

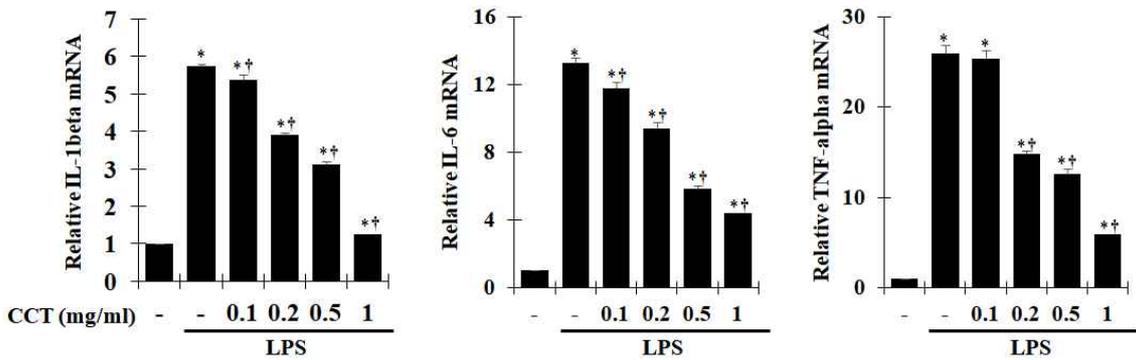


Fig. 3. Effects of *Cheongpochukeo-tang* (CCT) on the mRNA expression of IL-1β, IL-6 and TNF-α in RAW 264.7 cells.

The cells were pre-treated with CCT as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without LPS (500 ng/ml) for 24 h. The level of cytokine was measured by real time RT-PCR. Data were given as means of values±SD from three independent experiments.

* P<0.05 as compared with saline.

† P<0.05 as compared with only-LPS-treated group.

4. CCT가 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 MAPKs 및 NF-κB의 활성화에 미치는 영향

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포는 다양한 신호전달물질에 의해 cytokine들을 분비하게 되며, 대표적인 경로로 MAPKs와 NF-κB가 있다. CCT가 전 염증성인자들을 유의하게 억제하는 농도인 1 mg/ml의 농도로 전 처리한 후 LPS를 15분, 30분, 60분으로 나누어 시간대 별로 자극하였다. 이를 분석한 결과 CCT는 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 MAPKs의 활성화 지표인 ERK1/2, JNK, p38 모두 인산화를 억제하는 결과를 보였다. 또한 NF-κB의 활성화 지표인 Iκ-Bα의 분해 결과, CCT는 LPS에 의한 Iκ-Bα의 분해를 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 4).

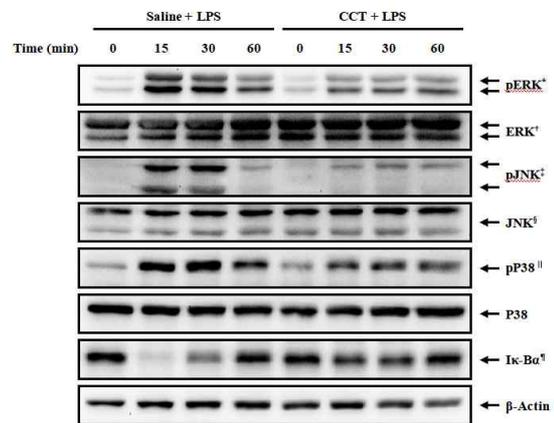


Fig. 4. Effects of *Cheongpochukeo-tang* (CCT) on the activation of MAPKs and NF-κB in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated with CCT (1 mg/ml) for 1 h, and then incubated with LPS (500 ng/ml) for indicated mins. Detail methods were described in Materials and Methods. The results shown are representative of three independent experiments.

* : phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinase

† : extracellular signal-regulated protein kinase

‡ : phosphorylated c-Jun amino-terminal kinases

§ : c-Jun amino-terminal kinases

|| : phosphorylated P38

¶ : inhibitory kappa Ba

5. CCT가 LPS로 유도된 mouse 모델의 생존율에 미치는 영향

LPS를 복강주사 한 후 12시간마다 생존율을 관찰한 결과, LPS 단독 처리군은 48시간 시점에 생존율 0%를 보였으며, CCT 0.01 mg/kg 투여군은 생존율 20%,

CCT 0.1 mg/kg 투여군은 생존율 40%, CCT 0.2 mg/kg 투여군은 생존율 70%를 보였다. 최종적으로 CCT 0.1 mg/kg 투여군은 120시간 시점에 20%의 생존율을 보였고, CCT 0.2 mg/kg 투여군은 120시간 시점에 50%의 생존율을 보였다(Fig. 5).

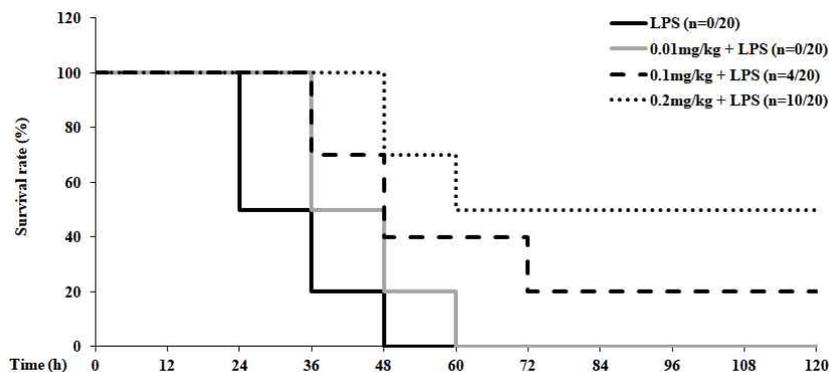


Fig. 5. Effects of *Cheongpochukeo-tang* (CCT) on the survival rate of mice. The mice were pre-intraperitoneal injected with CCT for 1 h, and then intraperitoneal injected with LPS (37.5 mg/kg). After 48 h, the survival rate of only-LPS-treated group was 0%. But after 120 h, the survival rate of CCT 0.1 was 20%, and the survival rate of CCT 0.2 was 50%. The number of mice of each group was 20.

6. CCT가 LPS로 유도된 mouse 혈청 cytokine 생성에 미치는 영향

LPS로 유도된 mouse 혈청 cytokine 발현을 측정된 결과, IL-1 β 생성의 경우 LPS 처리군의 580.91 \pm 11.63 pg/ml에 비해 CCT 0.01 mg/kg 투여군에서 535.15 \pm 15.85 pg/ml, CCT 0.1 mg/kg 투여군에서 410.84 \pm 4.07 pg/ml, CCT 0.2 mg/kg 투여군에서 285.3 \pm 5.4 pg/ml로 각각 감소되는 것이 관찰되었다(P<0.05).

IL-6의 경우 LPS 처리군의 917.77 \pm 16.26 pg/ml에 비해 CCT 0.01 mg/kg 투여군에서 888.1 \pm 7.37 pg/ml, CCT 0.1 mg/kg 투여군에서 702.21 \pm 16.33 pg/ml, CCT 0.2 mg/kg 투여군에서 411.57 \pm 6.96 pg/ml로

각각 감소되었으며(P<0.05), TNF- α 의 경우 LPS 처리군의 600.98 \pm 14.19 pg/ml에 비해 CCT 0.01 mg/kg 투여군에서 584.76 \pm 7.46 pg/ml, CCT 0.1 mg/kg 투여군에서 453.07 \pm 19.63 pg/ml, CCT 0.2 mg/kg 투여군에서 265.15 \pm 13.77 pg/ml로 각각 감소되었다(P<0.05).

RAW 264.7 세포에서 cytokine 생성 결과와 마찬가지로 CCT는 IL-1 β , IL-6, TNF- α 에서 모두 유의한 효과를 보였다. IL-1 β 의 경우 CCT 0.01 mg/kg 이상의 농도에서 유의한 억제 효과를 보였고(P<0.05), IL-6, TNF- α 의 경우 CCT 농도 0.1 mg/kg 이상에서 유의한 효과를 나타냈다(P<0.05)(Fig. 6).

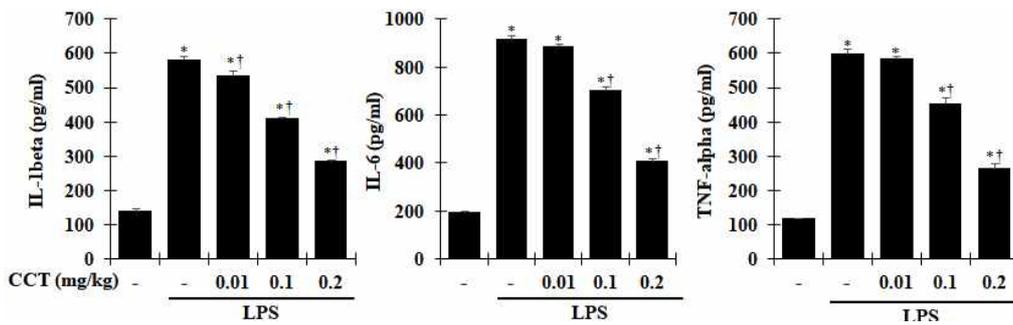


Fig. 6. Effects of *Cheongpochukeo-tang* (CCT) on the production of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in serum of mice.

The serum of mice was pre-treated with CCT 0.01, 0.1, 0.2 (mg/kg) for 1 h, and then incubated with LPS (37.5 mg/kg) for 24 h. The level of cytokine was measured by ELISA. Data were given as means of values \pm SD from three independent experiments.

* P<0.05 as compared with saline.

† P<0.05 as compared with only-LPS-treated group.

7. CCT가 LPS로 유도된 mouse 간 조직 손상에 미치는 영향

간 조직의 염증 정도는 무처치군 0.47 \pm 0.05에 비해 LPS 처리군은 2.63 \pm 0.09로 유의하게 증가하였고, CCT 0.2 mg/kg 투여군에서는 1.3 \pm 0.08로 LPS 처리군에 비해 유의하게 억제되었다(P<0.05).

간 조직의 출혈 정도는 무처치군 0.2 \pm 0.00에 비해 LPS 처리군은 2.47 \pm 0.05로 유의하게 증가하였으며, CCT 0.2 mg/kg 투여군은 0.83 \pm 0.05로 LPS 처리군에 비해 유의하게 출혈 정도를 억제하였다(P<0.05) (Fig. 7).

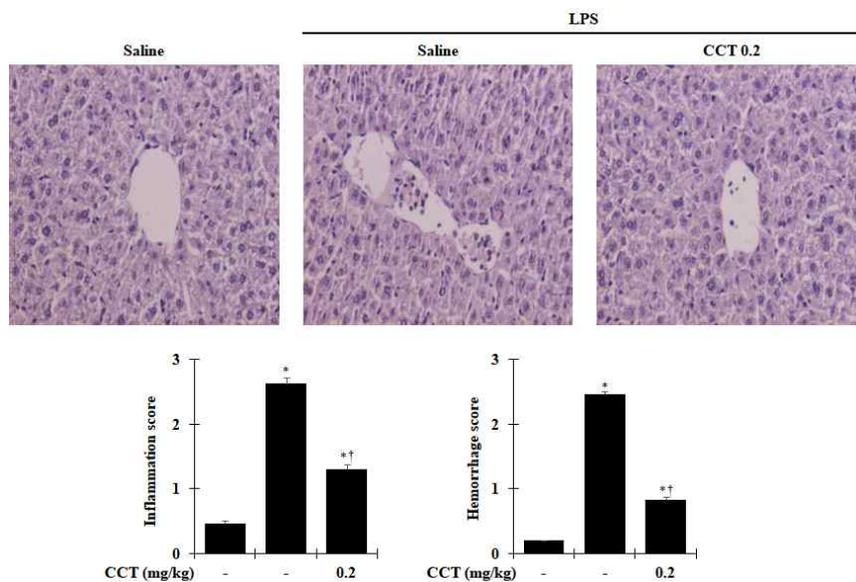


Fig. 7. Effects of *Cheongpochukeo-tang* (CCT) on the liver tissue of mice.

Representative H & E stained sections of the liver tissue in the normal mice not given LPS, in the control mice given LPS, and in mice given CCT 1 h before the first LPS injections. Histological sections of the liver were scored from 0 (normal) to 3 (severe) for inflammation and hemorrhage. These figures show representative images of experiment group. The score was calculated by three pathologists who were blinded.

* P<0.05 as compared with saline.

† P<0.05 as compared with only-LPS-treated group.

8. CCT가 LPS로 유도된 mouse의 간 cytokine mRNA 발현에 미치는 영향

LPS로 염증 유도한 mouse의 간 조직에서 cytokine mRNA 발현을 측정 한 결과, 아무 처리를 하지 않은 군을 1이라고 했을 때 IL-1 β 의 경우 LPS 처리군은 9.31 \pm 0.19배 증가한 반면 CCT 0.2 mg/kg 투여군은 3.67 \pm 0.4배로 감소하였다(P<0.05).

IL-6의 경우 LPS 처리군이 13.84 \pm 0.29배 증가한 것에 비해 CCT 0.2 mg/kg 투여군은 3.6 \pm 0.61배로 감소하였고(P<0.05), TNF- α 는 LPS 처리군이 82.85 \pm 1.9배 증가한 것에 비해 CCT 0.2 mg/kg 투여군은 33.5 \pm 2.18배로 유의하게 감소하였다(P<0.05)(Fig. 8).

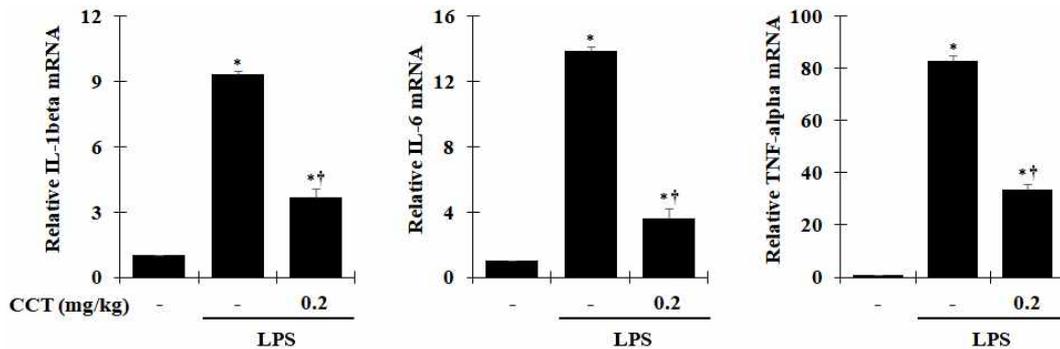


Fig. 8. Effects of *Cheongpochukeo-tang* (CCT) on the production of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in liver tissue of mice.

The cells were pre-treated with CCT as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without LPS (37.5 mg/kg) for 3 h. IL-1 β , IL-6, and TNF- α levels were measured by real time RT-PCR. Data were given as means of values \pm SD from three independent experiments.

* P<0.05 as compared with saline.

† P<0.05 as compared with only-LPS-treated group.

IV. 고 찰

청포축어탕은 1980년대 초 급·만성의 골반생식기 질환을 치료하기 위해 창방⁷⁾된 膈下逐瘀湯 가감방으로, 《韓方製劑解說集》에 처음 수록되었다⁶⁾. 膈下逐瘀湯은 본래 桃仁, 紅花, 五靈脂, 牡丹皮, 烏藥, 玄胡索으로 理氣行血破瘀하고 香附子, 枳殼으로 開鬱行滯하여 胸腹有痞塊 腹痛有定處를 치료하는 처방이다¹⁹⁾.

청포축어탕은 膈下逐瘀湯에서 桃仁, 紅花, 烏藥을 祛하여 破瘀作用을 경감하고, 清熱解毒 消癰排膿利濕 효능이 있는 金

銀花, 薏苡仁, 敗醬과 補肝腎 散瘀消腫 活血通經하는 續斷, 牛膝을 加味하여 瘀血과 濕熱이 併發한 病證을 치료한다¹³⁾. 청포축어탕에서 加味된 薏苡仁²⁰⁾, 敗醬^{21,22)}, 牛膝^{23,24)}의 경우 단미 추출액으로 항염증 효과를 나타낸다는 연구가 보고되어 있으며, 君藥인 金銀花의 경우 NO, Prostaglandin E₂(PGE₂), 염증성 cytokine 생성과 inducible NO synthase(iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) 발현을 억제하여 항염증 효과를 나타낸다는 보고²⁵⁻⁹⁾가 있었다. 임상에서 청포축어탕은 濕熱下注 및 瘀血氣滯로 인한 골반강내 질환, 특히 급·만성 골반염증성질환에 대한 치료를 목적으로

하며⁸⁾, 난임 변증진료에서는 濕熱型的 난임 치료에 응용된다³⁰⁾.

골반염증성질환은 자궁경부 상부의 생식기에 염증이 발생한 질환으로³⁴⁾, 난관·복막 요인의 난임, 자궁 외 임신, 만성 골반통, 재발성 골반염 등 장기적 후유증을 남길 수 있어³¹⁾ 임상적으로 중요하다. 특히 골반 유착, 난관의 불완전 혹은 완전 폐쇄는 난임을 유발할 수 있다³²⁾. 또한 최근 국내 연구에서 여성 난임의 임상적 연관 인자 중 골반염증 관련 인자는 26.2%에 달해³³⁾ 가장 중요한 인자 중 하나라고 보고된 바 있다. 따라서 골반염증성질환의 적절한 치료는 난임의 예방뿐만 아니라 치료에 주요한 방법이라고 할 수 있으며, 본 연구에서는 골반염증성질환의 치료에 활용되는 청포축어탕의 항염증 효과와 그 기전에 관하여 실험적으로 알아보하고자 하였다.

현재까지 보고된 청포축어탕에 대한 연구로는 혈전증, 고점도혈증과⁷⁾, 소염, 해열, 진통, 항균, 항혈전 등에 대한 연구¹³⁾가 있다. 그러나 기존에 보고된 청포축어탕의 항염증 효과에 대한 연구¹³⁾는 in-vivo에 한정하여 carrageenin, acetic acid, dextran으로 유도된 mouse의 부종 억제 효과만을 다루었다. 따라서 기존의 연구만으로는 in-vitro에서 청포축어탕의 항염증 효과와 구체적인 항염증 기전에 대해 파악하기 어려운 실정이다. 이에 본 연구에서는 청포축어탕(CCT)을 사용하여 in-vitro와 in-vivo에서 항염증 관련 실험을 진행하여 유의한 결과를 얻었기에 다음과 같이 보고하는 바이다.

다른 연구에 앞서 CCT 자체의 세포 독성을 확인하였다. MTT 분석법으로 RAW 264.7 cell의 생존율을 측정하였으며, 무처

치군의 생존율과 비교하였을 때 CCT 투여군은 각각 농도 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml에서 모두 유의미한 세포 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 1).

그람음성균의 세포 외막에 존재하는 LPS는 toll-like receptor-4(TLR-4)를 통해 대식세포를 활성화시키고, 면역 및 염증반응에 관여하는 각종 매개물질을 생성한다³⁴⁾. LPS에 의해 활성화된 대식세포는 iNOS를 발현하고, 이 효소의 작용을 통해 NO가 생성된다. NO는 바이러스 및 미생물의 증식을 억제, 혹은 직접 사멸시키며, 종양 성장 억제, 혈관 확장 등 염증 반응에 중요한 역할을 한다^{35,36)}. 그러나 NO 생성이 과다하면 염증을 심화시킬 수 있고, 신경, 관절을 포함한 조직 손상, 폐혈성 쇼크를 유발할 수 있다³⁶⁻⁸⁾. 따라서 LPS로 자극한 RAW 264.7 cell에서 CCT의 NO 생성 억제를 실험하였으며, 모든 농도의 CCT 투여군에서 유의미한 NO 생성 억제를 관찰할 수 있었다. 그러나 CCT 2 mg/ml 투여군에서는 자체적인 NO 증가가 나타났고, 이는 세포에 유해할 수 있어 추후 실험에는 배제하였다 (Fig. 2).

염증성 cytokine은 각종 항원 및 미생물 등에 대한 반응으로 생성되는 단백질로, 면역과 염증 반응을 자극한다. LPS로 자극한 macrophage는 pro-inflammatory cytokine으로 알려진 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 분비하며, 이들은 급성 염증 반응의 조절에 중요한 역할을 한다. IL-6는 호중구 생산, helper T 세포의 분화, B세포의 성장을 자극하며³⁹⁾, 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)의 분비를 유도하여 염증의 혈관 투과성을 유

발한다⁴⁰⁾. 그러나 과도한 IL-6 생성은 염증성 질환과 각종 악성 종양의 발현과도 깊은 관련이 있다⁴¹⁻³⁾. IL-1 β 과 TNF- α 는 유사한 작용을 하는 cytokine으로 급성 염증 반응을 매개한다. IL-1 β 은 낮은 농도에서 국소적 염증 반응에 관여하고, 다량 분비 시 내분비 기능을 통해 전신 작용을 나타낸다^{44,45)}. TNF- α 는 열 발생, 호중구 및 대식세포 활성화, 혈관내피세포 활성화 작용을 하며, LPS로 자극된 염증 반응의 주요 매개체이다. TNF- α 가 과잉 생성되면 혈압 강하, 혈관 내 혈전 형성, 심각한 대사 장애와 전신적 합병증을 유발할 수 있다^{44,46,47)}.

본 실험에서 CCT가 cytokine의 mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 조사한 결과, CCT는 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성을 모두 유의미하게 억제하는 것으로 나타났다. IL-1 β , IL-6의 경우 CCT 농도 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml 전부 유의한 억제 효과를 보였고, TNF- α 의 경우 CCT 0.2 mg/ml 이상의 농도에서 유의한 효과를 보였다($P < 0.05$) (Fig. 3). 이러한 결과를 통해, CCT는 pro-inflammatory cytokine인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 mRNA 발현을 억제하여 항염증 작용을 하는 것으로 보인다.

MAPKs는 세포 외 자극을 세포 내로 전달하는 신호전달경로 중 하나로, 호르몬이나 cytokine 등으로부터 활성화된 자극을 세포 내로 전달하여 세포 증식, 분화, 운동, 생존 및 사멸 등의 기능을 조절한다. 인산화를 통하여 활성화된 MAPKs는 cytokine의 생성에 관여한다. 현재까지 알려진 포유류의 MAPKs family로는 extracellular signal-regulated kinases(ERK), c-Jun amino-terminal kinases(JNK), p38

(α , β , γ , δ)가 있다^{48,49)}.

NF- κ B는 COX-2 및 iNOS 발현에 관여하는 전사조절인자로⁵⁰⁾, 평소에는 inhibitory kappa Ba(I- κ Ba)와 결합한 상태로 존재하나 염증 반응 시 I- κ Ba가 분해되어 활성화된다. 활성화된 NF- κ B는 핵 내로 이동하여 cytokine 발현을 촉진하고, iNOS 발현 증가를 통해 염증 반응을 가속화한다⁵¹⁾.

CCT가 MAPKs 및 NF- κ B에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RAW 264.7 cell에 CCT를 1 mg/ml의 농도로 전 처리한 후, 시간대별로 LPS를 자극하였다. 분석 결과 CCT는 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 MAPKs의 활성화 지표인 ERK1/2, JNK, p38 모두 인산화를 억제하였고, 또한 NF- κ B의 활성화 지표인 I- κ Ba의 분해를 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 이를 통해 CCT가 NO 및 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성을 억제하는 기전은 MAPKs와 NF- κ B의 활성화 억제를 통해 이루어지는 것으로 사료된다.

이상 in-vitro 실험에서 나타난 CCT의 항염증 효과를 토대로 in-vivo 실험을 진행하였다.

in-vivo 실험에서 경구 투여된 약물은 대부분 소장 점막에서 수동적 확산에 의해 흡수된다. 이때 gastric empty time에 따라 소장에 도달하는 시간과, 이에 따른 약물 흡수 정도가 달라지므로 경구 투여는 조절, 예측하기 어렵고 재현성이 낮다. 또한 경구 투여는 초회통과효과로 인해 비경구 투여에 비해 생체이용률이 떨어지고, 작용 시간이 연장된다. 반면 복강 내 주사는 흡수면적이 넓어 약물 흡수가 빠르며 작용이 신속하게 나타나고, 흡수의 주요 경로가 간을 통과하는 장관막

혈관에 있기 때문에 경구 투여의 약동학과 유사하다^{52,53}). 이를 기반으로 본 실험에서는 mouse의 CCT 투여를 복강 주사로 진행하였다.

먼저 mouse에 LPS와 CCT를 복강 주사하여 12 h 마다 생존율을 관찰한 결과, 최종 120h 시점에 LPS 단독 처리군은 생존율 0%를 보였으며, CCT 0.1 mg/kg 투여군은 20%의 생존율을, CCT 0.5 mg/kg 투여군은 50%의 생존율을 보였다(Fig. 5). 이를 통해 CCT가 LPS로 인한 mouse의 사망률을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

또한 mouse의 혈청 cytokine 농도를 측정 한 결과, in-vitro와 마찬가지로 CCT는 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성을 모두 유의미하게 억제하였다(Fig 6). 특히 IL-1 β 의 경우 CCT 0.01 mg/kg 농도에서도 유의하게 감소하여(P<0.05), 적은 농도에서 CCT의 IL-1 β 억제 효과를 확인할 수 있었다.

간은 LPS의 해독뿐만 아니라 LPS에 대한 반응에서도 핵심적인 역할을 하는 장기이며 LPS는 TNF- α , IL-1 β 등과 같은 염증 인자를 매개로 간 손상을 유발 혹은 심화한다⁵⁴). 때문에 mouse의 간 조직을 관찰하여 염증 및 출혈 정도를 평가하였으며, 정량중합효소반응을 통해 간 cytokine의 mRNA 발현을 측정하였다. 그 결과 CCT 0.2 mg/kg 투여군은 LPS 단독 처리군에 비해 염증 조직의 크기와 출혈 정도가 모두 유의하게 감소하였고(P<0.05)(Fig. 7), 간 cytokine mRNA 생성 역시 혈청 cytokine 생성 결과와 동일하게 IL-1 β , IL-6, TNF- α 에서 모두 유의한 생성 억제 효과를 보였다(P<0.05)(Fig. 8).

이상의 실험 결과 CCT는 MAPKs와 NF- κ B의 활성 억제를 통해 NO와 염증성 cytokine 생성을 억제하여 항염증 효과를 나타내는 것으로 판단되며, 동물실험에서도 유효한 항염증 효과를 확인할 수 있었다. 또한 CCT는 고농도에서도 세포독성을 보이지 않아 임상에 적극적으로 활용할 수 있는 가능성을 보였다. 본 연구를 바탕으로 CCT는 골반염증성질환을 비롯한 다양한 염증 반응의 완화 및 치료에 활용될 수 있으며, 나아가 골반염증성질환에 의해 발생한 난임의 예방에도 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

LPS로 유도된 RAW 264.7 cell과 mouse 염증모델에서 청포축어탕(CCT)의 항염증 효과를 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CCT는 RAW 264.7 cell에서 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 mg/ml 농도 모두 세포독성을 나타내지 않았다.
2. CCT는 RAW 264.7 cell에서 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/ml 농도에서 농도 의존적으로 NO 생성을 유의하게 억제하였으나, 2 mg/ml에서는 자체적인 NO 증가를 보였다.
3. CCT는 mRNA 수준에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 발현을 유의하게 억제하였다.
4. CCT는 RAW 264.7 cell에서 ERK1/2, JNK, p38의 인산화와 NF- κ B의 활성을 억제하였다.
5. CCT는 mouse 모델에서 120 h 시점에 0.1 mg/kg 투여군 20%, 0.5 mg/kg 투

여군 50%의 생존율을 보였다.

6. CCT는 mouse 혈청의 cytokine IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 모두 유의하게 억제하였다.
7. CCT는 mouse 간 조직에서 염증과 출혈 정도를 유의하게 억제하였다.
8. CCT는 mouse 간 조직에서 cytokine IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 mRNA 발현을 모두 유의하게 억제하였다.

Received : Oct 08, 2021

Revised : Oct 18, 2021

Accepted : Nov 26, 2021

References

1. Kumar V, et al. Robbins basic pathology 8th rev. ed. Seoul:Epublic. 2009:31-5, 57-8.
2. Male D, Brostoff J, Gray A. Immunology. London: Mosby. 1998:61-9, 229-32.
3. Korean Society of Obstetrics and Gynecology. Gynecology. 5th rev. ed. Seoul: Korea Medical Book Publishing Company. 2015: 154, 546.
4. The society of Korean medicine obstetrics and gynecology. Korean medicine obstetrics and gynecology. 3rd rev. ed. Seoul: Euseongdang. 2016:164, 171, 331-42.
5. Tsevat DG, et al. Sexually transmitted diseases and infertility. American journal of obstetrics and gynecology. 2017;216(1):1-9.
6. Kyunghee university Korean medicine hospital. Hanbangjejehaeseoljip(韓方製劑解說集(全)). Seoul:Kyunghee university medicine center. 1983:134.
7. Gang SH, Choi SH, Ahn KS. Experimental studies on effects of Qingbaozhuyutang (清胞逐瘀湯), bee venom on the blood stasis pattern. The journal of Korean oriental medicine society. 1995;16(1):351-69.
8. Lee KS, Song BK. Clinical observation on *Cheongpochookeo-tang*. The Journal Of Oriental Obstetrics & Gynecology. 1987;1(1):33-7.
9. Wee HS, et al. Pregnancy of infertility with endometriosis after oriental medicine treatment diagnosed as a IVF case. A case report. The Journal Of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2010;23(3):213-20.
10. Cho SH, Jin CS. The clinical study of PID patient by oriental medical treatment(focused on herbal medication & retention enema). The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2002; 15(3):181-9.
11. Ban HR, Lee JA, Cho SH. A case of chronic pelvic inflammatory disease. The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2005;18(1):253-61.
12. Song YR, et al. The clinical study one pelvic inflammatory disease(PID) patient treatments by Korean medicine. The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology.2014;27(3):158-67.
13. Chung JH, Song BK. Effects of *Kyökhach'ugotang* and *Ch'önp'och'ugotang* on anti-inflammatory, antipyretic, analgesic, anti-microbial and anti-thrombose action. Kyunghee Univ. Theses collection.

- 1986;15:101-16.
14. Kim DH, et al. Rubi Fructus Water Extract Alleviates LPS-Stimulated Macrophage Activation via an ER Stress-Induced Calcium/CHOP Signaling Pathway. *Nutrients*. 2020;12(11):3577.
 15. Wu C, et al. Neocryptotanshinone inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 macrophages by suppression of NF- κ B and iNOS signaling pathways. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2015; 5(4):323-9.
 16. Kim YH, et al. Biological Properties of *Vibrio vulnificus* Lipopolysaccharide and compared to those of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Lipopolysaccharides. *Korean journal of microbiology*. 1989;27(2):147-54.
 17. Tateda K, et al. Lipopolysaccharide-induced lethality and cytokine production in aged mice. *Infect Immun*. 1996;64(3):769-74.
 18. Patel S, et al. RIP1 inhibition blocks inflammatory diseases but not tumor growth or metastases. *Cell Death & Differentiation*, 2020;27(1):161-75.
 19. Yun YG. *Donguibangje and Cheobanghaeseol (東醫方劑斗 處方解說)*. 4th rev. ed. Seoul: Euseongdang. 2011:288-9.
 20. Yun HJ, et al. Inhibitory effect of *Coicis semen extract*(CSE) on pro-inflammatory mediatory. *The Journal of Pediatrics of Korean Medicine*. 2009;23(1):159-71.
 21. Ryu IH, et al. Effects of *Patrinia scabiosaefolia* aqueous extract on cytokine and NF- κ B activation in LPS-induced RAW 264.7 cells and mouse. *The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology*. 2017;30(2):1-15.
 22. Lee EJ, et al. Inhibition of LPS-induced inflammatory biomarkers by ethyl acetate fraction of *Patrinia scabiosaefolia* through suppression of NF- κ B activation in RAW 264.7 cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 2012;34(2):282-91.
 23. Kim M, et al. The anti-inflammatory effect of *Achyranthes japonica* on lipopolysaccharide-induced inflammatory activity in murine macrophages. *The Korea Journal of Herbology*. 2011;26(2):51-7.
 24. Chung WS. The anti-inflammatory effects of *Achyranthes japonica*. Department of Medicine, Graduate school of Wonkwang university. 2011.
 25. Lee D, et al. Inhibition of Lipopolysaccharide-Inducible Nitric Oxide Synthase, TNF- α , IL-1 β and COX-2 Expression by Flower and Whole Plant of *Lonicera japonica*. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*. 2005; 19(2):481-9.
 26. Yun YG, et al. Inhibitory Effect of Aqueous Extract from *Lonicera japonica* Flower on LPS-induced Inflammatory Mediators in RAW 264.7 Macrophages. *The Korea Journal of Herbology*. 2007; 22(3):117-25.
 27. Chae KW. Anti-inflammatory activity and osteoclast formation effects of *Lonicerae Flos*. Department of Herbology, Graduate school of Kyunghee university.

- 2008.
28. Yun KJ, Lee EY. Effects of hot aqueous and ethanol extract from *Lonicera japonica* Flos on NO and PGE2 in macrophage. *Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society*. 2012;29(1):67-74.
 29. Ryu HK, et al. Research of the Anti-inflammatory Effects of *Forsythiae Fructus* and *Lonicerae Flos* Ethanol Extracts. *The Journal of Korean Obstetrics and Gynecology*. 2020;33(3):40-59.
 30. Choi CM, et al. Analysis of Korean traditional medicinal treatment trend of infertility and development of questionnaire for infertility treatment. *The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology*. 2016;29(2):29-46.
 31. Westrom L, et al. Pelvic inflammatory disease and fertility. A cohort study of 1,844 women with laparoscopically verified disease and 657 control women with normal laparoscopic results. *Sex Transm Dis*. 1992;19(4):185-92.
 32. Grodstein F, Goldman MB, Cramer DW. Relation of tubal infertility to history of sexually transmitted diseases. *American journal of epidemiology*. 1993;137(5):577-84.
 33. Joeng JE, et al. In: Research proposal on the clinical cause and support plan of infertility. Ilsan:NHIS Ilsan Hospital Institute of Health Insurance & Clinical Research. 2017:51.
 34. Tsan MF, Gao B. Pathogen-associated molecular pattern contamination as putative endogenous ligands of Toll-like receptors. *Journal of endotoxin research*. 2007;13(1):6-14.
 35. Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy S.S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*. 2007;15(6):252-9.
 36. Spiller F, et al. Targeting nitric oxide as a key modulator of sepsis, arthritis and pain. *Nitric Oxide*. 2019;89(1):32-40.
 37. Boveris A, Alvarez S, Navarro A. The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. *Free radical biology and medicine*. 2002;33(9):1186-93.
 38. Tewari D, et al. Role of Nitric oxide in neurodegeneration: Function, regulation and inhibition. *Curr Neuropharmacol*. 2020;18(1):1-13.
 39. Kishimoto T, et al. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*. 1995;86(4):1243-54.
 40. Loeffler S, et al. Interleukin-6 induces transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytes in vivo and regulates VEGF promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between STAT3 and Sp1. *International journal of cancer*. 2005;115(2):202-13.
 41. John MAS, et al. Interleukin 6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*. 2004;130(8):929-35.
 42. Kotowicz B, et al. The value of tumor

- marker and cytokine analysis for the assessment of regional lymph node status in cervical cancer patients. *International Journal of Gynecologic Cancer*. 2008;18(6):1279-84.
43. Jones SA, Brendan JJ. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nature Reviews Immunology*. 2018; 18(12):773-89.
 44. Abul K, et al. Cellular and molecular immunology 7th rev. ed. Seoul: Panmuneducation. 2013:84-9, 180-6.
 45. Ren K, Torres R. Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. *Brain research reviews*. 2009;60(1):57-64.
 46. Borrelli E, et al. Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. *Critical care medicine*. 1996;24(3):392-7.
 47. Ramseyer VD, Garvin JL. Tumor necrosis factor- α : regulation of renal function and blood pressure. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2013; 304(10):1231-42.
 48. Cobb MH, Goldsmith EJ. Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biochem Sci*. 2000;25(1):7-9.
 49. Cargnello M, Philippe PR. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2011;75(1):50-83.
 50. Lee AK, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by sauchinone effects on I-kappa B alpha phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *Br J Pharmacol*. 2003;139(1):11-2.
 51. Baeuerle PA. I kappa B-NF-kappa B structures: at the interface of inflammation control. *Cell*. 1998;95(6):729-31.
 52. Lee JE. Drug Delivery Systems - associated with Pediatric Endocrinology. *Journal of Korean Society of Pediatric Endocrinology*. 2011;16(1):7-12.
 53. Turner PV, et al. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2011;50(5):600-13.
 54. Su GL. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2002;283(2):256-65.