

보음전의 항산화, 항염증 효능에 관한 실험연구

¹봄봄한의원, ²동신대학교 한의과대학 한방부인과교실
김수경¹, 조성희², 양승정²

ABSTRACT

The Experimental Study on Antioxidant, Anti-inflammatory Effects of the *Boeum-jeon* (BEJ)

Su-Kyung Kim¹, Seong-Hee Cho², Seung-Jeong Yang²

¹Bombom Korean Medical Clinic

²Dept. of Korean Gynecology and Obstetrics, College of Korean Medicine, Dong-Shin University

Objectives: *Boeum-jeon* (BEJ) is a herbal formula composed 8 Korean medicinal herbs and is traditionally used to treat inflammatory diseases. In this study, the authors tried to confirm the antioxidant efficacy of BEJ and its anti-inflammatory effect in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells.

Methods: In this experiment, results of BEJ on the following two were measured as follows: (1) Antioxidant effects was measured by DPPH Radical scavenging Activity, ABTS Radical scavenging Activity. (2) Anti-Inflammatory effects were evaluated by the production amount of ROS, NO, Cytokine (PGE2, IL-1 β , IL-6, TNF- α), COX-2, iNOS, TNF- α , IL-1 β , IL-6, HO-1, NQO1 (the previous seven are "mRNA Expression"), COX-2, iNOS, TNF- α , IL-1 β , IL-6, HO-1, NQO1, NRF2 (the previous eight are "Protein Expression") ERK, JNK, p38 (the previous three are "Protein Phosphorylation") in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

Results: The experimental measurement results are as follows: (1) DPPH Radical scavenging Activity, ABTS Radical scavenging Activity increased in a concentration-dependent manner in the BEJ-treated group. (2) As a result of measuring anti-inflammatory efficacy, the production of ROS, NO, and Cytokine (PGE2, TNF- α , IL-1 β , IL-6) in the BEJ-administered group was significantly reduced compared to the control group. (3) Among mRNA Expression levels, COX-2, iNOS, IL-1 β , IL-6 and TNF- α was significantly decreased in a concentration-dependent manner than in the control group, and HO-1 and NQO1 were significantly increased in a concentration-dependent manner than in the control group. (4) Among the Protein Expression levels, COX-2, iNOS, IL-1 β , IL-6 and TNF- α was significantly decreased in a concentration-dependent manner compared to the control group, and HO-1, NQO1 and NRF2 was significantly increased in a concentration-dependent manner compared to the control group. (5) As a result of Protein Phosphorylation, ERK, p38 and JNK was significantly decreased compared to the control group in a concentration-dependent manner.

Conclusions: *Boeum-jeon* has been experimentally confirmed to have antioxidant and anti-inflammatory effects, and if the evidence for efficacy is reinforced through further studies such as in vivo studies and clinical trials in the future, it can be effectively used to treat various inflammatory diseases such as bladder inflammation and chronic pelvic inflammation.

Key Words: Antioxidants, Anti-inflammatory Agents, Vaginitis, *Boeum-jeon*

I. 서 론

건강한 여성은 질 내부 산도가 pH 3.8~4.5로, 질 내 유용 유산균 총이 pH를 산성으로 유지하게 해주어 외부의 감염원으로부터 질 내부를 보호한다. 그러나 질 내부 균총에 변화가 생기면 pH가 증가하게 되고 질염의 감염 확률이 증가하며, 질 분비물, 작열감, 냄새, 소양감, 배뇨통, 성교통 등의 증상으로 나타난다¹⁾.

질염 환자들은 반복적으로 증상이 발현되어 장기간의 치료로 인해서 육체적, 정신적으로 삶의 질뿐만 아니라 건강에 대한 만족도가 크게 떨어지는 것으로 나타났으며²⁾ 반복적으로 재발되어 나타나는 질염의 경우 항생제나 항진균제 치료로는 분명한 한계가 있어서, 질내 정상 세균총을 유지하면서 면역력을 강화시킬 수 있는 치료가 필요하다³⁾.

한의학에서 대하는 병인, 병기를 인체 전신 장부의 기능 장애와 연관시킨다. 즉, 腎氣가 부족하거나 脾 기능에 문제가 생겼을 때에 任脈이 약하게 되며, 帶脈의 기능이 약해져 몸의 水濕이 하부 생식기로 흘러내려 가서 신체 외부로 대하가 많이 흘러내린다고 보았다. 따라서 濕邪가 주요한 병인으로 인식되었으며, 脾虛, 腎陰虛, 腎陽虛, 濕毒, 濕熱 등을 대하를 대표하는 병기로 보고 있다⁴⁾.

保陰煎은 《景岳全書》에서 “治男婦帶

濁遺淋, 色赤帶血, 脈滑多熱, 便血不止, 及血崩血淋, 或經期太早, 凡一切陰虛內熱動血等證”⁵⁾이라고 수록되어 滋陰補腎하고 清熱止血작용⁶⁾으로 부인의 帶下 및 崩漏, 血淋 등 여성의 비노생식기 염증성 질환의 치료에 사용되는 처방이다. 虛熱로 인한 月經過多, 陰虛內熱로 인한 經期延長, 陰虛血熱로 인한 崩漏, 血熱로 인한 胎漏 胎動不安, 陰虛內熱로 인한 滑胎, 血熱로 인한 胎萎不長과 產後惡露不絕 등 가임기 여성의 월경, 붕루뿐만 아니라 임신 출산에까지 작용한다⁴⁾.

최근 여성 생식기의 염증성 질환인 대하 치료를 위한 한약의 항산화, 항염증 효과에 대해 많은 연구가 진행되고 있지만, 보음전에 관한 연구는 보고된 바 없었다. 본 연구자는 in vitro에서 보음전의 항산화 효능, RAW 264.7세포에서 항염증 효능을 평가하였고, 이에 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 재 료

1) 약 재

본 연구에 사용된 보음전(Boeum-jeon, BEJ)의 구성 약재는 한약재 유통업체인 (주)옵니허브에서 검수된 한약재를 구입하여 사용하였으며, 한 첩의 내용 및 분량은 다음과 같다⁷⁾(Table 1).

Table 1. The Prescription of BEJ

Herbal medicine name	Scientific name	Origin	Weight (g)
生地黃	<i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch	Korea	8
熟地黃	<i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch	Korea	8
芍藥	<i>Paeonia lactiflora</i> Pall	Korea	8
山藥	<i>Dioscorea septemloba</i> Thunb	Korea	6
續斷	<i>Phlomis umbrosa</i> TURCZ	China	6
黃芩	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	China	6
黃柏	<i>Phellodendron amurense</i> Ruprecht	China	6
甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	China	4
Total amount			52

2) 시 약

본 연구에는 lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O111:B4(Sigma, U.S.A.), folin-ciocalteu's phenol reagent(Merck, Germany), trypan blue(Sigma, U.S.A.), ethanol(Merck, Germany), quercetin(Sigma, U.S.A.), gallic acid(Sigma, U.S.A.), 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS : Sigma, U.S.A.), fetal bovine serum(FBS : Gibco, U.S.A.), Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM : Gibco, U.S.A.), Acrylamide-Bis Solution 30%, 29:1(Intronbio, Korea) penicillin-streptomycin(Sigma, U.S.A.), Nitrix Oxide plus detection kit(Intronbio, Korea), EZ-cytox(Daeilab, Korea), aluminum nitrate nonahydrate(Sigma, U.S.A.), easy-spin™ total RNA extraction kit(Intronbio, Korea) dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS : Welgene, Korea), accupower® cyclescript RT premix(dT20)(Bioneer, Korea), RIPA lysis and extraction buffer(Thermo Fisher, U.S.A.), qPCR BIO SyGreen Blue Mix Lo-ROX(PCR Biosystems, U.S.A.), Prostaglandin E2 Parameter Assay Kit(R&D Systems, U.S.A.), DEPC-DW(Bioneer, Korea), 10% ammonium persulfate

(Thermo Fisher, U.S.A.), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH:Sigma, U.S.A.), mouse IL-1 beta ELISA kit(Komabiotech, Korea), protease inhibitor cocktail(Sigma, U.S.A.), 0.5M Tris-HCl, mouse IL-6 ELISA kit(Komabiotech, Korea), Pierce™ BCA protein assay Kit(Thermo Fisher, U.S.A.), 1.5M Tris-HCl, pH 6.8 w/SDS(Intronbio, Korea), sodium carbonate(Sigma, U.S.A.), pH 8.8 w/SDS(Intronbio, Korea), potassium acetate solution(Sigma, U.S.A.), phosphatase inhibitor cocktail 3(Sigma, U.S.A.), 10X transfer Buffer(Intronbio, Korea), sample buffer(ELPISbiotech, Korea), mouse TNF-alpha ELISA kit(Komabiotech, Korea), 10X Tris-Glycine-SDS buffer(Intronbio, Korea), phosphatase inhibitor cocktail 2(Sigma, U.S.A.), p 10X TBS with Tween 20(Intronbio, Korea), TEMED(Bio-RAD, U.S.A.), methyl alcohol(Samchunchemicals, Korea), GangNam-STAIN™ prestained protein ladder(Intronbio, Korea), p44/42 MAPK(Erk1/2)(137F5) Rabbit mAb(Cell signaling, U.S.A.), Cox2(D5H5) Antibody(Cell signaling, U.S.A.), iNOS(D6B6S) Antibody(Cell signaling, U.S.A.), NRF2

(D1Z9C) Antibody(Cell signaling, U.S.A.), Phospho-p38 MAPK(Thr180/Tyr182)(D3F9) XP[®] Rabbit mAb(Cell signaling, U.S.A.), p38 MAPK Antibody(Cell signaling, U.S.A.), peroxidase-conjugated affininure goat anti-mouse IgG(H+L)(Jackson immunoresearch, U.S.A.), NQO1 Antibody(Abcam, UK), Phospho-SAPK/JNK(Thr183/Tyr185)(G9) Mouse mAb(Cell signaling, U.S.A.), miracle-star[™] western blot detection system(Intronbio, Korea), SAPK/JNK Antibody(Cell signaling, U.S.A.), Phospho-p44/42 MAPK(Erk1/2)(Thr202/Tyr204)(D13.1 4.4E) XP[®] Rabbit mAb(Cell signaling, U.S.A.), peroxidase-conjugated affininure goat anti-rabbit IgG(H+L)(Jackson immunoresearch, U.S.A.), ultra pure bovine serum albumin(BSA : GenDEPOT, U.S.A.), HO-1(E3F4S) Antibody(Cell signaling, U.S.A.) 등을 사용하였다.

3) 기 기

본 연구에는 extraction mantle(Misung Scientific, Korea), rotary vacuum evaporator(EYELA, Japan), CO₂ incubator(Sanyo, Japan), clean bench(Vision scientific, Korea), freeze dryer(ilShinbiobase, Korea), plate shaker(Lab-Line, U.S.A.), autoclave(Sanyo, Japan), centrifuge(Vision scientific, Korea), luminex(Millipore, U.S.A.), vortex mixer(Vision scientific, Korea), PCR cycler(alpha cycler 1 PCRmax : PCRmax, U.K.), deep-freezer(Sanyo, Japan), micro plate reader(Molecular Devices, U.S.A.), ice-maker(Vision scientific, Korea), flow cytometry system(Becton, Dickinson and Company, U.S.A.), real-time PCR cycler(Rotor-Gene Q : Qiagen, Germany), chemidoc(fusion

FX : Vilber Lourmat, France), nanodrop(Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) 등을 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 시료 추출

10첩 분량의 BEJ(520 g)에 3 ℓ의 증류수를 넣고, 100℃에서 3시간 추출하였으며, 여과지를 사용하여 추출물을 여과하였다. 여과된 추출물은 rotary vacuum evaporator를 이용하여 감압농축하고 freeze dryer를 이용하여 동결건조를 진행하였다. 동결건조 완료 후, BEJ는 110.37 g(수득률 : 21.23%)의 분말을 얻었으며, -20℃에 보관하고 실험 당일날 소분해서 증류수에 용해하여 사용하였다.

2) 항산화 효능 평가

(1) DPPH radical 소거능 측정

BEJ의 최종 농도가 1000, 100, 10, 1 µg/ml 농도가 되게 희석하였으며, 시료와 에탄올과 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 150 µl 각 100 µl씩 섞어서 37℃에서 30분 동안 반응시키고 나서 이후, 517 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 대조군은 증류수를 주입하였고, DPPH 용액의 대조군은 에탄올을 넣어 보정 값을 얻었으며, DPPH 라디칼 소거능은 아래의 수식에 따라 계산하였다.

소거능(%) =

$$\left(\frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

(2) ABTS radical 소거능의 측정

BEJ의 최종 농도가 1, 10, 100, 1000 µg/ml의 농도로 희석하였고, ABTS 용액은 2.6 mM potassium persulphate와 7.4 mM ABTS(2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-

sulfonic acid))를 제조하였다. 이후 암소에 하루 동안 방치해서 양이온(ABTS^{•+})을 형성시켰다. 이후 732 nm에서 흡광도를 측정하고서, 흡광도 결과값이 1.5 이하가 나오도록 희석하였다. 시료 5 µl씩과 희석된 ABTS^{•+} 용액 150 µl을 혼합한 이후 실온에서 10분간 반응시켰고, 이후 732 nm 파장에서 흡광도를 측정 후, ABTS radical 소거능은 아래의 수식을 따라 계산했다. 소거능(%) =

$$(1 - \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}) \times 100$$

3) 세포 배양

생쥐 유래 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)에서 구입 후 사용하였으며, 10%의 Fetal bovine serum(FBS)가 추가된 DMEM 배지를 이용하여 37°C와 5% CO₂ 조건을 유지하는 세포 배양기에서 배양하였으며, 세포의 계대 배양은 2-3일 주기로 진행하였다.

4) 세포 생존율 측정

RAW 264.7 세포는 48 well plate에서 2×10⁴ cells/well로 분주하고 24시간 동안 배양하여 BEJ를 400, 200, 100, 50 µg/ml 농도로 만들어 다시 24시간 동안 배양하였다. 모든 배양이 종료된 후 배양액 100 µl 당 10 µl EZ-Cytox 용액을 추가하여 세포 배양기 안에서 30분간 반응시켰으며, 그 후, 450 nm에서 흡광도를 측정 후 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 나타내었다.

5) Reactive oxygen species 생성량 측정

RAW 264.7 세포를 6 well plate에다가 1×10⁵ cells/well로 분주하고 24시간 동안 배양 후, BEJ를 200, 100, 50 µg/ml의 농도로 처리 후 200 ng/ml의 LPS를 첨가하

여 다시 24시간 동안 배양하였다. 모든 배양이 종료된 후 원심 분리하여 얻은 세포는 차가운 Phosphate buffered saline(PBS)로 세척 후, 10 uM인 DCF-DA를 이용하여 세포 배양기에서 15분간 반응시키고 다시 차가운 PBS로 세척하여 남아있는 2',7'-dichloro-fluorescein diacetate(DCF-DA)를 제거하였다. 이후, flow cytometry system을 통해 ROS 생성량을 분석하였다.

6) Nitric oxide 생성량 측정

RAW 264.7 세포는 48 well plate에다 2×10⁴ cells/well로 분주한 후 24시간 동안 배양해서 BEJ를 200, 100, 50 µg/ml 농도로 처리 후 200 ng/ml의 LPS를 더하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 모든 배양이 끝난 후 N1 buffer 100 µl를 첨가하여 상온에서 10분간 반응시켰고, 반응 후 N2 buffer 100 µl를 첨가하여 상온에서 10분 동안 반응시켰다. 그리고 반응 이후, 540 nm에서의 흡광도 측정을 하였다.

7) Cytokine 생성량 측정

RAW 264.7 세포는 6 well plate에다 1×10⁵ cells/well로 분주해서 24시간 동안 배양해서 BEJ를 200, 100, 50 µg/ml 농도로 처리하였고, 200 ng/ml의 LPS를 첨가하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 모든 배양이 끝난 후, 96 well plate에 분리한 세포 배양액 100 µl를 넣어 상온에서 2시간 반응시켰다. 반응 후 plate에 있는 남은 시약을 버리고, washing buffer를 넣어서 4회 세척하였으며, 세척한 후 detection antibody를 100 µl씩 첨가하여 상온에서 2시간 반응시켰다. 그리고 반응 후 plate에 streptavidin-HRP 100 µl씩 추가하여 상온에서 30분 반응시켰으며, 반응 후 TMB or pink-ONE solution 100 µl씩 각 well에 넣은 후 15분간 반응시켰다. 이후 100 µl의 stop solution

을 첨가하여 micro reader를 통해서 450 nm에서의 흡광도를 측정하고, standard curve를 기준으로 해서 절대값으로 나타내었다.

8) 유전자 발현량 측정

RAW 264.7 세포를 6 well plate에다 1×10^5 cells/well로 분주해서 24시간 동안 배양해서 BEJ를 200, 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하고 200 ng/ml의 LPS를 추가한 이후, 다시 24시간 동안 배양하였다. 모든 배양이 종료된 이후, 원심 분리해서 얻은 세포와 total RNA prep kit를 이용하여 RNA를 추출했으며, 추출한 RNA는 reverse

transcription premix에 혼합하고 PCR cycler를 이용하여 45°C에서 60분 동안, 95°C에서 5분 동안 반응을 통하여 cDNA를 합성했다. 합성된 cDNA로부터 특정한 유전자를 증폭시켜 확인하기 위해서 real-time PCR을 진행했으며, cDNA와 특정 유전자가 맞는 primer와 SYBR green premix를 혼합하여 95°C에서 2분 동안 반응시키고 95°C에서 5초, 62.5°C에서 30초를 40번 반복하여 특정 유전자를 증폭시켰다. 유전자 발현량 측정은 대조군의 유전자 발현량을 기준으로 상대정량 했으며, 이용된 primer들의 정보는 다음 Table 2와 같다.

Table 2. Real-Time PCR Primer Sequences

Gene name	Size (bp)	F/R*	Sequences
iNOS [*]	127	F	GCTCCAGCATGTACCCTCAG
		R	AAGGCATCCTCCTGCCACT
COX-2 [‡]	128	F	CCGTGGGGAATGTATGAGCA
		R	GGGTGGGCTTCAGCAGTAAT
IL-1 β [§]	135	F	GCCACCTTTTGACAGTGATGAG
		R	ATGTGCTGCTGCGAGATTTG
IL-6	141	F	CCCCAATTTCCAATGCTCTCC
		R	CGCACTAGGTTTGCCGAGTA
TNF- α [¶]	129	F	GATCGGTCCCCAAAGGGATG
		R	TTTGCTACGACGTGGGCTAC
Beta actin	102	F	CACTGTGAGTTCGCGTCC
		R	CGCAGCGATATCGTCATCCA

F : forward, R : reverse, ^{}iNOS : inducible nitric oxide synthase, [‡]COX-2 : cyclooxygenase-2, [§]IL-1 β : Interleukin-1 β , ^{||}IL-6 : Interleukin 6, [¶]TNF- α : Tumor necrosis factor- α

9) 단백질 발현량 측정

RAW 264.7 세포를 6 well plate에다가 1×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하고 보음전을 200, 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 200 ng/ml의 LPS를 첨가하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 모든 배양이 종료된 후, 원심 분리하여 얻은 세포는 protease inhibitor cocktail I,

phosphatase inhibitor II, III가 포함되어 있는 RIPA buffer를 넣어 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 BCA protein assay kit를 이용하여 정량하였으며, sample loading buffer와 섞어 95°C에서 5분 동안 반응시켜 준비하였다. 준비된 단백질은 10% acrylamide gel을 통해서 SDS-PAGE하여 사이즈별로 분리하였고, PVDF membrane

에 이동시켰다. 단백질이 옮겨진 membrane 을 3% BSA에 담가서 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후 TBS-T buffer를 사용하여 세척하고 primary antibody를 넣어서 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 이후 다시 3회 세척하고 나서 secondary antibody를 넣어서 상온에 1시간 동안 반응시킨 후, 다시 세척하고 ECL solution을 이용하여 단백질을 발색시켰으며, 이후, chemidoc fusion FX를 통해서 단백질 발현량을 분석했다.

3. 통계 처리

연구 결과는 SPSS Statistics Version 21.0 (IBM, U.S.A.)을 이용하여 mean±standard error of mean으로 나타내었다. 먼저 두 그룹 간 통계적 비교는 independent sample

t-test를 이용하여 수행하였으며, 여러 그룹 간 통계적 비교는 analysis of variance (ANOVA)를 이용하여 수행하였다. 이후 Tukey's HSD test를 통하여 유의수준 0.05로 설정하여 유의성을 검정하였고, $p < 0.05$, $p < 0.01$ 와 $p < 0.001$ 의 3가지 유의수준으로 나눠서 표기하였다.

III. 실험 결과

1. 세포생존율

세포생존율의 측정된 결과를 보면, BEJ는 400 µg/ml 이상의 농도에서 세포에 대한 독성이 나타나 이후 실험에서는 200 µg/ml 농도까지 진행하였다(Fig. 1).

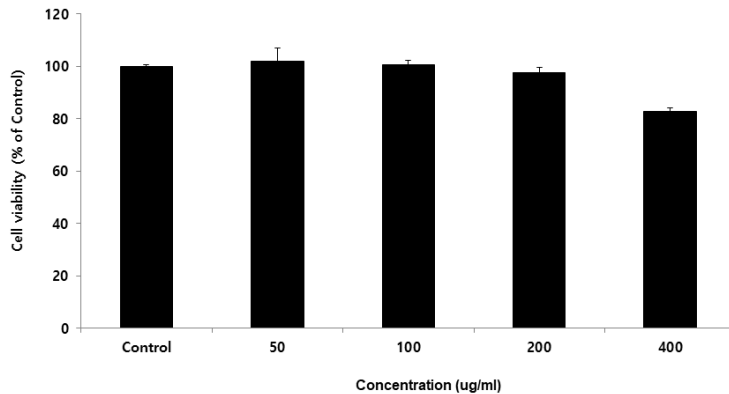


Fig. 1. Cell viability of BEJ in RAW 264.7 cells.

2. 항산화 효능 평가

1) DPPH radical의 소거능

DPPH radical 소거능의 측정된 결과를 보면, BEJ는 농도 의존적인 소거능의 증가가 나타났다(Fig. 2).

2) ABTS radical 소거능

ABTS radical 소거능의 측정된 결과를 보면, BEJ는 농도 의존적인 소거능의 증가가 나타났다(Fig. 3).

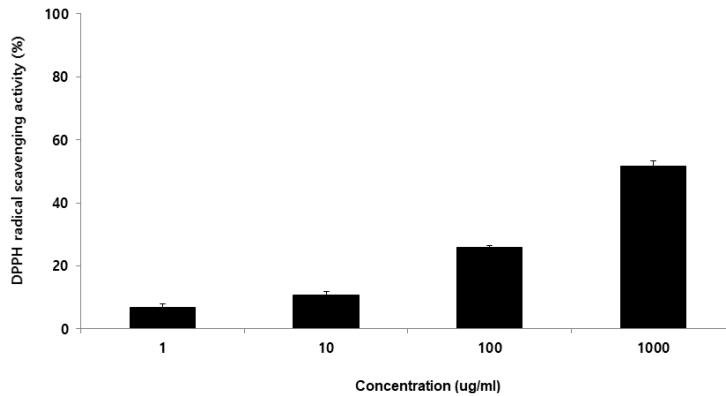


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of BEJ.

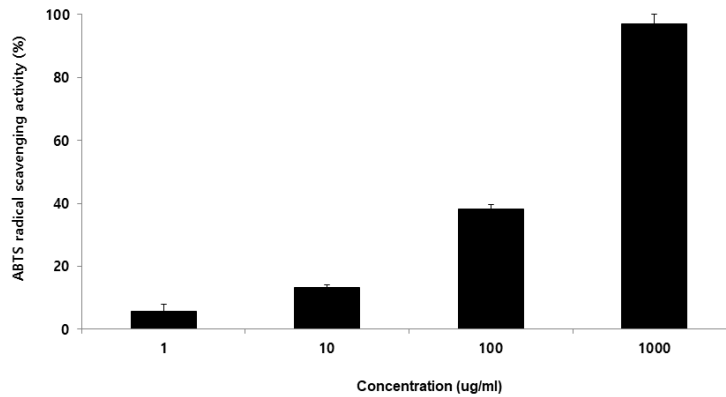


Fig. 3. ABTS radical scavenging activity of BEJ.

3. 항염증 효능

1) Reactive oxygen species(ROS) 생성량

ROS 생성량을 측정한 결과에서는 BEJ는 50 µg/ml 이상의 농도에서 농도 의존적이고 대조군과 비교해 유의성 있는 감

소를 보였다(Fig. 4).

2) Nitric oxide(NO) 생성량

Nitric oxide 생성량을 측정한 결과, BEJ는 50 µg/ml 이상 농도에서 농도 의존적이며, 대조군과 비교해 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 5).

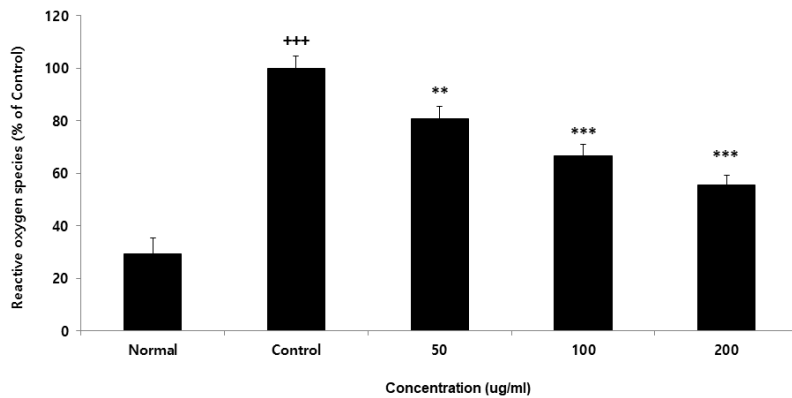


Fig. 4. Effect of BEJ on reactive oxygen species level in RAW 264.7 cells.
 ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compared to control, +++ : $p < 0.001$ compared to normal

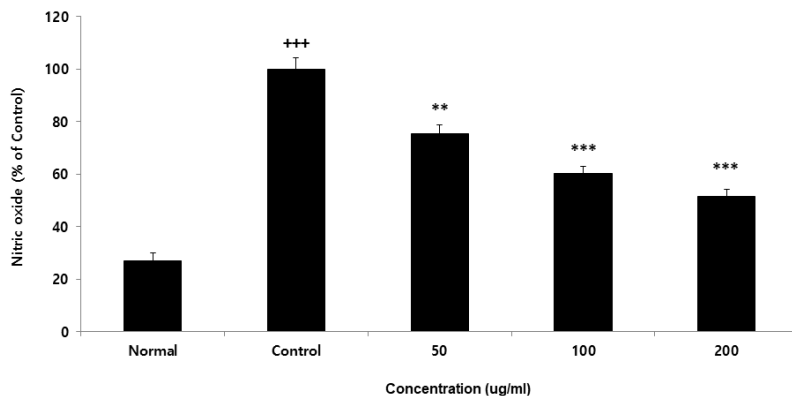


Fig. 5. Effect of BEJ on nitric oxide level in RAW 264.7 cells.
 ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compared to control, +++ : $p < 0.001$ compared to normal

3) Cytokine 생성량

① Prostaglandin E2(PGE2)

Prostaglandin E2 생성량을 측정한 결과, BEJ는 50 $\mu\text{g/ml}$ 이상 농도에서 대조군과 비교해 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 6).

② Interleukin-1 β (IL-1 β)

Interleukin 1 beta 생성량을 측정한 결

과, BEJ는 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상 농도에서 농도 의존적이고 대조군과 비교해 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 7).

③ Interleukin 6(IL-6)

Interleukin 6 생성량을 측정한 결과, BEJ는 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상 농도에서 대조군과 비교해 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 8).

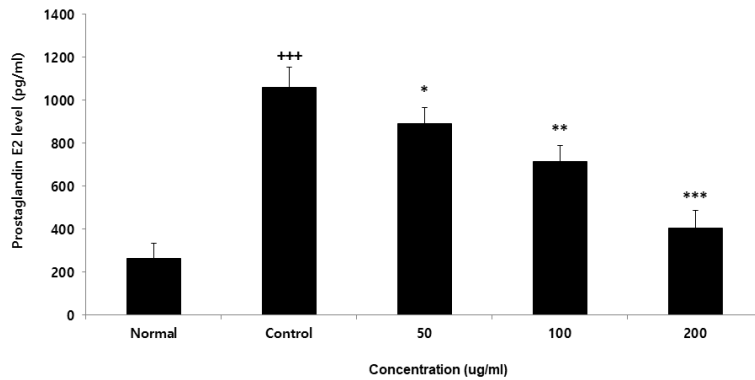


Fig. 6. Effect of BEJ on prostaglandin E2 level in RAW 264.7 cells.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compared to control, +++ : $p < 0.001$ compared to normal

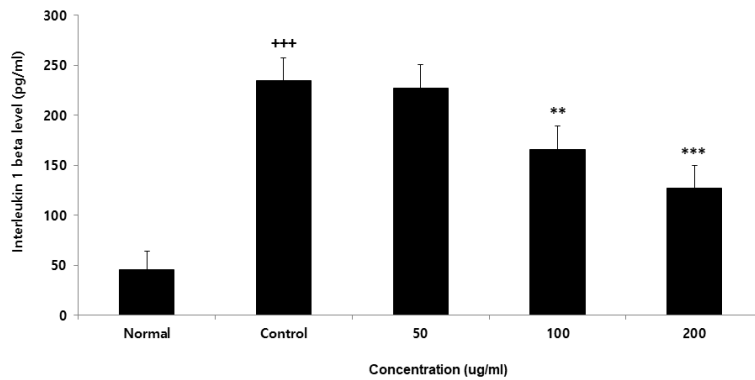


Fig. 7. Effect of BEJ on interleukin 1 beta level in RAW 264.7 cells.

** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compared to control, +++ : $p < 0.001$ compared to normal

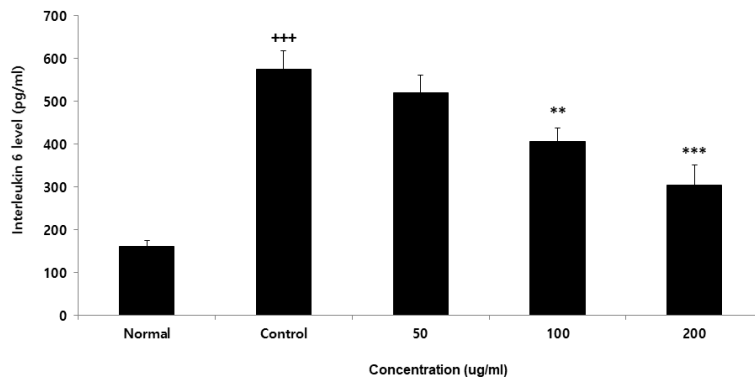


Fig. 8. Effect of BEJ on interleukin 6 level in RAW 264.7 cells.

** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compared to control, +++ : $p < 0.001$ compared to normal

④ Tumor necrosis factor- α (TNF- α)
Tumor necrosis factor alpha 생성량을
측정한 결과, BEJ는 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상 농도

에서 농도 의존적이고 대조군과 비교해
유의성 있는 감소를 나타냈다(Fig. 9).

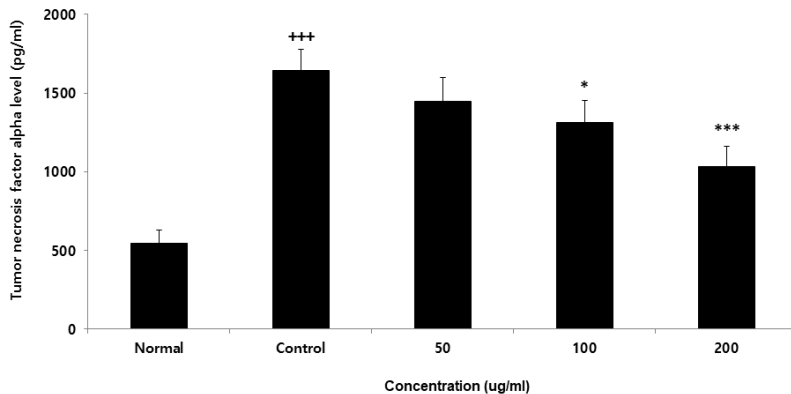


Fig. 9. Effect of BEJ on tumor necrosis factor alpha level in RAW 264.7 cells.
 * : $p < 0.05$, *** : $p < 0.001$ compared to control, +++ : $p < 0.001$ compared to normal

4) 유전자 발현량

① Inducible nitric oxide synthase(iNOS)

iNOS의 유전자 발현량 측정 결과에서는 BEJ는 50 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 농도 의존적이고 대조군과 비교해 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 10).

② Cyclooxygenase-2(COX-2)

COX-2의 유전자 발현량 측정 결과를 보면 BEJ는 50 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 농도 의존적이고 대조군과 비교해 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 11).

③ Interleukin-1 β (IL-1 β)

IL-1 β 의 유전자 발현량 측정 결과를 보면, BEJ는 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 농도 의존적이고 대조군과 비교해 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 12).

④ Interleukin-6(IL-6)

IL-6의 유전자 발현량 측정 결과를 보면, BEJ는 50 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 농도 의존적이고 대조군과 비교해 유의성 있는 감소가 나타났다(Fig. 13).

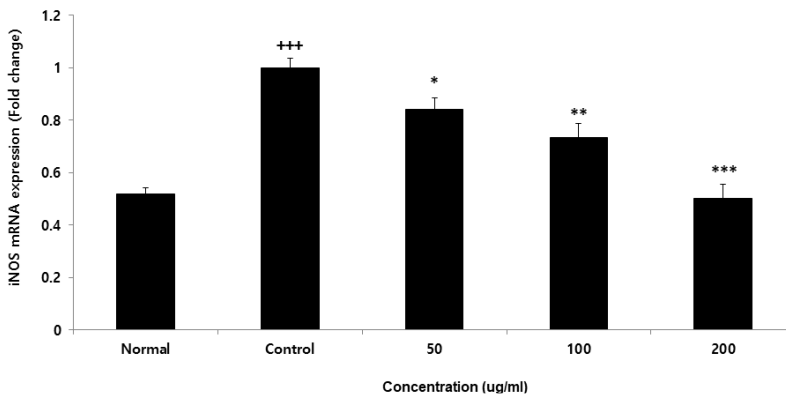


Fig. 10. Effect of BEJ on iNOS mRNA expression level in RAW 264.7 cells.
 * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compared to control, +++ : $p < 0.001$ compared to normal

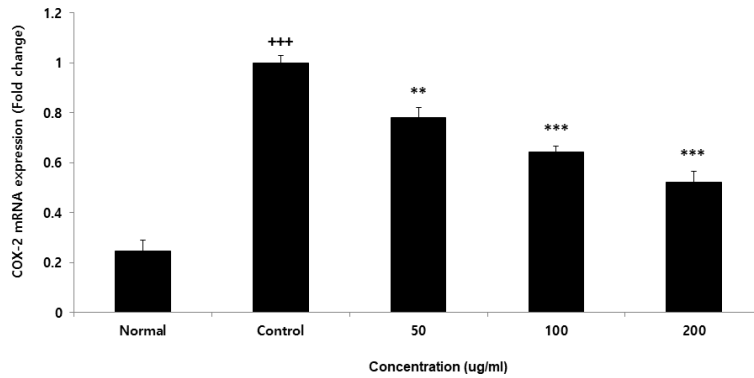


Fig. 11. Effect of BEJ on COX-2 mRNA expression level in RAW 264.7 cells.
 ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compared to control, +++ : $p < 0.001$ compared to normal

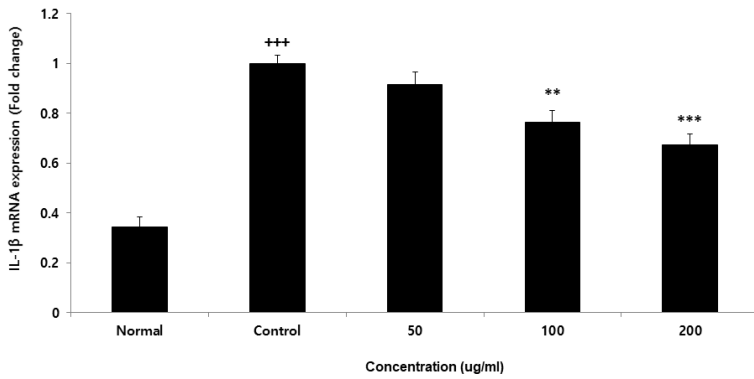


Fig. 12. Effect of BEJ on IL-1β mRNA expression level in RAW 264.7 cells.
 ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compared to control, +++ : $p < 0.001$ compared to normal

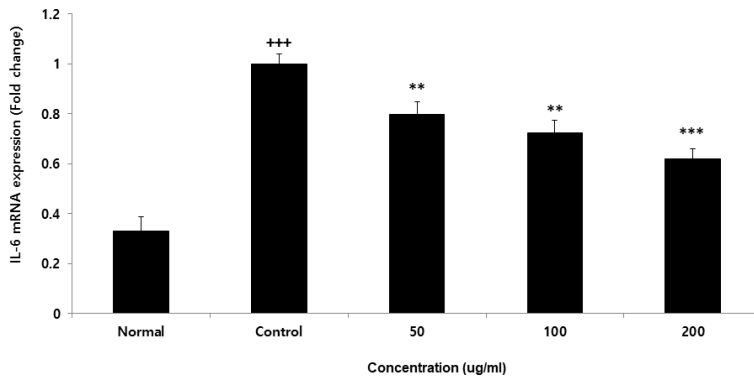


Fig. 13. Effect of BEJ on IL-6 mRNA expression level in RAW 264.7 cells.
 ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compared to control, +++ : $p < 0.001$ compared to normal

⑤ Tumor necrosis factor-α(TNF-α)

TNF-α의 유전자 발현량 측정 결과를 보면 BEJ는 50 μg/ml 이상의 농도에서 농도 의존적이고 대조군과 비교해 유의

성 있는 감소를 보였다(Fig. 14).

⑥ Hemeoxygenase 1(HO-1)

HO-1 유전자 발현량을 측정한 결과를 보면, BEJ는 50 μg/ml 이상의 농도에서

농도 의존적이고 대조군과 비교해 유의성 있는 증가가 나타났다(Fig. 15).

⑦ NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1)

NQO1 유전자 발현량 측정 결과를 보면, BEJ는 50 µg/ml 이상의 농도에서 농도 의존적이고 대조군과 비교해 유의성 있는 증가가 나타났다(Fig. 16).

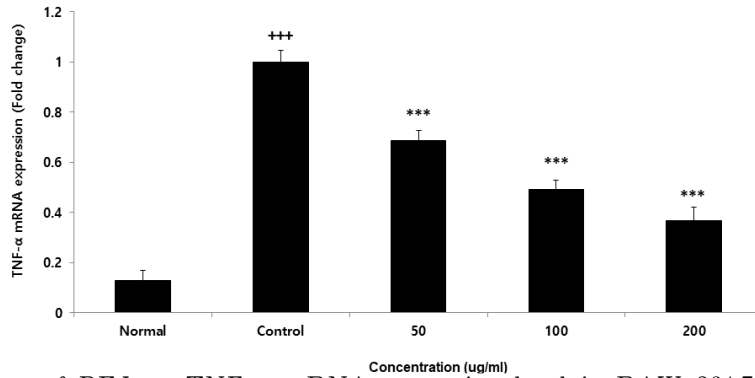


Fig. 14. Effect of BEJ on TNF-α mRNA expression level in RAW 264.7 cells.
*** : p<0.001 compared to control, +++ : p<0.001 compared to normal

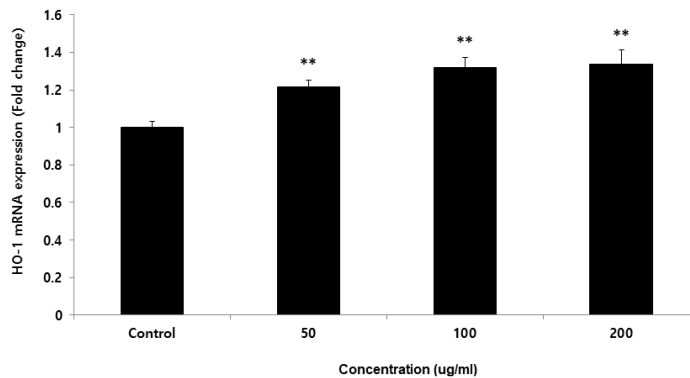


Fig. 15. Effect of BEJ on HO-1 mRNA expression level in RAW 264.7 cells.
** : p<0.01 compared to control

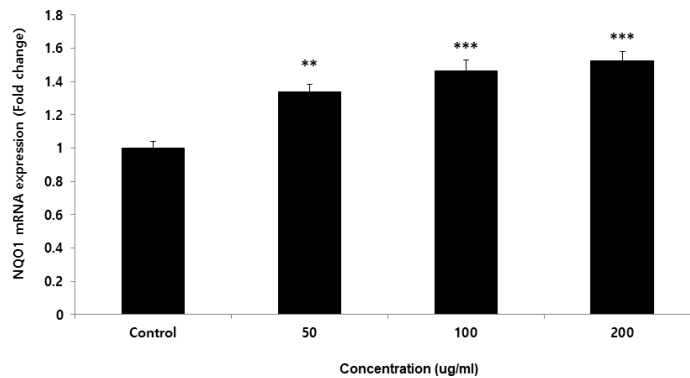


Fig. 16. Effect of BEJ on NQO1 mRNA expression level in RAW 264.7 cells.
** : p<0.01, *** : p<0.001 compared to control

5) 단백질 발현량

① Inducible nitric oxide synthase(iNOS)

iNOS 단백질 발현량을 측정한 결과, BEJ는 50 µg/ml 이상의 농도에서 농도 의존적이고 대조군과 비교해 유의성 있는 감소가 나타났다(Fig. 17).

② Cyclooxygenase-2(COX-2)

COX-2 단백질 발현량을 측정한 결과, BEJ는 50 µg/ml 이상 농도에서 대조군과 비교해서 유의성 있는 감소가 나타났다(Fig. 18).

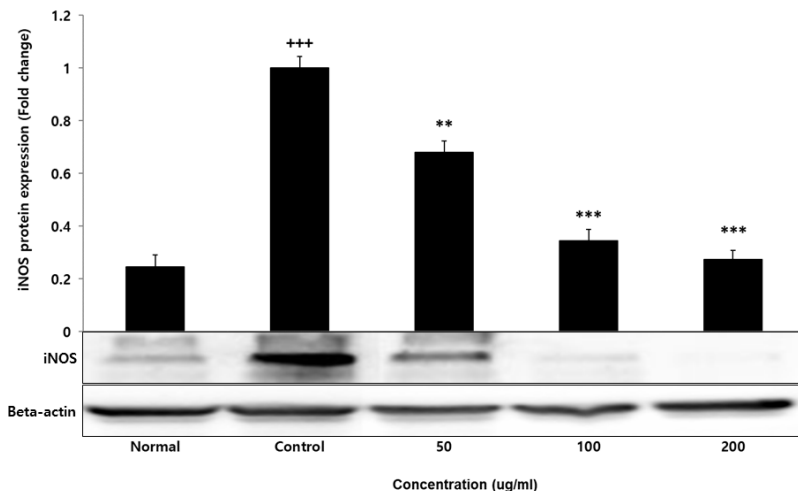


Fig. 17. Effect of BEJ on iNOS protein expression level in RAW 264.7 cells. ** : p<0.01, *** : p<0.001 compared to control, +++ : p<0.001 compared to normal

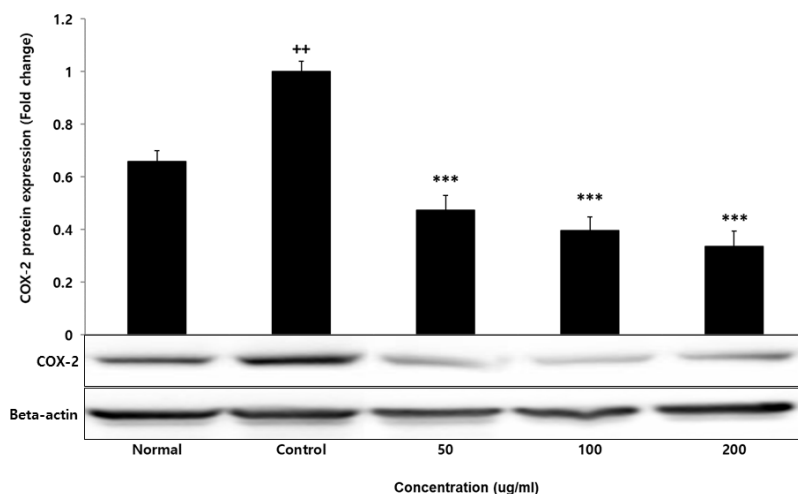


Fig. 18. Effect of BEJ on COX-2 protein expression level in RAW 264.7 cells. *** : p<0.001 compared to control, ++ : p<0.01 compared to normal

③ Interleukin-1β(IL-1β)

IL-1β 단백질 발현량을 측정한 결과,

BEJ는 50 µg/ml 이상의 농도에서 농도 의존적이고 대조군과 비교해 유의성 있

는 감소가 나타났다(Fig. 19).

④ Interleukin-6(IL-6)

IL-6 단백질 발현량을 측정 한 결과,

BEJ는 100 µg/ml 이상 농도에서 대조군과 비교해서 유의성 있는 감소가 나타났다(Fig. 20).

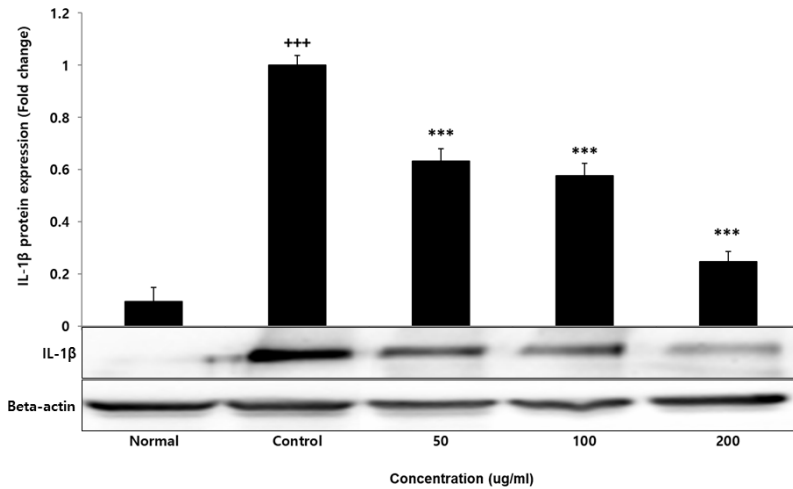


Fig. 19. Effect of BEJ on IL-1β protein expression level in RAW 264.7 cells. *** : p<0.001 compared to control, +++ : p<0.001 compared to normal

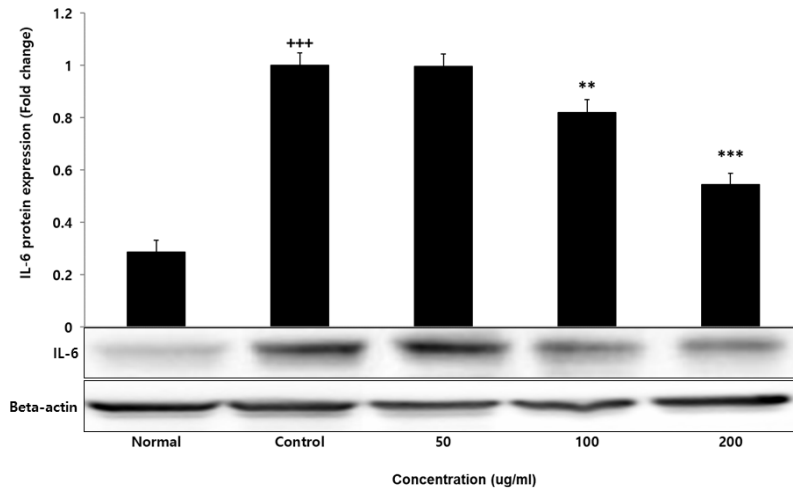


Fig. 20. Effect of BEJ on IL-6 protein expression level in RAW 264.7 cells. ** : p<0.01, *** : p<0.001 compared to control, +++ : p<0.001 compared to normal

⑤ Tumor necrosis factor-α(TNF-α)

TNF-α 단백질 발현량을 측정 한 결과, BEJ는 100 µg/ml 이상의 농도에서 농도의존적이고 대조군과 비교해 유의성 있는 감소가 나타났다(Fig. 21).

⑥ Hemeoxygenase 1(HO-1)

HO-1 단백질 발현량을 측정 한 결과, BEJ는 50 µg/ml 이상의 농도에서 농도의존적이고 대조군과 비교해 유의성 있는 증가가 나타났다(Fig. 22).

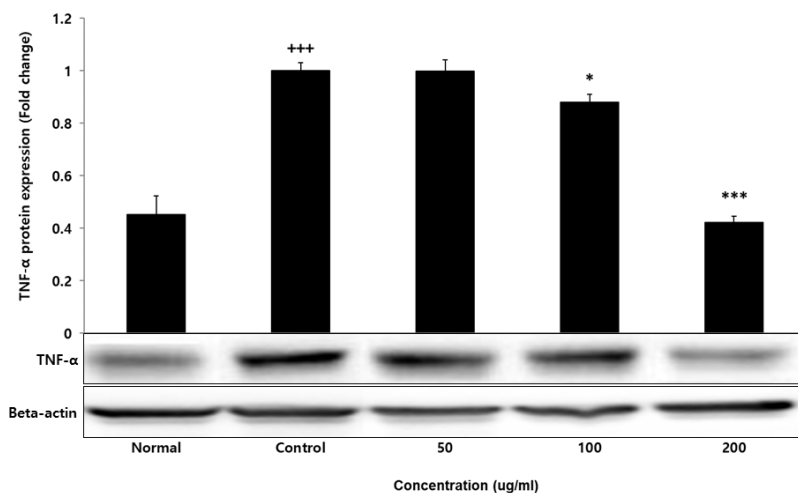


Fig. 21. Effect of BEJ on TNF-α protein expression level in RAW 264.7 cells.
 * : p<0.05, *** : p<0.001 compared to control, +++ : p<0.001 compared to normal

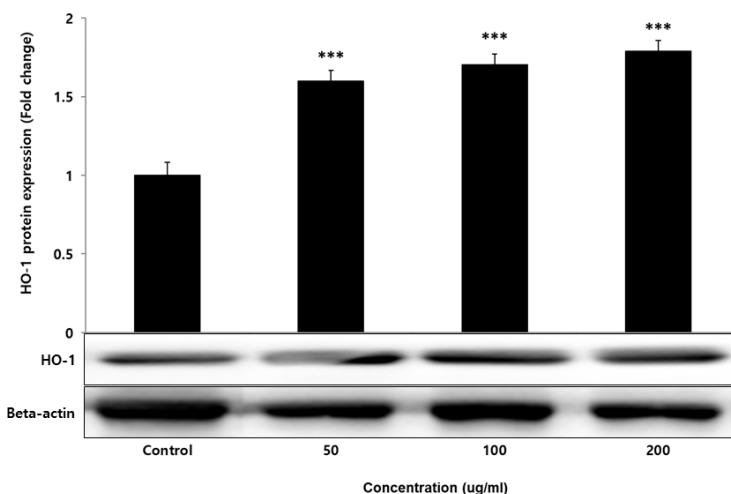


Fig. 22. Effect of BEJ on HO-1 protein expression level in RAW 264.7 cells.
 *** : p<0.001 compared to control

⑦ NAD(P)H: quinine oxidoreductase 1 (NQO1)

NQO1 단백질 발현량을 측정한 결과, BEJ는 50 μg/ml 이상의 농도에서 농도 의존적이고 대조군과 비교해 유의성 있는 증가가 나타났다(Fig. 23).

⑧ Nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2)

NRF2 단백질 발현량을 측정한 결과, BEJ는 200 μg/ml 농도에서 대조군과 비교해 유의성 있는 증가가 나타났다(Fig. 24).

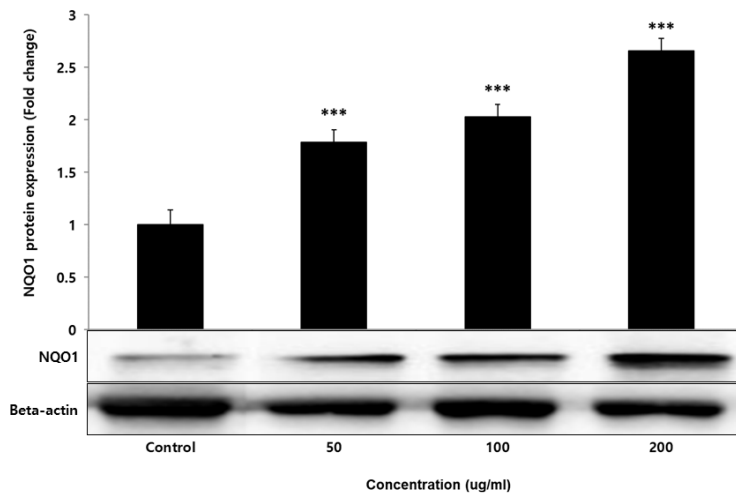


Fig. 23. Effect of BEJ on NQO1 protein expression level in RAW 264.7 cells.
*** : p<0.001 compared to control

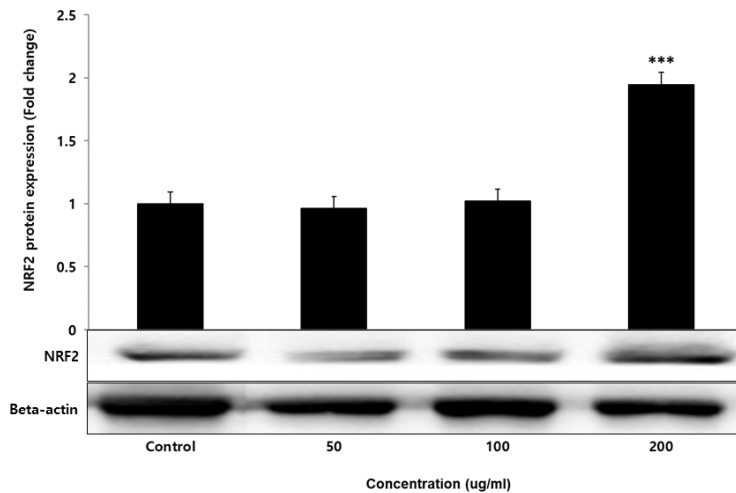


Fig. 24. Effect of BEJ on NRF2 protein expression level in RAW 264.7 cells.
*** : p<0.001 compared to control

IV. 고찰

대하는 출혈 이외에 질 바깥으로 나오는 분비물을 말하는데, 건강한 상태의 여성 생식기 점막은 분비물로 촉촉하게 적셔져 있으며, 호르몬 변화에 따른 배란기나 월경 전후 또는 임신 기간 중에 비교적 양이 증가하지만 대개는 질 밖으로

흐르지 않는다⁴⁾. 그러나 분비물의 양이 지나치게 많거나, 생식 내강의 어떤 부위에서 병적인 상황이 진행되면 이상 삼출물이 분비되는데⁵⁾, 악취, 국부의 소양감과 작열감, 소복창통 및 동통 등이 함께 나타나며, 이는 자궁경부, 질, 난관 등의 단순한 감염으로 인한 경우가 가장 많다⁵⁾.

保陰煎은 《景岳全書》〈卷之五十一 德集 新方八陣〉에서 “治男婦帶濁遺淋, 色赤帶血, 脈滑多熱, 便血不止, 及血崩血淋, 或經期太早, 凡一切陰虛內熱動血等證”⁵⁾에 수록된 처방으로 陰虛內熱에 의한 각종 비뇨생식기 염증성 증상을 치료하기 위해 사용되며, 陽熱이 항성하여 陰血이 손상되는 것을 방지하므로 保陰이라고 명명하였다⁷⁾. 保陰煎을 구성하는 약물의 효능을 살펴보면 生地黃은 淸熱生津, 涼血止血하고, 熟地黃은 滋陰補血하며, 芍藥은 酸寒하여 수렴하는 작용이 있는데, 숙지황과 배합하면 補血하고 생지황과 배합하면 淸血하는 작용이 강해진다. 黃芩과 黃柏은 淸熱하는 대표 약물로, 淸熱燥濕, 瀉火解毒하는데, 黃芩은 주로 中上焦의 열을 내리고 黃柏은 下焦의 열을 내리는 작용이 있다. 山藥은 補脾養胃, 生津益肺하고 收斂하는 작용이 있어서 補腎澁精하여 帶濁이나 遺精을 치료하고, 續斷은 續筋骨, 血脈을 조절하고, 補肝腎하여 崩漏, 帶下, 遺精을 치료하고, 甘草는 解毒, 調和諸藥, 健脾益氣한다⁸⁾. 보음전은 滋陰補腎하고 淸熱止血的 효능으로 陰虛內熱血熱한 증상을 다스릴 수 있다⁶⁾.

음허증은 면역, 내분비, 에너지 대사, cytokine, 혈액 순환, 미량 원소 함량, 활성 산소 제거 기능, 지질 대사 등의 이상으로 표현할 수 있어⁹⁾, 陰虛內熱證에 사용하는 補陰藥의 대표 처방인 보음전으로 항산화, 항염증 효능 실험 연구를 설계하였으며, 본 연구에서는 in vitro에서 보음전의 항산화 효능과 RAW 264.7 세포에서의 항염증 효능을 규명하기 위한 실험을 진행하였다.

먼저 보음전의 세포 독성을 알아보기 위해 세포 생존율을 측정하였는데, 생쥐

에서 유래한 대식세포인 RAW 264.7 세포에 BEJ를 처리하였을 때 200 µg/ml 이하 농도에서 97% 이상의 세포 생존율을 보이며, 정상 세포에 대한 세포 독성은 보이지 않았다.

DDPH radical과 ABRS radical은 화학적으로 안정적인 free radical을 가지는 수용성 물질인데, 항산화 활성이 있는 물질을 만나게 되면 전자를 내주면서 radical이 소멸되어 색깔이 변하게 된다¹⁰⁾. 항산화 효능을 측정한 결과, BEJ는 DDPH radical 소거능과 ABTS radical 소거능에서 농도 의존적으로 증가가 나타났으며 이러한 실험결과는 BEJ의 항산화 효과를 보여준다고 할 수 있다.

또한 보음전의 항염증 효능 평가를 위해 LPS로 유도된 RAW 264.7세포를 가지고 ROS, NO, Cytokine 생성량과 유전자 발현량, 단백질 발현량을 측정하였다.

우리 인체는 체내로 박테리아나 바이러스 같은 외부물질이 유입되면, 면역 세포가 이를 인지해서 다양한 염증 매개 물질을 분비하여 몸을 보호해준다¹¹⁾. 특히 대식세포(macrophage) RAW 264.7 세포는 그람음성세균(Gram negative bacteria)의 바깥 표층 peptide glycan을 둘러싸고 있는 외막의 중요한 구성 성분 중 지질 다당류(lipopolysaccharide, LPS)에 의해 활성화되어서 염증반응을 일으키며, 이때 염증 매개 인자인 NO나 PGE2와 염증 매개 cytokine인 IL-6, IL-1β, TNF-α 및 iNOS와 COX-2 생성을 조절하여 열, 통증, 부종 등의 염증 반응을 일으키고, 염증 부위로 면역 세포의 이동을 촉진하여, 우리 인체 방어에 중요한 역할을 한다^{12,13)}. 활성화된 대식세포는 높은 수준의 iNOS가 발현되며, 이 효소는 아르기

닌을 산화시켜서 NO와 citrulline을 생산한다. 일반적인 NO생성은 종양을 제거시키거나 박테리아를 죽이는 중요한 역할을 하는데, 염증 상태에서 iNOS에 의해서 과잉 생성된 NO는 부종, 혈관 투과성 등의 염증반응을 촉진시키며, 염증 매개체의 생합성을 촉진시켜 염증을 심하게 만드는 것으로 알려져 있으며, 심부전이나 출혈, 심하면 폐혈성 쇼크 상태를 유발하게 된다^{14,15}). LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서의 NO 생성을 관찰한 결과 NO의 농도는 LPS 자극에 의해서 증가하였으며, BEJ 처리군에서는 농도 의존적으로 대조군에 비해 생성이 감소하여(Fig. 5) BEJ는 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하여 염증반응을 억제함을 확인할 수 있었다.

LPS로 자극한 대식세포는 PGE2와 염증 매개 인자로 알려진 IL-6, IL-1 β , TNF- α 를 분비하는데, 이들은 급성 염증 반응을 조절하는 데 중요한 역할을 한다. TNF- α 는 염증 반응의 초기에 급성 염증 반응을 일으켜 악화시키는 인자로, 해당 부위로 호중구를 유도해서 감염을 극소화하는 역할을 하는데, 일단 감염이 혈액을 통해 확산되면 대식세포가 전신에서 TNF- α 생성 분비를 유도하여 혈관 확장, 혈관의 투과성 증가, 혈압 강하를 일으켜서 그로 인해 혈장이 손실되어 shock을 일으킬 수도 있다^{16,17}). 또한, IL-1 β 는 대식세포를 활성화하고, 호중구 및 림프구의 내피 세포 접착을 항진시키며, Chemokine 생성을 유도하여 염증 부위로 염증 세포 침윤을 증가시킨다¹⁸). 특히 IL-6은 B림프구의 성장과 분화를 통해 항체를 생산, 분비하는 데 중요 역할을 하며, 염증성 질환을 만성화된 단계로 발전시킨다¹⁹).

BEJ가 cytokine 생성에 끼치는 영향을 실험한 결과 BEJ 투여군은 농도 의존적으로 PGE2, IL-6, IL-1 β , TNF- α 의 생성을 감소시켜, 염증 반응을 억제함을 알 수 있었다(Fig. 6-9).

ROS는 산화적 대사에서 만들어지는 중요한 중간 생성물로 적정량의 ROS는 세포 내 항상성 유지를 위해 기본적으로 필요하다. 하지만 만성화된 염증 상태에서 지속적인 ROS 생성은 염증 관련 유전자의 과잉 발현을 통해서 대식세포의 염증 신호를 증폭시킨다²⁰). 또한 염증 반응과 동반한 산화적 스트레스로 인해서 과다한 ROS의 생산은 염증 부위로 추가적인 대식세포와 호중구(neutrophils)의 이주를 자극해서 cytokine과 염증성 매개 인자의 추가적인 분비를 촉진시킨다²¹). 따라서 LPS 자극에 의해서 ROS 생성에 대한 BEJ의 억제 효과를 조사한 결과, LPS 자극으로 유도된 RAW 264.7 세포에서 BEJ는 농도 의존적으로 ROS 생성을 억제하였는데, 이는 염증이 동반되는 산화적 스트레스를 함께 억제시킬 수 있는 가능성을 시사한다.

NO는 매우 반응성이 큰 생체 생성분자인데, 효소인 NOS에 의해서 L-arginine이 L-citrulline으로 합성될 때 만들어진²²). iNOS는 평소에는 발현되지 않는 상태이다가 LPS나 전염증성 cytokine등에 의해 자극을 받게 되면 대식세포에서 과잉 발현되면서 과량의 NO를 생성하게 되는데, 이는 염증을 일으켜 조직의 손상을 가져오는 것으로 알려져 있다²³).

한편, Cyclooxygenase(COX)는 arachidonic acid를 Prostaglandin으로 변화를 촉진하는 효소로, 대부분 조직에서는 정상적인 상태에 발현하여 신장 기능 조절, 위장

관 보호와 같은 인체의 항상성 유지에 관여하는 COX-1이 있고, 일부 신생 조직과 염증 반응이나 기타 면역 반응 시에 세포 분열 인자나 사이토카인에 의해 염증 부위에서 세포 내 발현이 늘어나는 COX-2가 있다. 즉, NO, PGE2와 iNOS와 COX-2의 발현은 면역 세포에서 대표적인 염증인자이다²⁴⁾.

LPS는 LBP(LPS-binding protein)에 의해서 복합체를 만들고, 이것이 혈액 내 대식세포의 CD14에 결합해서 TLR-4(Toll like receptor-4)에 인식되면 NF- κ B 및 MAPK를 활성화 하여 전사인자를 활성화 시켜서 염증 매개 물질을 만들어내게 된다²⁵⁾. 염증 매개 물질의 생성을 조절해주는 전사인자인 NF- κ B는 보통 내생성 억제 분자인 I κ B- α 단백질에 결합된 상태로 세포질에 존재하는데, 다양한 원인에 의해 자극이 되면 염증 반응으로 I κ B- α 가 분해 및 인산화되어 활성화되고 활성화된 NF- κ B는 핵 안으로 들어가 PGE2, TNF- α , IL-6, IL-1 β , iNOS와 COX-2 등의 발현을 증가시키고 염증 반응을 가속화하기 때문에, 항염증 작용에 있어서 NF- κ B의 활성화 억제는 매우 중요한 부분이다^{26,27)}.

본 실험에서 BEJ의 항염증 효과를 mRNA 수준에서 확인하기 위해 RT-PCR을 진행하였다. LPS에 유도된 RAW 264.7 세포에 BEJ를 처리 시, pro-inflammatory cytokine인 IL-6, IL-1 β , TNF- α 의 발현과 inflammatory mediator인 iNOS와 COX2의 발현을 조사한 결과, BEJ는 TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS, COX2의 생성을 모두 의미 있게 억제하는 것으로 나타났다. IL-1 β 는 BEJ 농도 100 μ g/ml 이상, IL-6과 TNF- α 는 농도 50 μ g/ml 이상 농도에

서 유의한 억제 효과를 보였으며(Fig. 12-14), iNOS와 COX2는 모두 50 μ g/ml 이상의 농도에서 대조군과 비교해서 유의한 감소를 보였다(Fig. 10, 11). 이러한 결과를 통해, BEJ는 pro-inflammatory cytokine과 inflammatory mediator의 mRNA 발현을 억제시켜 항염증 작용을 한다고 볼 수 있다.

Nrf2는 phase II 해독과 항산화효소를 암호화하는 세포 보호 유전자 발현을 조절해주는 중요한 인자로서 산화 스트레스가 발생하면 활성 친전자체(reactive electrophiles)를 중화시켜서 항산화효능 역할을 담당하며, AREa(antioxidant response element)와 결합되어 HO-1과 NQO1 등 항산화 효소들의 발현을 증가시킨다²⁸⁾.

Nrf2의 전사활성에 의해서 조절되는 HO-1은 heme으로부터 biliverdin, CO 그리고 free iron으로 분해되는 과정에서 염증성 인자들 생성을 효과적으로 차단시키는 표적인 항산화 효소이다. 또한 heme의 분해 산물 중 biliverdin과 CO는 COX-2와 iNOS의 발현을 감소시켜서 PGE2와 NO의 생성을 억제할 수도 있다^{29,30)}. 따라서 이러한 항산화 및 항염증 효능을 함께 가지는 HO-1 발현을 조절해주는 전사인자인 Nrf2는 세포의 염증성뿐만 아니라 산화적 자극에 대한 항상성을 유지하는 데 중요한 역할을 담당한다³¹⁾.

또 Nrf2 항산화 효소 중 한 가지인 NQO1은 세포질 내 존재하면서 항산화 작용을 통해서 세포 보호 작용을 하는 효소 중 하나인데 퀴논의 대사 과정 속에서 반응성이 높은 세미퀴논이 아닌 독성이 적은 하이드로 퀴논으로 변환을 해서 세포를 보호하는 능력을 보이는 것으로 알려져 있다³²⁾. Yang 등³³⁾의 연구를 보면 Nrf2

에 의한 HO-1과 NQO-1의 활성이 염증 인자인 COX-2와 iNOS의 발현 억제와 관련 있음을 알 수 있었다.

결론적으로 BEJ는 RAW 264.7 대식세포에서 LPS로 유도된 염증에서 PGE₂와 NO의 활성을 매개하는 유전자인 COX와 iNOS를 농도 의존적으로 억제하였고(Fig. 10, 11), HO-1, NQO1은 BEJ 50 µg/ml 이상의 농도에서 유의성 있는 증가가 나타나는데(Fig. 15, 16), 이는 IκBα의 인산화 억제를 통해 NF-κB의 핵내 전이를 억제시키는 등 염증성 반응들을 차단하여 항염증 효과가 나타남을 확인할 수 있었다.

따라서 보음전이 iNOS와 COX-2에 대해 유전자의 발현을 억제하는 것이 확인되어 추가적으로 단백질 발현의 억제능 여부를 확인하고자 하였다.

RAW 264.7 세포에 LPS와 BEJ를 동시에 처리하여 COX-2와 iNOS와 단백질 발현 억제능을 확인한 결과, iNOS와 COX-2 및 IL-6, IL-1β, TNF-α, HO-1, NQO1은 유전자 발현량 조사와 동일한 경향을 보이고(Fig. 17-23), NRF2는 농도 의존적이고, 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내 BEJ의 항염증 효과를 분명히 하였다(Fig. 24).

한편 MAPKs 신호전달경로는 p38 MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase), JNK(c-Jun N-terminal kinase), ERK (extracellular signal-regulated kinase)로 구성되며, p38 MAPK는 대식세포에서 염증성 매개 인자와 cytokine의 생성을 유도하는 경로일 뿐만 아니라 ROS 생성 자극 경로를 활성화하는 데에 핵심적인 역할을 한다³⁴. 이처럼 MAPKs는 cytokine과 스트레스 제어 및 세포의 성장과 분화

에 중요한 역할을 하는데, 적절한 농도의 활성 산소는 신호 조절 키나아제 ERKs를 활성화시켜 세포 증식에 도움을 주지만, 높은 농도의 활성 산소는 신호 전달 단백질 JNKs를 활성화시켜 세포를 사멸(apoptosis)시킨다³⁵. 그리하여 MAPKs 신호전달경로 표적 치료제는 다양한 염증성 자극 신호 차단을 유도할 수 있어서 염증 질환 치료에 효과적일 수 있다³⁶.

BEJ의 항염증 효과가 MAPKs 경로를 통해서 매개되는지의 여부를 조사하기 위해서, LPS에 의해 유도된 MAPKs 계열 단백질 활성화에 미치는 BEJ의 영향을 조사하였다.

이상의 결과로 보음전은 항산화, 항염증 효과가 있다는 것이 실험적으로 확인되었으며, 향후 in vivo 연구나 임상 시험 등의 추가적인 연구를 통해 효능 근거가 보강된다면 질염뿐만 아니라 방광염, 만성 골반염 등 다양한 염증성 질환 치료에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

보음전의 항산화, 항염증 효능을 검증하기 위해서 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세포 생존율을 측정된 결과를 보면, 생쥐 유래 대식세포인 RAW 264.7 Cell에 BEJ를 처리했을 때, 200 µg/ml 이하 농도에서 97% 이상의 세포 생존율을 나타내었다.
2. 항산화 효능을 측정된 결과, BEJ 투여군은 DPPH radical 소거능과 ABTS

- radical 소거능은 농도 의존적으로 증가하였다.
3. 항염증 효능을 측정된 결과, BEJ 투여군은 ROS, NO, Cytokine(PGE2, TNF- α , IL-1 β , IL-6) 생성량은 대조군에 비해서 유의하게 감소하였다.
 4. 유전자 발현량 측정 결과 iNOS와 COX-2 및 TNF- α , IL-1 β , IL-6는 농도 의존적으로 대조군에 비해 유의하게 감소하였고 HO-1, NQO1은 농도 의존적으로 대조군에 비해 유의하게 증가하였다.
 5. 단백질 발현량 측정 결과 iNOS와 COX-2 및 IL-6, IL-1 β , TNF- α 가 농도 의존적으로 대조군에 비해서 유의하게 감소하였고, HO-1, NQO1, NRF2는 농도 의존적으로 대조군에 비해 유의하게 증가하였다.

Received : Jul 11, 2023
 Revised : Jul 17, 2023
 Accepted : Aug 25, 2023

References

1. Korean Society of Obstetrics and Gynecology Textbook Compilation Committee. Gynecology 5th Edition. Seoul:Korea medicine Publish. 2015:147-54.
2. Fukazawa EI, et al. Influence of recurrent vulvovaginal candidiasis on quality of life issues. Arch Gynecol Obstet. 2019; 300(3):647-50.
3. Park KI, et al. A Case Study on Korean Medicine Treatment for Chronic Leukorrhea Diagnosed with Qi Deficiency. J Korean Obstet Gynecol. 2015;28(3):107-18.
4. The Society of Korean Medicine Obsstrics & Gynecology. Korean Medicine Obstetrics and Gynecology. Vol. 2. Seoul:Euseongdang. 2021:67, 82, 297-311, 496, 522, 539, 774.
5. Zhang Jiebin. Jingyuequanshu, Seoul: Jeongdam Publish. 2004:1082-6.
6. Xia Guicheng. Practical Gynecological Formulas. Beijing:People's Medical Publishing House company. 1997:50-2.
7. Choi DY, Kim JK, Yeom YH. (Jingyuequanshu) A new understanding of Shinbang Hachien. Seoul:Bubin Publish. 2010:268.
8. The Compilation Committee of the teaching materials for Korean college of Korean medicine. Herbal Medicine. Seoul:Youngrim Publish. 1995:218, 223, 233, 583, 586, 607, 635, 637.
9. Park MS, Kim YM. Study on Clinical Diseases of Yin Deficiency Pattern. Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine. 2013;27(3):289-98.
10. Re R, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine. 1999; 26(9-10):1231-7.
11. Willoughby DA. Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. Ann Rheum Dis. 1975;34(6):471-8.
12. Cho BO, et al. Anti-inflammatory effect of mangostenone F in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages by suppressing NF- κ B and MAPK

- activation. *Biomol Ther.* 2014;22(4):288-94.
13. Posadas I, et al. Correlation between cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000;361(1):98-106.
 14. Sin GM, et al. In vitro antiinflammatory activity of amygdalin in murine macrophage raw 264.7 Cells. *Kor J Pharmacogn.* 2003;34(3):223-7.
 15. Mu MM, et al. The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *J Endotoxin Res.* 2001;7(6):431-8.
 16. Zhang Y, Ramos BF, Jakschik BA. Neutrophil recruitment by tumor necrosis factor from mast cells in immune complex peritonitis. *Science.* 1992;258(5090):1957-9.
 17. Kenneth Murphy, Paul Travers, Mark Walport. *Janeway's immunobiology.* New York:Garland Science. 2008:78-91.
 18. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology* sixth edition. London: Mosby. 2002:119-28.
 19. Lee HJ, et al. Effect of Gami-sopungsan on Inflammation and DNCB-induced Dermatitis in NC/Nga in mice. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine.* 2014;28(2):146-53.
 20. Kauppinen A, et al. Antagonistic crosstalk between NF- κ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. *Cellular Signalling.* 2013;25(10):1939-48.
 21. Kasahara E, et al. Mitochondrial density contributes to the immune response of macrophages to lipopolysaccharide via the MAPK pathway. *FEBS Lett.* 2011;585(14):2263-8.
 22. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* 2001;13(2):85-94.
 23. Wang Y, et al. Mechanisms of hepatoprotection by nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;962:415-22.
 24. Golden BD, Abramson SB. Selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Rheum Dis Clin N Am* 1999;25(2):359-78.
 25. Charles AJ. *Immunobiology, 5th: the immune system in health and disease.* Seoul:Life science Publication co. 2002:76-7.
 26. Gilmore TD, Garbati MR. Inhibition of NF- κ B signaling as a strategy in disease therapy. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2011;349:245-63.
 27. Gadaleta RM, et al. Activation of bile salt nuclear receptor FXR is repressed by pro-inflammatory cytokines activating NF- κ B signaling in the intestine. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812(8):851-8.
 28. Kang KW, Lee SJ, Kim SG. Molecular mechanism of nrf2 activation by oxidative stress. *Antioxidants Redox Signal.* 2005;7(11-12):1664-73.
 29. Maines MD. The heme oxygenase system : a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997;37:517-54.

30. Lee TS, Chau LY. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med.* 2002;8(3):240-6.
31. Lee DH, et al. The hypertension drug, verapamil, activates Nrf2 by promoting p62-dependent autophagic Keap1 degradation and prevents acetaminophen-induced cytotoxicity. *BMB Rep.* 2017;50(2):91-6.
32. Ross D, et al. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chem Biol Interact.* 2000;129(1-2):77-97.
33. Yang JH, et al. Corynoline isolated from *Corydalis bungeana turcz.* exhibits anti-inflammatory effects via modulation of Nrf2 and MAPKs. *Molecules.* 2016;21(8):975.
34. Cho BO, et al. Anti-inflammatory effect of mangostenone F in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages by suppressing NF- κ B and MAPK activation. *Biomol Ther.* 2014;22(4):288-94.
35. Raingeaud J, et al. MKK3-and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol.* 1996;16(3):1247-55.
36. Pearson G, et al. Mitogenactivated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001;22(2):153-83.