

加味補陽還五湯의 抗血栓 및 抗炎作用에 대한 실험적 연구

이정은 · 유동열*

대전대학교 한의과대학 부인과교실

Experimental Study on Anti-thrombotic and Anti-inflammatory Effect of Kami-BoyangHwanoh-Tang

Jung Eun Lee, Dong Youl Yoo*

Department of Ob & Gyn, College of Oriental Medicine, Daejeon University

This study was performed to evaluate antithrombotic activities and anti-inflammatory effects of Kami-BoyangHwanoh-Tang(KBHT). The major findings were summarized as follows. In experiment of anti-thrombotic effect; KBHT inhibited human platelet aggregation induced by ADP and epinephrine as compared with the control group and inhibited pulmonary embolism induced by collagen and epinephrine (inhibitory rate is 50 %). KBHT increased platelet number significantly and also KBHT shortened PT and APTT significantly as compared with the control group in thrombus model induced by dextran. In experiment of anti-inflammatory effect; KBHT inhibited IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2 and NOS-II mRNA expression as compared with the control group in a concentration-dependent degree, and inhibited NO production significantly at 50, 100 $\mu\text{g}/\text{m}^{\text{l}}$, and also inhibited ROS production in a concentration-dependent degree as compared with the control group in RAW 264.7 cell line. KBHT inhibited IL-1 β , IL-6 and TNF- α production significantly in serum of acute inflammation-induced mice, and decreased IL-1 β , IL-6 and TNF- α production in spleen tissue, and also decreased IL-6 and TNF- α production in liver tissue, but increased IL-1 β production in liver tissue of acute inflammation-induced mice. KBHT increased survival rate at 3rd day in mice with lethal endotoxemia induced by LPS. These results suggest that KBHT can be useful in treating diverse female diseases caused by thrombosis and inflammation such as endometriosis, myoma, pelvic congestion, chronic cervicitis, chronic pelvic inflammatory disease and so on.

Key words : Kami-BoyangHwanoh-Tang(加味補陽還五湯, KBHT), anti-thrombotic activities, anti-inflammatory effects

서론

婦人은 血을 위주로 하며 월경, 임신, 출산이라는 고유한 생리적 특징을 가지고 있다^{1,2}. 이러한 특징으로 인해 부인과 질환에서 瘀血이 病因으로서 차지하는 중요성은 매우 크다^{1,3,4}.

瘀血은 체내에 있는 혈액이 停滯된 것으로, 離經之血이나 혈액의 運行이 不暢하여 經脈이나 臟腑에 阻滯된 血液을 포함하는 병리적 산물인 동시에 중요한 발병인자 중 하나이다^{5,6}.

최근에는 瘀血의 개념이 더욱 확대되어 혈전증 및 미세혈관의 경련, 혈류속도의 저하, 혈관내벽의 손상 등의 혈액순환장애

와 고점도혈증, 적혈구 증가증, 혈소판 증가증 등의 혈액학적 이상을 포함하고, 염증, 內出血, 外出血, 대사산물의 저류, 조직의 변성 등도 瘀血의 범주에 포함시키고 있다^{6,7}.

한의학분야에서 瘀血에 대한 실험적 연구는 주로 혈전증 병태 모델을 통해서 이루어지고 있으며⁸, 한방부인과에서도 活血祛瘀하는 처방⁹⁻¹² 및 약물^{13,14}의 항혈전 및 항염증 효과에 대한 많은 실험적 연구가 이루어져 유의한 효과가 있음이 보고되고 있다.

補陽還五湯은 《醫林改錯》¹⁵에 최초로 언급된 補氣祛瘀의 대표적 處方으로, 한방부인과 임상에서는 주로 자궁내막증, 여성 생식기의 종양성 질환, 산후출혈, 골반울혈증후군, 만성 골반통, 골반염 등 氣虛로 脈絡이 不暢하여 발생하는 瘀血로 인한 증상에 두루 사용되고 있다^{1,3,16-18}.

본 연구에 사용된 加味補陽還五湯은 補陽還五湯¹⁵에 蒲黃,

* 교신저자 : 유동열, 대전시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학

· E-mail : purifroggy@hanmail.net, · Tel : 042-229-6756

· 접수 : 2006/06/20 · 수정 : 2006/07/18 · 채택 : 2006/08/03

五靈脂, 玄胡索, 澤蘭을 加하여 活血祛瘀¹⁹⁾의 효과를 증대시킨 경험방으로 실험적으로도 혈전증과 염증에 유의한 효과가 있는 것으로 사료된다.

이에 저자는 加味補陽還五湯의 항혈전 효과를 알아보기 위해 혈소판 응집 억제력, 혈전유발에 따른 혈류속도 측정, 폐색전 유발에 대한 억제효과 및 dextran 어혈병태를 이용한 실험을 시행하였고, 항염증 효과를 알아보기 위해서는 염증 관련 cytokine의 유전자 발현 및 생성에 미치는 영향 등에 대해 실험한 결과 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료

1) 동물

실험 동물은 ICR계 mouse, SD계 rat, Balb/c계 mouse를 사용하였고, 12시간 소등과 점등 및 22±2 °C 조건의 사육실에서 사육하면서 사료와 물을 충분히 공급하였다.

2) 약물

실험에 사용된 加味補陽還五湯(이하 KBHT이라 稱함)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다. 1貼의 內容과 分量은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of Kami-BoyangHwanoh-Tang(KBHT)

藥材名	生藥名	重量(g)
黃芪	<i>Astragali Radix</i>	16
當歸	<i>Angelicae Gigantis</i>	8
赤芍藥	<i>Paeoniae Radix</i>	6
澤蘭	<i>Lycopi Herba</i>	6
地龍	<i>Lumbricus</i>	4
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	4
桃仁	<i>Persicae Semen</i>	4
紅花	<i>Carthami Flos</i>	4
蒲黃	<i>Typhae Pollen</i>	4
五靈脂	<i>Trogopterorum Faeces</i>	4
玄胡索	<i>Corydalis Tuber</i>	4
Total		64

2. 방법

1) 시료 추출물 분리

KBHT 2 접 분량을 증류수 2,000ml에 3시간동안 얻은 액을 여과하여 농축하고, 동결 건조하여 냉동(-84°C) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 혈소판 응집(Platelet aggregation) 측정^{20,21)}

3.8% sodium citrate 들어있는 일회용 시험관에 혈액과 1:9의 비율로 넣고 원심분리하여 상등액으로부터 PRP를 얻고 잔액을 다시 원심분리하여 PPP를 얻었다.

약물의 항혈소판 응집 효과는 platelet aggregation profiler Model PAP-4를 사용하였으며, 최종 농도는 ADP 6µM과 epinephrine 5µM이 되도록 하였다. Micro magnetic bar를 넣은 silicon treated cuvette에는 미리 37°C에서 incubation시킨 PRP 320µl와 KBHT를 40µl를 넣고 다시 incubation한 후 ADP 40µl를 가하여 5분간 반응시켰다.

약물에 의해 aggregation이 억제되는 정도를 다음 식에 의하여 transmission maximum reduction percent를 산출하였다.

$$Inhibition\% = \frac{A-B}{A} \times 100$$

단, A=대조군의 최대응집률%, B=실험군의 최대응집률%

3) 폐색전(Pulmonary thrombosis) 유발 실험

실험적 혈전의 유도는 Kimura의 실험 방법²²⁾에 준하여 실시하였다. 혈전의 유발은 혈소판 응집 시약을 HBSS 200µl에 함유되도록 조제하였고, 미정맥에 주사하였다. 혈소판 응집 유발 시약의 정맥 주사 2시간 전에 KBHT를 ICR계 mouse에 경구 투여하였으며, 양성대조군으로는 aspirin 1mg/kg을 경구 투여하였다. 항혈전 효과는 혈소판 응집 시약의 투여로 발생하는 마비나 죽음으로부터 보호된 실험동물 숫자의 백분율로 계산하였다.

4) Dextran 어혈 병태 유발 실험²³⁾

(1) 어혈 병태 유발 및 약물 투여

정상군은 생리식염수를 공급하고, 대조군은 생리식염수를 투여한 지 1시간 후에 dextran 어혈 병태를 유발하였으며, KBHT 투여군은 KBHT를 실험 하루 전에 1회 경구 투여한 후 절식시키고, 실험하기 1시간 전에 다시 1회 경구 투여한 다음 대조군과 동일한 방법으로 dextran 어혈 병태를 유발하였다.

(2) 혈소판수, Prothrombin time²⁴⁾, Activated Partial Thromboplastin time, Fibrinogen측정

혈소판수는 자동혈구계산기, Minos-ST를 사용하여 측정하였고, PT는 Simplastin Kit를 사용하여 ACL-100으로 측정하였고, APTT는 Simplastin Kit를 사용하여 ACL-100으로 측정하였다.

5) Mouse lung fibroblast cells (mLFCs) 배양

정상 Balb/c계 mouse의 폐조직(1g)을 잘게 분쇄하여 ACK 용액으로 적혈구를 제거한 후, cool D-PBS로 3회 세척하여 conical tube (15ml)에 넣고 1,400rpm에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리 후 tube에 DMEM을 넣고 37°C CO₂배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 배양 후 인산완충생리식염수(PBS)로 약 2회 1,500rpm에서 원심분리하였다. 이를 DMEM-10% FBS로 1주일 동안 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 세포를 분리하여 연속 1주일씩 3회 반복하여 살아있는 부착세포를 DMEM-5% FBS 배양액에서 배양하였다.

6) Quantitative real-time-PCR on RAW 264.7 cell line

(1) RAW 264.7 세포배양

Murine macrophage cell line RAW 264.7 세포주는 10 % FBS를 첨가한 DMEM에 넣고 37°C CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 배양 후 인산완충생리식염수 (PBS)로 약 2회 1,500 rpm에서 원심분리하였다. 이를 DMEM-10% FBS로 1주일 동안 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 세포를 분리하는 작업을 3회 반복하여 살아있는 부착 세포를 DMEM-5 % FBS 배양액에서 배양하였다.

(2) 정량적 중합효소 연쇄반응

Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast Real -Time PCR system을 이용하여 수행하였으며, 사용된 primers는 아래와 같다.

Table 2. Nucleotide Sequence of Primers

G3PDH	Forward Primer	5' TGAAGCAGGCATCTGAGGG 3'
	Reverse Primer	5' CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG 3'
TNF- α	Forward Primer	5'TTCTGTCTACTGAACITCGGGGTGATCGGTCC 3'
	Reverse Primer	5'GATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG 3'
IL-6	Forward Primer	5' TCCAGTTGCCTTCTGGGAC 3'
	Reverse Primer	5' GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG 3'
IL-1 β	Forward Primer	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG
	Reverse Primer	GATCCACACTCTCCAGCTGCA
COX-2	Forward Primer	5' TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA3'
	Reverse Primer	5' TGGCTCTGCAGGATTTTCATG 3'
NOS-II	Forward Primer	GGCAGCCTGTGAGACCTTTG
	Reverse Primer	GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC

7) Nitric oxide(NO) 생성량 측정

RAW 264.7 세포주에 KBHT(100, 50 및 10 μ g/ml) 처리하고, 1시간 후 LPS 2 μ g/ml를 각 well에 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 회수한 후 여기에 Griess 시약 용액 A와 용액 B를 1:1로 혼합하여 처리하였다. 다시 배양 상층액 100 μ l를 96well plate에 분주하고 혼합 용액 100 μ l를 처리한 후 ELISA reader를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) 세포 내 reactive oxygen species(ROS)의 분석

RAW 264.7 세포에 KBHT(100 및 50 μ g/ml)를 처리한 후, 1시간 후 다시 LPS 1 μ g/ml를 처리하고 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 세포내 형광 DCF 또는 ROS를 측정하였다.

9) LPS로 유도된 염증 생쥐 모델

(1) 혈청 IL-1 β , IL-6, TNF- α 생성량 측정

KBHT 투여군은 20g Balb/c계 mouse 1마리당 검액 7.13mg을 생리식염수 0.2ml에 용해시켜 하루에 1회씩 7일간 경구 투여하였다. 7일후 LPS를 1 mg/kg을 복강에 주사한 다음, 90분 후에 ethyl ether로 마취하고 심장천자법으로 채혈하였다. 채혈 후 혈청을 분리하여 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 생성량을 ELISA로 측정하였다.

(2) 간과 비장조직에서의 정량적 중합효소 연쇄반응

LPS로 유도된 실험 생쥐의 비장 및 간조직(0.1 g)과 RNAzolB 500 μ l를 넣고 용해될 때까지 분쇄하고, 이를 원심분리 후 상층액을 제거하였다. 여기에 RNAzolB 500 μ l를 넣고 용해될 때까지 혼합하였으며, 이 혼합 부유액에 chloroform(CHCl $_3$) 50 μ l를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 추출한 RNA는 diethyl phenyl carbonate (DEPC)를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 heating block 75 $^{\circ}$ C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(3) LPS로 유도된 염증 생쥐 모델의 생명 연장을 측정

ICR계 mouse를 이용하여 실험군은 KBHT를, 대조군은 normal saline을 7일간 경구투여 한 후, LPS 3mg/kg을 복강에 주사하고 5일간 생쥐의 생존율을 관찰하여 생명 연장 곡선을 만들었다. 단, 실험군은 LPS 주입 1시간 전에 KBHT를 1회 추가로 경구투여 하였다.

10) 통계처리

실험 결과는 mean \pm Standard Error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's t-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

성 적

1. 항혈전 효과

1) 혈소판 응집(Platelet Aggregation) 억제 효과

(1) ADP에 의한 혈소판 응집 억제 효과

KBHT 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3, 0.15, 0.07 및 0.03 mg/ml 농도에서 ADP(6 μ M)에 의해서 유도된 혈소판 응집 억제율은 각각 100, 100, 100, 100, 84.2, 55.7, 34.0, 16.7, 8.1 및 3.4 %로 나타났다.

(2) Epinephrine에 의한 혈소판 응집 억제 효과

KBHT 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3, 0.15, 0.07 및 0.03 mg/ml 농도에서 Epinephrine(5 μ M)에 의해서 유도된 혈소판 응집 억제율은 100, 100, 97.1, 85.4, 64.7, 48.0, 21.9, 9.7, 2.0 및 0 %로 나타났다.

(3) ADP와 epinephrine에 대한 Emax, EC50 및 γ 값

응집 유도제로 ADP를 사용한 경우 Emax는 102.87 %로 나타났고, EC50은 0.48 mg/ml로 나타났다. Epinephrine의 경우는 Emax가 102.38 %, EC50은 0.73 mg/ml로 나타났었다. Sigmoid Emax model에서 곡선의 sigmodicity를 나타내는 γ 은 ADP와 epinephrine이 각각 1.50와 1.34로 나타났다.

2) 폐색전(Pulmonary embolism) 억제 효과

Collagen과 epinephrine에 의해 유도된 폐색전 실험에서 대조군은 8 마리 중 8 마리가 죽거나 30 분간 이상 마비가 지속이 되었는데, 양성대조군인 aspirin 투여군은 8 마리 중 3 마리만이 죽거나 15 분 이상 마비가 지속 되었다. 이에 반하여 KBHT 투여군은 8 마리 중 4 마리가 죽거나 15 분 이상 마비가 지속되어 대조군에 비하여 50 %의 억제 효과를 나타내었다(Table 3).

Table 3. Effect of KBHT on Pulmonary Embolism Mice

	Dose (mg/20g)	No. of killed or paralyzed / No. tested	% Protection
Control	-	8/8	0
Aspirin	2	3/8	62.5
KBHT	6.5	4/8	50

Control : 11.3 μ g collagen and 1.32 μ g epinephrine/200 μ l/20 g treated group. Aspirin : 11.3 μ g collagen and 1.32 μ g epinephrine/200 μ l/20 g treated group after oral administration of 100 mg/kg of aspirin. KBHT : 11.3 μ g collagen and 1.32 μ g epinephrine/200 μ l/20 g treated group after oral administration of 6.5 mg/20 g of KBHT extract

3) Dextran 어혈 병태에 미치는 영향

혈소판 수 변화에서는 정상군이 658.7 \pm 18.5 ($\times 10^3$ /mm 3)인데 비하여, 대조군이 508 \pm 15.9 ($\times 10^3$ /mm 3), KBHT 투여군은 587.6 \pm 12.4 ($\times 10^3$ /mm 3)로 대조군에 비하여 유의성 (P<0.01) 있게 증가하였다(Table 4).

Table 4. Effect of KBHT on Platelet, Prothrombin Time and Activated Partial Thromboplastin Time in Dextran Treated Rat

Group	NO. of animals	Platelet (x10 3 /mm 3)	Prothrombin time (sec)	APTT (sec)
Normal	8	658.7 \pm 18.5 ^{ab}	19.8 \pm 1.51 ^{ab}	38.5 \pm 2.4 ^{ab}
Control	8	508 \pm 15.9 ⁺⁺⁺	28.4 \pm 2.1 ⁺⁺	52.7 \pm 1.58 ⁺⁺⁺
KBHT	8	587.6 \pm 12.4 ^{**}	22.1 \pm 1.05 ^{**}	42.8 \pm 2.48 ^{**}

Normal : oral administration of normal saline. Control : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of normal saline. KBHT : 1.1 ml/200 g dextran i.v. injected group after oral administration of 65.2mg/200g of KBHT extract. a) : Mean \pm SE. + : Statistically significant value compared with normal data(++ : P<0.01, +++ : P<0.001). * : Statistically significant value compared with control data(** : P<0.01, *** : P<0.001)

PT는 정상군이 19.8 ± 1.51 초인데 비하여, 대조군이 28.4 ± 2.1 초, KBHT 투여군은 22.1 ± 1.05 초로 대조군에 비하여 유의성 ($P < 0.01$) 있게 단축되었다(Table 4). APTT는 정상군이 38.5 ± 2.4 초인데 비하여 대조군이 52.7 ± 1.58 초, KBHT 투여군은 42.8 ± 2.48 초로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 ($P < 0.01$) 있게 단축되었다(Table 4).

2. 항염증 효과

1) 염증 관련 cytokine에 미치는 영향

(1) IL-1 β 유전자 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 세포주에서 IL-1 β 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이 0.125, 대조군이 1.00로 나타났으며, KBHT 100, 50 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리군에서는 각각 0.337, 0.589, 0.748의 RQ 값을 나타내어 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 1-A).

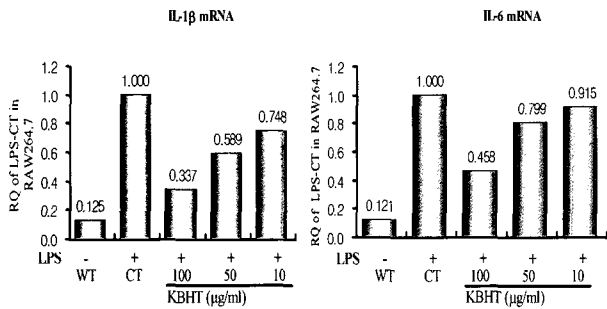


Fig.1-A

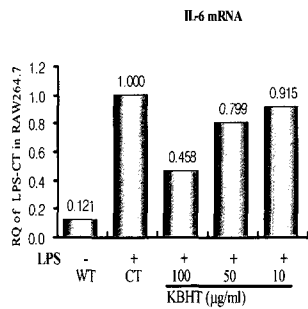


Fig.1-B

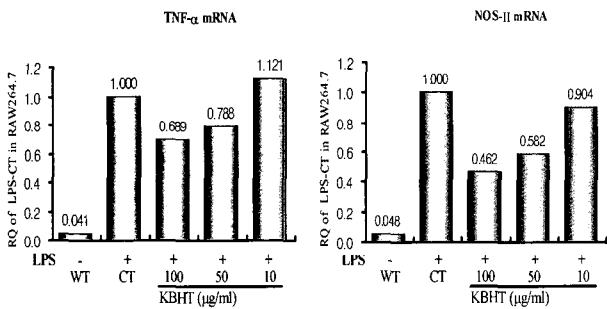


Fig.1-C

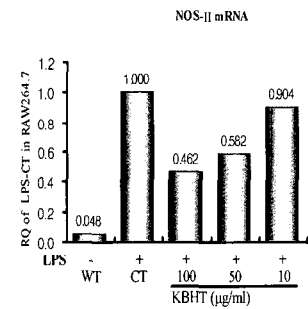


Fig.1-D

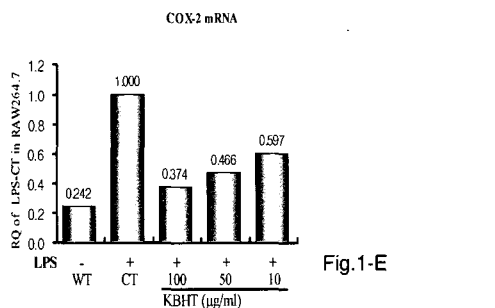


Fig.1-E

Fig. 1. Inhibitory effects of KBHT extract on cytokines mRNA expression in RAW 264.7 cell line. RAW 264.7 cells were pretreated with various concentrations of KBHT extract (100, 50 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS; 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 6 hrs. IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2 and NOS-II gene mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed. IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2 and NOS-II gene mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration.

(2) IL-6 유전자 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 세포주에서 IL-6 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이 0.121, 대조군이 1.00로 나타났으며, KBHT 100, 50 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리군이 각각 0.458, 0.799, 0.915의 RQ값을 나타내어 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 1-B).

(3) TNF- α 유전자 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 세포주에서 TNF- α 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이 0.041, 대조군이 1.00로 나타났으며, KBHT 100, 50 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리군에서는 각각 0.689, 0.788, 1.121의 RQ값으로 나타내어 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리군을 제외하고 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 1-C).

(4) COX-2 유전자 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 세포주에서 COX-2 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군 값이 0.242, 대조군이 1.00로 나타났으며, KBHT 100, 50 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서는 각각 0.374, 0.466, 0.597의 RQ 값을 나타내어 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 1-D).

(5) NOS-II 유전자 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 세포주에서 NOS-II 유전자 발현의 RQ 값, 정상군이 0.048, 대조군이 1.00로 나타났으며, KBHT 100, 50 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리군이 각각 0.462, 0.582, 0.904의 RQ 값을 나타내어 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 1-E).

2) Nitric oxide(NO) 생성량에 미치는 영향

RAW 264.7 세포주에서 NO 생성량은 정상군의 OD값이 0.054 ± 0.012 , 대조군이 1.458 ± 0.236 로 나타났으며, KBHT 100, 50 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리군이 각각 0.591 ± 0.144 , 0.688 ± 0.245 , 0.955 ± 0.264 로 나타나 대조군에 비하여 100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의성 있게 ($P < 0.01$, $P < 0.05$) NO 생성을 억제하였다(Fig. 2).

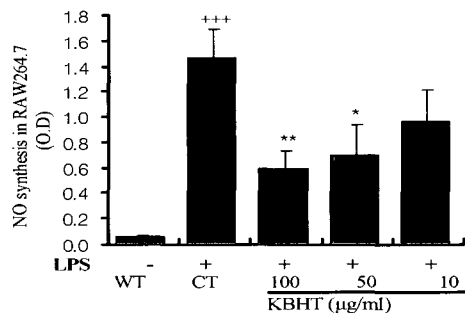


Fig. 2. Inhibitory effect of KBHT extract on the nitric oxide release in RAW 264.7 cell line. RAW 264.7 cells were pretreated with various concentrations of KBHT extract (100, 50 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS; 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 48 hr. The culture supernatant was collected 24 hr later and NO concentration in the supernatant was assayed. The data are expressed as the mean \pm SE. +Statistically significant value compared with normal data(***: $P < 0.001$). *Statistically significant value compared with control data(*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$)

3) 세포 내 reactive oxygen species(ROS) 생성량에 미치는 영향

ROS 생성량은 대조군이 정상군에 비하여 큰 폭으로 증가하였으며, KBHT 투여군(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ C, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ D)은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 ROS 생성을 억제하였다(Fig. 3).

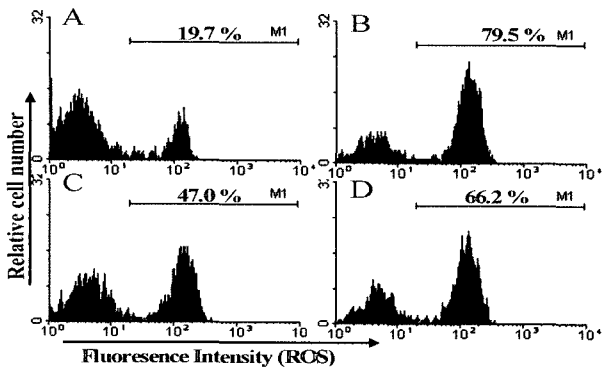


Fig. 3. Inhibitory effect of KBHT extract on the ROS production in RAW 264.7 cell line. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations of KBHT extract (C: 100 μ g/ml, D: 50 μ g/ml) in the presence (control, B) or absence (A) of LPS, (2 μ g/ml) for 48 hrs. After culture, cells were treated with DCFH-DA reagent (50 mM), harvested, and assayed for ROS positive cells (M1) by flow cytometry.

4) 급성 염증성 질환 생쥐 모델의 혈청 내 cytokine 변화에 미치는 영향

(1) IL-1 β 생성량에 미치는 영향

급성 염증이 유발된 생쥐의 혈청 내 IL-1 β 생성량을 측정 한 결과, 정상군은 1.3 \pm 0.7 ng/ml, 대조군은 57.4 \pm 5.2 ng/ml로 나타난 반면, KBHT 투여군에서는 37.6 \pm 3.4 ng/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (P<0.01) 결과를 나타내었다(Fig. 4-A).

Fig. 4-A

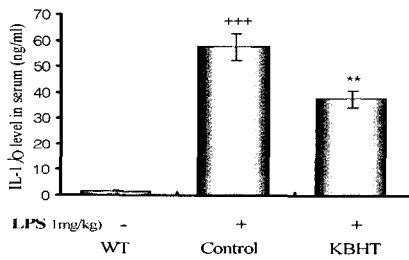


Fig.4-B

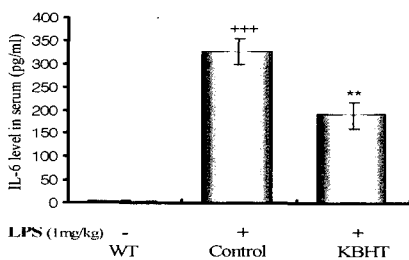


Fig.4-C

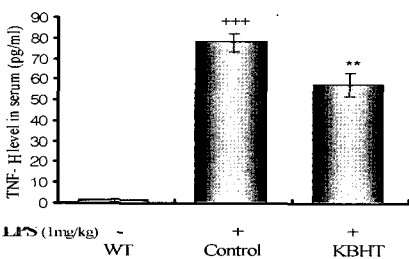


Fig. 4. The effect of KBHT extract on cytokine production in sera following LPS co-treatment. Female mice were co-treatment with KBHT extract (6.5 mg/20 g) and LPS (1 mg/kg). IL-1 β , IL-6, TNF- α levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. The data are expressed as the mean \pm SE. + : Statistically significant value compared with normal data(+++ : P<0.001).* : Statistically significant value compared with control data(** : P<0.01)

(2) IL-6 생성량에 미치는 영향

급성 염증이 유발된 생쥐의 혈청 내 IL-6 생성량을 측정 한 결과, 정상군은 3.7 \pm 1.4 ng/ml, 대조군은 326.4 \pm 27.4 ng/ml로 나타난 반면, KBHT 투여군에서는 189.5 \pm 27.8 ng/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(P<0.01) 결과를 나타내었다(Fig. 4-B).

(3) TNF- α 생성량에 미치는 영향

급성 염증이 유발된 생쥐의 혈청 내 TNF- α 생성량을 측정 한 결과, 정상군은 1.1 \pm 0.6 ng/ml, 대조군은 77.8 \pm 4.7 ng/ml로 나타난 반면, KBHT 투여군에서는 57.3 \pm 5.7 ng/ml로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (P<0.01) 결과를 나타내었다(Fig. 4-C).

5) 급성 염증성 질환 생쥐 모델의 비장 및 간 조직 내 cytokine 변화에 미치는 영향

(1) IL-1 β 유전자 발현에 미치는 영향

비장 조직에서 IL-1 β 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이 0.012, 대조군이 1.000로 나타난 반면, KBHT 투여군이 0.834로 대조군에 비하여 감소하였다. 간 조직에서는 정상군이 0.021, 대조군은 1.000로 나타난 반면, KBHT 투여군에서는 1.202로 대조군에 비하여 오히려 증가하였다(Fig. 5-A).

Fig. 5-A

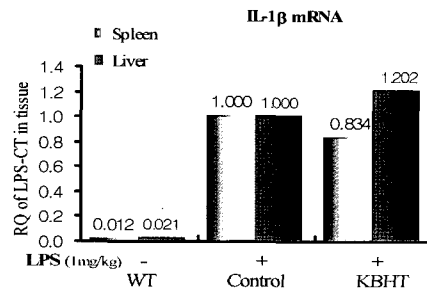


Fig. 5-B

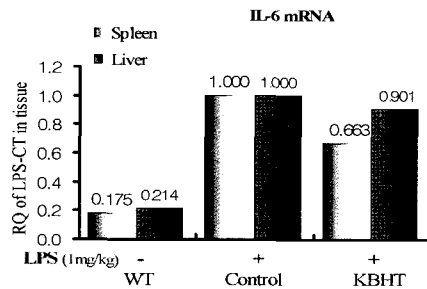


Fig. 5-C

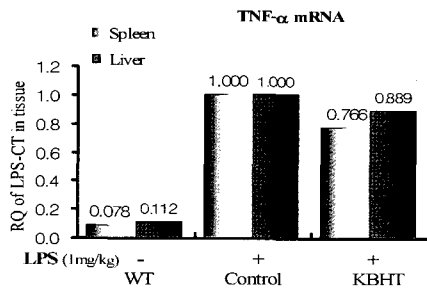


Fig. 5. Inhibitory effects of KBHT extract on cytokine mRNA expression level in spleen and liver following LPS co-treatment. Female mice were co-treatment with KBHT extract (6.5 mg/20 g) and LPS (1 mg/kg). Spleen and liver were collected after 90 minutes and total RNA was extracted and IL-1 β , IL-6 and TNF- α mRNA express were measured real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration.

(2) IL-6 유전자 발현에 미치는 영향

비장 조직에서 IL-6 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이 0.175 대조군이 1.000로 나타난 반면, KBHT 투여군이 0.663로 대조군에 비하여 감소하였다. 간 조직에서는 정상군이 0.214, 대조군이 1.000로 나타난 반면, KBHT 투여군이 0.901로 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 5-B).

(3) TNF-α 유전자 발현에 미치는 영향

비장 조직에서 TNF-α 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이 0.078 대조군이 1.000로 나타난 반면, KBHT 투여군이 0.766로 대조군에 비하여 감소하였다. 간 조직에서는 정상군이 0.112, 대조군은 1.000로 나타난 반면, KBHT 투여군이 0.889로 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 5-C).

6) LPS로 유도된 lethal endotoxemia에 대한 생명 연장 효과

생쥐의 복강에 LPS 3 mg/kg 을 주사하여 5 일간 생명연장을 관찰한 결과, KBHT 투여군이 LPS 투여 후 3일째에 대조군에 비하여 생존율이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6).

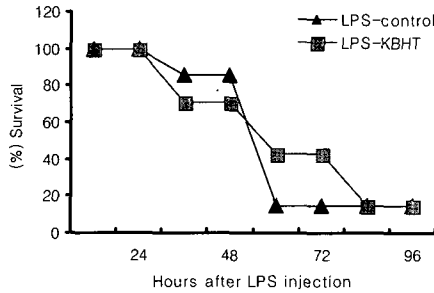


Fig. 6. KBHT protects mice from LPS-induced lethality. Groups of 7 ICR mice were injected i.v. with 100 μg of LPS (3 mg/kg) after oral administration of normal saline (control) or KBHT (6.5 mg/20g) for 7 days. Another group of mice received 100 μg of LPS together with KBHT (6.5 mg/20g) to serve as a positive control for 100 % protection from LPS-induced lethality. Survival was monitored over the next 5 days. Similar results were obtained in five identical independent experiments. The survival curves from all five experiments were analyzed by the Kaplan-Meier method.

고찰

혈전증(thrombosis)은 활동 중인 심혈관계 안에서 혈관과 혈액 성분들의 복잡한 상호작용에 의해 혈액응고인 혈전(thrombus)을 형성하는 것을 말하며 정상 지혈기전의 병리적인 현상이다^{25,26}. 정상적인 체내에서는 이러한 혈액응고계가 불필요하게 항진되는 것을 억제하는 기전이 있는데, 응고인자의 소모, 활성화된 혈액응고인자의 제거, 단백질해효소 억제인자의 활성화 및 섬유소 용해계로 요약할 수 있다^{25,26}. 따라서 혈전증이란 이러한 혈액응고의 기전과 항응고 기전 간에 균형을 이루지 못한 결과로 발생하는 것⁹이라고 할 수가 있다. 이러한 혈전증과 유사한 개념으로써 한의학에서는 瘀血을 들 수 있다. 비 생리적인 혈액의 停滯를 말하는 瘀血은 血滯라는 순환장애의 병리를 기반으로 하는 특수한 증후군까지 포함하는 한의학 고유 개념이다⁹.

婦人是 血을 위주로 하며 월경, 임신, 출산이라는 고유한 생리적 특징¹²을 가지고 있다. 이러한 생리적 특징으로 인해 婦人病證의 大綱을 이루고 있는 月經病, 性器病, 妊娠病과 產後病 등에서 瘀血이 病因으로서 차지하는 중요성은 매우 크다¹³. 최근에

는 자궁내막증, 자궁근증, 자궁선근증, 만성 골반통, 골반울혈증 후군 등의 질환의 주된 病機를 瘀血로 보고 있으며, 급·만성 골반염과 같은 여성 생식기의 염증성 질환에도 活血祛瘀法을 사용하여 좋은 치료효과를 나타내고 있다^{4,17,18,27}.

염증은 손상조직에 대한 살아있는 조직의 반응으로 손상을 국소화시키고 손상된 부위를 정상상태로 되돌리려는 생체의 고도로 발달된 자기방어체계인 면역과정의 일부이다²⁵.

한의학에서는 면역을 正邪間의 相爭으로 설명하고 있는데, 正氣는 臟腑의 기능 활동을 정상적으로 유지케 하는 病邪에 대한 抗病力을 말하고, 邪氣는 인체의 질병을 발병케 하는 각종의 발병요인을 말하는 것으로²⁸, 염증반응도 이러한 正邪鬪爭의 결과로 체내에 나타나는 病理的 현상중의 하나로 볼 수 있다^{29,30}. 또한 염증반응은 발적, 발열, 종창, 동통, 기능상실이 대표적인 증상이라고 할 수 있는데^{25,31}, 이러한 염증의 특징은 疼痛, 出血, 寒熱, 腫塊 등으로 요약되는 瘀血의 病態⁹와 유사함을 알 수 있다. 따라서 염증의 치료에 있어서도 活血祛瘀의 祛邪法과 補氣하는 扶正法의 결합이 더욱 좋은 치료효과를 내리라 기대되며 補氣祛瘀하는 補陽還五湯¹⁵이 대표적 처방이 될 것으로 사료된다.

補陽還五湯¹⁵은 君藥인 黃芪와 當歸, 赤芍藥, 川芎, 地龍, 桃仁, 紅花로 구성된 처방으로 “赤芍藥, 歸尾通經佐地龍, 黃芪爲主藥 血中瘀滯用桃紅”¹⁵이라 하여 補氣, 活血, 通暢脈絡하는 效能이 있어^{1,2,15}, 한방부인과 임상에서 자궁내막증, 여성생식기의 종양성 질환, 골반울혈증후군, 만성 골반통 등의 瘀血이 주요 病機가 되는 질환뿐 아니라, 급·만성 골반염, 산욕기감염, 산후출혈 등 여성생식기의 염증성 질환에도 사용되고 있다^{1,3,16-18}.

현재까지 韓醫學 연구에 있어서 瘀血에 대한 실험적 연구로는 주로 혈전증 병태모형을 이용해서 하고 있다⁸. 瘀血이 婦人科 영역에서 매우 높은 중요성을 차지하고 있는 만큼 많은 이미 桃紅湯, 生化湯, 少腹逐瘀湯 등^{7,9-12} 다수의 부인과 活血祛瘀之劑의 항혈전 효과에 대한 실험적 연구가 진행되어 혈전증 병태모형에 대한 유의한 효과가 있음이 보고되어 왔다.

본 연구의 대상인 補陽還五湯¹⁵도 실험적 연구^{32,33}를 통해서 혈전증, 고지혈증, 고점도혈증과 같은 심혈관계 질환에 대한 일정 효과가 이미 보고된바 있으나, 항염증에 대한 실험적 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 補陽還五湯¹⁵에 行血祛瘀, 止血하는 蒲黃, 活血散瘀, 理氣止痛하는 玄胡索과 五靈脂, 活血祛瘀, 利水消腫하는 澤蘭¹⁹을 가하여 活血祛瘀의 藥效를 더욱 강화시킨 處方인 加味補陽還五湯의 항혈전 및 항염증 효과에 대해 실험적 연구를 통해 알아보았다.

抗血栓 效能에 대한 실험에 있어서, 먼저 혈소관 응집 억제 효과를 알아보았다. ADP와 Epinephrine에 의해서 각각 유도된 혈소관 응집에 대한 KBHT 억제력은 KBHT 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3, 0.15, 0.07 및 0.03 mg/ml 각각의 농도에서, ADP의 경우 각각 100, 100, 100, 100, 84.2, 55.7, 34.0, 16.7, 8.1 및 3.4 %로 나타났고, Epinephrine의 경우 각각 100, 100, 97.1, 85.4, 64.7, 48.0, 21.9, 9.7, 2.4 및 0 %로 나타났다. 응집 유도제로 ADP를 사용한 경우 Emax는 102.87 %, EC50은 0.48 mg/ml로, Epinephrine의 경

우는 Emax가 102.38 %, EC50은 0.73 mg/ml로 나타났다. 여기서 Emax는 최대 응집 억제율을 나타내고, EC50은 50 %의 억제율을 보이는 농도를 나타낸다³⁴⁾. Sigmoid Emax model에서 곡선의 sigmoidicity를 나타내는 γ 은 ADP와 epinephrine이 각각 1.50와 1.34으로 epinephrine의 sigmoidicity가 약간 작게 나타났다. γ 가 작을수록 혈소판 응집억제를 위해 보다 높은 농도의 저해제가 필요하다는 것을 의미하므로³⁴⁾ 혈소판 응집 억제효과가 클수록 γ 값이 증가하게 된다.

Collagen과 epinephrine은 잘 알려진 혈소판 활성화제로, 혈소판 응집억제효과나 항 혈전 효과를 알아보기 위한 대다수의 실험적 연구에 주로 이용되고 있다^{22,35)}.

본 연구의 collagen과 epinephrine에 의해 유도된 폐색전 실험에서 대조군은 8 마리 중 8 마리가 죽거나 30 분간 이상 마비가 지속이 된 반면, aspirin 투여군은 8 마리 중 3 마리만이, KBHT 투여군은 8 마리 중 4 마리가 죽거나 15 분 이상 마비가 지속되어 50 %의 억제 효과를 나타내었다(Table 3).

현재까지 이용되고 있는 혈전증 병태 모델 중에서 본 연구에 사용된 dextran에 의한 瘀血병태는 고점도 혈증 모델로 혈액의 점성이 증가되어 혈액의 흐름이 정체되어 나타나는 血瘀 모델에 가깝다고 볼 수 있다⁹⁾.

KBHT의 항혈전 효과를 알아보기 위하여 Dextran 瘀血병태 모델을 이용해 혈소판수, Prothrombin time (이하 PT), Activated partial thromboplastin time (이하 APTT)을 측정하였다.

본 연구의 혈소판 수 변화는 정상군이 658.7 ± 18.5 ($\times 10^3$ /mm³)인데 비해, 대조군이 508 ± 15.9 ($\times 10^3$ /mm³), KBHT 투여군이 587.6 ± 12.4 ($\times 10^3$ /mm³)로 대조군에 비하여 유의성 ($P < 0.01$)있는 증가효과를 보였다(Table 2). PT에 미치는 효과에서는 정상군이 19.8 ± 1.51 초인데 비해, 대조군이 28.4 ± 2.1 초, KBHT 투여군이 22.1 ± 1.05 초로 나타나 대조군에 비하여 유의성 ($P < 0.01$)있는 단축 효과를 보였다(Table 2). APTT에 미치는 효과에서는 정상군이 38.5 ± 2.4 초인데 비해, 대조군이 52.7 ± 1.58 초, KBHT 투여군이 42.8 ± 2.48 초로 나타나 대조군에 비하여 유의성 ($P < 0.01$) 있는 감소 효과를 나타내었다(Table 4).

본 연구에서 KBHT 투여군의 platelets 수치가 대조군에 비해 증가된 것은, KBHT이 직접 혹은 간접적으로 응고계의 활성을 억제시키거나 또는 항응고 인자의 활성을 유도하여 platelets의 소비를 억제시킨 결과라고 추정할 수 있을 것이다.

염증반응은 국소반응과 전신반응으로 나누게 되는데, 그 중 전신반응은 그 원인과 반응조직의 차이에 상관없이 거의 유사한 조직학적 변화를 보인다^{25,30)}. 이러한 현상은 손상에 의하여 생체 내 국소부위에 유리되는 공통적인 물질요인의 존재를 추정하게 하는데, 이러한 화학적 매개체로는 혈관활성 아민류, 혈장단백 분해효소, 아라키돈산 대사물 (prostaglandin(이하 PG), leukotriene), 리소좀 성분, 산소유래유리기 (Oxygen-derived free radical), 혈소판 활성화인자 (platelet activating factor, 이하 PAF), 산화질소 (NO), Cytokine 등이 있다^{25,30)}.

Cytokine이란 세포, 주로 백혈구에서 분비되는 단백질성 물질인데, 특이면역에 관여하는 cytokine들은 인터루킨 (interleukin,

IL)이라고도 부른다³⁶⁾. 이 중에 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 cytokine으로, 면역계에서 면역반응, 급성기 반응과 hemotopoiesis를 조절하는 역할과 함께 host defense mechanism에서 중요한 역할을 담당 한다³⁷⁾.

KBHT의 항염증 효과에 대한 연구에서 대표적인 염증성 cytokines인 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 유전자 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 평가한 결과, TNF- α 에서의 KBHT 10 μ g/ml 처리군을 제외한 나머지 모두에서 각각 대조군에 비해 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 1).

Cyclooxygenase (이하 COX)는 arachidonic acid로부터 PG를 생성하는 과정에 작용하는 효소로, 현재 COX-1과 COX-2가 알려져 있다. COX-2는 염증을 포함한 다양한 자극에 의해 단기간 내에 급격히 발현되는데, COX-2의 생성을 자극하는 요인으로는 IL-1, IL-2, TNF- α 및 lipopolysaccharide (이하 LPS)가 있으며, IL-2와 IL-10에 의해 억제된다. 자극된 COX-2는 PG의 생성을 촉진하며 혈관의 수축작용과 염증반응에 관여하여 조기진통이나 임신중독증 그리고 여러 여성생식기 감염 및 종양에서 비정상적으로 발현되어 자궁조직 내 PG 대사산물이 증가된다고 알려져 있다³⁸⁾.

Nitric Oxide (이하 NO)는 혈관에서 강력한 혈관확장 작용을 하며 혈소판 응집을 저해하고 중성구나 혈소판이 혈관내피세포에 부착하는 것을 막는 역할을 한다. 생체 내에서 NO의 전구물질은 L-arginine으로서 Nitric Oxide Synthesis (이하 NOS)의 작용으로 L-arginine이 산화되면 L-citrulline과 NO를 생성하게 된다. NOS는 일종의 산화효소로서 혈관내피세포성 NOS, 신경세포성 NOS 및 유도성 NOS (이하 iNOS)의 세 가지 아형으로 존재하는데, 이 중 iNOS는 염증성 cytokine이나 LPS 등에 반응하여 분비된다³⁹⁾.

KBHT의 RAW 264.7 세포주에서 COX-2와 NOS-II 유전자 발현에 미치는 영향을 알아본 결과, KBHT 100, 50 및 10 μ g/ml 처리군에서 각각 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 2).

세포막 NOS와 NO의 활성화는 hydroxyl radical을 생성하고 ROS를 발생시키고, 세포의 원형질 내에서 미토콘드리아는 증가된 Ca²⁺로 에너지 공급을 더욱 감소시키고 free radical들의 생성 증가를 초래하며, free radical들은 DNA 손상 외에도 지질과 산화에 의해 세포막을 손상시켜 세포사에 이르게 한다⁴⁰⁾.

RAW 264.7 세포주에서 NO 생성량에 대해서는 KBHT 100, 50 μ g/ml의 농도에서 유의성 있게 ($P < 0.01$, $P < 0.05$) 생성을 억제하였고(Fig. 2), 세포 내 ROS 생성량은 대조군이 정상군에 비하여 큰 폭으로 증가하였으며, KBHT 투여군은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 ROS 생성을 억제하였다(Fig. 3).

급성 염증성 질환 생쥐 모델을 이용한 KBHT의 항염증 효과에 대한 연구에서는 혈청 내 cytokine의 생성량과 비장 및 간 조직 내 cytokine의 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보았는데, 먼저 혈청 내 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생성량을 측정한 결과, KBHT 투여군 모두에서 대조군에 비하여 유의성 있는 ($P < 0.01$) 결과를 나타내었다(Fig. 4).

비장 조직에서 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 유전자 발현에 미치

는 영향을 알아본 결과, 정상군의 RQ값이 각각 0.012, 0.175, 0.078이었고 대조군은 모두 1.000으로 나타난 반면, KBHT 투여 군에서는 각각 0.084, 0.663, 0.766으로 나타났고(Fig. 5), 간 조직에서는 정상군이 각각 0.021, 0.214, 0.112이었고 대조군은 모두 1.000로 나타난 반면, KBHT 투여군에서는 각각 1.202, 0.901, 0.889로 나타나서(Fig. 5) 간 조직에서의 IL-1 β 를 제외하고는 나머지 모두의 유전자 발현에 억제효과가 있는 것으로 나타났다.

LPS가 체내로 주입되면 혈장에서 LPS 결합단백과 함께 백혈구나 내피세포의 CD14 receptor에 부착되어 세포손상을 초래하며²⁶⁾, 이들 세포로 하여금 PAF, PG, leukotriene 등의 cytokine을 유리시키거나 complement 등의 혈장 단백을 활성화하게 되는데^{26,41)}, 이러한 인자들은 심근의 억제, 응고계의 활성화, 혈관확장, 여러 기관의 기능부전 등을 초래하게 된다^{26,42)}. 이러한 LPS (3 mg/kg)를 생쥐의 복강에 주사하여 lethal endotoxemia를 유도한 후 KBHT의 생명연장 효과를 관찰한 결과, 대조군에 비해 KBHT 투여군이 LPS 투여 후 3일째에 생존율이 증가하였다(Fig. 6).

이상의 실험적 연구 결과를 종합해 볼 때, 加味補陽還五湯의 항혈전 및 항염증 효과가 인정되어 혈전증 및 이와 관련된 血行障礙로 인한 韓醫學의 瘀血症과 다양한 염증성 질환에 유효하게 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

加味補陽還五湯(KBHT)의 항혈전 효과를 실험적으로 규명하기 위해 혈소판 응집 억제 효과와 혈전유발에 따른 혈류속도를 측정하고, 폐색전 유발 및 dextran에 의한 혈전증 병태모형을 이용하여 실험하였고, 항염증 효과의 규명을 위해서 염증관련 cytokines의 유전자 발현과 NO 및 ROS의 생산량에 미치는 영향, 급성 염증성 질환 생쥐 모델에서의 cytokine 변화에 미치는 영향 등을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

KBHT는 ADP와 epinephrine에 의해 유도된 혈소판 응집을 억제하였다. KBHT는 대조군에 비해 collagen과 epinephrine에 의해 유도된 폐색전에 대해 50 %의 억제효과를 나타내었다. KBHT는 dextran 어혈병태를 유발한 흰쥐의 혈소판수를 대조군에 비해 유의성 있게 증가시켰고, PT 및 APTT를 유의성 있게 감소시켰다. KBHT는 RAW 264.7 세포주에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2 및 NOS-II의 유전자 발현을 대조군에 비해 농도 의존적으로 억제하였으며, NO 생성량을 100, 50 μ g/ml의 농도에서 유의성 있게 억제하였고, ROS 생성량을 농도 의존적으로 억제하였다. KBHT는 급성 염증유발 생쥐의 혈청 내 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생성을 유의성 있게 억제하였고, 비장 조직에서의 유전자 발현은 모두 감소시켰으며, 간 조직에서는 IL-6 및 TNF- α 의 유전자 발현은 감소시켰으나 IL-1 β 의 유전자 발현은 증가시켰다. KBHT는 LPS 투여 후 3일째에 대조군에 비해 생쥐의 생존율을 증가시켰다.

이상의 실험 결과로 보아 加味補陽還五湯은 항혈전 및 항염증 효과가 인정되므로, 氣虛와 瘀血로 인해 발생하는 여성의 자궁내막증, 자궁근증, 골반울혈증후군, 만성 골반염, 만성 자궁경부염 등에 유효하게 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 羅元愷 主編. 實用中醫婦科學. 上海, 上海科學技術出版社, p 13, 20, 21, 277, 281, 1996.
2. 宋炳基. 韓方婦人科學. 서울, 행림출판, pp 17-19, 1995.
3. 한의부인과학 교재편찬위원회. 韓醫婦人科學(上). 서울, 도서출판 정담, p 61, 101, 190, 191, 2002.
4. 郭玲 외. 血府逐瘀湯膠囊治療慢性骨盤炎 17例. 北京中醫雜誌 21(3):192-193, 2002.
5. 전국한의과대학 병리학 교실 編. 동의병리학. 서울, 一中社, pp 152-165, 272-274, 424-426, 1999.
6. 易法銀 主編. 中醫瘀血證診療大全. 北京, 中國中醫藥出版社, pp 1-11, 664, 1999.
7. 張之南 외. 血瘀證與活血化癥研究. 上海, 上海科學技術出版社, pp 429-431, 1990.
8. 安圭錫, 朴種鉉, 朴耕模. 瘀血病態모형 개발에 관한 연구. 대한동의병리학회지 13(1):25-34, 1999.
9. 鄭學洙, 金亨俊, 徐一福. 흰쥐에서 endotoxin으로 유발된 과중성 혈관내 응고증에 대한 桃仁湯의 항혈전 효과. 대한한방부인과학회지 14(1):133-145, 2001.
10. 孫泰熏. 加味生化湯의 抗血栓 및 鎮痛效果에 對한 研究. 大田大學校 大學院, 2001.
11. 이해경. 加味通經湯의 抗血栓, 消炎 및 鎮痛作用에 對한 研究. 大田大學校 大學院, 2002.
12. 朴炳烈, 李相洙. 少腹逐瘀湯이 항혈전 및 소염, 진통에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지 9(1):81-96, 1996.
13. 고승희 외 8인. 桃仁, 蘇木이 endotoxin으로 유발된 어혈병태 모델에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 22(1):39-44, 2001.
14. 윤시진. 玄胡索·紅花·赤芍藥이 관절염 흰쥐의 염증과 간에 미치는 영향. 경원대학교 대학원, 2004.
15. 王淸任. 醫林改錯. 서울, 一中社, pp 85-86, 1992.
16. 김동일, 이동규, 이태균. 만성 골반통을 유발하는 골반울혈증 후군의 임상에 관한 연구. 대한한방부인과학회지 15(2):114-125, 2002.
17. 熊福榮. 補陽還五湯應用學隅. 北京中醫雜誌 22(2):65, 2003.
18. 王如英, 周琳. 活血祛瘀法治療子宮內膜異位症的臨床觀察. 中西醫結合雜誌 24(3):258-259, 2004.
19. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編. 本草學. 서울, 永林社, pp 401-402, 413-414, 425-426, 433-434, 1994.
20. Lee, J.H., Lee, Y.S., Kwon, K.I. Protective effects of *Phellinus linteus* on reperfusion of the isolated perfused Guinea pig hearts and anti-platelet aggregation effects of *Phellinus linteus*. J. Pharm. Sci.(C.N.U.), 10, 17-25, 1994.
21. Guerra-Fernando, J.I. et al. Effect of losartan on human platelet activation. J. Hypertension, 17:447-452, 1999.
22. Kimura, Y., Tani, T., Watanabe, K. Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. Arzneim.Forsch. Drug Res. 35(II):1144-1149, 1985.

23. Fonio, A. On the retraction process in blood plasma coagulation. *Acta Haematol.* 36(5):371-385, 1966.
24. Leadley, R.J. Jr, Morgan, S.R., Bentley, R., et al. Pharmacodynamic activity and antithrombotic efficacy of RPR120844, a novel inhibitor of coagulation factor Xa, *J Cardiovasc Pharmacol., USA*, 34(6):791-799, 1999.
25. 대한병리학회. 병리학. 서울, 고문사, pp 71-104, 112-120, 540-542, 1995.
26. Stanley, L., Robbins, et al. Pathologic basis of disease. 5th ed, Philadelphia, Saunders, pp 99-114, 117-121, 318-319, 623-626, 1994.
27. 李紅梅, 李亞平. 少腹逐瘀湯直腸灌注治療子宮線肌症 32例. *北京中醫雜誌* 21(5):292, 2002.
28. 정우열. 韓方病理學. 이리, 서울공판사, pp 5-34, 1983.
29. Kim, E.J. et al. Suppression by a sesquiterpene lactone from *Carpesium divaricatum* of inducible nitric oxide synthase by inhibiting nuclear factor- κ B activation. *Biochem. Pharmacol.*, 61, 903-910, 2001.
30. 최승만 외. *Propionibacterium acnes*에 대한 천연물의 항균효과 검색. *대한약학회지* 42, 89-94, 1998.
31. 송계용, 지제근, 함의근. 핵심 병리학. 서울, 고려의학, pp 62-94, 1998.
32. 설인찬, 김병탁. 加味補陽還五湯이 고지혈증, 혈전, 고점도혈증, 고혈압 및 뇌손상에 미치는 영향. *한방성인병학회지* 4(1):133-162. 1998.
33. 정우상 외 5인. 고혈압 및 고지혈증에 대한 補陽還五湯의 실험적 연구. *대한한방내과학회지* 18(2):246-267, 1997.
34. 우수경. 인체에 대한 cilostazol의 항혈소판 응집 작용과 심혈관계 작용에 대한 PK/PD modeling. *충남대학교 대학원*, 2001.
35. Konstantinides, S., et al. Inhibition of endogenous leptin protects mice from arterial and venous thrombosis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 24(11):2196-2201, 2004.
36. 홍천수 譯. Pathophysiology로 이해하는 내과학. 서울, 도서출판 정담, pp 10-12, 2002.
37. Aeberli, D., et al. Inhibition of the TNF-pathway: use of infliximab and etanercept as remission-inducing agents in case of therapy-resistant chronic inflammatory disorders. *Swiss Med. Wkly*, 132, 414-422, 2002.
38. Charles, N., Landen, Jr, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in cervical, endometrial, and ovarian malignancies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 188(5):1174-1176, 2003.
39. 지병철, 문신용. Nitric Oxide가 인간 황체화 과립막세포의 아포프토시스에 미치는 영향. *대한산부회지* 45(5):766-773, 2002.
40. 서영준. 발암과정에 있어서 Cyclooxygenase-2의 역할 및 그 저해를 통한 화학 암 예방. *분자세포생물학뉴스*, 13, 8-17, 2002.
41. Levi Marcel, ten Cate, Hugo. Current conceptions; disseminated intravascular coagulation. *N Eng J Med*, 341(8):586-592, 1999.
42. Hermida, Jose, et al. Endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in rabbits; effect of recombinant hirudin on hemostatic parameters, fibrin deposits, and mortality. *J Lab clin Med*, 131(1):77-83, 1998.