

定喘化痰降氣湯이 formalin으로 유발된 마우스의 만성 염증에 미치는 영향

신창호 · 박미연 · 최해윤 · 김종대*

대구한의대학교 한의과대학 내과학교실

Anti-inflammatory Effect of *Jungcheonhwadamgangki-tang* in Formalin-Injection Mouse Paw Chronic Inflammation Model

Chang Ho Sinn, Mee Yeon Park, Hae Yun Choi, Jong Dae Kim*

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

In the present study, the anti-inflammatory effect of *Jungcheonhwadamgangki-tang*(定喘化痰降氣湯) water extract was tested in formalin-injection mouse hind paw chronic inflammation model. The test articles were dosed once a day for 10 days, and changes on the body weight, paw weights were observed with histopathology of induced paw dorsum pedis. In addition, histomorphometry was also monitored at sacrifice. The increases of absolute and relative hind paw weight detected in vehicle control compared to that of sham, were significantly and dose-dependently inhibited by *Jungcheonhwadamgangki-tang* in the present study. A classic acute inflammatory histological changes such as subcutaneous edema, hypertrophy and infiltration of inflammatory cells, was detected in vehicle control. However, these histological changes were significantly and dose-dependently inhibited by *Jungcheonhwadamgangki-tang*. In addition, the increases of hind paw weight detected in the vehicle control, were also dose-dependently decreased in the all *Jungcheonhwadamgangki-tang*-dosing groups. Base on these aforementioned results, it is concluded that *Jungcheonhwadamgangki-tang* have clear anti-inflammatory effect on the chronic inflammation induced by formalin-injection.

Key words : *Jungcheonhwadamgangki-tang*(定喘化痰降氣湯), Anti-Inflammatory effect, Formalin-injection mouse

서론

염증은 세포손상을 유발하는 다양한 자극에 대한 살아있는 조직, 즉 혈관이 있는 조직의 복합적인 반응이다. 염증반응은 유해 물질을 파괴시키고 희석 또는 국소화시키면서 한편으로는 손상된 조직을 정상상태로 재구축하려는 일련의 과정으로 연결된다¹⁾.

만성 염증은 정확히 정의하기는 어려우나 일반적으로 수주 또는 수개월동안 지속되며 염증부위에서 염증 반응, 조직의 파괴, 치유과정이 동시에 일어나는 염증이라고 할 수 있다. 따라서 주로 혈관의 변화, 부종 및 호중구의 침윤을 동반하는 급성 염증과 대조적으로 만성 염증의 특징적 소견은 대식세포, 림프구 및

형질세포 등의 단핵구 침윤, 조직파괴, 혈관의 신생과 섬유화로 나타난다^{2,3)}.

定喘化痰降氣湯은 咳嗽, 痰喘, 氣喘, 哮喘 등의 병증^{4,5)}에 사용하는 처방으로 임상에서는 기관지 천식, 만성 기관지염, 만성폐쇄성 폐질환 등의 질환에 응용하고 있다. 만성 기관지염은 흡연, 반복되는 기도 감염 등의 원인으로 인해 기도내 만성 염증이 생긴 것으로 치료로는 기관지 확장제 투여, 항생제 투여, 스테로이드 투여 등이 주요 치료법이다⁶⁾. 하지만 dexamethasone같은 스테로이드제제는 골다공증, 위궤양 등과 같은 부작용^{7,8)} 때문에 현재에도 이를 대체하기 위한 치료제 개발이 진행되고 있다^{9,10)}.

定喘化痰降氣湯에 관한 실험연구로는 알레르기 천식모델을 이용한 박¹¹⁾의 즉시형 및 지연형 알러지 반응을 억제시키는 효과에 관한 연구와, 안¹²⁾과 이¹³⁾가 ovalbumin으로 유발된 천식

* 교신저자 : 김종대, 대구시 수성구 상동 165 대구한의대 한방병원

· E-mail : omendoim@dhu.ac.kr, · Tel : 053-770-2122

· 접수 : 2007/09/11 · 채택 : 2007/11/21

에서 혈액 화학적 변화와 조직학적 변화를 관찰한 연구가 있으며, 급성 염증에 관한 연구로 송¹⁴⁾이 Xylene으로 유발된 마우스에서 定喘化痰降氣湯이 양호한 항염 효과를 내는 것으로 보고하였다. 그러나 아직까지 만성 염증에 대한 항염 효과는 보고되지 않았다.

이에 본 연구에서는 定喘化痰降氣湯의 만성염증에 대한 항염 효과를 확인하기 위하여 formalin으로 유발된 마우스 hind paw chronic inflammation 모델을 이용하여 100, 250 및 500 mg/kg의 定喘化痰降氣湯을 10일간 경구투여하고 hind paw의 중량의 변화와 함께 hind paw의 조직학적 변화와 histomorphometry의 변화를 관찰하였으며, 아울러 항염 효과에 대한 대조약물로 dexamethasone (DEXA) 및 diclofenac (DICRO) 15 mg/kg을 복강 투여하여 그 효능을 비교 관찰하였다.

실 험

1. 재료

1) 약제

본 실험에 사용된 약제는 대구한의대 부속 대구한방병원 약제과에서 구입·정선하여 사용하였으며, 定喘化痰降氣湯⁵⁾ 1첩분량의 조성은 아래와 같다(Table 1).

Table 1. Composition of Jungcheonhwadamgangki-tang

藥物名	生藥名	用量 (g)
陳皮	<i>Citri Pericarpium</i>	8
柿蒂	<i>Kaki Calyx</i>	6
半夏	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	4
南星炮	<i>Arisaematis Rhizoma</i>	4
杏仁	<i>Armeniaca Amarum Semen</i>	4
五味子	<i>Schizandrae Fructus</i>	4
款冬花	<i>Farfarae Flos</i>	4
皂角刺	<i>Gleditsiae Spina</i>	4
沙 蔞	<i>Adenophorae Radix</i>	4
紫 菀	<i>Asteris Radix</i>	4
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
日當歸	<i>Angelicae Acutilobe Radix</i>	3
人 蔘	<i>Ginseng Radix</i>	3
蘇 子	<i>Perillae Fructus</i>	3
前 胡	<i>Peucedani Radix</i>	3
赤茯苓	<i>Poria Rubra</i>	3
浙貝母	<i>Fritillariae Thunbergii Bulbus</i>	3
枳 實	<i>Panciri Fructus</i>	3
Total amount		71

2) 동물

실험동물은 ICR mouse (Charles River, Japan)를 이용하였으며, 실험동물은 각 군 당 7마리씩 총 49마리를 이용하였다. 동물은 7마리씩 분리하여 polycarbonate cage에 수용하고 온도 20-25℃ 및 습도 30-35%로 조절된 무균시설에서 사육하였으며, 명암주기는 12 : 12시간으로 조절하였다. 사료 및 음수는 자유롭게 섭취할 수 있도록 공급하였으며 최종 부검시 12시간 이상 절식시켰다. 실험동물은 picric acid를 이용하여 개체 번호를 식별하였다.

2. 방법

1) 만성 염증의 유발

Hosseinzadeh 등¹⁵⁾의 방법에 준하여 formalin을 약물 투여 시작일(Day 0) 및 투여 3일(Day 2)에 약물투여 2시간 전 각각 마리당 0.02 ml의 3.75% formalin (Sigma, USA)을 왼쪽 hind paw의 발바닥 신경대로 주사(aponeurotic injection)하여 만성 염증을 유발하였다.

2) 실험군의 구분

정상군, 대조군, dexamethasone 15 mg/kg 복강 투여군(이하 DEXA 군), diclofenac 15 mg/kg 복강 투여군(이하 DICRO 군), 定喘化痰降氣湯 100 (J100), 250 (J250) 및 500 (J500) mg/kg 투여군으로 총 7개로 구분하였다(Table 2).

Table 2. Experimental Designs Used in This Study

Group ID	Treatment	Dosage	Formalin Injection
Sham	D.W.	0 mg/kg	No
Control	D.W.	0 mg/kg	Yes
DEXA	Dexamethasone	15 mg/kg	Yes
DICRO	Diclofenac	15 mg/kg	Yes
J100	JCWDKKT Extract	100 mg/kg	Yes
J250	JCWDKKT Extract	250 mg/kg	Yes
J500	JCWDKKT Extract	500 mg/kg	Yes

JCWDKKT Extract: Jungcheonhwadamgangki-tang extract; D.W.: Distilled water; JCWDKKT Extracts were dissolved in D.W. and dosed by gastric gavage at 10 ml/kg levels, and Dexamethasone (DEXA) and Diclofenac (DICRO) was dosed by intraperitoneal injection at 10 ml/kg levels using saline as vehicle. To induce chronic inflammation, Formalin was dose by aponeurotic injection at Day 0 and Day 2. 10 days after dosing, all animals were sacrificed.

3) 定喘化痰降氣湯의 추출

선정된 약제 1첩분량(710 g)을 취하여 정제수 4000 ml를 넣어 가열 추출한 후 흡인 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator (N-N type; LAB Camp, Daejeon, Korea)로 감압·농축하여 점조성의 추출물을 얻었다. 그 후에 programmable freeze dryer (PVTFD10A; Ilshin Lab., Seoul, Korea)를 사용하여 동결 건조시켜 1첩 당 15.549 g, 총 155.49 g (수율 약 21.90%)의 추출물을 얻어 실험에 사용하였다.

4) 약물의 투여

대조약물 투여군인 DEXA 및 DICRO 군에서는 각각 Dexamethasone (Sigma, USA) 및 Diclofenac (Suzhou Leader Chemical Co., CHINA) 15 mg/kg을 생리 식염수에 녹여 10 ml/kg의 농도로 매일 1회씩 10일간 복강투여 하였으며, 定喘化痰降氣湯은 100, 250 또는 500 mg/kg을 멸균 증류수에 녹여 매일 1회씩 10일간 경구투여 하였다. 또한 대조군 및 정상군에서는 동일한 양의 멸균 증류수를 定喘化痰降氣湯과 동일한 방법으로 투여하였다. 모든 실험물질은 formalin-injection 2시간 후 투여하였다.

5) 체중 및 체중증가량의 관찰

실험동물의 체중은 약물 투여 시작 1일 전부터 약물 투여 10일 후(최종 희생일)까지 매일 약물 투여 2시간 전에 각각 측정하였으며, 모든 실험동물은 사료 섭취와 관련된 체중 차이를 줄이기 위해 최종 희생일에는 18시간 이상 절식시켰다. 또한 실험 시작시의 개체별 체중 차이에 기인한 변화를 줄이기 위해 하기의 공식을 이용하여 체중증가량을 계산하였다.

Body weight gains (g) = Body weight at Day 9 - Body weight at initial dosing

6) Hind Paw 중량의 변화

모든 실험동물은 약물투여 시작 10일 후 최종 부검일에 Rompun® (Xylazine hydrochloride, 유한양행) 0.2 mg/kg을 복강 주사하여 진정시키고, Ketalar® (Ketamine hydrochloride, 유한양행) 1 mg/kg을 복강 주사하여 마취시킨 다음 양쪽 hind paw를 tarsus 부분에서 절단하여 적출한 후 g 단위로 중량을 측정하였다. 또한 개체간의 체중 차이에 기인한 오차를 줄이기 위하여 아래의 공식으로 상대 중량을 측정하였다.

$$\text{Relative weight (\%)} = [(\text{Absolute Hind Paw Weight} / \text{Body Weight at Sacrifice}) \times 100]$$

유발된 정도에 의한 오차를 줄이기 위하여, 정상부위와 유발부위 사이의 중량 차이 역시 아래의 공식을 이용하여 측정하였다.

$$\text{Differences (g)} = \text{Induced Hind Paw Weight} - \text{Intact Hind Paw Weight}$$

7) 조직학적 관찰

부검시 유발 Hind Paw를 tarsus 부분에서 절취하여 10% neutral buffered formalin (10% NBF)에 24시간 이상 고정하였다. 이후 고정된 조직은 ethanol 탈수를 거쳐 일반적인 방법으로 paraffin에 포매 하였으며, 이 후 3-4 μm의 연속절편을 제작한 다음 Masson's Trichrome 염색을 실시하고 광학현미경하에서 관찰하였다.

8) Histomorphometry 관찰

염색된 조직 표본 상에서 자동 조직영상장치 automated image analysis (Analysis Image Processing; SIS, Germany)를 이용하여, thickness-dorsum pedis를 μm단위로 측정하였다.

9) 통계처리

모든 수치는 평균 ± 표준편차 (n=7)로 나타내었으며, 대조군 또는 정상군과 비교하여 Mann-Whitney Wilcoxon's (MW) test를 실시하여 p value가 0.05 이하일 경우 유의성을 인정하였으며, 통계처리는 SPSS for Windows (Release 11.0.4, SPSS Inc., USA)를 사용하였다. 또한 체중 및 체중증가량의 변화를 제외한 모든 결과는 대조군과 비교한 % changes를 아래의 공식을 이용하여 산출하였다.

$$\% \text{ Changes vs Control} = [(\text{Data of tested group} - \text{Data of Control}) / \text{Data of Control}] \times 100$$

결 과

1. 체중 및 체중증가량의 변화

1) 체중의 변화

대조군의 경우 투여 1일전, 투여 시작일, 투여 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9일 및 최종 희생일의 체중이 각각 28.07 ± 0.97, 30.14 ± 1.17, 30.61 ± 1.32, 31.43 ± 1.18, 31.64 ± 0.99, 31.90 ± 0.74, 32.11 ± 0.83, 32.27 ± 1.03, 32.74 ± 0.55, 32.99 ± 0.43, 33.01 ± 0.76 및 30.53 ± 1.33 g/head로 관찰되어 정상군과 유사한 체중의 변화를 나타내었다(Table 3).

Table 3. Body Weight Changes in Formalin-injected ICR Mice after Jungcheonhwadamgangki-tang Extract Dosing

Group \ ID ^{a)}	Sham	Control	DEXA	DICRO	J100	J250	J500
Day -1	28.14±1.00 ^{@)}	28.07±0.97	28.04±1.09	28.16±0.69	28.27±1.23	28.20±0.98	28.21±1.06
Day 0 ^{b)}	30.39±1.13	30.14±1.17	30.16±1.87	30.16±1.39	29.94±1.95	30.09±1.12	30.03±1.49
Day 1	30.74±1.35	30.61±1.32	30.80±1.44	30.50±1.16	30.64±1.88	30.46±1.20	30.71±1.35
Day 2 ^{b)}	31.29±1.15	31.43±1.18	30.33±1.86	31.16±0.99	30.96±1.34	31.14±1.33	31.39±0.96
Day 3	31.49±1.06	31.64±0.99	29.80±1.74 ^{**}	31.71±0.49	31.51±1.01	31.40±1.23	31.79±0.76
Day 4	31.74±1.25	31.90±0.74	29.43±1.11 ^{**}	31.81±0.42	31.91±1.08	31.83±1.09	31.83±0.99
Day 5	31.94±0.95	32.11±0.83	29.20±1.09 ^{**}	32.01±0.84	32.24±0.80	31.93±1.42	31.81±0.67
Day 6	32.20±1.02	32.27±1.03	29.43±0.98 ^{**}	32.10±0.52	32.51±1.18	32.26±1.36	32.16±0.91
Day 7	32.73±0.95	32.74±0.55	29.37±1.57 ^{**}	32.43±0.82	32.51±0.92	32.30±1.29	32.59±1.01
Day 8	32.93±1.05	32.99±0.43	27.66±2.09 ^{**}	33.19±0.63	32.74±0.62	32.67±1.39	32.86±0.65
Day 9	33.20±0.96	33.01±0.76	26.56±1.55 ^{**}	33.31±0.78	33.04±0.96	32.74±1.44	33.07±0.81
Day 10 ^{c)}	30.80±0.82	30.53±1.33	24.13±1.28 ^{**}	31.06±1.04	30.50±0.84	30.30±2.03	30.91±0.99
Gains ^{d)}	2.81±1.22	2.87±1.27	-3.60±1.70 ^{**}	3.16±1.69	3.10±1.84	2.66±1.52	3.04±1.42

a) Group ID was listed in Table 2; b) The day of Formalin Injection; c) At sacrifice after fasting; d) Body weight gains between Day 0 and Day 9; @) mean ± S.D., g (n=7); * p<0.05 compared to that of Sham; ** p<0.01 compared to that of Sham; # p<0.05 compared to that of Control; ## p<0.01 compared to that of Sham.

DEXA 군에서는 체중이 각각 28.04 ± 1.09, 30.16 ± 1.87, 30.80 ± 1.44, 30.33 ± 1.86, 29.80 ± 1.74, 29.43 ± 1.11, 29.20 ± 1.09, 29.43 ± 0.98, 29.37 ± 1.57, 27.66 ± 2.09, 26.56 ± 1.55 및 24.13 ± 1.28 g/head로 관찰되어 정상군 및 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01 또는 p<0.05) 체중의 감소가 투여 후 3일부터 관찰되었다(Table 3).

DICRO 군에서는 체중이 각각 28.16 ± 0.69, 30.16 ± 1.39, 30.50 ± 1.16, 31.16 ± 0.99, 31.71 ± 0.49, 31.81 ± 0.42, 32.01 ± 0.84, 32.10 ± 0.52, 32.43 ± 0.82, 33.19 ± 0.63, 33.31 ± 0.78 및 31.06 ± 1.04 g/head로 관찰되어 정상군 및 대조군과 유사한 체중의 변화를 나타내었다(Table 3).

한편 J100 군에서는 체중이 각각 28.27 ± 1.23, 29.94 ± 1.95, 30.64 ± 1.88, 30.96 ± 1.34, 31.51 ± 1.01, 31.91 ± 1.08, 32.24 ± 0.80, 32.51 ± 1.18, 32.51 ± 0.92, 32.74 ± 0.62, 33.04 ± 0.96 및 30.50 ± 0.84 g/head로 관찰되어 정상군 및 대조군과 유사한 체중의 변화를 나타내었다(Table 3).

J250 군에서도 체중이 각각 28.20 ± 0.98, 30.09 ± 1.12, 30.46 ± 1.20, 31.14 ± 1.33, 31.40 ± 1.23, 31.83 ± 1.09, 31.93 ± 1.42, 32.26 ± 1.36, 32.30 ± 1.29, 32.67 ± 1.39, 32.74 ± 1.44 및 30.30 ± 2.03 g/head로 관찰되어 정상군 및 대조군과 유사한 체중의 변화를 나타내었다(Table 3).

J500 군에서도 체중이 각각 28.21 ± 1.06, 30.03 ± 1.49, 30.71 ± 1.35, 31.39 ± 0.96, 31.79 ± 0.76, 31.83 ± 0.99, 31.81 ± 0.67, 32.16 ± 0.91, 32.59 ± 1.01, 32.86 ± 0.65, 33.07 ± 0.81 및 30.91 ±

0.99 g/head로 관찰되어 정상군 및 대조군과 유사한 체중의 변화를 나타내었다(Table 3).

2) 체중증가량의 변화

정상군, 대조군, DEXA, DICRO, J100, 250 및 J500 군에서 체중증가량이 각각 2.81 ± 1.22, 2.87 ± 1.27, -3.60 ± 1.70, 3.16 ± 1.69, 3.10 ± 1.84, 2.66 ± 1.52 및 3.04 ± 1.42 g/head로 관찰되어, DEXA 군을 제외한 모든 실험군에서 유사한 체중증가량을 나타내었다. 한편 DEXA 군에서는 정상군 및 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 체중증가량의 감소가 인정되었다(Table 3).

2. Hind paw 중량의 변화

1) 절대 중량치의 변화

최종 희생일의 정상 부위의 절대 paw 중량은 정상군, 대조군, DEXA, DICRO, J100, J250 및 J500 군에서 각각 0.198 ± 0.009, 0.197 ± 0.006, 0.164 ± 0.008, 0.197 ± 0.008, 0.197 ± 0.010, 0.199 ± 0.017 및 0.197 ± 0.011g/head로 관찰되어, DEXA 투여군을 제외한 모든 실험군에서 유사한 절대 중량치를 나타내었다. 한편 DEXA 투여군에서는 정상군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 정상 paw 절대 중량의 감소가 인정되었다(Table 4).

Table 4. Changes on Absolute Paw Weight at Sacrifice in Formalin-injected ICR Mice after Jungcheonhwadamgangki-tang Extract Dosing

ID ^{a)}	Group	Absolute weight (g)			Changes ^{c)}
		Intact sides	Induced sides	Differences ^{b)}	
Sham		0.198±0.009 ^{@)}	0.199±0.010	0.001±0.005	
Control		0.197±0.006	0.394±0.071**	0.197±0.071**	
DEXA		0.164±0.008**	0.202±0.020 ^{#)}	0.037±0.018** ^{#)}	-80.97%
DICRO		0.197±0.008	0.256±0.035** ^{#)}	0.059±0.036** ^{#)}	-69.86%
J100		0.197±0.010	0.325±0.055**	0.128±0.056**	-34.86%
J250		0.199±0.017	0.287±0.012** ^{#)}	0.087±0.024** ^{#)}	-55.56%
J500		0.197±0.011	0.261±0.036** ^{#)}	0.064±0.029** ^{#)}	-67.39%

a) Group ID was listed in Table 2; b) Differences between intact and induced sides; c) Changes vs Control; @) mean ± S.D., (n=7); ** p<0.01 compared to that of Sham; # p<0.05 compared to that of Control; ## p<0.01 compared to that of Control.

유발 부위의 paw 중량은 0.199 ± 0.010, 0.394 ± 0.071, 0.202 ± 0.020, 0.256 ± 0.035, 0.325 ± 0.055, 0.287 ± 0.012 및 0.261 ± 0.036 g/head로 관찰되어 DEXA군을 제외한 모든 약물투여군에서 정상군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 유발 Paw 중량의 증가를 나타내었고, 대조군에 비해서는 유의성 있는(p<0.01 또는 p<0.05) paw 중량의 감소가 J100 군을 제외한 모든 약물투여군에서 인정되었다(Table 4).

한편 정상 부위와 유발 부위의 절대 paw 중량 차이는 0.001 ± 0.005, 0.197 ± 0.071, 0.037 ± 0.018, 0.059 ± 0.036, 0.128 ± 0.056, 0.087 ± 0.024 및 0.064 ± 0.029 g/head로 관찰되어, 모든 약물 투여군에서 정상군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 증가를 나타내었고, 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01 또는 p<0.05) 절대 paw 중량 차이의 감소가 J100 군을 제외한 모든 실험군에서 인정되었다. J100 군에서도, 대조군에 비해 현저한 정상부위와 유발부위 paw 절대 중량 차이의 감소가 관찰되었으나 유의성은 인정되지 않았으며, 定喘化痰降氣湯 투여군에서는 대조군에 비해 유발 부위와 정상부위 Paw 절대 중량 차이가 투여용량에 의존하

는 감소가 인정되었다. 이들 유발 부위와 정상부위 paw 절대 중량 차이는 -80.97, -69.86, -34.86, -55.56 및 -67.39%의 변화를 나타내었다(Table 4).

2) 상대 중량치의 변화

최종 희생일의 정상 부위의 상대 paw 중량은 정상군, 대조군, DEXA, DICRO, J100, J250 및 J500 군에서 각각 0.643 ± 0.031, 0.647 ± 0.018, 0.682 ± 0.051, 0.635 ± 0.030, 0.645 ± 0.020, 0.657 ± 0.020 및 0.637 ± 0.018%로 관찰되어, 모든 실험 군에서 유사한 상대 중량치를 나타내었다(Table 5).

유발 부위의 상대 paw 중량은 0.645 ± 0.029, 1.291 ± 0.228, 0.838 ± 0.101, 0.826 ± 0.117, 1.067 ± 0.184, 0.950 ± 0.080 및 0.843 ± 0.102%로 관찰되어 대조군과 모든 약물 투여군에서 정상군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 유발부위의 상대 paw 중량치의 증가를 나타내었고, 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01 또는 p<0.05) 유발부위의 상대 paw 중량치의 감소가 J100 군을 제외한 모든 약물 투여군에서 인정되었다. 한편 J100 군에서도 대조군에 비해 현저한 유발 paw 상대 중량치의 감소가 인정되었으나 유의성은 인정되지 않았다(Table 5).

한편 정상 부위와 유발 부위의 상대 paw 중량 차이는 0.003 ± 0.016, 0.644 ± 0.234, 0.156 ± 0.079, 0.191 ± 0.117, 0.421 ± 0.187, 0.293 ± 0.090 및 0.206 ± 0.091%로 관찰되어, 모든 약물 투여군에서 정상군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 증가를 나타내었고, 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01 또는 p<0.05) 상대 paw 중량 차이의 감소가 J100 군을 제외한 모든 실험군에서 인정되었다. J100 군에서도 대조군에 비해 현저한 정상과 유발 paw 상대 중량 차이의 감소가 관찰되었으나 유의성은 인정되지 않았으며, 定喘化痰降氣湯 투여군에서는 대조군에 비해 정상 부위와 유발 부위의 상대 paw 중량 차이가 투여용량에 의존하는 감소가 인정되었다. 이들 유발 부위와 정상부위 Paw 상대 중량의 차이는 -75.79, -70.28, -34.58, -54.50 및 -67.96%의 변화를 나타내었다(Table 5).

Table 5. Changes on Relative Paw Weight at Sacrifice in Formalin-injected ICR Mice after Jungcheonhwadamgangki-tang Extract Dosing

ID ^{a)}	Group	Relative weight (%)			Changes ^{c)}
		Intact sides	Induced sides	Differences ^{b)}	
Sham		0.643±0.031 ^{@)}	0.645±0.029	0.003±0.016	
Control		0.647±0.018	1.291±0.228**	0.644±0.234**	
DEXA		0.682±0.051	0.838±0.101** ^{#)}	0.156±0.079** ^{#)}	-75.79%
DICRO		0.635±0.030	0.826±0.117** ^{#)}	0.191±0.117** ^{#)}	-70.28%
J100		0.645±0.020	1.067±0.184**	0.421±0.187**	-34.58%
J250		0.657±0.020	0.950±0.080** ^{#)}	0.293±0.090** ^{#)}	-54.50%
J500		0.637±0.018	0.843±0.102** ^{#)}	0.206±0.091** ^{#)}	-67.96%

a) Group ID was listed in Table 2; b) Differences between intact and induced sides; c) Changes vs Control; @) mean ± S.D., (n=7); Relative weight (%) was ratio vs body weight at sacrifice; ** p<0.01 compared to that of Sham; # p<0.05 compared to that of Control; ## p<0.01 compared to that of Control.

3. 유발 paw의 조직병리학적 변화

정상군의 경우, 비교적 치밀한 각질 중층편평상피 및 정상적인 피하 조직을 나타내었다(Fig. 1a). 그러나 대조군의 경우에는 피하 부종과 매우 심한 염증세포의 침윤에 의한 paw dorsum pedis의 비후와 같은 전형적인 만성 염증 소견이 인정되었다(Fig. 1b, c).

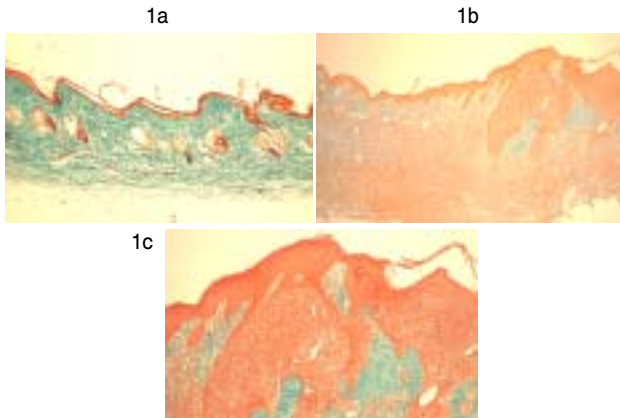


Fig. 1. Histological profiles of induced paw in Sham and Control groups. a. Sham b. Control c. Control. All Masson's Trichrome Stain; × 25 (b); × 50 (a, c). Note that normal histological appearance of paw dorsum pedis including keratinized stratified squamous epithelium were demonstrated in sham group with relatively well developed subcutaneous tissues. However, classic chronic inflammatory changes on the histological profiles of paw including edematous changes throughout the whole dorsum pedis tissues with severe infiltration of inflammatory cells. Therefore the paw thickness dorsum pedis were markedly increased in Control compared to that of Sham.

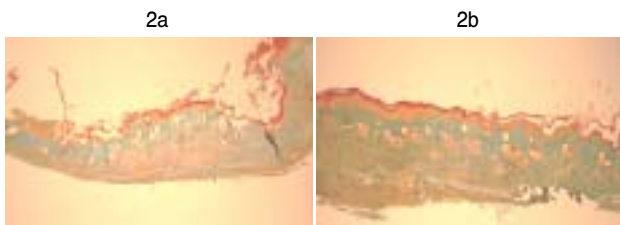


Fig. 2. Histological profiles of induced paw in reference drug-dosing groups. a. DEXA group b. DICRO group. All Masson's Trichrome Stain; × 250. Note that classic chronic inflammatory changes on the histological profiles of paw including edematous changes throughout the whole dorsum pedis tissues with severe infiltration of inflammatory cells were also demonstrated and the pedis thickness in DEXA and DICRO groups were markedly increased compared to that of Sham, respectively. However, these changes on histological profiles were dramatically decreased compared to that of Control in both DEXA and DICRO groups.

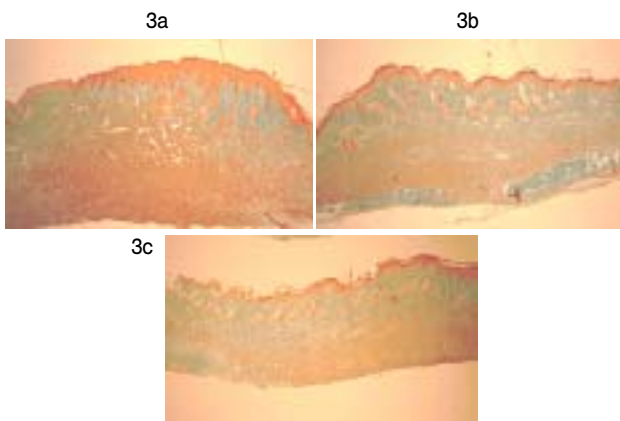


Fig. 3. Histological profiles of induced paw in Jungcheonhwadamgangki-tang extract dosing groups. a. 100 mg/kg -dosing group b. 250 mg/kg-dosing group c. 500 mg/kg-dosing group. All Masson's Trichrome Stain; × 25. Note that classic chronic inflammatory changes on the histological profiles of paw including edematous changes throughout the whole dorsum pedis tissues with severe infiltration of inflammatory cells and the paw thickness of dorsum pedis were markedly increased compared to that of Sham, respectively. However, these changes on histological profiles were dramatically and dose-dependently decreased compared to that of Control in all Jungcheonhwadamgangki-tang extract dosing groups.

그러나 DEXA 및 DICRO 군에서는 피하 부종과 매우 심한 염증세포의 침윤에 의한 paw dorsum pedis의 비후와 같은 전형적인 만성 염증 소견이 감소하여 현저한 항염 효과가 인정되었으며(Fig. 2a, b), 이러한 전형적인 paw dorsum pedis 부분의 만성 염증소견이 J100, J250 및 J500 군에서 투여 용량 의존적으로 경감되는 것으로 관찰되었다(Fig. 3a-c).

4. Histomorphometry의 변화

정상군의 경우에는 paw thickness dorsum pedis가 289.47 ± 67.81 μm로 관찰되었으나, 대조군에서는 1759.21 ± 818.63 μm로 관찰되어, 정상군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 증가를 나타내었다.

DEXA, DICRO, J100, J250 및 J500 군에서는 paw thickness dorsum pedis가 각각 394.23 ± 171.84, 626.76 ± 199.13, 1233.48 ± 201.67, 950.97 ± 166.41 및 757.25 ± 226.90 μm로 관찰되어, 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) paw thickness dorsum pedis의 감소가 J100 군을 제외한 모든 약물 투여군에서 관찰되었다. 한편 J100 군에서도 대조군에 비해 현저한 paw thickness dorsum pedis의 감소되었으나 유의성은 인정되지 않았고, 定喘化痰降氣湯 투여군에서는 대조군에 비해 투여 용량 의존적인 감소가 인정되었다. paw thickness dorsum pedis는 대조군에 비해 -77.59, -64.37, -29.88, -45.94 및 -56.96%를 나타내었다(Table 6).

Table 6. Changes on the Paw Thickness Dorsum Pedis in Formalin-injected ICR Mice after Jungcheonhwadamgangki-tang Extract Dosing

ID ^{a)}	Group	Thickness dorsum pedis (μm) ^{b)}	Changes ^{c)}
	Sham	289.47±67.81 @)	
	Control	1759.21±818.63**	
	DEXA	394.23±171.84##	-77.59%
	DICRO	626.76±199.13**##	-64.37%
	J100	1233.48±201.67**	-29.88%
	J250	950.97±166.41**##	-45.94%
	J500	757.25±226.90**##	-56.96%

a) Group ID was listed in Table 2; b) Thickness dorsum pedis is measured using automated image analyzer; c) Changes vs Sham or Control; @) mean ± S.D., (n=7); ** p<0.01 compared to that of Sham; ## p<0.01 compared to that of Control.

고 찰

염증은 손상에 대한 살아있는 조직의 반응으로 생체조직이 어떤 원인에 의하여 손상을 받았을 때 이 손상을 국소화 시키고 손상된 부위를 정상상태로 되돌리려는 생체의 고도로 발달된 방어기전이며 이 기전은 손상부위의 혈관, 신경, 체액, 세포의 반응이 관여하는 대단히 복잡한 일련의 과정으로 이루어진다¹⁻³⁾.

현재까지 수많은 항염 물질들이 다양한 방법을 통해 개발되어져 왔는데 이중 가장 대표적인 실험방법으로 개발되어 온 formalin 유발 마우스 hind paw chronic inflammation 모델은 만성염증에 대한 효력평가지 가장 일반적으로 이용되는 방법으로 알려져 있다¹⁶⁻¹⁸⁾. NSAIDS의 일종인 diclofenac과 부신피질 호르몬 제제인 dexamethasone은 항염 실험에서 가장 흔히 사용되는 reference 물질이며¹⁸⁾, diclofenac 및 dexamethasone의

formalin 유발 마우스 hind paw chronic inflammation 모델에서의 효과는 비교적 잘 알려져 있고, 이 모델에서 여러 가지 물질들의 만성염증에 대한 평가 시 reference 물질로 사용되어져 왔다^{16,17}. Formalin 유발 마우스 hind paw chronic inflammation 모델에서는 formalin 등의 염증유발 물질을 aponeurotic 부위에 국소적으로 주입한 다음 초래되는 hind paw의 두께, 무게 및 체적 등의 변화를 평가하여 약효를 검증하며, 조직학적 변화 역시 하나의 중요한 기준으로 간주되고 있다^{19,21}.

定喘化痰降氣湯은 咳嗽, 痰喘, 氣喘, 哮喘 등에 사용하는 처방으로 千縉湯, 定喘化痰湯, 蘇子降氣湯 3개 처방을 합방하여 만든 처방이며 陳皮, 柿蒂, 半夏, 南星炮, 杏仁, 五味子, 款冬花, 皂角刺, 沙蔞, 紫菀, 甘草, 當歸, 人蔘, 蘇子, 前胡, 赤茯苓, 貝母, 枳實의 18종의 한약재로 구성⁴⁵되어 임상에서 천식, 만성 기관지염, 만성 폐쇄성 폐질환 등 호흡기계의 염증성 질환 치료에 사용되어져 온 처방이다.

본 연구에서는 定喘化痰降氣湯의 만성염증에 대한 항염 효과를 확인하기 위하여 formalin 유발 마우스 hind paw chronic inflammation 모델을 이용하여 100, 250 및 500 mg/kg의 定喘化痰降氣湯을 10일간 경구투여하고, hind paw 중량의 변화와 함께 hind paw의 조직학적 변화 및 thickness dorsum pedis와 같은 histomorphometry의 변화를 관찰하였으며 아울러 항염 효과에 대한 대조약물로 Dexamethasone 및 Diclofenac 15 mg/kg을 부강 투여하여 그 효능을 비교 관찰하였다.

본 실험의 결과, DEXA 15 mg/kg을 투여한 실험군을 제외한 모든 formalin-injection 만성 염증 유발군에서 정상군과 비교하여 의미 있는 체중 및 체중증가량의 변화는 나타나지 않았으며, 모든 定喘化痰降氣湯 투여군에서는 대조군과 유사한 체중 및 체중증가량을 나타내었다. 그러나 DEXA 15 mg/kg 투여군에서는 투여 3일 후부터 정상군 및 대조군에 비해 유의성 있는 현저한 체중 및 체중증가량의 감소가 관찰되었다. 일반적으로 만성 염증성 병변이 지속될 경우 이로 인한 탈수와 쇠약으로 체중 감소가 초래되나 그 정도는 매우 미미하고, 국소적으로 만성 염증을 유발한 경우에는 별다른 체중 및 체중증가량의 변화가 초래되지 않는다. DEXA 군에서 관찰된 체중 및 체중증가량의 감소는 DEXA 자체의 독성에 의한 것으로 부신피질 억제에 의한 체중 감소는 이미 잘 알려져 있다²²⁻²⁵.

또한 formalin-injection 후 대조군에서는 정상군에 비해 투여 1일 후부터 현저한 Paw 중량의 증가가 관찰되었으며, 부검시 절대 및 상대 Paw 중량의 증가가 역시 관찰되었다. 이러한 Paw 중량의 증가는 전형적인 formalin 유발 만성 염증 소견이며^{16,17,19-21}, 이러한 paw 중량은 대조군에 비해 DEXA 및 DICRO 군을 포함한 모든 약물 투여군에서 현저히 감소되어 이들 약물이 formalin으로 유발된 마우스 hind paw chronic inflammation 모델에 대한 항염 효과를 나타내는 것으로 생각된다. 특히 定喘化痰降氣湯 투여군의 경우, 투여 용량 의존적으로 현저한 유발부위의 Paw 중량의 감소가 초래되어 이들 추출물이 항염 활성을 가지고 있을 것으로 생각된다. 한편 DEXA 군의 경우, 정상부위의 Paw 중량이 정상군 및 대조군에 비해 유의성 있게 감소된 것은 DEXA

투여에 의해 초래된 체중 감소²²⁻²⁵에 기인한 것으로 생각된다.

만성 염증시 일반적으로 현저한 만성 임파구와 같은 염증세포의 조직내 침습과 함께 피하부종으로 인한 조직자체의 비후가 관찰되며, 이러한 조직 소견은 formalin으로 유발된 마우스 hind paw chronic inflammation 모델에서도 유사하게 관찰되는 것으로 알려져 있다²⁶⁻²⁸. 본 실험의 결과에서도 현저한 조직부종과 염증세포의 침윤에 의한 paw의 비후가 대조군에서 관찰되었으며, 이로 인한 paw thickness dorsum pedis의 유의성 있는 증가가 나타났다.

일반적으로 후보물질의 항염 효과 평가 시 염증과정의 억제, 조직부종의 감소 및 염증세포의 침윤 억제 등을 조직학적으로 판단하게 된다²⁶⁻²⁸. 본 실험의 결과, DEXA 및 DICRO 군을 포함한 모든 약물 투여군에서 대조군에 비해 이러한 조직학적 변화 및 paw thickness dorsum pedis가 현저히 감소되어, 이들 약물이 formalin으로 유발된 마우스 hind paw chronic inflammation에 대한 항염 효과를 나타내는 것으로 생각된다. 특히 定喘化痰降氣湯 투여군의 경우 투여 용량 의존적으로 현저한 감소가 초래되었으므로, 이들 추출물이 비교적 우수한 항염 활성을 가지고 있을 것으로 생각된다.

이상의 결과로 볼 때 定喘化痰降氣湯은 만성염증에 대해 비교적 양호한 항염 효과를 나타내는 것으로 생각되며, 또한 기도염증으로 야기되는 기관지 천식 및 만성 폐쇄성 폐질환에도 효과가 있을 것으로 추정된다. 또한 그 효과는 DEXA 및 DICRO 보다 비교적 낮으며, 500 mg/kg의 定喘化痰降氣湯 투여군이 DICRO 15 mg/kg 부강 투여군과 유사한 항염 효과를 나타내는 것으로 관찰되었다.

결론

定喘化痰降氣湯의 만성염증에 대한 항염 효과를 평가하기 위해 Formalin 유발 마우스 모델을 이용하여 100, 250 및 500 mg/kg의 定喘化痰降氣湯을 10일간 경구투여하고 다음과 같은 결과를 얻었다.

체중 및 체중증가량의 변화의 경우 모든 定喘化痰降氣湯 투여군에서 실험 전 기간 동안 대조군과 유사한 체중 및 체중증가량을 나타내었다. Paw 중량 변화의 경우 250 및 500 mg/kg의 定喘化痰降氣湯 투여군에서 대조군에 비해 현저한 절대 및 상대 Paw 중량의 감소를 나타내었으며, 정상부위와 유발부위의 차이 역시 대조군에 비해 현저히 감소되었다. Paw 조직의 변화와 histomorphometry 변화의 경우 모든 定喘化痰降氣湯 투여군에서 피하 부종과 매우 심한 염증세포의 침윤에 의한 paw dorsum pedis의 비후와 같은 전형적인 만성 염증 소견이 대조군에 비해 현저하게 감소되었고, 대조군에 비해 paw thickness dorsum pedis의 유의성 있는 감소가 투여 용량 의존적으로 관찰되었다.

이상의 결과로 볼 때, 定喘化痰降氣湯은 기도염증으로 야기되는 기관지 천식 및 만성 폐쇄성 폐질환 등에 효과가 있을 것으로 추정된다.

참고문헌

1. 대한병리학회 대구경북지부학회. 간추린 병리학(2판). 서울, 정문각, pp 73-77, 2000.
2. 대한병리학회 편. 병리학(제5판). 서울, 고문사, pp 84-85, 2005.
3. 고려대학교 의과대학 병리학교실 편. 병리학. 서울, 신광출판사, pp 25-33, 2001.
4. 전국한의학대학 폐계내과학교실 편저. 東醫肺系內科學. 서울, 도서출판 국진기획, p 199, 576, 587, 2004.
5. 경희의료원한방병원. 한방기본처방집. 서울, 대성문화사, p 191, 1988.
6. 한용철. 임상호흡기학. 서울, 일조각, pp 226-228, 1993.
7. Barns, P., Pederson, S. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids in asthma. *Am Rev Respir Dis* 148: 1-26, 1993.
8. Waddell, A.N., Patel, S.K., Toma, A.G., Maw, A.R. Intranasal steroid sprays in the treatment of rhinitis: is one better than another? *J Laryngol Otol* 117(11):843-845, 2003.
9. Roh, G.S., Seo, S.W., Yeo, S., Lee, J.M., Choi, J.W., Kim, E., Shin, Y., Cho, C., Bae, H., Jung, S.K., Kwack, K. Efficacy of a traditional Korean medicine, Chung-Sang-Bo-Ha-Tang, in a murine model of chronic asthma. *Int Immunopharmacol* 5(2):427-436, 2005.
10. Leclerc, N., Noh, T., Khokhar, A., Smith, E., Frenkel, B. Glucocorticoids inhibit osteocalcin transcription in osteoblasts by suppressing Egr2/Krox20-binding enhancer. *Arthritis Rheum* 52(3):929-939, 2005.
11. 박동일, 정승기, 이형구. 定喘化痰湯 및 定喘化痰降氣湯의 효능에 관한 실험적 연구. *경희의학* 5(2):183, 1989.
12. 안태호, 황희정, 김대준, 박지현, 최해윤, 김종대. 定喘化痰降氣湯이 ovalbumin으로 유발된 천식에 미치는 영향. *대한방제학회지* 8(1):191-211, 2000.
13. 이상준, 박지현, 최해윤, 김종대. 定喘化痰降氣湯이 ovalbumin으로 유발된 천식의 조직학적 변화에 미치는 영향. *대한방제학회지* 9(1):273-288, 2001.
14. 송무식, 조동희, 전귀옥, 박미연, 최해윤, 김종대. 定喘化痰降氣湯이 Xylene으로 유발된 마우스의 급성 염증에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 20(4):875-881, 2006.
15. Hosseinzadeh, H., Haddadkhodaparast, M.H., Arash, A.R. Antinociceptive, antiinflammatory and acute toxicity effects of *Salvia leriifolia* Benth seed extract in mice and rats. *Phytother Res* 17(4):422-425, 2003.
16. Abdel-Salam, O.M., Baiuomy, A.R., El-batran, S., Arbid, M.S. Evaluation of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and gastric effects of *Ginkgo biloba* in the rat. *Pharmacol Res* 49(2):133-142, 2004.
17. Pillai, A.D., Rathod, P.D., P X F, Patel, M., Nivsarkar, M., Vasu, K.K. et al. Novel drug designing approach for dual inhibitors as anti-inflammatory agents: implication of pyridine template. *Biochem Biophys Res Commun* 301(1):183-186, 2003.
18. Hosseinzadeh, H., Younesi, H.M. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacol* 15(2):7, 2002.
19. Torres-Lopez, J.E., Ortiz, M.I., Castaneda-Hernandez, G., Alonso-Lopez, R., Asomoza-Espinosa, R., Granados-Soto, V. Comparison of the antinociceptive effect of celecoxib, diclofenac and resveratrol in the formalin test. *Life Sci* 70(14):1669-1676, 2002.
20. Gupta, S.K., Bansal, P., Bhardwaj, R.K., Jaiswal, J., Velpandian, T. Comparison of analgesic and anti-inflammatory activity of meloxicam gel with diclofenac and piroxicam gels in animal models: pharmacokinetic parameters after topical application. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 15(2):105-111, 2002.
21. Yashpal, K., Coderre, T.J. Influence of formalin concentration on the antinociceptive effects of anti-inflammatory drugs in the formalin test in rats: separate mechanisms underlying the nociceptive effects of low and high-concentration formalin. *Eur J Pain* 2(1):63-68, 1998.
22. Lockshin, M.D., Sammaritano, L.R. Corticosteroids during pregnancy. *Scand J Rheumatol Suppl* 107: 136-138, 1998.
23. Waddell, A.N., Patel, S.K., Toma, A.G., Maw, A.R. Intranasal steroid sprays in the treatment of rhinitis: is one better than another? *J Laryngol Otol* 117(11):843-845, 2003.
24. Roh, G.S., Seo, S.W., Yeo, S., Lee, J.M., Choi, J.W., Kim, E. et al. Efficacy of a traditional Korean medicine, Chung-Sang-Bo-Ha-Tang, in a murine model of chronic asthma. *Int Immunopharmacol* 5(2):427-436, 2005.
25. Leclerc, N., Noh, T., Khokhar, A., Smith, E., Frenkel, B. Glucocorticoids inhibit osteocalcin transcription in osteoblasts by suppressing Egr2/Krox20-binding enhancer. *Arthritis Rheum* 52(3):929-939, 2005.
26. Kenjo, T., Kikuchi, S., Konno, S. Cooling decreases fos-immunoreactivity in the rat after formalin injection. *Clin Orthop Relat Res* 394: 271-277, 2002.
27. Dumka, V.K., Tandan, S.K., Raviprakash, V., Tripathi, H.C. Central noradrenergic and cholinergic modulation of formaldehyde-induced pedal inflammation and nociception in rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 40(1):41-46, 1996.
28. Perez, R.M., Perez, S., Zavala, M.A., Salazar, M. Anti-inflammatory activity of the bark of *Hippocratea excelsa*. *J Ethnopharmacol* 47(2):85-90, 1995.