加減透膿散의 항염작용에 대한 실험적 연구

김상진 · 유동열*

대전대학교 한의과대학원 부인과학교실

Anti-inflammatory Effects of Gagamtunong-san

Sang Jin Kim, Dong Youl Yoo*

Department of Obstetrics & Gynecology, College of Korean Medicine, Daejeon University

The purpose of this research was to investigate the anti-inflammatory effects of Gagamtunong-san(GTNS) which has been medicated the patient such as mastitis. The results were as follows. The cytotoxicity on mouse lung fibroblast Cells(mLFC) was not served at all concentration of GTNS. GTNS in RAW264.7 cell inhibited IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2 and NOS-II mRNA genes expression in a concentration-dependent manner. Specially GTNS inhibited NOS-II production very significantly at 100 ㎍/㎖. GTNS inhibited NO production significantly in a concentration-dependent manner. GTNS inhibited ROS production in a concentration-dependent manner. GTNS inhibited IL-1β, IL-6 and TNF-α production significantly in serum of acute anti-inflammation-induced mice. GTNS increased the survival rate from the 3rd day on LPS-induced lethal endotoxemia. These results suggest that Gagamtunong-san(GTNS) can be useful in treating a lot of women mammary diseases caused by inflammation such as acute and chronic mastitis.

Key words : Anti-inflammatory, Gagamtunong-san(加減透膿散), RAW264.7 cell

서 론

透膿散은 ≪外科正宗≫[1]에 수록된 처방으로 乳癰을 치료할 목적으로 立方되었으며, 加減透膿散[2]은 여기에 健脾燥濕, 淸熱解毒, 潤肺殺蟲, 活血祛瘀의 작용이 있는 白朮, 白茯苓, 金銀花, 黃芩, 百部根, 丹蔘을 가미한 방제[3]이다.

乳癰은 乳房部位에 발생하는 癰疽로써 吹乳, 奶脹, 妬乳, 發乳, 乳毒 등으로도 불리우는데, 乳房이 紅腫하고 堅硬하고, 疼痛, 增寒, 壯熱, 頭痛 등 증상이 發하고 대개 2주일이면 化膿하며 成膿하여 潰하면 膿水가 流出하고 乳汁에는 膿이 섞여 나오고 腋窩淋巴腺腫脹을 兼하여 手不擧하기도 하며 주로 산후 부인에게 多發[4]하며 흔히 乳房外上方部位[5]에 생기는 질환으로 초기에는 치료하기 쉽지만, 이에 대한 처치가 늦어지면 염증은 더욱 확대되거나 만성화되기 쉽다.

乳癰은 急慢性乳腺炎, 乳房膿瘍과 증상상의 유사점이 있는데, 乳腺炎은 兒口나 呼吸器에 있던 化膿性 病原菌이 乳頭나 乳頭 주위의 傷處를 통하여 感染되어 發生하는 細菌性 乳房炎과 淋巴液, 乳汁, 靜脈血의 鬱滯로 인해 發生하는 鬱血性 乳房炎으로 나뉘는데, 鬱血性인 것은 鬱血이 消失되면 治愈되나 종종 續發的으로 膿瘍을 形成하기도 한다[6,7].

乳癰의 治法으로 炎症期에는 淸熱解毒, 理氣活血하고, 膿腫期에는 活血透腫하며, 破潰期에는 補益氣血, 扶正托毒하는 방법이 활용되고 있다[8].

乳癰에 대한 실험적 연구로 內消散[9], 瓜蔞牛蒡子湯[10], 連翹湯 및 加味連翹湯[11], 加味消毒飮[12], 加減流氣飮[13] 등의 消炎 진통 작용에 대한 연구 보고들은 있으나, 加減透膿散에 대한 연구는 아직 접할 수가 없었다.

이에 저자는 항염작용의 효능이 있는 加減透膿散의 抗炎症 작용을 실험적으로 구명하고자 세포독성에 미치는 영향, RAW264.7 세포주에서의 정량적 중합 효소 연쇄 반응, 염증 관련 cystokines 인 IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2 및 NOS-Ⅱ의 유전자 발현에 미치는 영향, NO, ROS 생성량에 미치는 영향, LPS로 유도된 연증 생쥐 모델의 혈청 내 cystokines 변화에 미치는 영향 및 생명 연장 효과 등을 실험 평가하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

* 교신저자 : 유동열, 대전시 중구 대흥동 22-5 대전대학교 한방병원

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

· 접수 : 2007/11/12 · 채택 : 2008/01/28

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

실험동물은 한국생명공학연구원에서 구입한 수컷 ICR계 마우스와 Balb/c계 마우스 8주령을 구입하여, 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22±2℃, 1일중 12시간은 200-300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 고형사료(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사, 항생제 무첨가)와 물을 충분히 공급하였다.

2) 약물

실험에 사용된 가감투농산 (GTNS)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입하여 정선한 후 사용하였다.

Table 1. Prescription of Gagamtunong-san (GTNS)

한약명	생 약 명	중량 (g)
黃 芪	*Astragali radix*	30
皂角刺	*Gleditsiae spina*	15
當 歸	*Angelicae gigantis radix*	12
白 朮	*Atractylodis macrocephalae rhizoma*	12
白茯苓	*Poria*	12
穿山甲	*Manitis squama*	12
金銀花	*Lonicerae flos*	12
黃 芩	*Scutellariae radix*	12
丹 蔘	*Salviae miltiorrhizae radix*	12
百部根	*Stemonae radix*	9
川 芎	*Cnidii rhizoma*	9
Total		147

3) 시약 및 기기

(1) 시약

실험에 사용된 시약은 lipopolysaccaride(LPS), chlorosulforrodamin-B (SRB), diethyl pyrocarbonate(DEPC), tris-base, tris-HCL, ethanol, trypsin-EDTA, trichloroacetic acid (TCA), acetic acid, dulbecco's minimum essential medium (DMEM), DNase type Ⅰ, penicillin, streptomycin, amphotericin, 2,7-dichlorodihydro fluorescin diacettate (DCFH-DA), anti-bady avidin-HRP, chloroform, naphthylethylen diamine dihydrochloride, sulfonylamide, H_3PO_4, Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), RNAzolB, RNA inhibitor, ACK solution, KCl, isopripanol, magnesium chloride($MgCl_2$)(Sigma Co., U.S.A), fetal bovine serum(FBS)(Hyclone Logan Co., U.S.A), RNase(Pharmingen Torreyana Co., U.S.A), IL-1β, IL-6, TNF-α ELISA kit(R&D system Co., U.S.A) 등을 사용하였으며, 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기기

본 실험에 사용된 기기는 centrifuge, flow cytometer (Beckman Co., U.S.A.), rotary vacuum evaporator, vacuum pump(Büchi 461 Co., Swiss), deep freezer(Sanyo Co., Japan), freeze dryer(Eyela Co., Japan), roller mixer(Gowon scientific technology Co., Korea), 열탕추출기(대웅, Co., Korea), CO_2 incubator (Forma scientific Co., U.S.A), autoclave(Sanyo Co., Japan), micro- pipet(Gilson Co., France), clean bench, water bath , heating block, vortex mixer, ice-maker(Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimazue Co., Japan), plate shaker(Lab-Line Co., U.S.A), ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A), 7500 Fast Real -Time PCR system (Applied Biosystems Co., U.S.A) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출물 분리

GTNS 2첩 분량을 증류수 2,000 ㎖에 가하여 열탕 추출기로 3시간 추출하고 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치 (Rotary vacuum evaporator)로 농축한 다음, 동결 건조기 (Freeze dryer)를 이용하여 완전 건조하여 GTNS 추출액 18.5 g을 얻어 냉동 (-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) Mouse lung fibroblast cells (mLFCs) 배양

정상 Balb/c 생쥐의 폐조직 (1 g)을 잘게 분쇄하여 ACK 용액으로 적혈구를 제거한 후, cool D-PBS로 3회 세척하여 conical tube (15 ㎖)에 넣고 1,400 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 tube에 DMEM {containing collagenase A 5 mg/㎖와 DNase type Ⅰ 0.15 mg/㎖, antibiotics (penicillin 104 U/㎖, streptomycin 10 mg/㎖, amphotericin B, 25 ㎍/㎖)}를 넣고 37℃ CO_2 배양기에서 2 시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가하여 30 분간 배양 후 인산완충생리식염수 (PBS)로 약 2회 1,500 rpm에서 원심분리 하였다. 이를 DMEM-10% FBS로 1주일 동안 배양한 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 세포를 분리하는 작업을 3회 반복한 후 최종적으로 살아있는 부착세포를 DMEM-5% FBS 배양액에서 배양하였다.

3) 세포독성 측정

mLFCs에 GTNS (200 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖, 1 ㎍/㎖)를 처리하고, 배양 종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척한 후, 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50 ㎕를 가하고, 1 시간 동안 4℃에 방치하였다. 이를 다시 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. 여기에 SRB (0.4%/1% acetic acid) 용액을 100 ㎕/well로 가하고 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 다시 0.1% acetic acid 용액으로 약 4-5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM Tris Base로 100 ㎕/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5 분간 shaking하고 ELISA reader로 540 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

4) RAW264.7 세포주에서의 정량적 중합효소 연쇄반응

(1) RAW264.7 세포주 배양

Murine macrophage cell line RAW264.7 세포주는 10% FBS를 첨가한 DMEM에 넣고 37℃ CO_2 배양기에서 2 시간 동

안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30 분간 배양 후 인산완충생리식염수 (PBS)로 약 2회 1500 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) RAW264.7 세포주에서 RNA 분리

먼저 RAW264.7 세포주는 24 well plate에 1×10^6 세포로 분주하였다. 여기에 GTNS (100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖)를 처리하고 1시간 후 LPS (2 ㎍/㎖)를 각각의 well에 첨가한 후 6시간 배양하고 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고, 여기에 RNAzolB 500 ㎕를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform ($CHCl_3$) 50 ㎕를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200㎕의 상층액을 회수하여 2-propanol 200㎕와 동량 혼합하여 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 ㎕의 증류수에 녹여 heating block 75℃에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

5) Nitric oxide(NO) 생성량 측정

RAW264.7 세포주를 96 well plate에 2×10^4 cells/well로 분주하였다. 여기에 GTNS (100, 50, 10㎍/㎖) 처리하고 1시간 후 LPS (2 ㎍/㎖)를 각각의 well에 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 회수한 후 여기에 Griess 시약 용액 A (0.2% naphthylethylene diamine dihydrochloride in D.W.)와 용액 B (2% sulfonylamide in 5% H_3PO_4)를 1:1로 혼합 처리하였다. 다시 배양 상층액 100 ㎕를 96 well plate에 분주하고 혼합 용액 100 ㎕를 처리한 후 ELISA reader를 사용하여 540 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

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

RAW264.7 세포주내의 ROS를 측정하기 위하여 24 well plate에 5×10^5 cells/well로 분주하였다. 여기에 GTNS (100 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖)를 처리하고 1시간 후 LPS (2 ㎍/㎖)를 처리한 다음, 37℃에서 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 DCFH-DA 50 ㎛M을 처리하고 5분간 배양하고 2회 수세한 후 flow cytometer로 세포내 형광 DCF 또는 ROS를 측정하였다.

7) LPS로 유도된 염증 생쥐 모델

(1) 혈청 내 IL-1β, IL-6, TNF-α 생성량 측정

Lipopolysaccharide (LPS)를 1 mg/kg을 Balb/c계 마우스 복강에 주사한 후 90분 후에 ethyl ether로 마취하고 심장천자법으로 채혈하였다. 채혈 후 혈청을 분리하여 IL-1β, IL-6 및 TNF-α 생성량을 ELISA로 측정하였다. 각 well에 생쥐의 혈청 100 ㎕ (1/100 dilution)씩 분주한 후 antibady cytokines- biotined conjugated 100 ㎕를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 2시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibady Avidin-HRP conjugated 100 ㎕를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 ㎕씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 100 ㎕의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 염증 생쥐 모델의 생명 연장율 측정

일주일간 GTNS를 경구투여 한 후 LPS 3 mg/kg을 복강에 주사하고 실험군은 1시간 전에 다시 한번 GTNS를 경구투여 하여, 5일간 생쥐의 생존율을 관찰하여 생명 연장 곡선을 만들었다.

8) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's t-test 분석방법을 사용하였다.

실험성적

1. 세포독성에 미치는 영향

mLFCs에 대한 세포독성 평가에서 GTNS는 200, 100, 50, 10, 1 ㎍/㎖ 농도에서 대조군(100%)에 비해 각각 90.5 ± 2.8, 92.6 ± 3.4, 92.3 ± 4.6, 95.2 ± 2.8, 98.6 ± 3.6%로 세포독성이 없는 것으로 나타났다(Table 2).

Table 2. Cytotoxicity of GTNS Extract on Mouse Lung Fibroblast Cells

Drug	Dose (㎍/㎖)	% of Control Data mLFC.
Control	0	100 ± 5.4
GTNS	200	90.5 ± 2.8
	100	92.6 ± 3.4
	50	92.3 ± 4.6
	10	95.2 ± 2.8
	1	98.6 ± 3.6

2. 염증 관련 cytokines에 미치는 영향

1) IL-1β 유전자 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포주에서 IL-1β 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이 0.125, 대조군이 1.00로 나타났으며, GTNS 100, 50, 10 ㎍/㎖ 농도 처리군에서는 각각 0.458, 0.555, 0.748로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 1-1).

2) IL-6 유전자 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포주에서 IL-6 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이 0.121, 대조군이 1.00인대 비하여, GTNS 100, 50, 10 ㎍/㎖ 농도 처리군이 각각 0.568, 0.789, 0.959로 나타나, 역시 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 1-2).

3) TNF-α 유전자 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포주에서 TNF-α 유전자 발현의 RQ 값은, 정상군이 0.041, 대조군이 1.00로 나타났으며, GTNS 100, 50, 10 ㎍/㎖ 농도 처리군에서는 각각 0.508, 0.868, 0.948로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 1-3).

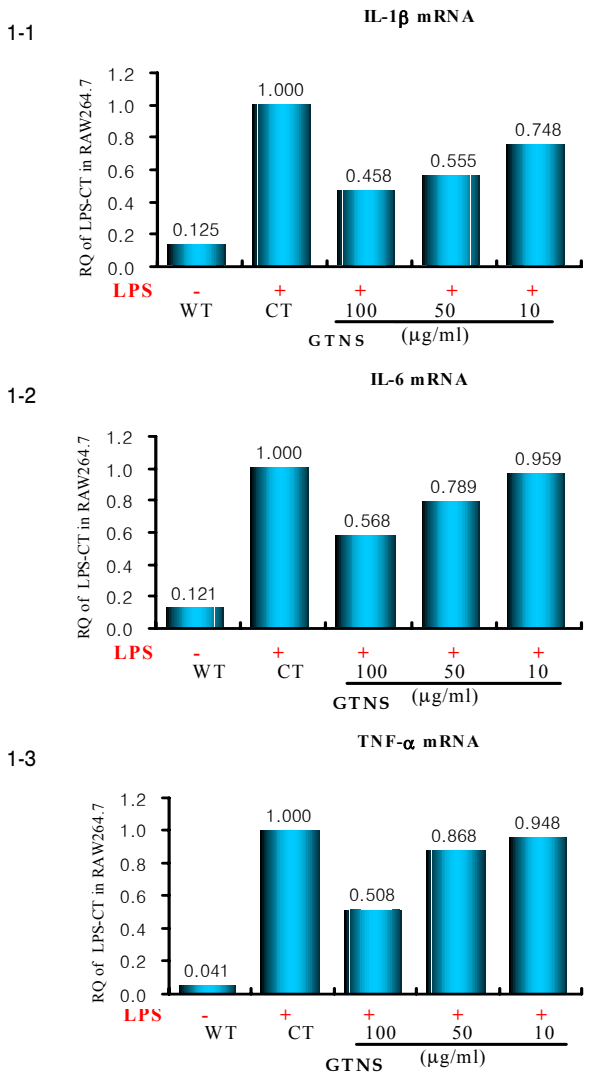

Fig. 1. RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of GTNS extract(100, 50 and 10 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 2 ㎍/㎖) for 6 hr. IL-1β mRNA, IL-6 mRNA and TNF-α mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed.

4) COX-2 유전자 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포주에서 COX-2 유전자 발현의 RQ 값은 정상군이 0.242, 대조군이 1.00로 나타난 반면, GTNS 100, 50, 10 ㎍/㎖ 처리군에서는 각각 0.501, 0.569, 0.879로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 2-1).

5) NOS-II 유전자 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포주에서 NOS-II 유전자 발현의 RQ 값은 정상군이 0.048, 대조군이 1.00로 나타난 반면, GTNS 100, 50, 10 ㎍/㎖ 농도 처리군이 각각 0.323, 0.626, 0.895로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였으며, 특히 100 ㎍/㎖ 농도에서는 억제 효과가 뚜렷하였다(Fig. 2-2).

3. Nitric oxide (NO) 생성량에 미치는 영향

RAW264.7 세포주에서 NO 생성량은 정상군의 OD값이 0.054 ± 0.012 nm, 대조군이 1.458 ± 0.236 nm로 나타났으며, GTNS 100, 50, 10 ㎍/㎖ 농도 처리군이 각각 0.641 ± 0.145, 0.796 ± 0.215, 1.145 ± 0.235 nm로 나타나 대조군에 비하여 100, 50 ㎍/㎖ 농도에서 유의성 있게 ($p<0.01$, $p<0.05$) NO 생성을 억제하였다(Fig. 3).

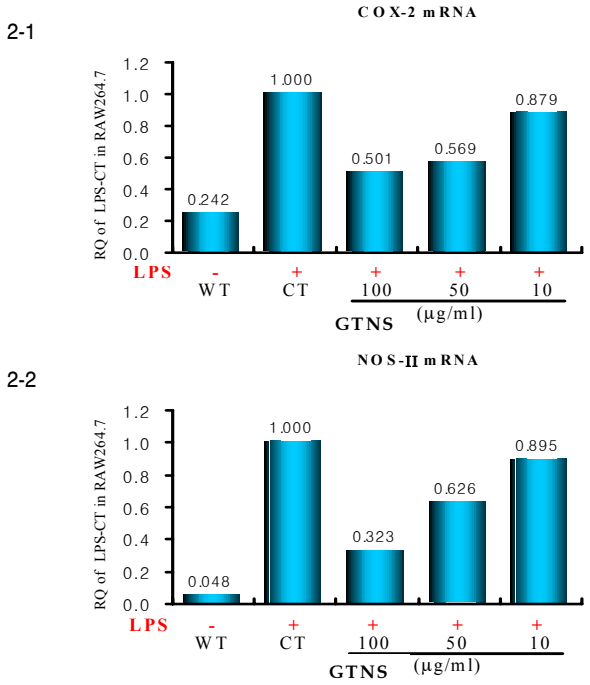

Fig. 2. RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of GTNS extract(100, 50 and 10 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride(LPS; 2 ㎍/㎖) for 6 hr. COX-2 mRNA and NOS-II mRNA synthesized by real-time PCR was analyzed.

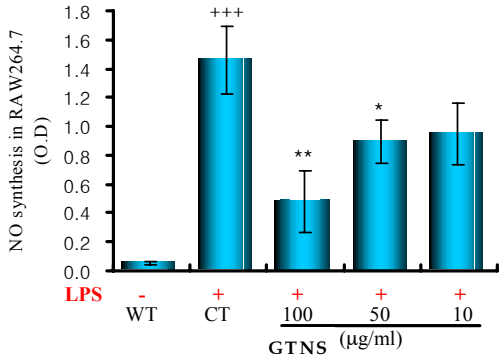

Fig. 3. Inhibitory effect of GTNS extract on the nitric oxide release in RAW264.7 cell line. RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of GTNS extract(100, 50, 10 ㎍/㎖) in the presence or absence of lipopolysacchride (LPS; 2 ㎍/㎖) for 48 hr. The culture supernatent was collected 24 hr later and NO (nitric oxide) concentration in the supernatent was assayed. The data are expressed as the mean ± sem. +: Statistically significant value compared with normal data (+: $P<0.05$, ++: $P<0.01$, +++: $P<0.001$) *: Statistically significant value compared with control data (* : $P<0.05$, ** : $P<0.01$, *** : $P<0.001$)

4. 세포 내 reactive oxygen species (ROS) 생성량에 미치는 영향

ROS 생성량은 대조군이 정상군에 비하여 큰 폭으로 증가하였으며, GTNS 투여군 (100 ㎍/㎖ C, 50 ㎍/㎖ D)은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 ROS 생성을 억제하였다(Fig. 4).

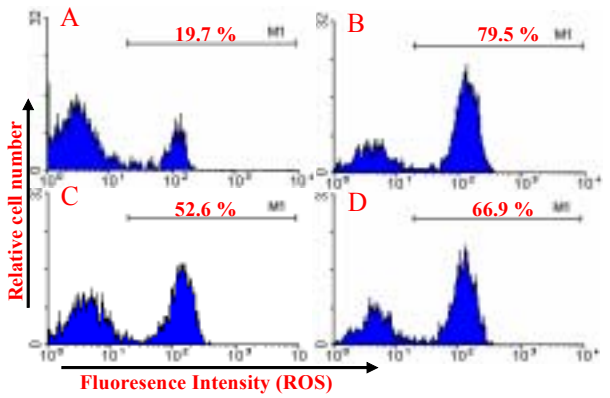

Fig. 4. Inhibitory effect of GTNS extract on the ROS production in RAW264.7 cell line. RAW264.7 cells were treated with various concentrations of GTNS extract(C: 100 ㎍/㎖, D: 50 ㎍/㎖) in the presence(control, A) or absence (B) of LPS(2 ㎍/㎖) for 48 hr. After culture, cells were treated with DCFH-DA reagent (50 mM), harvested, and assayed for ROS positive cells (M1) by flow cytometry.

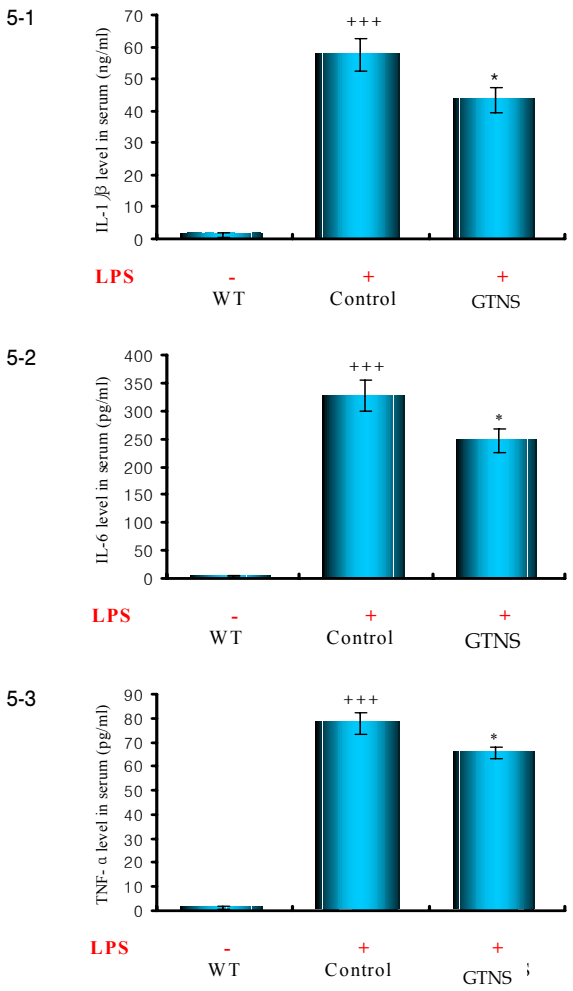

Fig. 5. Female mice were co-treatment with GTNS extract(6.1 ㎎/20 g) and LPS(1 mg/kg). Total IL-1β, IL-6 and TNF-α levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. The data are expressed as the mean ± sem. Comparisons between groups were analyzed using Student's paired test and differences between experimental and control groups were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher T test. +: Statistically significant value compared with normal data (+: P<0.05, ++ : P<0.01, +++ : P<0.001) *: Statistically significant value compared with control data (* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

5. LPS로 유도된 염증 생쥐 모델의 혈청 내 cystokines 변화에 미치는 영향

1) IL-1β 생성량에 미치는 영향

급성 염증 유발 생쥐 모델의 혈청 내 IL-1β 생성량을 측정한 결과, 정상군은 1.3 ± 0.7 ng/㎖, 대조군은 57.4 ± 5.2 ng/㎖로 나타난 반면, GTNS 투여군에서는 43.5 ± 4 ng/㎖로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게($p<0.05$) 감소하였다(Fig. 5-1).

2) IL-6 생성량에 미치는 영향

급성 염증 유발 생쥐 모델의 혈청내 IL-6 생성량을 측정한 결과, 정상군은 3.7 ± 1.4 ng/㎖, 대조군은 326.4 ± 27.41 ng/㎖로 나타난 반면, GTNS 투여군에서는 247.3 ± 21.3 ng/㎖로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게($p<0.05$) 감소하였다(Fig. 5-2).

3) TNF-α 생성량에 미치는 영향

급성 염증 유발 생쥐 모델의 혈청 중 TNF-α 생성량을 측정한 결과, 정상군은 1.1 ± 0.6 ng/㎖, 대조군은 77.8 ± 4.7 ng/㎖로 나타난 반면, GTNS 투여군에서는 67.4 ±2.2 ng/㎖로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게($p<0.05$) 감소하였다(Fig. 5-3).

6. LPS로 유도된 염증 생쥐 모델의 생명 연장 효과

생쥐의 복강에 LPS(3 mg/kg)를 주사하여 5일간 관찰한 결과, GTNS 투여군은 LPS 투여 3일째부터 대조군에 비하여 생존율이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6).

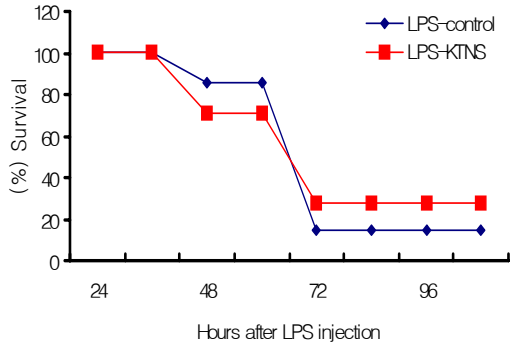

Fig. 6. Protective Effect of GTNS on LPS-induced lethality. Groups of 7 ICR mice were injected i.v. with 100 ㎍ of LPS(3 mg/kg) after oral administration of normal saline(control) or GTNS(6.1 ㎎/20 g) for 7 days. Another group of mice received 100 ㎍ of LPS together with GTNS(6.1 ㎎/20 g) to serve as a positive 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.

고 찰

透膿散은 明代 《外科正宗》[1]에 수록된 處方으로 乳癰, 乳疽를 治療할 목적으로 立方되었으며, 加減透膿散[2]은 여기에 白朮, 白茯苓, 金銀花, 黃芩, 百部根, 丹蔘을 加味한 方劑이다.

乳房에 대하여 《東醫寶鑑》[14]에서는 "男女乳腎爲根本"이라 하여 그 중요성을 설명하였으며, "女人屬陰, 陰極則必自下而上衝, 故乳房大而陰戶縮也"라 하여 女子는 陰에 屬하고, 陰이 極하면 반드시 스스로 내려와 위로 上衝하므로 乳房은 커지고 陰戶는 줄어든다고 하여 乳房의 발생에 대하여 설명하였고, 《醫

學入門》[15]에서는 "乳房은 膽胃에 屬하고, 乳頭는 肝에 屬한다"고 하여 肝胃와의 상관관계를 설명하였다.

乳癰은 乳房部位에 발생하는 癰疽로써, 乳房이 紅腫하고 堅硬하고, 疼痛, 增寒, 壯熱, 頭痛 등 症狀이 發하고 대개 2주일이면 化膿하며 成膿하여 潰하면 膿水가 流出하고 乳汁에는 膿이 섞여 나오고 腋窩淋巴腺腫脹을 兼하여 手不擧하기도 하며 主로 産後婦人에게 多發하며 흔히 乳房外上方部位에 생긴다[5].

《鍼灸甲乙經》[16]에서는 "乳癰寒熱, 短氣, 臥不安, 腐窗主之", "乳癰, 凄索寒熱, 痛不可按, 乳根主之" 라 하여 乳癰의 全身症狀으로 發熱, 惡寒, 短氣, 夜臥不安을, 局部症狀으로 疼痛拒按을 제시하여 乳癰의 기본적인 증상에 대하여 언급하였고, 《外臺秘要》[17]에서는 "療乳房腫痛, 如升碗大, 痛不可忍方", "乳癰堅硬, 痛不可忍方" 이라 하여 乳癰의 국부증상에 대하여 말하였다. 《東醫寶鑑》[14]에서는 "核久內脹作痛 外腫堅硬 手不可近 或 寒熱 頭痛"을 乳癰이라 정의하고 있고, 乳癰의 증상은 惡寒 發熱 煩燥 大渴이며, 심하면 嘔吐가 멎지 않는다고 하였다.

乳癰의 原因에 대해서 살펴보면, 巢[20]는 "乳汁이 排出되지 않고 蓄積되어 血과 相搏하므로 蓄積된 곳에서 熱이 發生하고 結聚되어서 乳癰을 形成한다"고 하였으며, 陳[18]은 "肝胃熱毒과 氣血壅滯로 발생한다"고 하였고, 朱[19]는 "乳房은 陽明이 경과하는 곳이고, 乳頭는 厥陰의 所屬이니 乳母가 調養을 제대로 못하여 忿怒所逆하고 鬱悶所遏하며 厚味所養하여 厥陰의 血이 운행하지 않으면 乳竅가 폐색되고 乳汁이 不通하며 陽明의 血이 沸騰하는 故로 熱이 심해서 化膿하고, 또한 젖먹는 아이가 胸膈에 滯痰이 있을 때 口氣가 熱하므로 이때에 젖꼭지를 물고 자면 熱氣가 吸注하여 乳房으로 들어가 結核을 이루게 된다"고 하였다. 또한 陳[1]은《外科正宗・癰疽原委論》에서 乳癰의 原因을 "成癰者 雍也 爲陽 屬六腑毒騰于外 其發暴而所患浮淺 因病原稟于陽分中 蓋陽氣輕淸浮而故起 故易腫 易膿 易腐 而斂 誠爲不傷筋骨易治之症也"라 하여 外癰의 意味와 性質, 發病經過 豫後를 說明하고 있다. 《醫學入門》[15]에서는 乳癰의 原因을 "婦人胃厚 多憂鬱火化汁濁 塞竅端結核 有兒吹熱氣"라 하여 婦人의 膏粱珍味로 胃에 쌓인 것인 많은데 忿怒 憂鬱이 겹쳐서 汁液이 濁해져서 肝經의 氣滯로 乳頭를 막아 通하지 못하여 結核을 이루는데 乳兒의 熱氣가 겹쳐서 생긴다고 보았다. 또한 外的인 原因으로는 "乳子膈有痰滯 口氣炘熱 含乳而睡 風熱吹入乳房 凝住不散 作痛" 이라 하여 乳子가 젖을 물고 잠든사이에 風熱이 乳房으로 侵入하여 흩어지지 못한 것도 原因이 된다 하였다. 《東醫寶鑑》[14]에서는 乳癰의 原因을 "多因厚味濕熱之痰 停蓄膈間 與滯乳相博而成 亦有兒口氣吹噓而成 又有怒氣激滯而生"이라 하였다.

治療法에 대해 宋[21]은 "膿이 익지 않은 初期에는 活血敗毒, 風熱解散하거나 消散을 위주로 하여 治療하고, 潰한 뒤에 수렴이 안될 때는 補氣血하면서 敗毒하거나 內托排膿하는 치법을 사용하여야 한다"고 하였다. 武[22]는 "膿未成時에는 消散위주로 하고, 膿已盛時에는 刀鍼排膿하며 久潰不斂時에는 內托排膿한다"고 하였고, 傅[23]는 "痛腫寒熱하면 發表散邪하고 통증이 심하면 疏肝淸胃하고 膿盛不潰하면 用托裏하고 肌肉이 生하지 않고 膿水가 淸希하면 補脾胃하며 膿水及潰 惡寒發熱하면 補血氣하고 食慾不振 或作嘔吐하면 補脾胃氣하고 若用行氣補血之劑 或亡甚矣한다"고 하였다. 顧[24]는 "乳癰초기에는 解表疏肝 淸解和營하고, 이미 化膿되어 潰瘍을 형성하였으면 淸熱解毒 托裏透膿하고 이미 潰瘍이 潰한 후에는 托裏排膿한다"고 하였다. 葉[25]은 "若初期結塊 宜澤瀉湯 外用活鯽魚一尾 搗爛 和鹽月飴糖 慄一小團 硏細 調敷 腫消卽下 如未消再敷"이라 하였고, 宋[21]은 "初發時에 南星을 강즙에 각반하여 첨부하면 消腫이 되며 만약 破血逐壞하고자 할 때는 여기에 草烏를 更加하고 潰後에는 乳香沒藥 末을 가하여 定痛한다"고 하여 外治法을 제시 하고 있다. 《傳靑主男女科 葉天士女科》[25]에서는 "痛腫寒熱하면 宜發表散邪 하고 痛甚하면 宜疎肝淸胃하며 膿成不潰 하면 用托裏하며, 肌肉不生하고 膿水淸稀하면 宜補脾胃하며, 膿出及遺 惡寒發熱하면 宜補血氣"라 하여 代表方劑로 瓜蔞散, 回脈散, 十全大補湯을 제시하였다.

加減透膿散 構成藥物의 效能을 살펴보면 黃芪는 補氣助陽藥으로써 托毒 排膿 止痛, 皂角刺는 活血祛瘀藥으로써 消腫 排膿 祛風殺蟲, 當歸는 補血養陰藥으로써 生肌肉 破惡血 排膿 止痛, 白朮은 補氣助陽藥으로써 除濕 益氣 治水腫, 白茯苓은 淡滲水濕藥으로써 健脾化濕 利水, 金銀花는 淸熱解毒藥으로써 消腫 敗毒, 黃芩은 淸熱燥濕藥으로써 排膿 治疔瘡, 丹蔘은 活血通絡藥으로써 排膿 止痛 消積聚, 百部根은 殺蟲藥으로써 溫肺 殺蟲, 川芎은 活血祛瘀藥으로써 長肉排膿 消瘀血한다[3,37]. 특히 川芎, 丹蔘, 穿山甲, 皂角刺는 活血祛瘀通絡하는 효능이 있어 消腫 止痛하며, 黃芪, 白朮은 補氣하여 正氣를 돕고, 黃芩, 金銀花는 淸熱解毒하는 효능이 있어 治癰腫한다. 이상 각 藥物의 效能을 綜合하여 보면 加減透膿散은 正氣를 돕고 托毒透膿의 效果가 있어 乳癰의 治療에 적합한 方劑임을 알 수 있다[2].

乳癰은 西洋醫學的으로 急慢性乳腺炎과 증상상의 유사점이 많은데, 乳腺炎도 일종의 炎症反應이라고 할 수 있다. 炎症(inflammation)은 損傷에 대한 살아있는 조직의 반응으로, 菌의 感染, 熱, 外傷, 抗原抗體反應 등 생체조직의 器質變化를 초래하는 침습에 대한 방어기전이라고 정의하고 있다. 炎症이 발생한 부위는 發赤, 發熱, 疼痛, 腫脹, 機能障礙와 같은 炎症의 5대 징후가 발생되는데, 이러한 炎症을 병리조직학적으로 볼 때는 혈관 투과성 항진과 과립구 및 대식세포와 같은 세포의 침윤이 커다란 특징이라고 할 수 있다[26].

炎症의 과정으로 국소증상과 전신증상이 나타나게 되는데, 국소증상은 첫째, 혈류 및 혈관 크기의 변동, 둘째, 혈관 투과성의 변화, 셋째, 백혈구 침윤에 기인하며, 전신증상은 조직손상 후에 일어나는 변화로서 손상에 의하여 生體內 국소부위에 유리되는 공통적인 물질에 의한다고 생각 된다[27].

화학적 매개체란 그 자신이 炎症의 원인이 되는 것이 아니고, 炎症의 여러 가지 현상들 사이에 개재하여 炎症반응을 중개하는 물질이다. 이러한 화학적 매개체는 혈장, 세포 및 손상 받은 조직으로부터 유래되는데 활성산소, 산화질소(NO), 프로스타글란딘(PG), 炎症을 유발시키는 여러 cytokines등이 있다[28].

본 실험에 쓰인 cytokines의 작용을 살펴보면 이 실험의 방향성과 炎症에의 적용 가능여부를 볼 수 있다.

숙주내 cytokines은 염증을 죽이는 작용을 하는데, 세포가 특

정한 상황에서 세포 밖으로 분비하는 단백질이다. 종류에 따라 면역기능을 담당하기도 하고 어떤 것은 다른 세포의 분화를 유도하기도 한다. cytokines은 주요한 면역 조절화합물인 세포간 messenger 단백질군이다. 이들은 임상 시험에서 생물학적 치료제 중 가장 큰 군을 이루고 interferons, interleukin 및 조혈 성장인자를 포함한다. IL(interleukin)계통이 가장 많이 밝혀져 있다. ILs는 백혈구 전령으로써 주로 작용하는 cytokines이다. IL-1은 염증 반응에서 중요한 매채체이며 다향성 생물학적 활성을 가지고 있다. 또한 적은양에서 CD4cell, β-cell을 활성화하고, 염증 세포를 자극할 수 있다. IL-6은 다향성 면역 조혈 효과를 가지고 있으며 간세포에 작용하여 β-cell의 성장을 촉진하며, T-cell이나 thymocytes에 co-stimulator로 작용이 가능하다. TNF-α는 세균의 세포막에 있는 내포소인 LPS(lipopolysaccaride)에 의해 활성화된 림프구에 의해 만들어진다. TNF-α(종양괴사인자-α)는 백혈구나 혈관 세포에 작용하며 국소적 염증 반응이 나타나 항원이 제거된다. 여기서 LPS(lipopolysaccaride)는 면역조절 물질, 염증 유발 물질로써 세포 파괴 물질을 생산 자극 한다. 그람 음성 세균의 세포표면을 구성하는 물질로 병원성 세균과 진핵생물간의 상호작용에 다양한 역할을 한다. LPS의 또 다른 역할은 기주에서 유래한 독성물질이 세균내부로 들어오는 것을 차단함으로써 세균 자신의 생명을 지키는 것이며 세포 방어 시스템을 활성화 시키는 것이다.

COX는 I형과 II형의 2가지 isoform이 존재한다. 이중 I형인 COX-1은 위장관 보호, 신장의 혈류 조절, 혈소판 응집 등 우리 몸의 정상적인 기능 유지에 중요한 작용을 하는 house keeping enzyme인 반면, 외부 자극에 의해 발현이 유도되는 II형인 COX-2는 염증과 암 등의 각종 퇴행성 질환에 중요한 역할을 한다. 그러므로 본 실험에서는 COX-2유전자 발현에 미치는 영향이 유효성이 있다[29-31]. 이러한 cytokines들은 쥐에 투여된 약물이 抗炎作用이 있는지 여부를 판단하는데 有效하다.

Nitric oxide(NO)는 nitric oxide synthase(NOS)효소에 의해 만들어지며, 체내 炎症과정에서는 과량의 NO가 만들어져 관절염을 비롯한 각종 급성, 혹은 만성 炎症 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NO는 혈관에서 강력한 혈관 확장 작용을 하며 혈소판 응집을 저해하고 중성구나 혈소판이 혈관내피세포에 부착하는 것을 막는 역할을 한다[32].

NOS는 일종의 산화효소로 혈관내피세포성 NOS, 신경세포성 NOS, 유도성 NOS(iNOS)의 세가지 아형으로 존재하는데 이중 iNOS는 염증성 cytokines아나 LPS반응에 의하여 분비된다. 생성된 iNOS는 과량의 NO를 생성해 각종 염증질환에 작용하는 것으로 알려져 있다. 생산된 과량의 NO는 그 자체로도 유전자 및 단백질에 독성을 나타내지만 활성산소의 하나인 superoxide anion (O^{2-})과 반응해 맹독성을 가진 peroxynitrite ($ONOO^-$)를 생성하므로 더욱 강력한 독성물질로 변화되어 암 형성과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다. 따라서 각종 염증의 발생억제와 치료를 위해서는 iNOS의 활성을 억제시키는 것이 중요하다[32,33]. 특히 iNOS와 COX-2의 염증반응에서의 중요성이 대두되고 있으며 이들을 염증반응 및 염증 초기반응 물질에 의해 상승 조절되고, 활성화된 이들 효소에 의한 생성물이 급성 및 만성 염증반응의 중요한 매개체로 작용한다고 알려져 있다[32].

본 실험에서는 加減透膿散의 추출물에 항염증 작용이 있는지를 확인하기 위해 細胞毒性에 미치는 영향, RAW264.7 cell line(대식세포주)에서의 정량적 중합 효소 연쇄 반응, IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, NOS-II 등의 유전자 발현에 미치는 영향, 세포내 Nitric oxide(NO), reactive oxygen species(ROS) 생성량에 미치는 영향과 IL-1β IL-6 TNF-α 등의 생성량에 미치는 영향, LPS로 유도된 lethal endotoxemia(치사의 내독소 혈증)에 대한 생명 연장 효과 등을 실험 평가하였다.

mLFCs에 대한 세포독성 평가에서 GTNS 는 200, 100, 50, 10, 1 ㎍/㎖ 농도에서 대조군(100 %)에 비해 각각 90.5 ± 2.8, 92.6 ± 3.4, 92.3 ± 4.6, 95.2 ± 2.8, 98.6 ± 3.6%로 세포독성이 없는 것으로 나타났다(Table 2).

GTNS는 RAW264.7 세포주에서 IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2 및 NOS-II의 유전자 발현을 100, 50, 10 ㎍/㎖ 농도에서 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였으며(Fig. 1, 2) 특히 100 ㎍/㎖ 농도에서 NOS-II 유전자 발현을 억제 효과가 뚜렷하였다(Fig. 2-2).

加減透膿散의 추출물이 Nitric oxide(NO) 생성량에 미치는 영향에 대해 살펴본 결과 RAW264.7 세포주에서 NO 생성량은 정상군의 OD값이 0.054 ± 0.012 nm, 대조군이 1.458 ± 0.236 nmdm로 나타났으며, GTNS 100, 50, 10 ㎍/㎖ 농도 처리군이 각각 0.641 ± 0.145, 0.796 ± 0.215, 1.145 ± 0.235로 나타나 대조군에 비하여 100, 10 ㎍/㎖ 농도에서 유의성 있게 NO 생성을 억제하였다(Fig. 3).

加減透膿散 추출물이 ROS 생성량에 미치는 영향을 평가한 결과 세포내 ROS 생성량은 대조군이 정상군에 비하여 큰 폭으로 증가하였으며, GTNS 투여군(100 ㎍/㎖ C, 50 ㎍/㎖ D)은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 ROS 생성을 억제하였다(Fig. 4).

GTNS는 LPS로 유도된 염증 생쥐 모델의 혈청 내에서 IL-1β, IL-6 및 TNF-a의 생성을 대조군에 비하여 유의성 있게 ($p<0.05$) 감소시켰다(Fig. 5).

LPS로 유도된 염증 생쥐 모델의 생명 연장 효과를 살펴보기 위해서, 생쥐의 복강에 LPS(3 mg/kg)를 주사하여 5일간 생명연장을 관찰한 결과, 대조군에 비하여, GTNS 투여군은 LPS 투여 3일째부터 대조군에 비하여 생존율이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6).

이상의 실험 결과를 종합하면 加減透膿散은 炎症 유발 cytokines의 유전자 발현을 억제하였고, NO와 ROS의 생성을 억제하였다. 그리고 LPS로 유도된 염증 생쥐 모델의 혈청 내 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성량을 억제하였으며, LPS로 유도된 염증 생쥐 모델에서 lethal endotoxemia(치사의 내독성혈증)에 대한 생명 연장 효과를 보이는 등 抗炎症 效果가 인정되므로, 乳癰과 같은 婦人科 乳房疾患에 유용하게 활용될 수 있으리라고 思料된다.

결 론

加減透膿散의 抗炎作用의 효과를 평가하기 위해 細胞毒性에

미치는 영향, RAW264.7 세포주에서의 정량적 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR), 염증 관련 cystokines 인 IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2 및 NOS-Ⅱ의 유전자 발현에 미치는 영향, NO, ROS 생성량에 미치는 영향, LPS로 유도된 연증 생쥐 모델의 혈청 내 cystokines 변화에 미치는 영향 및 생명 연장 효과 등을 실험평가를 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

加減透膿散은 mLFCs에 대한 세포독성 평가에서 독성이 나타나지 않았다. 加減透膿散은 RAW264.7 세포주에서 IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2 및NOS-Ⅱ 의 유전자 발현을 농도 의존적으로 억제하였다. 加減透膿散은 100, 50 ㎍/㎖ 농도에서 유의성 있게 NO 생성을 억제하였다. 加減透膿散은 농도 의존적으로 ROS 생성을 억제하였다. 加減透膿散은 LPS로 유도된 염증 생쥐 모델의 혈청 내 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성량을 대조군에 비하여 유의성 있게 감소시켰다. 加減透膿散은 LPS 투여 후 3일째부터 대조군에 비하여 생쥐의 생존율을 증가시켰다.

참고문헌

1. 陳實功. 外科定宗. 北京, 人民衛生出版社, p 552, 1981.
2. 陸德銘. 實用中醫乳房病學. 上海, 上海中醫藥大學出版社, p 210, 1993.
3. 전국한의과대학 본초학교실. 본초학. 서울, 영림사, p 178, 198, 302, 419, 479, 536, 1994.
4. 김동일 외. 東醫學事典. 서울, 여강출판사, p 823, 1988.
5. 金在誠. 五峰靑囊訣. 대구, 대구한방연구회, p 88, 99, 100, 1964.
6. 金在佶. 臨床韓方藥物療法. 서울, 南山堂, pp 351-352, 1990.
7. 安微中醫學院. 中醫臨床手冊. 香港, 商務印書館, pp 146-149, 1975.
8. 실용중서의학편집조. 臨床各科疾病療法. 향항, 시대도서유한공사, p 118, 1975.
9. 朴美淳. 乳癰에 活用되는 內消散의 鎭痛 消炎作用에 대한 硏究. 大田大學校大學院, 1996.
10. 金姸希. 乳癰에 活用되는 瓜蔞牛蒡湯이 消炎 鎭痛 作用에 미치는 영향. 大田大學校大學院, 1992.
11. 姜東瑛. 妬乳에 活用되는 加味連翹湯이 消炎 鎭痛 및 抗菌作用에 미치는 영향. 大田大學校大學院, 1992.
12. 白成俊. 乳癰에 活用되는 加味消毒飮의 鎭痛 消炎作用에 대한 硏究. 대한한방부인과학회지 10(1):51-61, 1997.
13. 金貞淑 외. 乳癰에 活用되는 加減流氣飮에 대한 實驗的 硏究. 大田大學校大學院, 1995.
14. 許浚. 對譯 東醫寶鑑. 하동, 東醫寶鑑出版社, pp 681-683, 2005.
15. 李梴. 醫學入門. 서울, 대성문화사, p 1841, 1842, 1990.
16. 皇甫謐. 鍼灸甲乙經. 北京, 人民衛生出版社, p 153, 1956.
17. 王 燾. 外臺秘要. 北京, 人民衛生出版社, p 946, 1955.
18. 陳子明. 校註婦人良方大全. 臺北, 文光圖書有限公司, 14: 71-75, 1987.
19. 方 廣. 丹溪心法附餘. 서울, 대성문화사, p 576, 1982.
20. 巢元方. 諸病源候論. 北京, 人民衛生出版社, p 217, 1955.
21. 宋炳基. 漢方婦人科學. 서울, 행림출판, p 273, 274, 1978.
22. 武之望. 濟陰綱目. 서울, 일중사, p. 561, 1992.
23. 傅靑主. 傅靑主女科. 서울, 대성문화사, p 170, 171, 1984.
24. 顧佰康. 中醫外科學. 북경, 인민위생출판사, pp 153-161, 1987.
25. 葉天士. 葉天士女科. 서울, 대성문화사, p 171, 172, 1984.
26. 박광균. 口腔生化學. 서울, 군자출판사, pp 318-325, 1999.
27. 大韓病理學會. 病理學. 서울, 고문사, pp 71-104, 1995.
28. 김태성. Th1 cytokiness as therapeutic targets of infectious diseases. 전남의대학술지 37(3), 2001.
29. Muller-Decker, K. Cyclooxygenases in the skin, J Dtsch Dermatol Ges. 2(8):668-675, 2004.
30. 문태철 외. 천연물로부터 사이클로옥시게나제-2 저해제 검색. 약학회지 42: 214-219, 1998.
31. 노민수 외. 리포폴리사카라이드에 의해 유도되는 대식세포의 프로스타글란딘 생합성을 저해하는 천연물의 탐색. 약학회지 42: 558-566, 1998.
32. 지병철, 문신용. Nitric Oxide가 인간 황체화 과립막세포의 아포프토시스에 미치는 영향. 대한산부회지 45(5):766-773, 2002.