대한한방부인과학회지 pISSN 1229-4292 / eISSN 2508-3619
J Korean Obstet Gynecol. VOL.33 NO.3 : 040-059 (2020)
https://doi.org/10.15204/jkobgy.2020.33.3.040

連翹와 金銀花 에탄올 추출물의 항염증 효능 연구

[1]동신대학교 한의과대학 한방부인과교실, [2]평동한의원
류효경[1], 정민재[2], 최유진[1], 양승정[1], 조성희[1]

ABSTRACT

Research of the Anti-inflammatory Effects of *Forsythiae Fructus* and *Lonicerae Flos* Ethanol Extracts

Hyo-Kyung Ryu[1], Min-Jae Jung[2], Yu-Jin Choi[1],
Seung-Jeong Yang[1], Seong-Hee Cho[1]
[1]Dept. of Korean Gynecology and Obstetrics, College of Korean Medicine, Dong-Shin University
[2]Pyeong-Dong Korean Medical Clinic

Objectives: The purpose of this study was to investigate the anti-inflammatory effects of ethanol extracts from *Forsythia viridissima Lindley*'s fructus and *Lonicera japonica Thunberg*'s flos *in vitro*, which has been frequently used in inflammatory diseases.

Methods: In this experiment, the anti-inflammatory effects of ethanol extracts from *Forsythia viridissima Lindley*'s fructus and *Lonicera japonica Thunberg*'s flos were evaluated by checking the following substances of LPS-activated Raw264.7 cell: Prostaglandin E_2 (PGE_2), Nitric oxide (NO), Cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible Nitric oxide synthase (iNOS), Interlukine-1β (IL-1β), Interlukine-6 (IL-6), Tumor necrosis factor-α (TNF-α), mitogen-activated protein kinase (MAPK), Inhibitor of kappa B-α (IκBα), Nuclear factor kappa B (NF-κB). And additionally measured reactive oxygen species (ROS) and free radicals to check the antioxidant effect of ethanol extracts from *Forsythia viridissima Lindley*'s fructus and *Lonicera japonica Thunberg*'s flos which affect inflammatory responses.

Results: As a result of measuring anti-inflammatory efficacy, PGE_2, NO, IL-1β, IL-6, TNF-α production amounts were reduced in the ethanol extracts from *Forsythia viridissima Lindley*'s fructus and *Lonicera japonica Thunberg*'s flos groups compared with the control group, and decreased the amount of COX-2 mRNA, iNOS mRNA gene expression. Expression of MAPK (ERK, JNK, p38) pathway was decreased. Expression of IκBα was increased and NF-κB was decreased. It is demonstrated that ethanol extracts from *Forsythia viridissima Lindley*'s fructus and *Lonicera japonica Thunberg*'s flos, by reducing NF-κB, regulate the expression of the inflammatory genes and reduce the inflammatory mediators. Ethanol extracts from *Forsythia viridissima Lindley*'s fructus and *Lonicera japonica Thunberg*'s flos also decreased ROS production and free radicals, which shown to have antioxidant efficacy and influence anti-inflammatory effects.

Conclusions: These data suggest that ethanol extracts from *Forsythia viridissima Lindley*'s fructus and *Lonicera japonica Thunberg*'s flos can be used to treat various inflammatory diseases.

Key Words: *Forsythiae Fructus*, *Lonicerae Flos*, Ethanol Extract, Anti-inflammatory Effect

Corresponding author(Seong-Hee Cho) : Korean Hospital of Dong-Shin University, 141 Wolsan-ro, Namgu, Gwangju
Tel : 062-350-7213 E-mail : drlmp72@hanmail.net

Ⅰ. 서 론

손상된 부위의 조직은 다양한 화학물질을 유리하여 염증반응을 유도한다. 국소 증상으로는 열, 통증, 발적, 종창이 있고 전신 증상으로는 발열, 피로, 식욕감퇴, 쇠약, 수면 양상의 변화 등이 있어 일상생활 전반에 불편을 초래한다. 또한 과도한 염증 반응은 국소부위 조직의 변화와 순환 장애를 초래하며 특히 혈관내 혈장과 혈구의 비정상적인 삼출과 염증 발생 부위의 세포증식을 일으켜 인체의 기관과 세포의 손상을 악화시킨다[1-4].

염증치료의 상용 약물인 비스테로이드성 소염진통제의 경우 부작용으로 궤양, 출혈을 동반한 위장관 질환이 가장 흔하게 나타나고[5], 신경색[6], 간질성 신염[7] 등 신장질환의 발생도 보고되고 있다. 이러한 소염진통제의 부작용을 줄이기 위한 관련 연구가 활발하게 진행되고 있으며 한의학적으로도 항염증 효과를 가진 단일약재 및 처방에 대한 실험이 다양하게 이루어지고 있다.

천연물에 대한 실험연구 중 단일약재로 연교와 금은화 추출물의 연구는 많이 진행되어 있다. 연교 추출물은 항염증 작용을 하며[8-10] 항노화[11], 항산화[12], 멜라닌 생성 억제 및 미백 등의 효과[13], 아토피 피부염[14] 등의 효과가 보고되었으며 금은화 추출물은 항염증 효능[15-7] 항바이러스[18], 항균[19], 미백[20], 아토피 피부염[21] 역류성 식도염[22], 지방세포 분화 억제[23], 항소양[24], 항암[25,26] 등의 효과가 보고되어 연교와 금은화 추출물이 염증성 질환과 여성피부질환 및 비만에 응용될 수 있음을 시사한다. 더불어 연교는 질염균에 대한 항균효과가 보고되었고[27] 금은화를 사용한 처방은 여성 질환 중 대하[28], 만성골반염[29]의 치료에 응용되고 있으며 금은화와 연교가 함께 들어간 처방은 질염[30]과 유선염[31]에 활용되는 등 임상에서 여성 질환에 흔히 사용된다.

이에 본 연구에서는 부인과 염증성 질환의 다빈도 천연물인 연교와 금은화의 효능을 관찰하여 염증성 질환에 미치는 영향을 파악하기 위해 연교와 금은화의 에탄올 추출 실험을 통해 항염증 효과를 알아보았다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 시 료

본 실험에 사용한 연교 에탄올 추출물(*Forsythia viridissima Lindley*(의성개나리)의 과실, 이하 FVL으로 표기), 금은화 에탄올 추출물(*Lonicera japonica Thunberg*(인동덩굴)의 꽃봉오리, 이하 LJT로 표기)의 연교와 금은화는 각각 충남 금산군, 경남 산청군에서 생산된 것을 사용하였다.

2) 시 약

시약은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco BRL, U.S.A.), Fetal bovine serum (Gibco BRL, U.S.A.), Penicillin-Streptomycin (Gibco BRL, U.S.A.), Sample loading buffer(BIO-RAD Co., Japan), 30% Acrylamide /Bis Solution 29:1(3.3%C) (BIO-RAD Co., Japan), Skim Milk(BD Co., France), Pierce BCA Proein Assay Kit(Thermo Co., U.S.A.), TEMED(BIO-RAD Co., Japan), Protease inhibitor cocktail (Sigma Co., U.S.A),

Phosphatase inhibitor cocktail(Sigma Co., U.S.A), Total RNA prep kit(Intronbio, Korea), ECL solution (Intronbio, Korea), EZ-Cytox(Daeil Lab, Korea), NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Co., U.S.A.), AccuPower CycleScript RT PreMix(Bioneer, Korea), NO assay kit (Intronbio, Korea), Primer ACTIN, iNOS, COX-2(Bioneer, Korea), PGE_2(Prostaglandin E2) ELISA Kit(R&D systems Co., U.S.A.), Luminex Kit(Merck Co., U.S.A.), SYBR Green(Qiagen, Germany), Primary Antibody ERK, JNK, p38, IκBα, NF-κB, Actin(Cell signaling, Danvers, MA), Peroxidase IgG (Immuno Research PA, USA) 등을 사용하였다.

3) 기 기

사용된 기기는 High-performance liquid chromatography(shimadzu corp, Japan), Mini-Protean tetra Cell(BIO-RAD Co., Japan), Rotary vacuum evaporator(EYELA, Japan), Extraction heating mantles(Misung, Korea), Freeze dryer(IlShinbiobase, Korea), Clean bench(Vision scientific Co., Korea), Autoclave(Sanyo Co., Japan), Vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), Micro centrifuge (Hanil scientific, Korea), Deep-freezer (Sanyo Co., Japan), Ice-maker(Vision scientific Co., Korea), Plate shaker(Lab-Line Co., U.S.A.), Micro plate reader(Molecular Devices Co., U.S.A.), Nanodrop(Thermofisher, U.S.A.), Alpha Cycler 1 PCRmax(PCRmax, U.K.), Real time PCR(Qiagen, Germany), Chemidoc(Vilber Lourmat, France), Optical microscope(Carl ZEISS, Germany) 등을 사용하였다.

2. 방 법

1) 시료 추출

연교 30 g, 금은화 30 g에 각각 70% EtOH 500 ml을 넣어 100℃에서 3시간 동안 추출을 한 뒤 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용해 감압 농축하였다. 농축 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 FVL는 6.53 g, LJT는 8.81 g의 분말을 얻었고, 초저온 냉동고에서 -80℃로 보관하며 실험에 필요한 농도를 증류수에 희석해 사용하였다.

2) High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) 측정

FVL과 LJT의 지표물질 분석을 위해 고속액체크로마토그래피 기기를 사용하였으며, 컬럼은 Agilent eclipse Plus C18 (250×4.6 mm), 5 μm를 사용하였다. 유속은 1 ml/분, 시료의 주입량은 10 μl으로 설정하였으며, 0-45 분간 A 용액 0-90%와 B 용액 10-100%으로 용리단계를 설정하였다. FVL 분석 시, A는 water, B는 acetonitrile을 사용하였으며, LJT 분석 시, A는 0.1% formic acid, B는 acetonitrile을 사용하였다. 이 후, FVL은 280 nm, LJT는 330 nm의 파장에서 지표성분의 용출을 측정하였다.

3) Raw264.7 세포 배양

Raw264.7 cell은 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin-streptomycin으로 조성된 DMEM 배지를 사용해 37℃, 5% CO_2가 유지되는 세포 배양기로 배양하였으며, 2일 주기로 계대 배양하여 실험을 진행하였다.

4) 세포 생존율 측정

Raw264.7 cell은 96 well plate에 5×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 약물처리는 serum free media에

희석하여 처리하였다. FVL과 LJT를 1, 5, 50, 100 μg/ml 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 μl의 EZ-Cytox 용액을 첨가해 37℃, 5% CO_2가 유지되는 세포 배양기에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 450 nm에서의 흡광도 변화를 측정해 정상군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시 하였다.

5) α-diphenyl-β-picrylhydrazyl(DPPH) radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능 측정은 FVL, LJT의 최종 농도가 FVL은 1, 5, 50 μg/ml, LJT는 1, 5, 50 μg/ml의 농도로 희석시켰으며, 에탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 150 μl와 FVL, LJT을 각각 100 μl씩 혼합하여 37℃에서 30분 동안 반응시켰다. 반응 후 517 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 시료액의 대조군으로는 증류수를 넣었으며, DPPH 용액의 대조군으로는 에탄올을 넣어 보정값을 얻었다. DPPH 자유라디칼 소거율은 아래의 식을 이용해 계산하였다.

소거율(%) =

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

6) 세포 내 reactive oxygen species(ROS) 생성 측정

세포 내 ROS 측정을 위하여 2', 7'-dichlorofluorescin diacetate(DCF-DA)를 이용하였다. Raw264.7 cell을 1.5×10^5 cells/well이 되게 12 well plate에 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. FVL과 LJT 1, 5, 50 μg/ml와 LPS 1 μl/ml을 함께 처리한 뒤, 24시간 동안 37℃, 5% CO_2가 유지되는 세포 배양기에서 배양하였다. 배양 후, 2,000 rpm에서 5분간 원심 분리해 모은 세포를 차가운 PBS로 2회 세척한 뒤, DCF-DA가 10 μM이 되도록 첨가하여 15분 동안 상온, 암소에 두었다. 염색 후 차가운 PBS를 넣어 1,200 rpm에서 5분간 원심분리를 한 후 상층액을 제거하고 다시 PBS 400 μl를 부유시켜 유세포 분석기를 사용하여 형광강도의 세기에 따른 변화를 분석하였다.

7) Prostaglandin E_2(PGE_2) 생성 측정

PGE_2를 측정하기 위하여 PGE_2 assay kit를 이용하였다. Raw264.7 cell을 1×10^5 cells/well이 되게 24 well plate에 분주하여 24시간 배양하였다. FVL과 LJT를 1, 5, 50 μg/ml 농도로 처리 1시간 후 LPS 1 μg/ml을 처리하였다. 다시 24시간 동안 37℃, 5% CO_2가 유지되는 세포 배양기로 배양하였다. 배양 후, 상층액만 13,000 rpm에서 10분 원심 분리하여 수집하였다. 96 well plate에 상층액 150 μl와 primary antibody 50 μl를 넣고 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 conjugate 50 μl를 추가하여 상온에서 2시간 반응시켰다. plate에 있는 시약은 버리고 washing buffer를 넣어서 3회 세척 작업을 진행하였다. 세척 후 substrate solution 200 μl를 첨가하여 상온에서 30분 반응시켰다. 반응 후 stop solution 100 μl를 첨가하여 ELISA reader기를 이용해 450 nm에서의 흡광도를 측정하였으며, standard curve를 기준으로 결과를 확보하였다.

8) Nitric oxide(NO) 생성 측정

NO를 측정하기 위하여 NO assay kit를 이용하였다. Raw264.7 cell을 1×10^5 cells/well이 되게 24 well plate에 분주, 24시간 동안 배양하였다. FVL과 LJT를 1, 5, 50 μg/ml 농도로 처리 1시간 후 LPS 1 μg/ml를 처리하였다. 다시 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 조건이 유지되는 세포 배양기로 배

양하였다. 배양 후, 상층액만 13,000 rpm에서 10분 원심 분리하여 수집하였다. 96 well plate에 상층액 100 μl에 N1 buffer와 N2 buffer를 각 50 μl를 첨가하여 상온에서 5~10분 반응시켰다. 반응 후 540 nm에서의 흡광도 변화를 측정하여 정상군과 대조군 그리고 실험군의 NO 생성 수준을 백분율로 표시하였다.

9) Real-time PCR analysis

Cyclooxygenase-2(COX-2) mRNA, inducible nitric oxide synthetase(iNOS) mRNA 생성량을 측정하기 위해 PCR kit 사용하였다. Raw264.7 cell을 5×10^5 cells/well이 되게 6 well plate에 분주하여 24시간 동안 배양하였다. FVL과 LJT를 1, 5, 50 μg/ml 농도로 처리 1시간 후 LPS 1 μg/ml을 처리하였다. 다시 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 조건이 유지되는 세포 배양기에서 배양하였다. 배양 후, 배지는 전부 제거하고 phosphate buffer saline(PBS)로 3회 세척작업을 진행하였다. 세척 후, cell lysis buffer를 1 ml씩 넣어 혼합한 후 chloroform을 200 μl씩 첨가해 다시 혼합하였다. 이를 13,000 rpm에서 10분 원심분리 후 400 μl의 상층액을 회수하여 binding buffer를 400 μl씩 넣어 혼합하여 column에 주입하고 원심분리하였다. column에 washing buffer A를 700 μl씩 넣어 원심분리하고 washing buffer B를 700 μl씩 넣어 원심분리한 뒤 elution buffer 50 μl을 넣고 원심분리하여 RNA를 추출하였다. 역전사(reverse transcription) 반응은 RT premix(reverse transcriptase, reaction buffer, dNTPs, dT20 primer, stabilizer)에 total RNA를 1 μg 첨가하고 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 처리된 증류수를 최종 부피가 20 μl가 되도록 첨가하였다. 이 혼합액을 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심 침강하고 45℃ heating block에서 60분 반응시켜 first-strand cDNA를 합성하였다. 이를 다시 95℃에서 5분 반응시켜 M-MLV RT를 불활성화시킨 후 합성 완료된 cDNA를 PCR에 사용하였다. 합성이 완료된 cDNA를 증폭시키기 위해 real-time PCR을 진행하였으며, real-time 전용 tube에 cDNA 1 μl, 각 primer 2 μl, SYBR Green 10 μl, DEPC-DW 5 μl씩 넣어 다음과 같이 진행하였다. 95℃에서 5초 동안 denaturation을 일으킨 다음 62.5℃에서 30초 동안 primer의 annealing 및 신장 단계를 수행하였다. 이 후 유전자 발현량을 대조군에 비하여 계산하였으며, 이 실험에 사용한 primer는 Table 1과 같다.

Table 1. The Sequences of Primers for Real-Time PCR

Primer	F/R*	Sequences	SIze (bp)
COX-2	F	AACCGCATTGCCTCTGAAT	130
	R	CATGTTCCAGGAGGATGGAG	
iNOS	F	CGAAACGCTTCACTTCCAA	51
	R	TGAGCCTATATTGCTGTGGCT	
ACTIN	F	AGGGAAATCGTGCGTGACAT	95
	R	TCCAGGGAGGAAGAGGATGC	

* F : forward, R : reverse

10) Cytokine(IL-1β, IL-6, TNF-α) 생성 측정

Cytokine 생성량를 측정하기 위하여 luminex kit를 이용하였다. Raw264.7 cell을 1.5×10^5 cells/well이 되게 12 well plate에 분주하여 24시간 배양하였다. FVL과 LJT를 1, 5, 50 μg/ml 농도로 처리 1시간 후 LPS 1 μg/ml을 처리하였다. 다시 24시간 동안 37℃, 5% CO_2가 유지되는 세포 배양기로 배양하였다. 배양 후, 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리해 상층액만 수집하였다. 특화된 96 well에 상층액과 appropriate matrix solution을 25 μl씩 넣고 상온에서 18시간 반응시켰다. 반응 후 plate에 있는 시약은 버리고 washing buffer를 넣어서 3회 세척 작업을 진행하였다. 세척 후 detection antibody 25 μl를 첨가하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 plate에 streptavidin-phycoerythrin 25 μl를 첨가하여 상온에서 30분 반응시켰다. 반응 후 plate에 있는 시약은 버리고 washing buffer를 넣어서 3회 세척 작업을 진행하였다. 세척 후 PBS 125 μl를 각 well에 넣은 후 luminex reader기를 통해 standard curve를 기준으로 결과를 확보하였다.

11) Western blot 단백질 발현 측정

Raw264.7 cell을 6 well plate에 5×10^5 cells/well씩 seeding하여 24시간 동안 배양하였다. FVL과 LJT를 1, 5, 50 μg/ml 농도로 처리 1시간 후 LPS 1 μg/ml을 처리하였다. 다시 24시간 동안 37℃, 5% CO_2가 유지되는 세포 배양기에서 배양하였다. 배양 후, RIPA buffer 또는 NE-PER™ nuclear and cytoplasmic extraction reagents에 100x protease inhibitor cocktail Ⅰ, phosphatase inhibitor Ⅱ, Ⅲ를 넣어서 lysis 진행하여 단백질 추출을 진행하였다. 10% gel에 SDS-PAGE 진행 후 poly-vinyl difluoride(PVDF) membrane에 transfer 진행 후 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase(JNK), p38는 first antibody 1:1000, inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells alpha(IκBα), nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells(NF-κB)는 first antibody 1:500 4℃ overnight, 상온에서 secondary antibody 1:8000, enhanced chemiluminescence(ECL) detection reagent로 항원 항체 반응을 확인하였다.

3. 통계처리

실험 결과는 SPSS 18.0의 ANOVA와 unpaired student's T-test를 사용하여 통계처리를 하였고 $p<0.001$, $p<0.01$ 및 $p<0.05$ 수준에서 그 유의성을 검정하였다.

Ⅲ. 실험 결과

1. HPLC 측정

1) FVL

연교의 지표성분인 arctigenin을 분석한 결과, FVL에는 38.81 mg/ℓ의 arctigenin이 함유되어있었다(Fig. 1).

2) LJT

금은화의 지표성분인 chlorogenic acid를 분석한 결과, LJT에는 154.07 mg/ℓ의 chlorogenic acid가 함유되어있었다(Fig. 2).

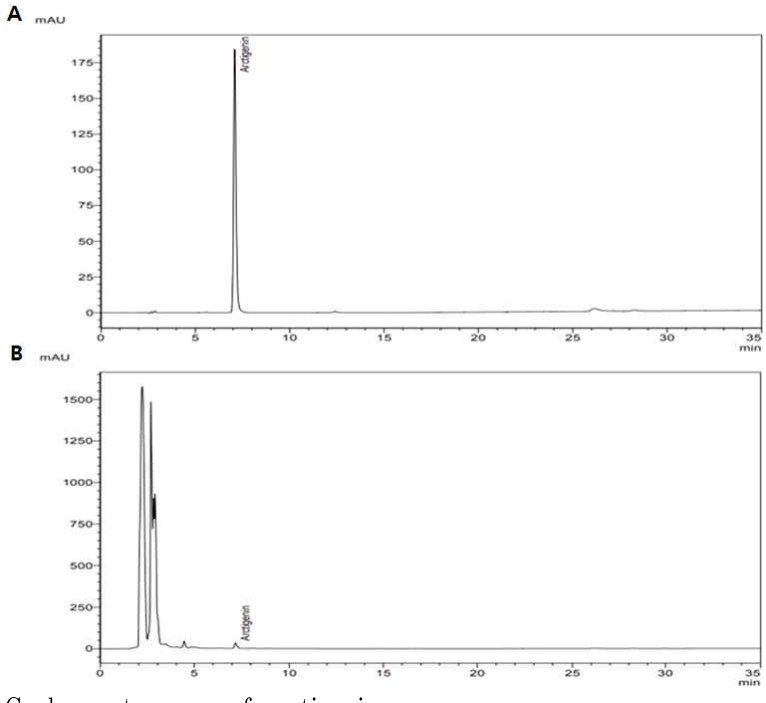


Fig. 1. HPLC chromatograms of arctigenin.
A : standard, B : FVL

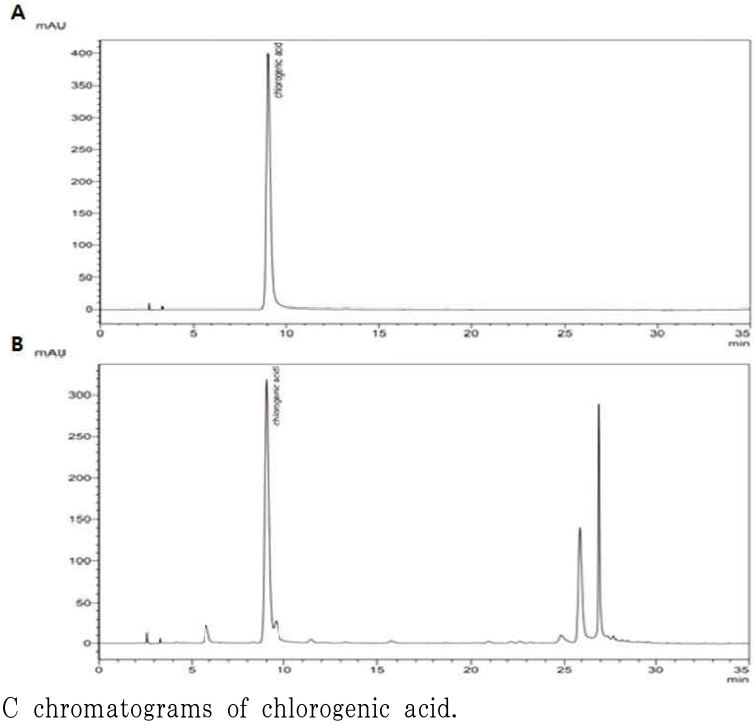


Fig. 2. HPLC chromatograms of chlorogenic acid.
A : standard, B : LJT

2. 세포 생존율

정상군은 100.00±0.83%, 대조군은 57.82±1.27%, FVL은 1, 5, 50, 100 μg/ml 농도에서 각각 100.17±0.12%, 100.21±0.01%, 100.45±0.74%, 100.56±0.43%로 나타났으며, LJT는 1, 5, 50, 100 μg/ml 농도에서 각각 100.90±0.50%, 100.25±0.33%, 97.50±1.64%, 76.00±4.72%로 나타났다(Fig. 3).

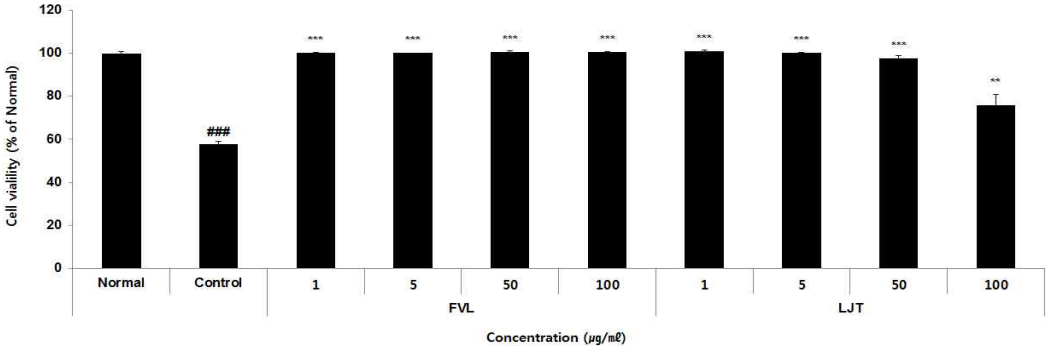


Fig. 3. Cell viability of FVL and LJT in Raw264.7 cells.
Raw264.7 cells were treated with FVL (1, 5, 50, and 100 μg/ml), LJT (1, 5, 50, and 100 μg/ml), and LPS (1 μg/ml) for 24 h. Cell viability was measured using a WST assay. Each data represents the mean±SD from three independent experiments.
###$p<0.001$ compared with the normal group and ***$p<0.001$, **$p<0.01$ compared with the control group.

3. 항산화 효능평가

1) DPPH radical 소거능 측정

FVL은 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 3.31±2.33%, 6.59±0.53%, 20.63±0.60%로 나타났으며, LJT는 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 1.17±2.07%, 6.07±2.00%, 62.11±5.99%로 나타나 FVL과 LJT 모두 DPPH radical 소거능의 농도의존적인 증가가 나타났다(Fig. 4).

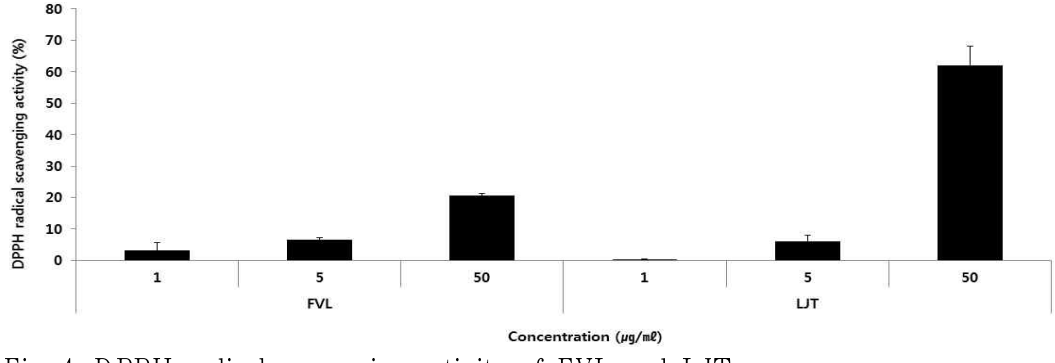


Fig. 4. DPPH radical scavenging activity of FVL and LJT.
FVL was incubated at 1, 5 and 50 μg/ml LJT was incubated at 1, 5 and 50 μg/ml with DPPH solution. Activities were determined by measurement of absorbance at 517 nm. Each data represents the mean±SD from three independent experiments.

4. 세포 내 ROS 측정

정상군은 9.51±4.17%, 대조군은 100.00±3.94%, FVL는 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 91.96±0.39%, 86.27±0.15%, 76.47±1.52%로 나타났으며, LJT는 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 101.58±1.33%, 85.38±1.99%, 65.72±3.95%로 나타나 LJT 1 μg/ml를 제외한 모든 군에서 감소하는 경향을 보였다(Fig. 5).

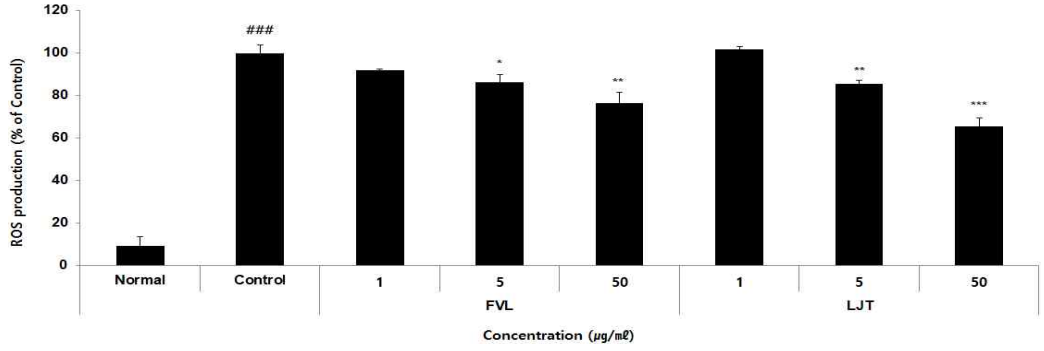


Fig. 5. The effects of FVL and LJT on ROS production in LPS-stimulated Raw264.7 cells.
Raw264.7 cells were pre-treated with FVL (1, 5, and 50 μg/ml), LJT (1, 5, and 50 μg/ml) for 1 h, followed by co-incubation with LPS (1 μg/ml) for 24 h. Level of ROS production was examined by FACS. Each data represents the mean±SD from three independent experiments. ###$p<0.05$ compared with the normal group and ***$p<0.001$, **$p<0.01$, *$p<0.05$ compared with the control group.

5. Enzyme-linked immunosorbent assay

1) PGE_2

정상군은 0.01±0.00 pg/ml, 대조군은 10603.57±842.09 pg/ml, FVL은 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 9598.67±1224.67 pg/ml, 9221.97±66.59 pg/ml, 6051.15±66.59 pg/ml로 나타났으며, LJT는 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 7992.46±181.97 pg/ml, 7890.02±420.88 pg/ml, 7603.17±619.05 pg/ml로 나타나 FVL과 LJT 모든 군에서 감소하는 경향을 보였다(Fig. 6).

2) NO

정상군은 6.85±5.31%, 대조군은 100.00±2.25%, FVL은 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 103.94±0.39%, 98.19±0.66%, 88.20±0.79%으로 나타났으며, LJT는 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 109.08±2.02%, 85.65±2.71%, 64.52±4.55%로 나타나 FVL 1, 5 μg/ml와 LJT 1 μg/ml를 제외한 모든 군에서 유의하게 감소하였다(Fig. 7).

6. mRNA 발현

1) COX-2

정상군은 0.01±0.01, 대조군은 1.00±0.00, FVL은 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 0.94±0.05, 0.94±0.06, 0.85±0.07로 나타났으며, LJT는 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 0.99±0.07, 0.73±0.12, 0.61±0.04로 나타나 LJT 1 μg/ml를 제외한 모든 군에서 감소하는 경향을 보였다(Fig. 8).

2) iNOS

정상군은 0.33±0.18, 대조군은 1.00±0.00,

FVL은 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 0.93±0.17, 0.92±0.09, 0.88±0.07로 나타났으며, LJT는 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 1.07±0.01, 0.95±0.10, 0.40±0.15로 나타나 FVL과 LJT 50 μg/ml에서만 감소하는 경향을 보였다(Fig. 9).

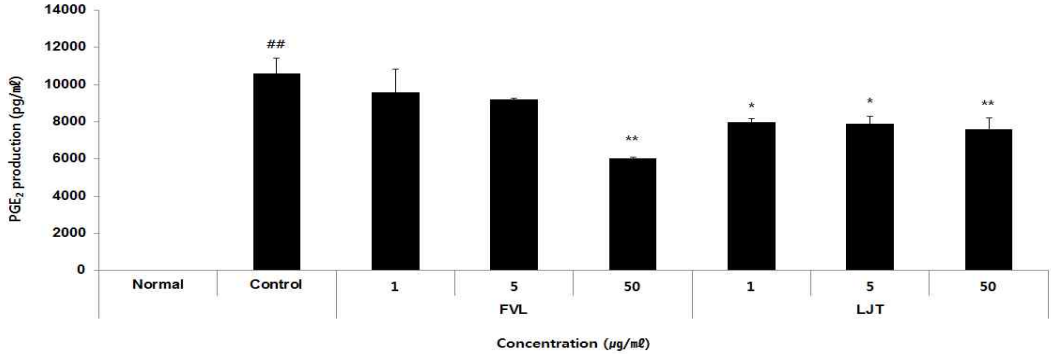


Fig. 6. The effects of FVL and LJT on PGE_2 producion in LPS-stimulated Raw264.7 cells.

Raw264.7 cells were pre-treated with FVL (1, 5, and 50 μg/ml), LJT (1, 5, and 50 μg/ml) for 1 h, followed by co-incubation with LPS (1 μg/ml) for 24 h. Production of PGE_2 was measured using a ELISA. Each data represents the mean±SD from three independent experiments.

$^{\#\#}p<0.01$ compared with the normal group and $^{**}p<0.01$, $^{*}p<0.05$ compared with the control group.

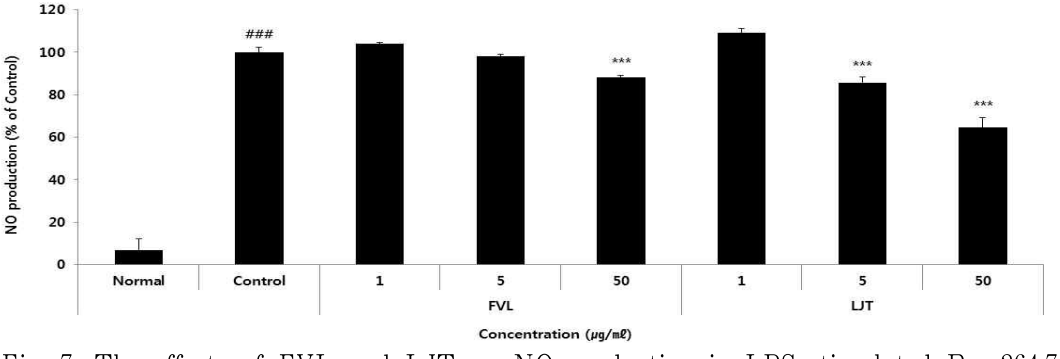


Fig. 7. The effects of FVL and LJT on NO production in LPS-stimulated Raw264.7 cells.

Raw264.7 cells were pre-treated with FVL (1, 5, and 50 μg/ml), LJT (1, 5, and 50 μg/ml) for 1 h, followed by co-incubation with LPS (1 μg/ml) for 24 h. Production of NO was measured using a griess reagent for nitric oxides. Each data represents the mean±SD from three independent experiments.

$^{\#\#\#}p<0.001$ compared with the normal group and $^{***}p<0.001$ compared with the control group.

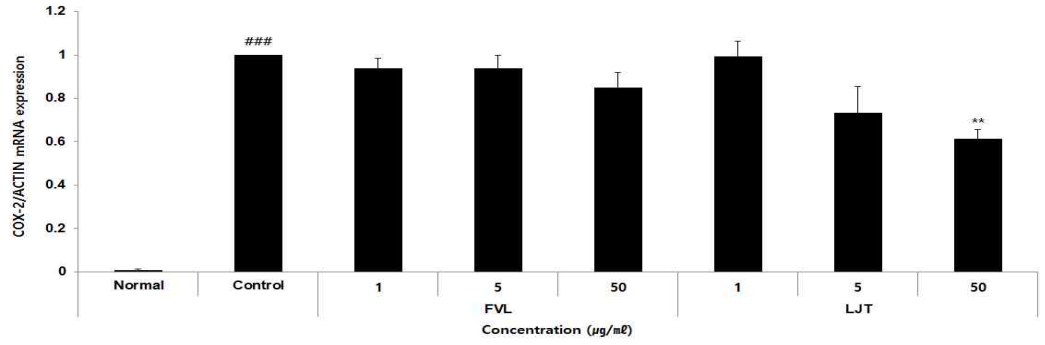


Fig. 8. The effects of FVL and LJT on COX-2 mRNA expression in LPS-stimulated Raw264.7 cells.

Raw264.7 cells were pre-treated with FVL (1, 5, and 50 μg/ml), LJT (1, 5, and 50 μg/ml) for 1 h, followed by co-incubation with LPS (1 μg/ml) for 24 h. Level of COX-2 mRNA expression was examined by real-time PCR. Each data represents the mean±SD from three independent experiments.

$^{###}p<0.001$ compared with the normal group and $^{**}p<0.01$ compared with the control group.

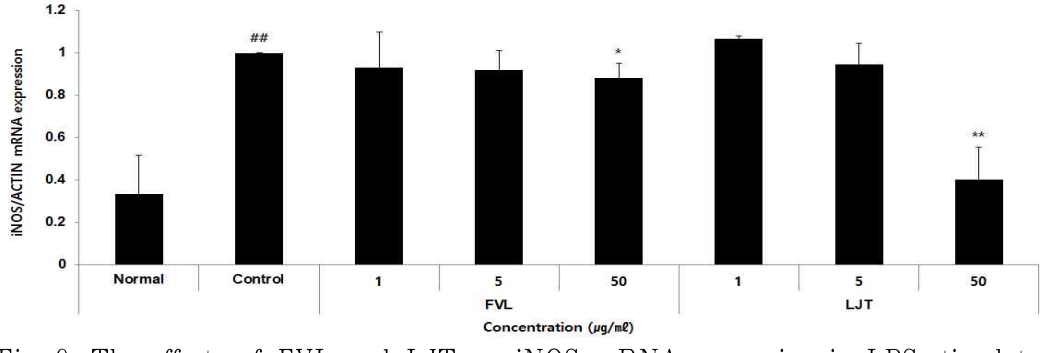


Fig. 9. The effects of FVL and LJT on iNOS mRNA expression in LPS-stimulated Raw264.7 cells.

Raw264.7 cells were pre-treated with FVL (1, 5, and 50 μg/ml), LJT (1, 5, and 50 μg/ml) for 1 h, followed by co-incubation with LPS (1 μg/ml) for 24 h. Level of iNOS mRNA expression was examined by real-time PCR. Each data represents the mean±SD from three independent experiments.

$^{##}p<0.01$ compared with the normal group and $^{**}p<0.01$, $^{*}p<0.05$ compared with the control group.

7. Cytokine level

1) IL-1β

정상군은 3.20±0.00 pg/ml, 대조군은 124.74±7.81 pg/ml, FVL은 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 132.62±14.47 pg/ml, 120.76±0.62 pg/ml, 84.21±4.71 pg/ml로 나타났으며, LJT는 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 120.27±6.04 pg/ml, 103.57±3.58 pg/ml, 78.28±2.40 pg/ml로 나타나 FVL와 LJT 1 μg/ml를 제외한 모든 군에서 감소하는 경향을 보였다(Fig. 10).

2) IL-6

정상군은 2.68±0.86 pg/ml, 대조군은 35042.93±2478.71 pg/ml, FVL은 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 23422.05±2309.40 pg/ml, 23238.63±56.53 pg/ml, 22422.05±349.20 pg/ml로 나타났으며, LJT는 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 32057.20±1578.06 pg/ml, 30271.71

±1023.53 pg/ml, 28910.16±2560.41 pg/ml로 나타나 FVL과 LJT 모든 군에서 감소하는 경향을 보였다(Fig. 11).

3) TNF-α

정상군은 123.23±33.54 pg/ml, 대조군은 1246.81±96.92 pg/ml, FVL은 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 924.66±126.89 pg/ml, 894.93±5.93 pg/ml, 759.21±9.36 pg/ml로 나타났으며, LJT는 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 750.62±53.32 pg/ml, 718.07±74.21 pg/ml, 691.01±16.39 pg/ml로 나타나 FVL과 LJT 모든 군에서 감소하는 경향을 보였다(Fig. 12).

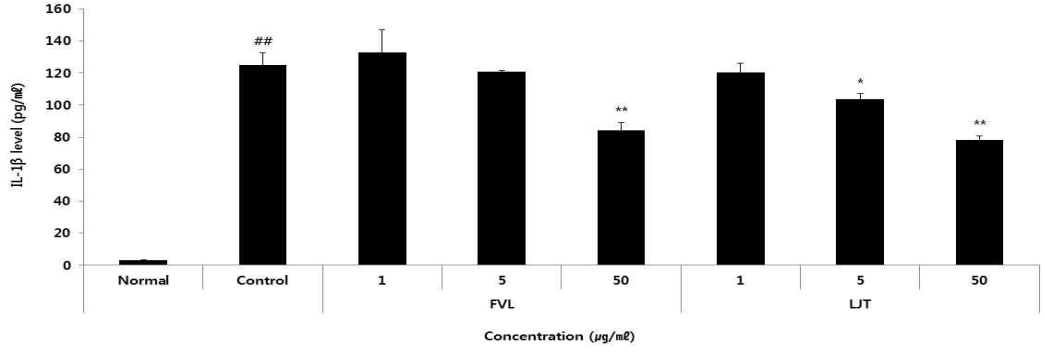


Fig. 10. The effects of FVL and LJT on IL-1β level in LPS-stimulated Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were pre-treated with FVL (1, 5, and 50 μg/ml), LJT (1, 5, and 50 μg/ml) for 1 h, followed by co-incubation with LPS (1 μg/ml) for 24 h. Level of IL-1β was measured using a luminex multiplex assays. Each data represents the mean±SD from three independent experiments.
$^{\#\#}p<0.01$ compared with the normal group and $^{**}p<0.01$, $^{*}p<0.05$ compared with the control group.

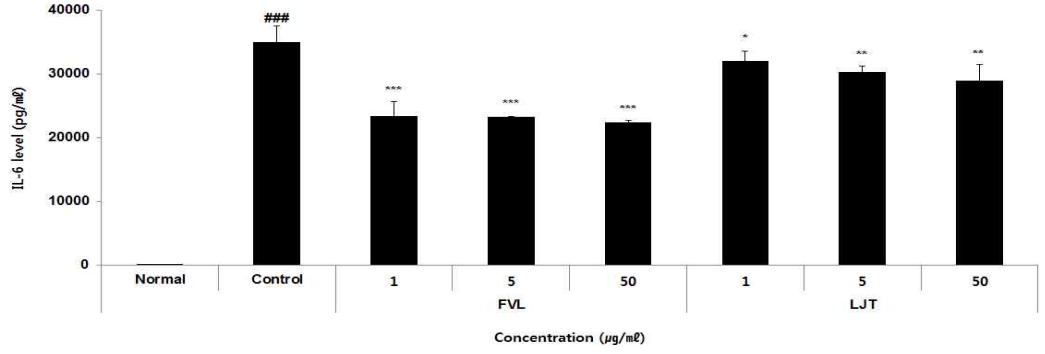


Fig. 11. The effects of FVL and LJT on IL-6 level in LPS-stimulated Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were pre-treated with FVL (1, 5, and 50 μg/ml), LJT (1, 5, and 50 μg/ml) for 1 h, followed by co-incubation with LPS (1 μg/ml) for 24 h. Level of IL-6 was measured using a luminex multiplex assays. Each data represents the mean±SD from three independent experiments.
$^{\#\#\#}p<0.001$ compared with the normal group and $^{***}p<0.001$, $^{**}p<0.01$, $^{*}p<0.001$ compared with the control group.

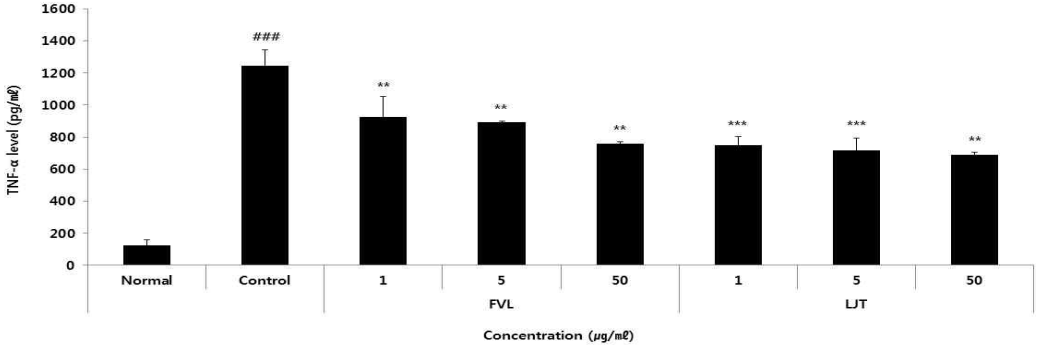


Fig. 12. The effects of FVL, LJT on TNF-α level in LPS-stimulated Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were pre-treated with FVL (1, 5, and 50 μg/ml), LJT (1, 5, and 50 μg/ml) for 1 h, followed by co-incubation with LPS (1 μg/ml) for 24 h. Level of TNF-α was measured using a luminex multiplex assays. Each data represents the mean±SD from three independent experiments.
###$p<0.001$ compared with the normal group and ***$p<0.001$, **$p<0.01$ compared with the control group.

8. Protein expression

1) ERK

정상군은 0.44±0.07, 대조군은 1.00±0.03, FVL은 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 0.90±0.03, 0.84±0.01, 0.65±0.01로 나타났으며, LJT은 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 0.63±0.04, 0.65±0.01, 0.69±0.04로 나타나 FVL과 LJT 모든 군에서 유의하게 감소하였다(Fig. 13).

2) JNK

정상군은 0.05±0.09, 대조군은 1.00±0.06, FVL은 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 1.00±0.04, 0.99±0.01, 0.95±0.00으로 나타났으며, LJT는 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 1.00±0.02, 0.95±0.07, 0.82±0.03으로 나타나 FVL과 LJT 1 μg/ml를 제외한 모든 군에서 감소하는 경향을 보였다(Fig. 13).

3) p38

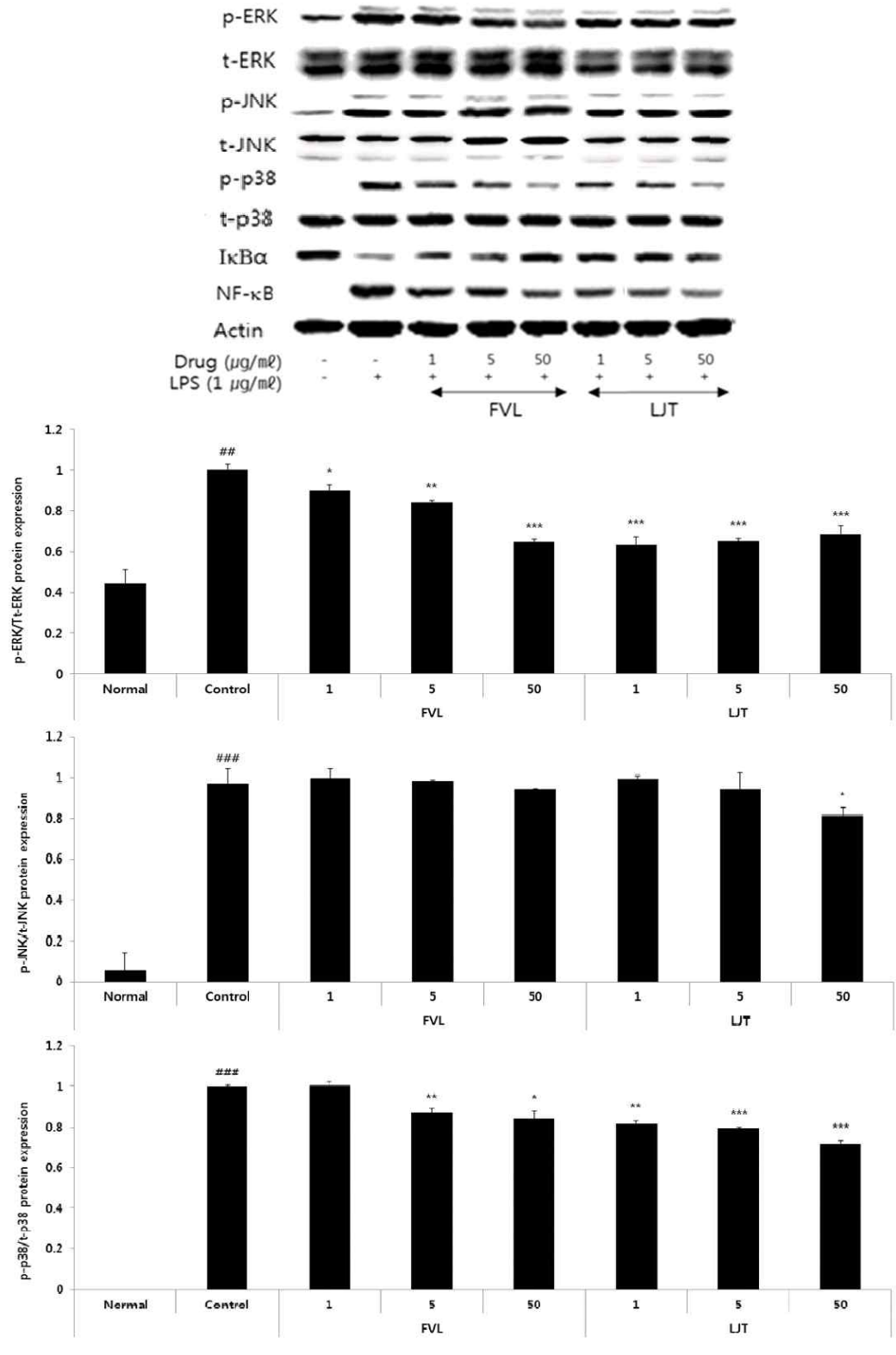
정상군은 0.00±0.00, 대조군은, FVL은 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 1.00±0.02, 0.87±0.02, 0.84±0.04로 나타났으며, LJT는 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 0.81±0.02, 0.80±0.01, 0.72±0.02로 나타나 FVL 1 μg/ml를 제외한 모든 군에서 감소하는 경향을 보였다(Fig. 13).

4) IκBα

정상군은 6.46±0.14, 대조군은 1.00±0.02, FVL은 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 6.56±0.51, 7.56±0.03, 9.05±0.01로 나타났으며, LJT는 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 9.67±0.18, 9.68±0.07, 10.75±0.14로 나타나 FVL과 LJT 모든 군에서 유의하게 증가하였다(Fig. 13).

5) NF-κB

정상군은 0.00±0.00, 대조군은 1.00±0.02, FVL은 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 0.84±0.04, 0.75±0.03, 0.63±0.04로 나타났으며, LJT는 1, 5, 50 μg/ml 농도에서 각각 0.48±0.02, 0.45±0.01, 0.33±0.03으로 나타나 FVL과 LJT 모든 군에서 유의하게 감소하였다(Fig. 13).


p-ERK
t-ERK
p-JNK
t-JNK
p-p38
t-p38
IκBα
NF-κB
Actin
Drug (μg/mℓ) - - 1 5 50 1 5 50
LPS (1 μg/mℓ) - + + + + + + +
FVL
LJT
p-ERK/Tt-ERK protein expression
p-JNK/t-JNK protein expression
p-p38/t-p38 protein expression
Normal
Control
1
5
50
FVL
LJT

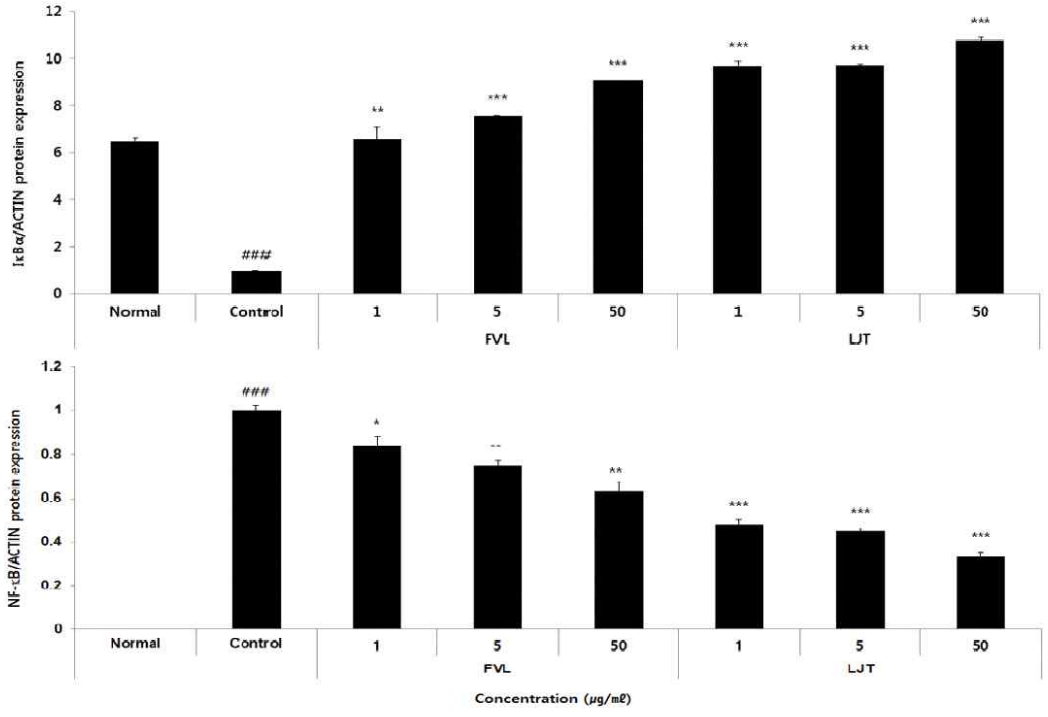


Fig. 13. The effects of FVL and LJT on ERK, JNK, p38, IκBα and NF-κB in LPS-stimulated Raw264.7 cells.

Raw264.7 cells were pre-treated with FVL (1, 5, and 50 μg/ml), LJT (1, 5, and 50 μg/ml) for 1 h, followed by co-incubation with LPS (1 μg/ml) for 24 h. Level of ERK, JNK, p38, IκBα and NF-κB expression were measured using a western blot. Each data represents the mean±SD from three independent experiments.

$^{###}p<0.001$, $^{##}p<0.01$ compared with the normal group and $^{***}p<0.001$, $^{**}p<0.01$, $^{*}p<0.05$ compared with the control group.

Ⅳ. 고 찰

과도한 염증반응을 억제하기 위한 염증 치료제로 흔하게 사용하는 비스테로이드성 소염제의 경우 부작용으로 위궤양, 대장궤양과 위장관 출혈 및 점막 손상 등의 위장관 질환이 보고되었으며[5,32], 나트륨 저류를 일으키고 신경색, 간질성 신염을 일으키는 등 신장질환도 보고된다[6,7,33]. 또한 스테로이드 계통의 약물도 항염증제로 널리 쓰이는데 골다공증이나 근병증을 유발할 수 있고 위장관, 심혈관계에 이상, 안질환과 피부과 질환, 내분비나 대사성 질환, 기분장애, 인지장애, 불안, 불면과 같은 신경성 질환 등 부작용이 광범위하게 발생한다[34].

연교와 금은화는 모두 감염성 열증에 상용하는 淸熱解毒藥으로 열증에 있어서 내외를 막론하고 相須작용을 한다[35]. 특히 부인과 질환에서 연교와 금은화는 함께 염증을 줄여주는 역할로 쓰인다. 연교와 금은화를 이용한 처방으로 만성 질염 환자의 증상을 개선시킨 증례가 있으며[30] 유선염 및 유방농양 환자를 치료한 증례가 보고 되었다[31]. 또한 유방암, 자궁경부암 환자의 상태 호전에도 쓰인 임상

사례도 보고 되었다[36].

따라서 본 연구에서는 같은 淸熱解毒藥으로서 부인과 염증 질환에 다용되는 연교와 금은화의 항염증 효능을 비교해 보고자 70% EtOH로 가열 추출한 연교 에탄올 추출물(이하 FVL)과 금은화 에탄올 추출물(이하 LJT)이 LPS로 유도된 Raw264.7 cell의 ROS, NO, PGE2, Cytokine생성과 COX-2, iNOS 및 염증 관련 전사조절인자들의 발현에 미치는 영향을 통하여 항염증 효능과 이에 대한 기전을 연구 관찰하였다.

먼저 실험에 앞서 FVL과 LJT의 Raw264.7 cell에 대한 세포독성을 알아보기 위해 WST assay를 이용해 세포 생존율을 관찰하였다. 그 결과 FVL는 모든 농도에서 세포의 생존율에 영향을 주지 않았으며 LJT는 100 μg/ml의 농도에서 세포생존율이 급감하였다(Fig. 3). 따라서 이후 실험은 FVL과 LJT 각 농도 1, 5, 50 μg/ml로 진행하였다.

FVL과 LJT의 항산화 효능을 알아보기 위해 FVL과 LJT의 radical 소거능을 측정한 결과 FVL과 LJT는 모두 radical 소거능의 농도의존적인 증가를 보였다(Fig. 4). 이어서 세포 내 ROS 측정 결과 LJT 1 μg/ml를 제외한 모든 FVL과 LJT군에서 LPS에 의한 ROS의 분비를 감소시킴을 관찰할 수 있었다(Fig. 5). 따라서 FVL과 LJT는 항산화 효능뿐 아니라 radical이 관여하는 염증 기전에 대해 억제 효과를 가진다는 것을 확인할 수 있었다.

다음으로 염증반응에 중추적 역할을 하는 PGE_2와 NO의 생성과 COX-2 mRNA와 iNOS mRNA 발현량에 대한 FVL과 LJT의 억제정도를 관찰하기 위한 실험을 진행하였다. PGE_2의 양을 측정한 결과 대조군에 비해 FVL과 LJT 처리를 한 모든 군에서 감소하는 경향을 보였으며(Fig. 6), 세포질 내의 COX-2의 mRNA 발현량을 조사한 결과 FVL과 LJT는 COX-2 유전자 발현량을 LJT 1 μg/ml을 제외한 모든 군에서 감소시키는 경향을 보였다(Fig. 8).

LPS 자극에 의해 생성되는 NO의 생성량을 측정한 결과 FVL 1, 5 μg/ml, LJT 1 μg/ml를 제외한 모든 군에서 유의하게 감소하였다(Fig. 7). 이어서 NO생성 억제 기작에 대해 iNOS의 관련성을 조사하기 위하여 세포질 내의 iNOS의 mRNA 발현량을 조사한 결과 iNOS 유전자 발현량은 50 μg/ml의 FVL과 LJT 에서만 유의한 감소를 보였다(Fig. 9).

이 실험으로 FVL과 LJT는 염증반응에서 COX-2 유전자 발현과 iNOS 유전자 발현을 감소시켜 PGE_2, NO의 생성을 각각 억제하였음을 확인하였다. 많은 비스테로이드성 항염증약물이 COX의 Prostaglandine 합성을 억제하거나 혹은 iNOS의 생성을 억제해 NO를 감소시켜 항염증 효능을 나타내는 것으로 보아[1,37] FVL과 LJT도 염증을 완화시키는 약물로써 기능할 수 있음을 확인하였다.

염증 초기에 급성염증반응을 유발하는데 핵심적인 역할을 하는 염증성 cytokine의 생성에 대해 FVL과 LJT가 미치는 영향을 알아보고자 FVL과 LJT 처리 군의 cytokine의 생성량를 측정하였더니 IL-1β의 경우 대조군에 비해 FVL과 LJT 1 μg/ml를 제외한 모든 군에서 감소하는 경향을 보였고(Fig. 10), IL-6의 생성량을 측정한 결과 모든 군에서 유의한 감소를 보였으며(Fig. 11), TNF-α의 경우 역시 모든 군에서 농도 의존적으로 유의하게 감소하였음을 관찰하였다(Fig. 12). 이를 통해 FVL과 LJT가 염증반응의

주요 매개물질인 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성에 억제작용을 가진다는 것을 확인할 수 있었다.

이어서 FVL과 LJT의 항염증 효능을 유전자적 수준에서 알아보고자 MAPK와 NF-κB 단백질 발현을 관찰하였다. 그 결과 ERK의 경우 모든 군에서 유의하게 감소하는 모습이 관찰되었고, JNK는 FVL과 LJT 1 μg/ml를 제외한 모든 군에서 감소하는 경향을 보였으며 p38은 FVL 1 μg/ml를 제외한 모든 군에서 농도 의존적인 유의한 감소를 관찰할 수 있었다(Fig. 13). IκBα는 FVL과 LJT 모든 군에서 생성량이 농도에 비례해 유의하게 증가하였고, NF-κB는 FVL과 LJT 모든 군에서 생성량이 농도가 증가할수록 유의하게 감소하였다(Fig. 13). 이는 단순히 FVL과 LJT가 비스테로이드성 소염진통제처럼 COX-2나 iNOS를 직접 억제하는 것이 아니라 유전자적 수준에서 단백질 합성을 억제하는 것임을 시사한다.

이상의 결과들을 가지고 FVL과 LJT의 항염증 효능을 종합하여 비교해볼 때, radical 소거능이나 ROS 및 COX-2, iNOS, NO 등 염증 매개물질에 있어서 대개 낮은 농도에서는 FVL이, 높은 농도에서는 LJT가 효율적인 항염증 효과를 나타낸다는 것을 알 수 있었고, PGE_2의 경우만 반대로 LJT가 낮은 농도에서, FVL이 높은 농도에서 효율적인 항염증 효과를 보였다. Cytokine의 경우 IL-1β는 FVL, LJT군 모두 비슷하게 감소했고, IL-6는 FVL가, TNF-α는 LJT의 항염증 효과가 더 뛰어났으며, ERK, JNK, p38, IκBα, NF-κB등 염증 전사조절인자에 있어서는 LJT가 FVL에 비해 효율적인 억제효과를 보였음을 관찰하였다.

본 연구결과를 바탕으로 항염증, 항산화 작용이 뛰어난 연교와 금은화를 방광염, 질염, 급만성 골반염, 유방의 염증성 질환, 자궁경부염과 같은 폭넓은 부인과 질환에 적극적으로 활용할 수 있을 것으로 사료되며 향후 자세한 항염증 기전의 검증과 심화된 실험연구를 통하여 다양한 질환에도 응용 가능할 것으로 사료된다.

V. 결 론

에탄올로 추출한 연교 에탄올 추출물(FVL), 금은화 에탄올 추출물(LJT)의 항염증 효과를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. FVL과 LJT는 DPPH radical 소거능을 농도 의존적으로 증가시켰다.
2. FVL과 LJT는 세포 내 ROS 생성량과 NO, PGE_2의 생성량을 대조군에 비해 유의하게 감소시켰다.
3. FVL과 LJT는 iNOS 유전자 발현량과 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성량을 대조군에 비해 유의하게 감소시켰다. COX-2 유전자 발현량은 LJT군에서만 유의한 감소를 보였다.
4. FVL과 LJT는 ERK, p38, NF-κB 단백질 발현량을 대조군에 비해 유의하게 감소시켰고 IκBα 단백질 발현량의 경우 대조군에 비해 유의하게 증가시켰다. JNK 단백질 발현량은 LJT에서만 유의적인 감소를 나타냈다.

□ Received : Jul 14, 2020
□ Revised : Jul 20, 2020
□ Accepted : Aug 28, 2020

References

1. Kang MJ, et al. General Pathology. 6th rev. ed. Seoul:Komoonsa. 2013:22-34.
2. Constanzo LS. Physiology. 4th rev. ed. Philadelphia, PA:Saunders Elsevier. 2010:77.
3. Parham P. The Immune System. 3rd rev. ed. New York, NY:Garland Science. 2009:8-12, 49-53, 243-4.
4. Male D, Brostoff J, Gray A. 2nd rev. Immunology. ed. London:Mosby. 1998 :61-9, 229-32.
5. Kim JW. Diagnosis and treatment of Helicobacter pylori infection in patients treated with non-steroidal anti-inflammatory drugs. Korean journal of internal medicine. 2008:75(5):496-502.
6. Yoon SH, et al. Renal Infarction after NSAID Treatment. The Korean journal of internal medicine. 2012:82(5):618-22.
7. Park MY, et al. A Case of Chronic Interstitial Nephritis Associated with Non-Steroidal Anti-inflammatory Drug. Journal of Soonchunhyang Medical Science. 2009:14(3):831-6.
8. Chu CK, et al. Research on Anti-inflammatory Effects of Forsythiae Fructus. The journal of internal Korean medicine. 2010:31(2):242-53.
9. Nam JB, et al. Effect of Forsythiae Fructus ethanol extract on inflammatory cytokine production and cellular signaling pathways in mouse macrophages. Korean Journal of Herbology. 2012:27(1):59-64.
10. Kang HS, Lee JY, Kim CJ. Anti-inflammatory activity of arctigenin from Forsythiae Fructus. Journal of Ethnopharmacology. 2007:116(2):305-12.
11. Kim MJ, et al. Skin Anti-aging Effect of Forsythia viridissima L. Extract. KSBB Journal. 2006:21(6):444-50.
12. Yang SJ, Choe TB. Antioxidant Activity and Whitening Effect of Forsythiae Fructus Extracts. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 2011:19(6) :472-7.
13. Jo MK, et al. Inhibitory Effect of the Methanol Extract of Fructus Forsythiae on the Melanogenesis. Korean Journal of Korean Medical Institute of Dermatology & Aesthetics. 2005:1(1):41-52.
14. Yu JS, et al. The Effects of Lonicerae Flos, Forsythiae Fluctus and *Hwangryunhaedok* Decoction Pharmacopuncture on Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice. Journal of Acupuncture Research. 2015:32(4) :119-31.
15. Lee DE, et al. Inhibition of Lipopolysaccharide -Inducible Nitric Oxide Synthase, TNF-α, IL-1β and COX-2 Expression by Flower and Whole Plant of Lonicera japonica. Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology. 2005:19(2):481-9.
16. Yun KJ, Lee EY. Effects of Hot Aqueous and Ethanol Extract from Lonicera japonica Flos on NO and PGE2 in Macrophage. Journal of Acupuncture Research. 2012:29(1):67-74.
17. Park KI, et al. Regulation of Proinflammatory Mediators via NF-κB and p38 MAPK-Dependent Mechanisms in

RAW 264.7 Macrophages by Polyphenol Components Isolated from Korea Lonicera japonica THUNB. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2012;2012:828521.
18. Suhr SS, Jung SK. Antiviral Effects of Fermented Lonicerae Flos on A Type Influenza Virus. The journal of internal Korean medicine. 2009;30(3):465-80.
19. Bae JH, Kim MS, Kang EH. Antimicrobial Effect of Lonicerae Flos Extracts on Food-borne Pathogens. Journal of Korean Society of Food Science and Technology. 2005;37(4):642-7.
20. Yu PY, et al. Effects of Hot Water Extracts from Lonicera Japonica Flos Extracts on whitening using B16F10 cell lines. The journal of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 201;30(2):38-50.
21. Ahn SH, Kim HH. Lonicera Japonica Inhibits Atopy Dermatitis in NC/Nga Mouse through Regulation of iNOS by NF- Suppression. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2010;24(2):278-83.
22. Lee YJ, Park JH, Roh SS. Effects on Rats with Reflux Esophagitis Treated with Lonicerae Flos Extract. Korean Journal of Oriental Physiology and Pathology. 2010;24(6):970-75.
23. Chag SJ, et al. Effect of Atractylodes Rhizoma Alba, Houttuyniae Herba, Lonicerae Flos, Scutellariae Radix and Coptidis Rhizoma Extracts Combined with Metformin on the Antioxidant and Adipocyte Differentiate Inhibition. Journal of Korean Medicine for Obesity Research. 2015;15(1):24-32.
24. Mok JY, et al. Synergic Anti-Pruritic and Anti-Inflammatory Effects of Scutellariae Radix plus Flos Loncerae Extracts in Rat Peritoneal Mast Cell and Chemical Antigen-Induced Mice. Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine. 2013;27(1):83-91.
25. Park HS. The Effects of Anti-cancer Response of Lonicerae Flos Herbal-acupuncture. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2005;22(5):91-7.
26. Kim JW, et al. Chemopreventive Potential of Lonicerae flos Aqua-Acupuncture Solution. Korean Journal of Pharmacognosy. 1999;30(3):261-8.
27. Zhang KH, Lee DN, Kim HJ. In vitro activities of Moutan Cortex Radicis, Caesalpiniae Lignum, Houttuyniae Herba, Forsythiae Fructus, Prunellae Herba, Scrophuiariae Radix against Gardnerella vaginalis. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2005;19(4):1016-21.
28. Lee LK, et al. An experimental study on the anti-inflammatory, anti-pruritic and anti-microbial effects of the three herbal prescription : Eunhwasagan-tang (EST), Sobokchukeo-tang (SCT), Wandae-tang (WDT). J Korean Obstet Gynecol. 2019;32(3):32-56
29. Lee LK, et al. A Clinical Report on Two Patients with Chronic Pelvic Inflammatory Disease. J Korean Obstet

Gynecol. 2018;31(3):109-20.
30. Yoo JE, et al. A Clinical study on 2 Cases of Recurrent VulvoVaginal Candidiasis. J Korean Obstet Gynecol. 2010;23(3):205-12.
31. Choi CM, Lee JD, Ryu SW. A case series on nonpuerperal mastitis and breast abscess. J Korean Obstet Gynecol. 2006;19(2):295-304.
32. Kim HJ, et al. Multiple Gastrointestinal Drug Induced Ulcers Associated with Aspirin and Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs: A Case Report and Review of the Literature. Clinical Endoscopy. 2009;39(6):379-83.
33. Kim GH, et al. Contributory Roles of Distal Renal Sodium Transporters inNSAID-induced Sodium Retention. Kidney Research and Clinical Practice. 2003;22(5):522-31.
34. Kim JM, Park SH. Risk and benefit of steroid therapy. Korean journal of internal medicine. 2009;77(3):298-303.
35. College of Oriental Medicine, Professor of Prescriptionology Cocompilation. Prescriptionology. 2nd rev. ed. Seoul: Yeongrimsa. 2012:83-4.
36. Yoo HS, et al. Case Study of Cancer Patients Treated with Herbal Acupuncture Therapy. Journal of Korean pharmacopuncture institute. 2004;7(1):27-36.
37. Lee EH. Synthesis and Biological Evaluation of 4-(3-Oxo-3-phenylpropyl) morpholin-4-ium chloride Analogues as an Inhibitor of Inducible Nitric Oxide Production in Lipopolysaccharide -Induced BV2 Cells. Collection of master's dissertations of Ajou University. 2012.