

丹蔘飲의 약리효능에 대한 연구

은재순*

우석대학교 약학대학

Study of Dansameum on the Pharmacological Effect

Jae Soon Eun*

Department of Pharmacy, Woosuk University

The purpose of this research was to investigate the pharmacological effects of Dansameum (DSE) water extract which is composed with *Salviae Radix*, *Santali Lignum* and *Amomi Semen*. DSE was administered orally at the concentration of 100 and 500 mg/kg. DSE decreased the writhing syndrome induced by acetic acid and the permeability of Evans blue into peritoneal cavity. Also, DSE inhibited the production of nitric oxide from murine macrophages. Furthermore, DSE protected the liver injury induced by galactosamine *in vitro* system and CCl_4 *in vivo* system. These results suggest that DSE has diverse effects such as analgesic action, inflammatory action and liver protective action.

Key words : Dansameum, writhing syndrome, galactosamine, CCl_4

서론

丹蔘飲은 단삼을 주약으로 단향과 사인을 좌사약으로 배합한 처방으로, 심통과 위완부의 제반 통증에 사용하며, 특히 부인에게 효능이 좋은 것으로 알려져 있고¹⁾, 또한, 간병이 오래 경과하여 어체증후(瘀滯證候)가 나타날 때 사용할 수 있는 처방이다²⁾. 구성 약재인 단삼은 간에 효능이 있을 뿐만 아니라³⁻⁵⁾, 항암⁶⁻⁸⁾ 및 항균작용⁹⁾이 있음이 보고되었으며, 단향은 기가 잘 흐르도록 하여 肝氣를 소통시켜 간병을 치료할 수 있으며¹⁰⁾, 사인은 울결을 풀어주어 간병을 치료할 수 있는 약제이다¹¹⁾. 본 연구자들은 기능성 식품 및 기능성 음료를 개발하기 위하여 일련의 실험을 진행하고 있으며, 단삼음은 이들 연구를 위하여 선택한 처방 중 하나이다. 본 실험에서는 단삼음의 약리 효능을 확인하기 위하여, 진통, 소염 및 간보호작용에 대한 실험을 실시한 결과 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물

* 교신저자 : 은재순, 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 약학대학

· E-mail : jseun@mail.woosuk.ac.kr, · Tel : 063-290-1569

· 접수 : 2010/09/07 · 수정 : 2010/09/30 · 채택 : 2010/10/08

본 실험에 사용한 생쥐는 대한실험동물(주)에서 ICR계 수컷 20 ± 2 g을 구입하여, 온도 20 ± 3 °C, 습도 50 ± 5%, dark/light 12시간의 조건하에서 1 주일 이상 실험실에 적응시킨 후 사용하였으며, 고형사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2. 시약 및 동물

실험에 사용한 시약 sodium salicylate, Evans blue, galactosamine, DMEM, RPMI1640 medium, lipopolysaccharide, γ -interferone, thioglycollate, sulfanilamide, MTT, penicillin-streptomycin, N-naphthylenediamine·HC는 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)에서, ALT 및 AST kit는 아산제약에서 구입하여 사용하였다.

3. 검액의 조제

본 실험에 사용한 각 약제는 시중 건재상에서 구입하여 엄선하여 사용하였으며, 구성은 醫學全書·時方歌括¹⁾에 의하였다. 처방 3첩 분량을 증류수 1,000 ml로 2회 가열 추출한 후, 여과하여 rotary evaporator로 여액을 농축한 다음, freeze dryer로 동결 건조하여 사용하였다(수득률 41.4%).

4. 진통작용 실험

생쥐 8마리를 1군으로 하여 acetic acid writhing법¹²⁾에 따라

대조군에는 생리식염수만을, 실험군에는 DSE 100 mg/kg 및 500 mg/kg을, 약물대조군에는 sodium salicylate 300 mg/kg을 각각 경구투여하고, 1시간 후에 0.7% acetic acid 10 ml/kg을 복강 내에 주사한 다음, 10분 후부터 10분간의 writhing syndrome의 횟수를 측정하였다.

5. 모세혈관 투과성 실험

생쥐 8마리를 1군으로 하여 Shimomura의 방법¹³⁾에 따라 대조군에는 생리식염수만을, 실험군에는 DSE 100 mg/kg 및 500 mg/kg을, 약물대조군에는 sodium salicylate 300 mg/kg을 경구투여 하였으며, 1시간 후에 1% evans blue 5 ml/kg을 꼬리정맥에 주사하였다. 주사 후 즉시 0.6% acetic acid 10 ml/kg을 복강 내에 주사하고, 1시간 후에 복강액을 생리식염수 5 ml로 세척하여 회수한 다음, 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상정액을 620 nm에서 흡광도를 측정하여 미리 작성한 검량선에 의해 누출된 evans blue의 양을 비색정량하였다.

6. 대식세포로부터 nitric oxide 생성량 측정

대식세포의 분리는 생쥐 복강에 3% thioglycollate 2 ml를 주입하고, 3일후에 경추탈골하여 도살시킨 다음, 복강에 cold PBS 10 ml를 넣어 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4°C에서 1,300 rpm으로 10 분간 원심분리하고 RPMI1640 배지로 2회 세척 후, 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO₂ incubator에서 배양시키고 2 시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 배지는 RPMI1640 배지에 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100 µg/ml)을 첨가하여 사용하였다. 분리한 대식세포를 24 well plate에 well당 2 × 10⁶ cells로 분주한 후, 각 well에 LPS 1 µg/ml와 γ-IFN 25 units/ml 및 DSE를 첨가하여 48 시간 배양한 후, 배양액 100 µl와 Griess 시약 (1 % sulfanilamide + 0.1 % N-naphthylendiamine·2HCl + 2.5 % H₃PO₄) 100 µl를 혼합하여 96 well plate에 넣고, 37°C에서 10 분간 방치한 후 570 nm에서 microplate-reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO₂의 검량선에 의해 NO₂⁻의 농도를 환산하였다¹⁴⁾.

6. Galactosamine에 의한 간손상 실험

Human normal liver cell-line인 Chang cell을 DMEM 배지에 10% FBS를 첨가한 배지를 이용하여 5 × 10⁴ cells/ml로 조제한 다음 96 well에 100 µl씩 분주하고, 24시간 배양하였다. 배양액을 교체한 후 30 mM galactosamine 50 µl와 DSE 50 µl를 처리하여 CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거한 후 0.04N isopropyl alcohol 100 µl와 MTT 20 µl를 첨가하여 4시간 후에 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다¹⁵⁻¹⁷⁾.

7. CCl₄에 의한 급성 간손상 실험

생쥐 8마리를 1군으로 대조군에는 생리식염수만을, 실험군에는 단삼음 엑스 100 mg/kg 및 500 mg/kg을 경구투여 하였다. 급성 간손상은 CCl₄ 0.5 ml를 olive oil 10 ml로 희석하여 생쥐 1 마리 당 0.25 ml를 복강에 주사하였다. 단삼음은 CCl₄ 투여 48시

간, 24시간, 2시간 전 및 투여 후 6시간 후에 경구투여 하였으며, CCl₄ 투여 24시간 후에 채혈하였다¹⁸⁾. 혈액을 3,000rpm으로 20분간 원심분리하여 serum을 분리한 다음, ALT 및 AST assay kit를 이용하여 Reitman-Trankel법으로 측정하였다¹⁹⁾.

8. 통계처리

모든 실험 결과들은 mean ± SE로 나타내었고 통계처리는 Student's t-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

Table 1. Prescription of Dansameum (DSE)

韓藥名	生藥名	重量(g)
丹 蔘	<i>Salviae Radix</i>	37.5
檀 香	<i>Santali Lignum</i>	3.75
砂 仁	<i>Amomi Semen</i>	3.75
總 量		45.0

결 과

1. DSE의 진통작용

대조군의 writhing syndrome 횟수는 28.3 ± 3.2회 이었으나, DSE 100 mg/kg 및 500 mg/kg을 각각 투여한 군은 16.5 ± 2.7회 및 13.1 ± 1.5회로, sod. salicylate 300 mg/kg을 투여한 군은 9.5 ± 1.2회로 대조군에 비해 감소하였다(Table 2).

Table 2. Effects of Dansameum (DSE) and sod. salicylate on acetic acid-induced writhing syndrome in 8mice

Samples	Dose (mg/kg, p.o.)	No. of writhing syndrome	Inhibition rate (%)
Control	-	28.3 ± 3.2	-
DSE	100	16.5 ± 2.7*	41.7
DSE	500	13.1 ± 1.5*	53.7
Sod. salicylate	300	9.5 ± 1.2*	66.0

The data represents the mean ± SE of 8 mice. *, Significantly different from control group (*; p<0.001).

2. DSE의 모세혈관투과성 억제작용

대조군의 evans blue 유출량은 12.8 ± 0.8 µg/ml 이었으나, DSE 100 mg/kg 및 500 mg/kg을 각각 투여한 군은 9.4 ± 0.5 및 7.5 ± 0.7 µg/ml로, sod. salicylate 300 mg/kg을 투여한 군은 5.3 ± 0.4 µg/ml로 대조군에 비해 감소하였다(Table 3).

Table 3. Effects of DSE and sod. salicylate on permeability of evans blue into peritoneal cavity in mice

Samples	Dose (mg/kg, p.o.)	Leakage of evans blue (µg/ml)	Inhibition rate (%)
Control	-	12.8 ± 0.8	-
DSE	100	9.4 ± 0.5*	26.6
DSE	500	7.5 ± 0.7***	41.4
Sod. salicylate	300	5.3 ± 0.4***	58.6

The data represents the mean ± SE of 8 mice. *, Significantly different from control group (*; p<0.05, ***; p<0.001).

3. DSE가 nitric oxide 생성에 미치는 효과

대조군의 대식세포에 LPS와 γ -IFN을 처리하지 않고 48 시간 배양하였을 때 nitric oxide (NO) 생성량은 대조군에 비해 LPS와 γ -IFN을 처리하였을 때 현저히 증가하였다. DSE를 각각 10, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하고 LPS와 γ -IFN을 처리하였을 때 NO 생성량은 50 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 대조군에 비해 NO 생성량이 감소하였다(Table 4).

Table 4. Effects of DSE on the production of nitric oxide from murine peritoneal macrophages

Samples	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	γ -IFN + LPS	Nitric oxide (μM)
Control	-	-	3.5 \pm 0.2
	-	+	58.6 \pm 2.5
DSE	10	+	56.7 \pm 2.1
	50	+	35.0 \pm 1.8***
	100	+	43.2 \pm 2.3***

Peritoneal macrophages (2×10^6 cells/ml) obtained after 2 hr adherence period were cultured for 48 hrs. in the presence or in the absence of γ -IFN + LPS. The production of nitric oxide was determined with a Griess reagent. The data represents the mean \pm SE of 3 experiments. *: Significantly different from γ -IFN + LPS treated control group (***: $p < 0.001$).

4. DSE가 galactosamine에 의한 간손상에 미치는 효과

Human normal liver cell-line인 Chang cell에 대한 대조군의 세포생존율을 100%로 하였을 때, galactosamine을 처리한 군은 세포생존율이 52.4 \pm 2.8%로 감소하였으나, DSE 10, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 군은 각각 53.7 \pm 2.0%, 58.5 \pm 2.1% 및 64.3 \pm 2.3%로 DSE 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 군에서 galactosamine을 처리한 군에 비해 세포생존율이 증가하였다(Table 5).

Table 5. Effects of DSE on the cell viability of galactosamine-induced Chang cells

Samples	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Galactosamine (30 mM)	Cell viability (%)
Control	-	-	100.0 \pm 1.1
	-	+	52.4 \pm 2.8
DSE	10	+	53.7 \pm 2.0
	50	+	58.5 \pm 2.1
	100	+	64.3 \pm 2.3*

The data represents the mean \pm SE of 3 experiments. *: Significantly different from galactosamine-treated control group (*: $p < 0.05$).

5. DSE가 CCl₄에 의한 간손상에 미치는 효과

CCl₄를 투여하지 않은 정상군의 ALT 및 AST 수치는 35.2 \pm 2.8 IU/L 및 27.8 \pm 2.5 IU/L 이었으나, CCl₄를 투여한 대조군에 비해 현저히 증가하였으며, DSE 100 mg/kg을 투여한 군은 대조군과 별 차이가 없었으나, 500 mg/kg 투여군에서 CCl₄ 투여군에 비해 ALT 및 AST 수치가 감소하였다(Table 6).

Table 6. Effects of DSE on the serum aminotransferase activities in the CCl₄-induced mice

Samples	Dose(mg/kg)	CCl ₄	ALT(IU/L)	AST(IU/L)
Normal	-	-	35.2 \pm 2.8	27.8 \pm 2.5
Control	-	+	1875.4 \pm 151.5	1327.3 \pm 125.7
	100	+	1725.9 \pm 142.3	1215.6 \pm 110.4
DSE	500	+	1435.7 \pm 121.7*	978.4 \pm 85.6**

The data represents the mean \pm SE of 8 mice. *: Significantly different from control group (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

고찰

丹蔘飲은 陳修園의 《醫學全書·時方歌括》에 심통과 위완부의 제반통증에 효과가 있으며, 심통과 제반 통증에 오묘한 효과가 있는 처방인데 단삼을 주약으로 하는 것은 당연하고, 단향과 사인을 좌사약으로 하는 것도 배합의 법도에 맞는 것이어서 복용해보면 누구나 그 효험이 뛰어나다는 것을 알 수 있다고 소개하였다¹⁾. 또한, 江克明은 협심증, 간병, 위병에 어체증후를 치료하는데 사용한다고 하였다²⁾. 따라서 단삼은 간병이 오래 경과하여 어체증후가 나타날 때 사용할 수 있는 처방이라 할 수 있다.

Acetic acid에 의해 유도되는 진통작용 실험에서 단삼은 100 mg/kg 및 500 mg/kg을 투여한 군은 writhing syndrome 횡수를 41.7% 및 53.7% 억제하였으며, 약물대조군인 sod. salicylate 투여군은 66.0% 억제하였다. 이는 단삼을 500 mg/kg이 sod. salicylate 300mg/kg 보다는 약하지만 강력한 진통작용을 가지고 있음을 의미하는 것이다.

Evans blue에 의한 모세혈관투과성 실험에서 단삼은 100 mg/kg 및 500 mg/kg을 투여한 군은 evans blue 유출을 26.6% 및 41.4% 억제하였으며, 약물대조군인 sod. salicylate 투여군은 58.6% 억제하였다. 이는 단삼이 모세혈관투과성을 억제하여 강력한 항염작용을 나타낼 수 있음을 시사하는 것이다.

염증이 시작될 때 내피 세포는 혈류로 염증을 유도하는 물질을 분비하는 세포의 유출(exocytosis) 과정을 활성화시키는데, NO는 N-ethylmaleimide-Sensitive Factor (NSF)를 차단하여 염증을 억제하는 것으로 알려져 있다²⁰⁾. 대식세포로부터 nitric oxide 생성에 미치는 효과를 관찰한 결과, 대조군에 LPS와 γ -IFN을 처리하였을 때 NO 생성량은 현저히 증가하였으며, 단삼을 각각 10, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하고 LPS와 γ -IFN을 처리하였을 때 NO 생성량은 50 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 대조군에 비해 NO 생성량이 감소하였다. 이 결과는 단삼이 NO 생성을 억제하여 항염작용을 나타낼 수 있음을 시사하는 것이다.

본 연구자는 단삼이 간보호작용이 있다는 사실을 이미 보고한 적이 있으며³⁾, 또한 단삼이 간섬유화 억제작용이 있다는 보고^{4,5)}가 있어, 단삼에도 간보호작용이 있을 것이라 추정되어 이를 확인하기 위하여 galactosamine 및 CCl₄로 간손상을 유도하여 실험하였다. CCl₄는 세포막의 지질과산화물을 일으켜 간독성을 유발하며²¹⁾, 2차적으로 kupffer cell을 활성화시켜 매개인자를 생성하는 것으로 알려져 있다²²⁾. 아미노산 전이효소는 세포질에 존재하며, ALT 및 AST 활성은 alcohol, 유기용매 및 기타 독소 등에 의해 간장애가 발생하면 혈중으로 유리되어 농도가 증가하므로 간독성의 지표로 사용하고 있다²³⁾. Human normal liver cell-line인 Chang cell에 galactosamine을 처리하였을 때 세포생존율은 현저히 감소하였으나, 단삼을 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 군에서 galactosamine 만을 처리한 군에 비해 세포생존율이 증가하였다. 이는 단삼이 *in vitro*에서 간세포 보호효과가 있음을 시사하는 것이다. 단삼이 *in vivo*에서도 간보호 효과가 있는지 확인하기 위하여 CCl₄로 간손상을 일으키고 단삼을 500 mg/kg 투여하였을 때 CCl₄ 투여군에 비해 ALT 및 AST 수치가 감소하였다. 이는

단삼음이 *in vivo*에서도 간 보호작용이 있음을 시사하는 것이다.

결 론

단삼음은 acetic acid에 의한 writhing syndrome 억제작용, evans blue의 모세혈관투과성 억제작용 및 galactosamine과 CCl₄에 의한 간 손상을 보호하는 작용이 있어, 진통, 항염 및 간 보호작용이 있는 탕제라 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 교육과학기술부(지역거점연구단육성사업/헬스케어기술개발사업단) 및 우석대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. 陳修園. 醫學全書·時方歌括. 北京, 中國中醫藥出版社, p 956, 2006.
2. 江克明 外. 簡明方劑辭典. 上海, 上海科學技術出版社, p 221, 1989.
3. Jae Soon Eun, Jong Pil Lim, Yi Kyu Park, Dong Seong Choi and Moon Seng Ahn. Hepatoprotective Activity of Salvia miltiorrhizae Radix Extract, 22(2):95-100, 1991.
4. Park, E.J., Zhao, Y.Z., Kim, Y.C., Sohn, D.H. Preventive effects of a purified extract isolated from Salvia miltiorrhiza enriched with tanshinone I, tanshinone IIA and cryptotanshinone on hepatocyte injury in vitro and in vivo. Food Chem. Toxicol., 47(11):2742-2748, 2009.
5. Chor, J.S., Yu, J., Chan, K.K., Go, Y.Y., Sung, J.J. Stephania tetrandra prevents and regresses liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. J. Gastroenterol. Hepatol., 24(5):853-859, 2009.
6. 손윤희, 조현정, 장현욱, 손건호, 남경수. 단삼 분획추출물의 암예방 효과, Journal of Life Science, 16(3):369-374, 2006.
7. 최선미, 최승훈, 안규석. Study on Antitumor and Apoptosis - Inducing Effects of Salviae miltiorrhizae Radix, 14(2):22-47, 2000.
8. Lee, W.Y., Cheung, C.C., Liu, K.W., Fung, K.P., Wong, J., Lai, P.B., Yeung, J.H. Cytotoxic effects of tanshinones from Salvia miltiorrhiza on doxorubicin-resistant human liver cancer cells. J. Nat. Prod., 73(5):854-859, 2010.
9. Cha Jae-Young, Ha Se-Eun, Sim Seon-Mi, Park Jong-Kun, Chung Yeon-Ok, Kim Hyun-Joong, Park Nou-Bog. Antimicrobial Effects of Ethanol Extracts of Korea Endemic Herb Plants, Journal of Life Science 18(2):228-233, 2008.
10. 김창민 外. 完譯 中藥大辭典, 서울, 도서출판 정담, p 866, 1999.
11. 김창민 外. 完譯 中藥大辭典 5권. 서울, 도서출판 정담, p

12. Whittle, B.A. The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics. Brit. J. Pharmacol. 22: 246-253, 1964.
13. Shimomura, K., Fukushima, T. A new method for the rapid determination of azovan blue leaked into the skin. J. Pharm. Pharmacol. 24(10):837-838, 1972.
14. Rockett, K.A., Awburn, M.M., Cowden, W.B. and Clark, I.A. Killing of Plasmodium faciparum in vitro by nitric oxide derivatives. Infec. Immunity, 59(9):3280, 1991.
15. Park, E.J., Zhao, Y.Z., Na, M., Bae, K., Kim, Y.H., Lee, B.H., Sohn, D.H. Protective effects of honokiol and magnolol on tertiary butyl hydroperoxide- or D-galactosamine-induced toxicity in rat primary hepatocytes. Planta Med. 69(1):33-37, 2003.
16. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. methods. 65: 55, 1983.
17. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr. A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. J. Immunol. methods. 129: 23, 1990.
18. Iga, T., Sugiyama, Y., Yokota, M., Tomono, Y., Awazu, S., Hanano, M. Pharmacokinetic aspects of sulfobromophthalein transport in chronically carbon tetrachloride-intoxicated rats. Biochem. Pharmacol., 26(20):1867-1875, 1977.
19. Reitman, S., Frankel, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. Am. J. Clin. Pathol., 28(1):56-63, 1957.
20. Matsushita, K., Morrell, C.N., Cambien, B., Yang, S.X., Yamakuchi, M., Bao, C., Hara, M.R., Quick, R.A., Cao, W., O'Rourke, B., Lowenstein, J.M., Pevsner, J., Wagner, D.D., Lowenstein, C.J. Nitric Oxide Regulates Exocytosis by S-Nitrosylation of N-ethylmaleimide-Sensitive Factor. Cell, 115(2):139-150, 2003.
21. Clawson, G.A. Mechanisms of carbon tetrachloride hepatotoxicity. Pathol. Immunopathol. Res., 8(2):104-112, 1989.
22. Ding, H., Huang, J.A., Tong, J., Yu, X., Yu, J.P. Influence of Kupffer cells on hepatic signal transduction as demonstrated by second messengers and nuclear transcription factors. World J. Gastroenterol., 9(11):2519-2522, 2003.
23. Cherkasov, V.S., Nemchenko, N.S. [Determination of the activity of blood serum alanine- and aspartate aminotransferases (ALT, AST) in various forms of hearing disorders]. Zh Ushn Nos Gorl Bolezn. (2):23-26, 1978.