

## 加味溫清飲 추출물이 항염증, 항산화 및 미백에 미치는 효과

최유진, 노정두\*

세명대학교 한의과대학 침구학과교실



### [Abstract]

#### Effects of *Gamioncheong*-decoction Water-extract on Anti-inflammation, Anti-oxidation and Skin Whitening

You Jin Choi and Jeong Du Roh\*

Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, Colloge of Korean Medicine, Semyung University

**Objectives** : This study was an analysis of the anti-inflammatory, anti-oxidative and skin whitening properties of *Gamioncheong*-decoction(GMOCD) extract.

**Methods** : GMOCD(96 g) and 2 L of distilled water were heated at 100°C for four hours and then concentrated, frozen, freeze-dried, dissolved in distilled water and filtered. The following analysis was completed: cell cytotoxic effect using MTT assay, oxidative products of NO by griess assay, concentration of prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) by commercially competitive enzyme immunoassay, and cytokines(IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ) by Bio-Plex<sup>®</sup> Suspension Array System's Bio-Plex Pro<sup>™</sup> mouse cytokine, chemokine, and growth factor assay. Anti-oxidative effect was measured using the DPPH method and skin whitening effect using tyrosinase inhibition assay.

**Results** : GMOCD water-extract did not show any toxicity at all doses and cell viability was more than 90 % at all doses. GMOCD water-extract significantly inhibited NO production at doses of 100, 200, 400  $\mu$ g/ml, significantly inhibited PGE<sub>2</sub> production at doses of 200 and 400  $\mu$ g/ml and reduced the LPS-induced IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  production in a dose-dependent manner. IL-1 $\beta$  production was significantly reduced at a dose of 400  $\mu$ g/ml and IL-6 production was significantly reduced at doses of 200 and 400  $\mu$ g/ml. DPPH free radical scavenging capability had a skin whitening effect rate of more than 50%. Tyrosinase inhibition activity was apparent in a dose-dependent manner.

**Conclusions** : This study suggests that GMOCD water-extract suppressed NO and PGE<sub>2</sub> production and inhibited cytokines(IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ). GMOCD also improved DPPH free radical scavenging capability. GMOCD water-extract increased tyrosinase inhibitory activity in a dose-dependent manner but this was not a statistically significant result.

#### Key words :

*Gamioncheong*-decoction,  
 Anti-inflammation;  
 Anti-oxidation;  
 Skin whitening

Received : 2015. 08. 18.

Revised : 2015. 09. 01.

Accepted : 2015. 09. 09.

On-line : 2015. 09. 20.

\* Corresponding author : Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, Jecheon Hospital of Traditional Korean Medicine, Semyung University, 65, Semyeong-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do, 27136, Republic of Korea  
 Tel : +82-43-649-1816 E-mail : wsrohmi@hanmail.net

## I. 서론

외부 활동의 증가와 환경 오염으로 인하여 피부는 자외선에 자주 노출된다. 피부가 지속적으로 자외선에 노출되면, 과잉의 활성산소가 형성되고 이들 활성산소종들은 피부 항산화 방어계를 붕괴시키며 피부 세포 및 조직의 손상과 세포 사멸을 초래하여 피부 광노화, 광산화가 촉진되고 색소침착이 생성되기도 한다.<sup>2)</sup> 최근까지도 광산화, 광노화의 치료에 도움을 줄 수 있는 항염증, 항산화, 미백 효과에 대해 蘆薈와 紫花地丁<sup>3)</sup>, 枸杞子<sup>4)</sup>·獨活<sup>5)</sup>·赤何首烏<sup>6)</sup>·黃連<sup>7)</sup>·鬱金<sup>8)</sup> 등의 약재와 升葛湯<sup>9)</sup>, 聖愈湯加減方<sup>10)</sup>, 蛇床子湯과 加味蛇床子湯<sup>11)</sup>, 調肝湯加減方<sup>12)</sup>, 奪命散<sup>13)</sup>, 五德丸과 四神丸<sup>14)</sup> 등의 처방이 연구되어 왔다.

溫清飲은 《萬病回春·血崩門》에 최초로 기재된 처방으로 四物湯과 黃連解毒湯을 합방하여<sup>15)</sup> 溫補養血하고 혈액순환을 촉진시켜 瘀血을 제거하고 清血熱하므로 각종 충혈성 염증에 사용된다<sup>16)</sup>.

矢數道明의 《漢方治療百話》에서는 《萬病回春》에 수록된 溫清飲을 바탕으로, 그 구성 약재의 용량을 달리하고 荊芥·連翹·薏苡仁을 추가한 加味溫清飲으로 피부질환에 활용하였다<sup>17)</sup>. 기존에 동일 처방으로 항알레르기 면역과 혈액응고의 효과<sup>18)</sup>에 관한 실험적 연구가 있었으나, 그 외의 다른 연구는 이루어지지 않은 상태이다.

본 연구에서는 諸血症에 주로 활용되던 溫清飲에 荊芥·連翹·薏苡仁을 더한 加味溫清飲이 피부질환에도 활용<sup>17)</sup>되는 것에 착안하여, 加味溫清飲 추출물을 대식세포에서 세포독성, NO, PGE<sub>2</sub>, IL, TNF- $\alpha$ , tyrosinase 및 DPPH free radical 등의 항목을 연구 분석하여 항염, 항산화 및 미백 효과 등에 대해 연구분석하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료 준비

본 실험에 사용한 加味溫清飲은 《漢方治療百話》<sup>17)</sup>에 근거하여 구성 약물을 (주) 휴맥스(HMAX, Korea)에서 구입하여 사용하였다(Table 1).

조제방법은 다음과 같다. 加味溫清飲 96 g을 3차 증류수 2 L와 혼합하여 100℃로 4시간 동안 열수 추출 하였으며, 여과지로 여과한 추출액을 rotary evaporator(EYELA, NE-1001, Japan)를 이용하여 100 ml 까지 농축하고 -80℃로

Table 1. The Amount and Composition of Gamioncheong-decoction

Herb medicine	Amount
<i>Angelica gigantis Radix</i>	12
<i>Rehmanniae Radix</i>	12
<i>Paeonia Radix</i>	9
<i>Cnidii Rhizoma</i>	9
<i>Scutellariae Radix</i>	9
<i>Coptidis Rhizoma</i>	6
<i>Phellodendri Cortex</i>	6
<i>Gardeniae Fructus</i>	6
<i>Schizonepetae Herba</i>	6
<i>Forsythial Fructus</i>	6
<i>Coicis Semen</i>	15
Total	96

동결하였다. 농축한 동결액을 freezing dryer system (Labconco, USA)으로 7일간 동결건조하였다. 최종적으로 19.21 g의 분말(수율: 20)을 얻었으며, 이를 3차 증류수에 용해시켜 0.80  $\mu$ m syringe filter와 0.20  $\mu$ m syringe filter로 필터링한 후 농도별로 제조하였다.

### 2. 세포 배양

대식세포 계열인 RAW 264.7 세포는 American Type Culture Collection(ATCC; Manassas, VA, USA)에서 구입하여 10 fetal bovine serum(FBS; Gibco, USA)과 penicillin 100 units/ml 과 streptomycin 100  $\mu$ g/ml이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM; Gibco, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37℃, 5 CO<sub>2</sub>의 조건에서 배양하였다.

### 3. 실험군 설정

대조군의 설정은 multiple target tracking(MTT) assay, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) method 및 tyrosinase inhibition assay 에서는 세포주에 별다른 처치를 하지 않는 군으로 설정하였고, griess assay, commercial competitive enzyme immunoassay 및 cytokine, chemokine, and growth factor assay에서는 lipopolysaccharide (LPS) 1  $\mu$ g/ml만 처리한 군으로 설정하였다.

실험군은 세포주에 加味溫清飲 추출물을 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$  농도별로 처리하였다.

- Control : group untreated with GMOCD
- 50 : group treated with GMOCD(50  $\mu\text{g/ml}$ )
- 100 : group treated with GMOCD(100  $\mu\text{g/ml}$ )
- 200 : group treated with GMOCD(200  $\mu\text{g/ml}$ )
- 400 : group treated with GMOCD(400  $\mu\text{g/ml}$ )

#### 4. 세포 독성

세포주를 샘플 처리 전  $1 \times 10^5$  cells/well의 농도로 96 well plate에 24시간 동안 배양하였다. 24시간 뒤 배지를 제거하고 L-glutamate가 결핍된 DMEM에서 다시 24시간 동안 배양시켰다. 여기에 加味溫清飲 추출물을 각각 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고 24시간 동안 배양한 뒤 multiple target tracking(MTT)(Sigma Aldrich, USA)를 10  $\mu\text{l}$  넣고 4시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 200  $\mu\text{l}$ 의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 넣고 충분히 교반한 뒤 이를 enzyme linked immunosorbent assay reader(ELISA reader, Finland)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 5. Nitric oxide(NO) 생성량 측정

RAW 264.7 세포를 10 FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여  $1 \times 10^5$  cells/well로 조절한 후 24 well plate에 접종하고, lipopolysacharride(LPS) 1  $\mu\text{g/ml}$ 와 加味溫清飲 추출물을 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$  농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양 상등액 100  $\mu\text{l}$ 와 Griess 시약 100  $\mu\text{l}$ 를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 microplate reader(Bio-TEK Instruments Inc Vermont, WI, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 sodium nitrite( $\text{NaNO}_2$ )를 기준으로 비교하였다.

#### 6. Prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 생성량 측정

PGE<sub>2</sub>의 측정은 commercial competitive enzyme immunoassay kit를 R&D systems(Minneapolis, USA)에서 구입하여 실험하였다. RAW 264.7 세포에 LPS 1  $\mu\text{g/ml}$

와 加味溫清飲 추출물을 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$  농도별로 처리하고 24시간 배양한 후 세포 배양액 상층을 수거하여 PGE<sub>2</sub> 측정에 사용하였다. 배양액을 goat anti-mouse로 coating된 96 well plate에 각각의 배양액을 100  $\mu\text{l}$ 씩 loading하였다. 여기에 primary antibody solution 50  $\mu\text{l}$ 와 PGE<sub>2</sub> conjugate 50  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 4°C에서 overnight 시켰다. 기질용액을 200  $\mu\text{l}$ 씩 처리하여 5~20 분간 반응시킨 후, 50  $\mu\text{l}$ 의 stop solution을 처리하고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 7. Cytokine 생성량 측정

96 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well의 cell을 100  $\mu\text{l}$ 씩 넣고 37°C, 5 CO<sub>2</sub>가 공급되는 배양기에서 24시간 동안 배양하여 세포를 안정화 시켰다. 안정화 시킨 세포에 LPS 1  $\mu\text{g/ml}$ 와 加味溫清飲 추출물을 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$  농도별로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 상층액을 채취하여 Bio-Plex® Suspension Array System(BIO-RAD, Hercules, California, USA)을 이용, Bio-Plex Pro™ mouse cytokine, chemokine, and growth factor assay(BIO-RAD, Hercules, California, USA)를 실시하여 interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6(IL-6) 및 tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 생성량을 측정하였다.

#### 8. DPPH Radical 소거능 측정

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 용액에 加味溫清飲 추출물을 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도별로 혼합하여 37°C에서 30분간 암실에서 반응시킨 후 microplate reader(Bio-tek Instruments Inc. Vermont, WI, USA)를 사용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 9. Tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase 효소 활성 저해 효과 측정은 0.1 M phosphate buffer(pH 6.8), 5 mM L-DOPA solution 및 加味溫清飲 추출물을 각각 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$  농도별로 혼합하여 tyrosinase(250 U/mL)를 첨가하여 25°C에 10분간 반응시킨 다음 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 10. 통계 분석

대조군과 각 실험군간 통계적 유의성을 분석하기 위하여 Student's *t*-test 를 사용하였다. 실험 결과의 자료처리는 SPSS 프로그램(ver. 12.0)을 이용하였고, 모든 결과는 각 실험군의 평균값 그리고 표준편차로 나타내었다. 유의수준은  $p < 0.05$ 로 설정하였다.

## III. 결 과

### 1. 세포주에 대한 독성 평가

加味溫清飲 추출물로 처리된 RAW 264.7 세포의 세포 생존율에서, 대조군의 세포 생존율은  $100.00 \pm 7.05$ 로 나타났다. 加味溫清飲 추출물의 실험한 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 1).

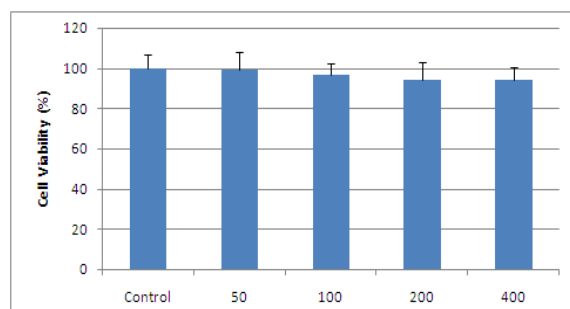


Fig. 1. This graph describes the cytotoxic effect of *Gamioncheong*-decoction(GMOCD) water-extract on RAW 264.7 macrophage cells by MTT assay

Control : Group untreated with GMOCD,  
 50 : group treated with GMOCD(50  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 100 : group treated with GMOCD(100  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 200 : group treated with GMOCD(200  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 400 : group treated with GMOCD(400  $\mu\text{g/ml}$ ).

### 2. NO 생성에 미치는 영향

1  $\mu\text{g/ml}$  농도의 LPS를 단독으로 처리한 대조군에서는  $100.00 \pm 4.63$ 으로 나타난 반면에, 加味溫清飲 추출물을 100, 200 및 400  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리한 군에서 대조군에 비하여 유의한 감소가 나타났다(Fig. 2).

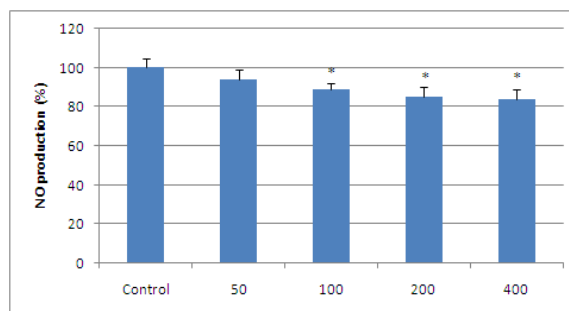


Fig. 2. This graph describes the NO production effect of *Gamioncheong*-decoction(GMOCD) water-extract on RAW 264.7 macrophage cells

Control : group treated with LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 50 : group treated with GMOCD(50  $\mu\text{g/ml}$ ) and LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 100 : group treated with GMOCD(100  $\mu\text{g/ml}$ ) and LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 200 : group treated with GMOCD(200  $\mu\text{g/ml}$ ) and LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 400 : group treated with GMOCD(400  $\mu\text{g/ml}$ ) and LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 \* : statistically significant difference from the control group as determined by the Student's *t*-test as  $p < 0.05$ .

### 3. PGE<sub>2</sub> 생성에 미치는 영향

대조군은  $100.00 \pm 4.12$ 로 나타나고, 加味溫清飲 추출물을 200 및 400  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리한 군에서 대조군에 비하여 유의한 감소가 나타났다(Fig 3).

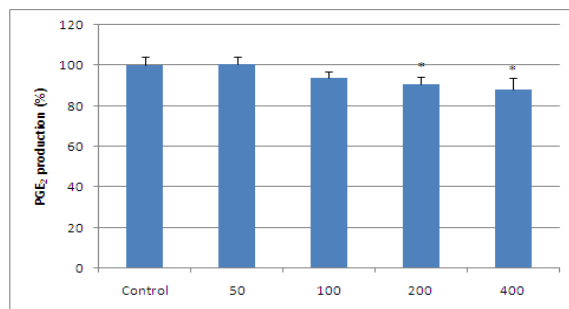


Fig. 3. This graph describes the prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) production effect of *Gamioncheong*-decoction(GMOCD) water-extract on RAW 264.7 macrophage cells

Control : group treated with LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 50 : group treated with GMOCD(50  $\mu\text{g/ml}$ ) and LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 100 : group treated with GMOCD(100  $\mu\text{g/ml}$ ) and LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 200 : group treated with GMOCD(200  $\mu\text{g/ml}$ ) and LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 400 : group treated with GMOCD(400  $\mu\text{g/ml}$ ) and LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 \* : statistically significant difference from the control group as determined by the Student's *t*-test as  $p < 0.05$ .

#### 4. IL-1 $\beta$ 생성에 미치는 영향

대조군이 100.00  $\pm$  8.82로 나타나고, 加味溫清飲 추출물을 400  $\mu\text{g/ml}$  처리한 군에서 대조군에 비하여 유의한 감소가 나타났다(Fig. 4).

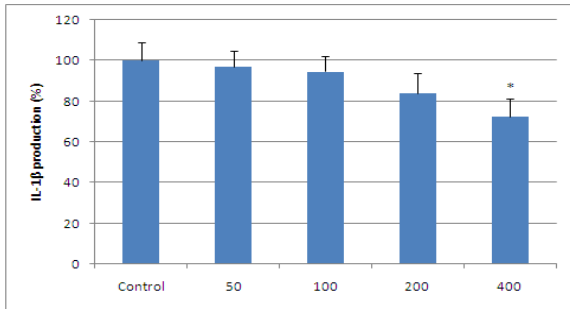


Fig. 4. This graph describes the interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) production effect of *Gamioncheong*-decoction(GMOCD) water-extract on RAW 264.7 macrophage cells

Control : group treated with LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 50 : group treated with GMOCD(50  $\mu\text{g/ml}$ ) and LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 100 : group treated with GMOCD(100  $\mu\text{g/ml}$ ) and LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 200 : group treated with GMOCD(200  $\mu\text{g/ml}$ ) and LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 400 : group treated with GMOCD(400  $\mu\text{g/ml}$ ) and LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 \* : statistically significant difference from the control group as determined by the Student's *t*-test as  $p < 0.05$ .

#### 5. IL-6 생성에 미치는 영향

대조군이 100.00  $\pm$  4.41로 나타나고, 加味溫清飲 추출물을 200  $\mu\text{g/ml}$  및 400  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리한 군에서 대조군에 비하여 유의한 감소가 나타났다(Fig. 5).

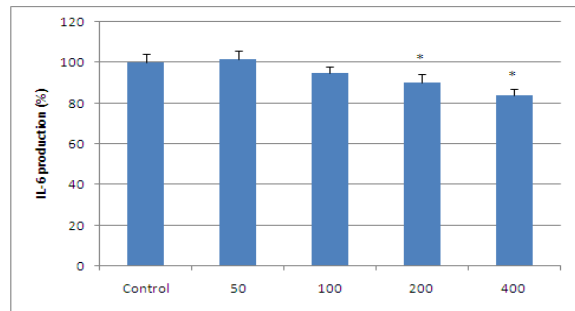


Fig. 5. This graph describes the interleukin 6(IL-6) production effect of *Gamioncheong*-decoction(GMOCD) water-extract on RAW 264.7 macrophage cells

Control : group treated with LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 50 : group treated with GMOCD(50  $\mu\text{g/ml}$ ) and LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 100 : group treated with GMOCD(100  $\mu\text{g/ml}$ ) and LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 200 : group treated with GMOCD(200  $\mu\text{g/ml}$ ) and LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 400 : group treated with GMOCD(400  $\mu\text{g/ml}$ ) and LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 \* : statistically significant difference from the control group as determined by the Student's *t*-test as  $p < 0.05$ .

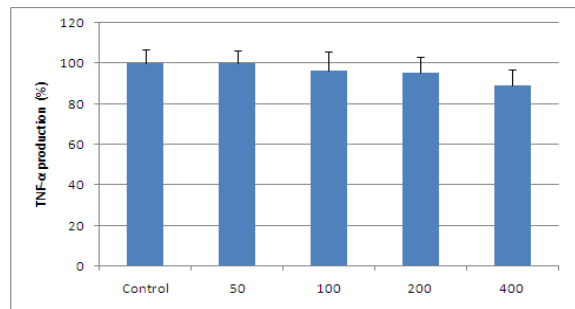


Fig. 6. This graph describes the tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) production effect of *Gamioncheong*-decoction(GMOCD) water-extract on RAW 264.7 macrophage cells

Control : group treated with LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 50 : group treated with GMOCD(50  $\mu\text{g/ml}$ ) and LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 100 : group treated with GMOCD(100  $\mu\text{g/ml}$ ) and LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 200 : group treated with GMOCD(200  $\mu\text{g/ml}$ ) and LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ ),  
 400 : group treated with GMOCD(400  $\mu\text{g/ml}$ ) and LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ ).

#### 6. TNF- $\alpha$ 생성에 미치는 영향

대조군이 100.00  $\pm$  6.97로 나타나고, 加味溫清飲 추출물로 처리한 모든 농도에서 대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소가 나타나지 않았다(Fig. 6).

50이 넘는 소거능을 보였다.(Fig. 7).

#### 7. DPPH Radical 소거능에 미치는 영향

加味溫清飲 추출물을 400  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리한 군에서

#### 8. Tyrosinase 생성에 미치는 영향

加味溫清飲 추출물을 각각 50, 100, 200 및 400  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 군은 농도의존적으로 tyrosinase 생성이 저해되었지만, 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 8).

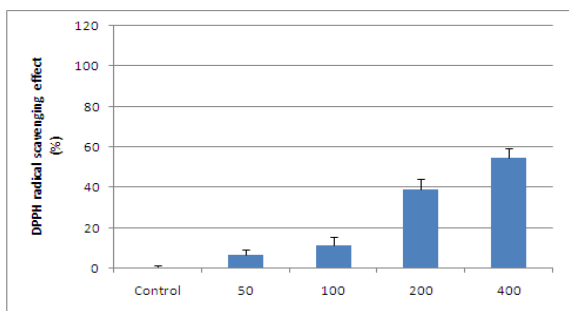


Fig. 7. This graph describes the DPPH radical scavenging effect of *Gamioncheong*-decoction (GMOCD) water-extract

Control : untreated group,  
 50 : group treated with GMOCD(50 µg/ml),  
 100 : group treated with GMOCD(100 µg/ml),  
 200 : group treated with GMOCD(200 µg/ml),  
 400 : group treated with GMOCD(400 µg/ml).

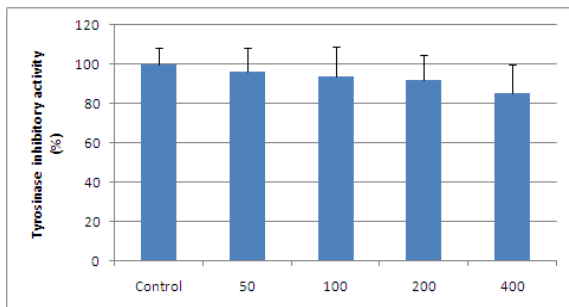


Fig. 8. This graph describes the tyrosinase inhibitory activities of *Gamioncheong*-decoction (GMOCD) water-extract

Control : untreated group,  
 50 : group treated with GMOCD(50 µg/ml),  
 100 : group treated with GMOCD(100 µg/ml),  
 200 : group treated with GMOCD(200 µg/ml),  
 400 : Group treated with GMOCD(400 µg/ml).

## IV. 고찰

溫清飲은 四物湯과 黃連解毒湯을 合方한 처방으로 《萬病回春》<sup>15)</sup>에 처음 수록되었으며, 婦人의 經水不住, 或如豆汁, 五色相雜, 面色萎黃, 臍腹刺痛, 寒熱往來, 崩漏不止를 주치로 한다. 기존에 溫清飲과 관련하여 베체트병<sup>19)</sup>, 전층 피부 손상<sup>20)</sup>, 아토피<sup>21)</sup> 등에 관한 보고가 있다.

加味溫清飲은 溫清飲에 荊芥·連翹·薏苡仁이 더해진 처방으로, 항알레르기 반응과 혈액응고에 미치는 영향<sup>18)</sup>이 보고되어 있으나 피부질환에 관한 연구가 미흡한 실정이다.

溫清飲에 加味하는 약재의 구성 방향에 따라 그 연구 방

향도 달라질 수 있는데, 구성약물을 고려해 보았을 때, 《漢方治療百話》<sup>20)</sup>에서 피부질환에 활용되는 溫清飲의 구성에 荊芥·連翹·薏苡仁을 더한 加味溫清飲으로 본 연구를 진행하였다.

加味溫清飲의 처방 구성에서 四物湯과 黃連解毒湯을 제외한 구성 약재인 荊芥·連翹·薏苡仁의 효능과 주치, 보고된 실험적 연구를 관찰해보면 荊芥는 祛風解表, 祛風止癢, 祛風透疹, 癩瘡, 止血의 효능이 있어 溫病發熱, 瘡癤腫毒, 熱毒血痢, 風濕熱痹, 각종 出血 병증 등을 치료하며<sup>22)</sup>, 실험적 연구로는 미백효과<sup>23)</sup>와 항산화 활성 및 tyrosinase 저해활성에 대한 원적외선 처리의 효과<sup>24)</sup> 등이 보고되고 있다. 連翹는 清熱解毒, 消腫散結의 효능이 있어 外感風熱, 溫病初起에 응용되고, 內癰外癰, 痰核, 癰癤, 喉痺, 血熱發斑, 高熱煩渴, 神昏發斑, 熱淋尿閉 등에 사용되며<sup>22)</sup>, 실험적 연구로는 항산화 활성 및 미백효과<sup>25)</sup>, 항노화 작용<sup>26)</sup> 등이 보고되어 있다. 그리고 薏苡仁은 健脾滲濕, 除痺止瀉, 清熱排膿의 효능이 있어 水腫脚氣, 小便不利, 濕痺拘攣, 脾虛泄瀉, 肺癰, 腸癰 등에 치료 효과가 있고<sup>22)</sup>, 실험적 연구로는 염증성 사이토카인 발현 및 조절에 관한 연구<sup>27,28)</sup> 등이 보고되어 있다. 荊芥·連翹·薏苡仁 모두 항염증에 대한 연구가 기본적으로 이루어져 있고, 다양한 피부질환에 응용되는 주치를 가지고 있어, 저자는 荊芥·連翹·薏苡仁이 溫清飲에 추가된 加味溫清飲 추출물로 농도별 항염증, 항산화 및 미백 효과에 관해 연구를 시행하였다.

자외선에 노출된 사람의 피부는 자외선으로 인해 활성산소 생성이 촉진되고, 과도한 생성으로 축적된 활성산소에 의해 피부노화가 일어난다<sup>29)</sup>. 활성산소는 외부로부터 침입한 바이러스나 세균으로부터 몸을 보호하는 역할을 하지만 체내에 그 수가 지나치게 많아지면 정상세포까지 공격하여 알레르기성 질환 및 염증 반응을 일으키며<sup>30)</sup>, 멜라닌 생합성과 멜라닌 세포의 증식을 유도하기도 한다<sup>31)</sup>.

염증은 생체 조직이 어떠한 원인에 의하여 손상을 받았을 때 이 손상을 국소화시키고 손상된 부위를 정상 상태로 되돌리려는 생체의 고도로 발달된 방어기전이다. 염증의 여러 가지 현상 사이에 개재하여 염증반응을 증대하는 물질인 화학적 매개체로는 활성산소, 산화질소(NO), 프로스타글란딘(PGE<sub>2</sub>), 염증을 유발시키는 여러 cytokine 등이 있다<sup>32)</sup>. 염증 반응 시 대식세포는 IL-1β, IL-6 및 TNF-α와 같은 cytokine을 생산하여 감염초기에 생체 방어에 중요한 역할을 하며<sup>33)</sup>, 이때 분비되는 NO 및 cytokine은 숙주에 치명적인 결과를 초래 할 수 있는 것으로 보고되어 있다<sup>34)</sup>.

NO는 염증의 발현과 해소에서 면역조절자의 역할을 하며, 중성구 및 대식세포에서 iNOS를 경유하여 발생한 대량

의 NO는 직간접적으로 많은 염증성 및 감염성 질환을 매개하여 유해한 작용을 나타낸다<sup>35)</sup>. 그러므로 NO 생성의 억제제는 항염작용과 연관성이 있음을 유추할 수 있다.

Arachidonic acid로부터 PGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>를 거쳐 생성되는 PGE<sub>2</sub>는 염증, 부종, 통증 및 발열 등의 증상을 일으키며, 염증 반응시 PGE<sub>2</sub>는 COX-2에 의해 생성되며 혈관을 확장시키고 혈관투과성을 증가시켜 백혈구의 염증 부위로의 화학주성을 증가시킨다<sup>36)</sup>.

Cytokine은 면역계와 염증에서 세포 사이의 신호전달을 담당하는 단백질로서 중요한 매개자 역할을 담당하며, 면역역과 염증에 관련된 여러 cytokine 중 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 cytokine으로 각종 염증질환의 발생과 진행에 중요한 작용을 하는 것으로 보고되어 있다<sup>37)</sup>. 염증관련 cytokine 중, IL-1 $\beta$ 는 monocyte, macrophage, B-cell, dendritic cell, 간세포 등에서 분비되며 TNF나 IL-6같은 다른 전염증성 cytokine의 분비를 활성화시킨다<sup>38)</sup>. IL-6는 면역 반응, 염증 및 조혈작용, 신경계에 관련된 다기능의 cytokine으로 과잉 생산 시 류마티스 관절염, systemic-onset juvenile idiopathic arthritis(SoJIA), Castleman's disease 등 염증성 질환이 발생한다<sup>39)</sup>. TNF는 중요한 cytokine의 하나로 패혈증, 암, 류마티스 관절염, 궤양성 대장염 및 크론씨병 등을 포함하는 다양한 종류의 질병 병태에서 병리학적인 원인<sup>40,41)</sup>으로 오랫동안 고려되어 왔다.

DPPH는 free radical로서 비교적 안정한 515~520 nm에서 최대 흡광도를 나타낸다. 이는 항산화활성이 있는 물질과 만나면 DPPH radical이 소멸되고 색깔이 탈색되는 성질로 인하여 항산화능 측정에 다용<sup>42)</sup>되어 본 실험에서도 DPPH를 이용하여 加味溫清飲 추출물의 농도에 따른 소거효과를 측정하였다.

Tyrosinase는 tyrosine이 melanin으로 전환되는 전 과정에 관여하는 효소로 melanin 합성에서 가장 중요한 요소이다. tyrosinase의 활성을 억제하면 피부 내에서 tyrosine이 melanin으로 전환되는 것을 효과적으로 차단할 수 있고 피부의 색소침착을 방지할 수도 있게 된다<sup>43)</sup>.

加味溫清飲 추출물의 RAW 264.7 대식세포에 대한 독성 여부를 MTT assay로 조사한 결과 50, 100, 200 과 400  $\mu\text{g/ml}$ 의 모든 농도에서 독성이 없는 것으로 확인할 수 있었다. 加味溫清飲 추출물의 모든 농도에서 세포 독성이 관찰되지 않았고, 본 실험에서의 가장 높은 농도인 400  $\mu\text{g/ml}$ 에서도 약 94 % 이상의 세포 생존율을 보여 차후 연구에 적정 농도를 설정할 시 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

염증 관련하여 NO, PGE<sub>2</sub>, cytokine(IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ )에 관하여 살펴보면, RAW 264.7 대식세포에서

LPS에 의한 NO생성의 영향을 조사한 결과 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리하였을 때 LPS 단독처리 한 군에 비해 통계학적으로 유의한 감소가 나타났다. 또한 加味溫清飲 추출물이 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 PGE<sub>2</sub>에 미치는 영향을 평가한 결과 200과 400  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 PGE<sub>2</sub>의 생성을 유의성 있게 감소시켰다. 염증 반응의 매개체인 NO, PGE<sub>2</sub>가 농도의존적으로 유의하게 감소하여 加味溫清飲 추출물이 염증반응을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

加味溫清飲 추출물이 cytokine 생성에 미치는 영향을 관찰한 결과, IL-1 $\beta$  생성에서는 400  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 LPS를 단독처리한 군에 비해 유의하게 감소하였고, IL-6 생성에서는 200과 400  $\mu\text{g/ml}$  군 농도에서 통계적으로 유의성 있게 감소하여 IL-1 $\beta$ 와 IL-6 모두 농도의존적인 결과를 관찰할 수 있었으나, TNF- $\alpha$  생성에서는 농도의존적인 감소는 관찰되었지만 유의성은 관찰되지 않았다.

이는 Lim et al<sup>18)</sup>이 보고한 Bechet 환자 단구세포 배양 혈액에서 溫清飲의 투여가 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 의 억제에 유의한 효과를 보였다는 결과와 유사하며 加味溫清飲 추출물도 염증 물질의 생성 억제 효과가 있음을 알 수 있었다.

加味溫清飲 추출물을 DPPH법으로 측정 시 소거 효과는 50, 100, 200 및 400  $\mu\text{g/ml}$ 의 모든 농도에서 항산화능이 농도의존적인 경향을 나타내었다. 특히 400  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 50이 넘는 소거능이 관찰되어 加味溫清飲 추출물이 항산화 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 가미온청음의 구성약물 중 連翹 추출물<sup>26)</sup>에서도 butylated hydroxy-anisole (BHA)보다 높은 소거능을 보였다.

加味溫清飲 추출물의 tyrosinase 저해 활성을 측정한 결과 50, 100, 200 및 400  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 농도의존적으로 감소되었으나 유의한 감소는 관찰되지 않았다. 加味溫清飲의 구성약물 중 荊芥 추출물의 실험<sup>23)</sup>에서 낮은 농도에서 tyrosinase 저해율을 보였으며, 連翹 추출물<sup>25)</sup>에서도 각각의 농도에서 tyrosinase 저해율을 보였지만, 단일약물과 복합처방이라는 차이와 본 실험과의 농도의 차이 등을 고려해 본 실험에서도 고농도에서의 실험이 차후 필요할 것으로 사료된다.

본 실험의 결과를 종합적으로 고려해 볼 때, 加味溫清飲 추출물은 본 실험의 모든 농도에서 세포 독성이 나타나지 않아 비교적 안전하게 사용할 수 있는 처방으로 생각되나, NO 생성 억제는 100  $\mu\text{g/ml}$  농도 이상에서, PGE<sub>2</sub> 생성 억제는 200  $\mu\text{g/ml}$  농도 이상에서 유의한 결과가 나타났으며, cytokine 생성 억제 시 IL-1 $\beta$ 에서는 400  $\mu\text{g/ml}$  농도에서, IL-6에서는 200  $\mu\text{g/ml}$  농도 이상에서, TNF- $\alpha$ 는 모든 농도에서 유의한 감소가 나타나지 않은 것으로 보아 세포독성이 나타나지 않는 고농도에서의 실험이 추가된다면, 비

교적 높은 농도에서도 안전하게 항염증에 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

DPPH free radical 소거능에서는 400  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 50 이상의 소거능이 관찰된 것으로 보아 보다 높은 항산화의 효과를 보기 위해서는 비교적 안전한 농도에서의 시료 처리가 필요한 것으로 사료되며, tyrosinase 저해효과는 대조군에 비해 유의한 효과가 나타나지 않았지만, 농도의존적인 모습이 보였다.

이상의 결과로 살펴보면 加味溫清飲 추출물이 항염증, 항산화 효과를 나타낼 수 있을 것으로 사료되나, 효과적이며 안전한 농도에 대한 실험이 필요한 것으로 생각된다. 미백 효과는 통계적 유의성은 없으나 농도의존적인 결과가 관찰되며 향후 이와 관련한 연구 및 임상적인 활용에 다각적인 고찰이 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

加味溫清飲 추출물로 대식세포에서 세포독성, NO, PGE<sub>2</sub>, IL, TNF- $\alpha$ , tyrosinase 및 DPPH free radical 등의 항목을 연구분석하여 항염증, 항산화, 미백에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 加味溫清飲 추출물의 세포 생존율은 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$  의 농도 모두에서 세포 독성이 나타나지 않았다.
2. NO 생성의 억제에는 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유의한 감소가 나타났다.
3. PGE<sub>2</sub> 생성의 억제에는 200과 400  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 유의한 감소가 나타났다.
4. IL-1 $\beta$  생성의 억제에는 400  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 유의한 감소가 나타났다.
5. IL-6 생성의 억제에는 200과 400  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 비해 유의한 감소가 나타났다.
6. TNF- $\alpha$  생성의 억제에는 농도의존적인 감소를 보였다.
7. DPPH free radical 소거능은 농도의존적인 경향을 보였다.
8. Tyrosinase 생성은 농도의존적인 감소가 나타났다.

이상으로 보아 加味溫清飲 추출액이 농도의존적으로 항산화, 항염증 효과를 나타나는 것으로 관찰되고, 미백 효과에 관해서는 위의 결과를 바탕으로 추후 발전적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## VI. References

1. Youn JI, Photomedicine, Seoul : Ryo Moon Gak, 1994 : 89-121.
2. Korean Dermatological Association, Dermatology, Seoul : Ryo Moon Gak, 2008 : 64, 623-9.
3. Kim CH, Jung HA, Roh SS, Hong SH, Effects of aloe and violae herba extract on the anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-wrinkle and whitening. The J of Korean Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2010 ; 23(1) : 23-43.
4. Choi JH, Choi JH, Park SH, Kim JH, Jung MY, Effects of lycii fructus extracts on skin elasticity and whitening using B16F10 cell lines. The J of Korean Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2014 ; 27(1) : 58-67.
5. Lee SG, Jo DJ, Chang HJ, Kang H, Antioxidant and anti-inflammatory activities of ethanol extracts from aralia continentalis Kitagawa, J Naturopath, 2015 ; 4(1) : 10-4.
6. Lee ES, Kim HJ, Yu JM et al, Anti-inflammatory effect of polygonum multiflorum extraction in activated RAW 264,7 cells with lipopolysaccharide. Korean J Food Preserv. 2014 ; 21(5) : 740-6.
7. Kim HK, Hong SU, The anti-inflammatory effects of *Huang-Lyun(Coptidis Rhizoma, CR)* on injured tissue after burn elicitation, J of Korean Medicine, 2011 ; 32(2) : 1-13.
8. Park EY, Hur SJ, Kim KY, Whang WK, Yang KS, Anti-oxidant and whitening effects of *Curcuma longa* L. Korean J of Aesthetic Society. 2010 ; 8(1) : 111-20.
9. Jun SK, Yoon HJ, Ko WS, Kim H, The anti-inflammatory effects of *Seunggaltang* in the BV2 cells, The J of Korean Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2006 ; 19(2) : 118-29.
10. Kim EI, Yoo DY, The experimental study on anti-oxidant and anti-inflammatory effect of *Sung-youtanggagambang(SYTG)*, The J of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2008 ; 21(4) : 69-89.
11. Choi JE, Park BK, Jin MR, Anti-inflammatory



- and antioxidant effects of water extracts of *Sasangja-tang*(SSJ) and *Gami-sasangja-tang* (GSJ). The J of Daejeon University Korean Medicine Institute, 2015 ; 23(2) : 5-13.
12. Byun HK, Yoo DY. The experimental study on anti-oxidant and anti-inflammatory effect of *Jogantanggagambang*(JGTG). The J of Oriental Obstetrics & Gynecology, 2008 ; 21(2) : 76-96.
  13. Cho HJ, Park SD. Anti-oxidative and anti-inflammatory experiments of *Talmyung-san* in RAW264.7 cells. The J of HFS, 2014 ; 22(1) : 79-92.
  14. Kim TH, Cho HJ, Park SD. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Odukhwan* and *Sasinhwan* in RAW264.7 cells. The J of HFS, 2012 ; 20(2) : 65-82.
  15. Gong JH. *Man Byung Hoe Chun*. Taipei : Chinese Publishing Company, 1967 : 83.
  16. Park SS, Yeom TH. Modern oriental medicine lecture. Seoul : Hanglim Media, 1979 : 185-6, 204, 507, 518.
  17. Domei Yakazu. Otrinerat treatment encyclopedia. Seoul : Dongnam Publishing Company, 1984 : 144-8, 154-6, 270-93, 351-62, 524-8.
  18. Bum HB, Chae BY. Effects of *Onchung-eum* and *Gamionchung-eum* on the anti-allergic response and blood coagulation. The J of Kyung Hee University Medical Center, 1990 ; 6(4) : 490-9.
  19. Lim HJ, Hwang CY, Chiang HC, Kim NK, Kwon IH. Inhibitory effects of *Onchung-eum* on cytokine production from phytohaemagglutinin-stimulated peripheral blood mononuclear cells of healthy patients. Korean J of Oriental Physiology & Pathology, 2002 ; 16(4) : 768-73.
  20. Kim BH, Lee HW, Sohn NW, Park DI. Angiogenic effect of *Onchung-eum* on full-thickness skin wound in rats. Korean J of Oriental Preventive Korean Medicine, 2010 ; 14(1) : 97-110.
  21. Hong CH, Seo ES, Weon YH, Kim YG, Hwang CY. Effects of *Onchung-eum* administration along with *Samhwangseze-gamibang* on treatment atopic dermatitis development in NC/Nga mice. Korean J of Oriental Physiology & Pathology, 2007 ; 21(3) : 679-87.
  22. Korean Medicine Univ Herbology Prof Coeditorship. Herbology. Seoul : Younggrimsa, 2005 : 159-60, 244-5, 352-3.
  23. Hwang EY, Kim DH, Hwang JY et al. A study on the depigmenting effect of carthamus tinctorius seed, cyperus rotundus and schizonepeta tenuifolia extracts. Korean J Food Sci Technol, 2012 ; 44(1) : 76-81.
  24. Yang HY, Baek AM, Lim YT, Park AH, Lee JH, Lee SC. Effects of far-Infrared irradiation on the antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of extracts from schizonepeta tenuifolia. J Korean Soc Food Sci Nutr, 2013 ; 42(9) : 1357-62.
  25. Yang SJ, Choe TB. Antioxidant activity and whitening effect of forsythiae fructus extracts. KJMCS, 2011 ; 19(6) : 472-7.
  26. Kim MJ, Kim JY, Jung TK, Choi SW, Yoon KS. Skin anti-aging effect of *Forsythia viridissima* L. extract. KSBB Journal, 2006 ; 21(6) : 444-50.
  27. Yun HJ, Lee YJ, Kang MS, Baek JH. Inhibitory effect of *Coicis Semen Extract*(CSE) on pro-inflammatory mediatory. jkop, 2009 ; 23(1) : 159-71.
  28. Lee SJ, Kim YB. The effects of *Coicis Semen Extract* on blood serum cytokine of allergic rhinitis mice model. The J of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology, 2013 ; 26(2) : 58-67.
  29. Chen JS, Wei CI, Marshall MR. Inhibition mechanism of Kojic acid on polyphenol oxidase. J Agric Food Chem, 1991 ; 39(11) : 1897-901.
  30. Dunstan JA, Breckler L, Hale J et al. Associations between antioxidant status, markers of oxidative stress and immune responses in allergic adults. Clin Exp Allergy, 2006 ; 36(8) : 993-1000.
  31. Yasui H, Sakurai H. Age-dependent generation of reactive oxygen species in the skin of live hairless rats exposed to UVA light. Exp Dermatol, 2003 ; 12(5) : 655-61.
  32. The Korean Society of Pathologists. Pathology. Seoul : Komoonso, 1995 : 71-104.
  33. Lee YS, Kim HS, Kim SK, Kim SD. IL-6 mRNA expression in mouse peritoneal macrophages and NIH3T3 fibroblasts in response to candida

- albicans. *J Microbiol Biotechnol*. 2000 ; 10(1) : 8–15.
34. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1996 ; 211(1) : 24–32.
35. Kobayashi Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *J Leukoc Biol*. 2010 ; 88(6) : 1157–62.
36. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1992 ; 6(12) : 3051–64.
37. Toshio Hirano, *Cytokine molecular biology*. Seoul : World Science. 2002 : 73–85.
38. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Production of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin 1- $\beta$ , interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance. *Neuro-peptides*. 2003 ; 37(6) : 355–61.
39. Nishimoto N. Interleukin-6 as a therapeutic target in candidate inflammatory diseases. *Clin Pharmacol Ther*. 2010 ; 87(4) : 483–7.
40. Felson DT, Anderson JJ, Boers M et al. American College of Rheumatology Preliminary definition of improvement in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995 ; 38(6) : 727–35.
41. Baumgart DC. The diagnosis and treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Deutsches Arzteblatt International*. 2009 ; 106(8) : 123–33.
42. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958 ; 181(4617) : 1199–200.
43. Hearing VJ, Ekel TM. Mammalian tyrosinase: a comparison of tyrosinase hydroxylation and melanin formation. *Biochemical Journal*. 1976 ; 157(3) : 549–57.