

加味生脈散 및 개별약재의 항산화 및 항염증 효능에 대한 비교 연구

지중구*

중부대학교 한방건강관리학과

Anti-Oxidative and Anti-inflammatory Effect of Combined Extract and Individual Extract of GamiSaengmaeksan

Joong-Gu Ji*

Dept. of Oriental Health care, Joongbu University

ABSTRACT

Objectives : The aim of this study is to investigate the various effects of individual or combined extract of GamiSaengmaeksan (GSS) on cell viability, anti-inflammatory and antioxidant activity

Methods : In order to evaluate cytotoxicity, MTT assay was performed. We investigated the levels of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-6 and interleukin (IL)-1 β , and nitric oxide(NO) in LPS-induced RAW 264,7 cells to check the effects on anti-inflammatory activity. The level of NO production in RAW 264,7 cells was measured by using Griess reagent. The levels of cytokines and ROS were measured by Luminex and Flow cytometry, respectively.

Results : At concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GSS, cytotoxicity was observed in RAW 264,7 cells. However, at concentration less than 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of both combine and individual GSS, cytotoxicity was not observed in Raw 264,7 cells. However, the level of ROS in RAW 264,7 cells were decreased at both extract of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GSS. Also, the level of NO in RAW 264,7 cells were decreased from extraction of concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in GSS and individual-extraction of Liriopis Tuber, White Ginseng and Glycyrrhizae Radix. In addition, productions of pro-inflammatory cytokines (TNF- α) in LPS-induced RAW 264,7 cells were decreased from extraction of concentration of 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) in GSS and individual-extraction of Liriopis Tuber.

Conclusions : It is concluded that combined extract of GSS appears to be more effective in anti-oxidation and anti-inflammatory effect than those in individual-extraction of GSS. These results may be developed as a raw material for new therapeutics to ease the symptoms related with inflammatory and oxidative stress.

Key words : anti-oxidation, anti-inflammatory, cytokine, GamiSaengmaeksan, Reactive oxygen species

서론

염증반응은 생체나 조직에서 물리적 작용이나, 세균감염, 화학적 물질 등의 다양한 감염원에 대한 생체 반응으로서, 조직의 혈관확장에 의한 발열과 부종, 조직손상, 세포증식 등을 특징으로 한다^{1,2)}. 인체에서 염증은 가벼운 물리적 손상과 같이 경미하게 나타나기도 하지만, 비정상적으로 과도한 염증반응이 유도되면, 대식세포는 외부에서 이물질이나 바이러스, 병원 미생물 등이 침입할 경우, 생체 방어를 보다 효과적으로 수행하기 위해 반응성이 높은 독성 물질인 활성산소 (ROS)를

생산하게 되고 그 결과, 영구적인 유전자의 변형이 야기되어 다양한 질환들이 나타나게 되는데, 피부질환, 급성 용혈성 빈혈, 기관지 천식 등의 알러지질환을 비롯하여 노화로 인한 파킨슨 질환, 노인성 치매, 암, 당뇨, 고혈압 및 동맥경화, 류마티스 관절염과 같은 만성 염증성질환이 발생하게 된다. Liang³⁾ 등은 연구를 통해 항산화제에 의해 산화적 스트레스가 차단될 경우 염증반응이 효과적으로 억제된다고 밝혀내었다. 따라서 염증과 활성산소는 상호작용을 하며, 항산화제를 통한 산화적 스트레스의 감소는 염증성 질환의 치료와 개선에 도움을 줄 수 있다.

*Corresponding author : Joong-Gu Ji, Dept. of Oriental Health care, Joongbu University
· Tel : +82-41-750-6258 · Fax : +82-41-750-6396 · E-mail : jjg1970@jbm.ac.kr
· Received : 14 December 2015 · Revised : 06 January 2016 · Accepted : 11 January 2016

生脈散은 金代 李東垣의 《內外傷辨惑論》⁴⁾에 "夏月宜補者 補天真元氣非補熱火 夏食寒者是也. 故以人蔘之甘 補氣 麥門冬 苦寒 瀉熱補水之源 五味子之酸 清肅燥金, 名曰生脈散. 孫真人云 五月常服 五味子 以補五臟之氣 亦此意也"라 기록된 이래 暑熱에 상하여 땀이 줄줄 흐르며 목이 마르고 몸이 나른하고 맥이 약한 증상이 나타나거나, 肺虛로 인해 마른 기침을 하며, 호흡이 짧고, 땀이 줄줄 흐르는 증상을 치료하는데 활용되어 왔다⁵⁾. 生脈散에 대한 연구로는 이⁶⁾ 등이 스포츠음료로서 운동수행능력 향상을 보고하였으며, 김⁷⁾ 등은 生脈散의 항산화 효과, 박⁸⁾과 김⁹⁾ 등은 피로회복 효과 등을 보고하였고, 최근에는 김¹⁰⁾과 문¹¹⁾ 등이 한의학의 肺主皮毛 이론에 근거하여 補肺氣虛나 清熱生津의 효능이 있는 生脈散의 피부 질환에 대한 항염증 효과를 보고하였다.

이에 본 연구에서는 김⁷⁾과 문¹¹⁾ 등의 연구결과에 착안하여 보다 유의적인 항염증 및 항산화제로서의 개발을 위하여 임상에서 消炎, 祛痰 작용이 있는 甘草와 桔梗을 가미한 加味生脈散과 개별약재를 열수 추출 한 후 세포독성, DPPH 라디칼 소거능, ROS 생성량, NO 생성량, Cytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α) 등의 항산화 및 항염증 효능을 비교하여 임상에서의 활용성 제고와 더불어 보다 효과적이고 안전한 치료제 개발을 위한 기초적 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 기기

사용된 시약은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM : Gibco BRL Co., U.S.A.), 우태아혈청 (fetal bovine serum: FBS, Invitrogen Co., U.S.A.), lipopolysaccharide (LPS : Sigma Co., U.S.A.), cell viability assay kit (Daeillab sevice, Korea), penicillin (Hyclone, Co., U.S.A.), nitric oxide detection kit (Intron Biotechnology, Korea), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH : Sigma Co., U.S.A.), (2,7)-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA : Sigma Co., U.S.A.), mouse cytokine milliplex map immunoassay kit (Millipore Co., U.S.A.)을 사용하였으며, 기기는 rotary vacuum evaporator (Büchi B-480 Co., Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), spectrophotometer (Shimadzu Co., Japan), ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A.), 유세포 분석기 (Flow cytometer, Becton Dickinson, Co., U.S.A.), Luminex (Millipore Co., U.S.A.) 등을 사용하였다.

2. 시료

加味生脈散 (GamiSaengmaeksan 이하, GSS)은 五味子 (Schisandrae Fructus 이하, SF), 麥門冬 (Liriodopsis Tuber 이하, LT), 白蔘 (White Ginseng 이하, WG), 甘草 (Glycyrrhizae Radix et Rhizoma 이하, GRR), 桔梗 (Platycodi Radix 이하, PR)은 (주)음니허브 (Korea)에서 구입하였다. GSS는 개별 약재 각 50g씩 총 250g에 DW 3.75 L, 개별약재는 각 50g씩에 DW 750 ml을 넣고 97℃에서 10시간 동안 환류 추출 후 여과액을 얻었으며, 얻어진 여과액을 rotary vacuum

evaporator에서 감압 농축하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 분말로 얻었다. 얻어진 분말은 초저온 냉동고(-80℃)에서 보관하면서 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

3. DPPH 라디칼 소거능 측정

GSS는 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$)의 농도와 개별약재 추출물은 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 희석시켜 에탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 150 μl 와 GSS와 개별약재 추출물을 각각 100 μl 씩 혼합하여 37℃에서 30분간 반응 시켰다. 반응 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료액의 대조군은 증류수를 넣었으며, DPPH 용액의 대조군으로써 에탄올을 넣어 보정값을 얻었다. DPPH 라디칼 소거율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{소거율(\%)} = \frac{(\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도})}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

4. 세포 배양

실험에 사용된 RAW 264.7 세포는 한국 세포주 은행에서 구입하였다. 동결된 RAW 264.7 세포를 50 ml 튜브에 옮기고 PBS 9 ml을 넣어 세포를 부유시킨 뒤 1,200 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 제거하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin으로 조성된 DMEM 배지 1 ml을 넣어 부유시켜 세포배양기 (37℃, 5% CO₂)에서 배양하였다. 계대배양 횟수는 5회 이상으로 하였고, 시료들을 처리하기 전에 24시간을 적응시켰다.

5. 세포독성 측정

RAW 264.7 세포는 96 well plate에 1.5 × 10⁵ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 새로운 배양액으로 교체한 후 GSS는 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$)의 농도와 개별약재 추출물은 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양 하였다. 배양 후 10 μl 의 WST solution을 첨가하여 세포배양기 (37℃, 5% CO₂)에서 30분간 반응 시켰다. 반응 후 450 nm에서 ELISA reader기를 이용하여 흡광도의 변화를 측정 한 후 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시 하였다.

6. 세포 내 Reactive oxygen species (ROS) 생성 측정

세포 내 reactive oxygen species (ROS)를 측정하기 위하여 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 이용하였다. 12 well plate에 RAW 264.7 세포를 2 × 10⁵ cells/well이 되게 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였으며, GSS는 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$)의 농도와 개별약재 추출물은 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에 LPS를 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후, 다시 24시간 동안 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양 후, 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 모든 세포를 차가운 PBS로 2회 세척하고, DCF-DA는 10 μM 이 되도록 첨가하여 15분 동안 암소, 상온

에 두었다. 염색 후 차가운 PBS를 넣어 1,200 rpm에서 5분간 원심분리 한 다음 상청액을 제거하고 다시 PBS 400 μ l를 부유시켜 유세포 분석기를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 변화를 분석하였다.

7. Nitric oxide(NO) 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitric oxide 농도를 griess reagent system을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 한 후 새로운 배양액으로 교체 하였고 GSS는 1, 10, 100 (μ g/ml)의 농도와 개별추출물은 100 μ g/ml의 농도에 LPS를 1 μ g/ml의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. N1 buffer와 N2 buffer를 각각 10분간 반응 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite standard의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

8. 세포 내 cytokine 측정

12 well plate에 RAW 264.7 세포를 2×10^5 cells/well이 되게 분주하여 24시간 동안 배양 후 새로운 배양액으로 교체 하였고, GSS는 1, 10, 100 (μ g/ml)의 농도와 개별추출물은 100 μ g/ml의 농도에 LPS를 1 μ g/ml의 농도로 처리한 후 다시 24시간 동안 세포배양기 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)에서 배양하였다. 원심분리 후 상청액으로 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 luminex 기기로 측정하였다.

9. 통계처리

실험 결과는 실험 결과는 SPSS 11.0의 unpaired student's T-test 및 ANOVA를 사용하여 통계처리 하였으며 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 세포 독성

GSS의 RAW 264.7 세포 내 독성을 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 6.5\%$ 로 나타냈을 때, 1, 10, 100, 200 (μ g/ml) 농도에서 $114.4 \pm 9.4\%$, $115.2 \pm 8.4\%$, $103.3 \pm 7.4\%$, $79.1 \pm 5.5\%$ 의 세포 생존율을 나타내어 200 μ g/ml의 농도에서 독성이 나타나 100 μ g/ml의 농도까지 실험을 진행하였다(Fig. 1A). 또한, GSS를 구성하는 개별약재 추출물의 100 μ g/ml 농도에서 SF, LT, WG, GRR, PR은 대조군을 $100.0 \pm 6.5\%$ 로 나타냈을 때, 각각 $120.7 \pm 3.3\%$, $119.5 \pm 1.7\%$, $106.2 \pm 2.2\%$, $102.5 \pm 4.4\%$, $115.4 \pm 3.7\%$ 의 세포 생존율을 나타내어 100 μ g/ml 농도의 개별약재 추출물은 안전한 것으로 나타났다(Fig. 1B).

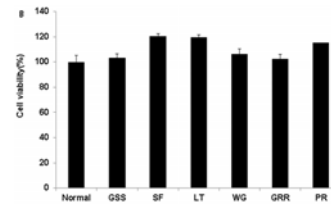
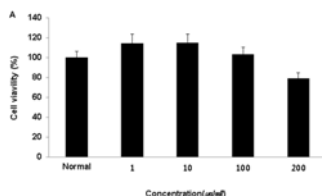


Fig. 1. Effects of GSS and individual -extraction of GSS on the cell viability in RAW 264.7 cells.

Cell viability was determined using the WST assay. The results are expressed as mean \pm SD from three independent experiments. A; Cells were treated with 1, 10, 100 (μ g/ml) of GSS for 24hr. B; Cells were treated with 100 μ g/ml of individual-extraction of GSS for 24hr.

2. DPPH 라디칼 소거능에 미치는 영향

GSS의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과, 1, 10, 100 (μ g/ml) 농도에서 $19.5 \pm 1.1\%$, $25.1 \pm 0.5\%$, $54.4 \pm 3.4\%$ 로 나타나 농도 의존적인 라디칼 소거능을 나타냈다(Fig. 2A). 또한, GSS를 구성하는 개별 약재 추출물의 100 μ g/ml 농도에서 SF, LT, WG, GRR, PR은 각각 $41.5 \pm 2.6\%$, $50.5 \pm 5.1\%$, $32.2 \pm 3.1\%$, $39.8 \pm 5.3\%$, $46.6 \pm 3.1\%$, $30.5 \pm 0.6\%$ 의 라디칼 소거능을 나타냈다(Fig. 2B).

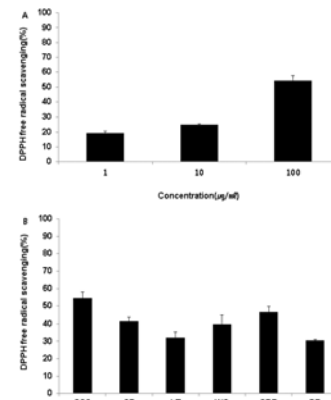


Fig. 2. Effect of GSS and individual -extraction of GSS on DPPH free radical scavenging activity.

Activities were determined by measurement of absorbance at 517 nm. The results were expressed as mean \pm S.D from three independent experiments. A; Concentration is 1, 10, 100 (μ g/ml) of GSS. B; Concentration is 100 μ g/ml of individual-extraction of GSS.

3. ROS 생성량에 미치는 영향

GSS의 RAW 264.7 세포 내 ROS 생성량을 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 1.0\%$ 로 나타냈을 때, 1, 10, 100 (μ g/ml) 농도에서 $98.7 \pm 0.9\%$, $95.3 \pm 7.5\%$, $60.2 \pm 5.9\%$ 로 나타나 대조군에 비하여 100 μ g/ml 농도에서 유의성 있는 ($p < 0.001$) 감소가 나타났다(Fig. 3A). 또한, GSS를 구성하는 개별 약재 추출물의 100 μ g/ml 농도에서 SF, LT, WG, GRR, PR은 대조군을 $100.0 \pm 1.0\%$ 로 나타냈을 때, 각각 $70.6 \pm 8.1\%$, $64.3 \pm 1.9\%$, $65.9 \pm 0.6\%$, $72.7 \pm 8.9\%$, $77.4 \pm 6.9\%$, $79.4 \pm 1.6\%$ 로 나타나 대조군에 비하여 모든 개별 약재 추출물의 100 μ g/ml 농도에서 유의성 있는 ($p < 0.001$, $p < 0.05$) 감소가 나타났다(Fig. 3B).

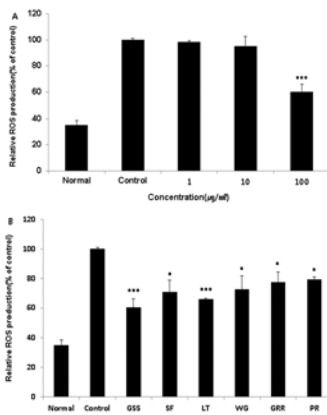


Fig. 3. Effect of GSS and individual -extraction of GSS on ROS production in RAW 264.7 cells.

The ROS production was analyzed by flow cytometry. The results were expressed as mean \pm S.D from three independent experiments (Significance of results, ^{***}: $p < 0.001$, ^{*}: $p < 0.05$). A; Cells were treated with 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) of GSS and LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ for 24hr. B; Cells were treated with 100 $\mu\text{g/ml}$ of individual-extraction and LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ for 24hr.

4. NO 생성량에 미치는 영향

GSS의 RAW 264.7 세포 내 NO 생성량을 측정한 결과, 대조군을 100.0 \pm 1.0%로 나타냈을 때, 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 93.9 \pm 10.2%, 97.8 \pm 0.7%, 80.3 \pm 6.7%로 나타나 대조군에 비하여 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있는 (^{*} $p < 0.05$) 감소가 나타났다(Fig. 4A). 또한, GSS를 구성하는 개별 약재 추출물의 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 SF, LT, WG, GRR, PR은 대조군을 100.0 \pm 1.0%로 나타냈을 때, 각각 97.7 \pm 0.1%, 125.1 \pm 4.7%, 88.6 \pm 3.1%, 70.4 \pm 2.8%, 73.8 \pm 2.9%, 92.2 \pm 0.1%로 나타나 대조군에 비하여 LT, WG, GRR의 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있는 (^{**} $p < 0.01$, ^{*} $p < 0.05$) 감소가 나타났다(Fig. 4B).

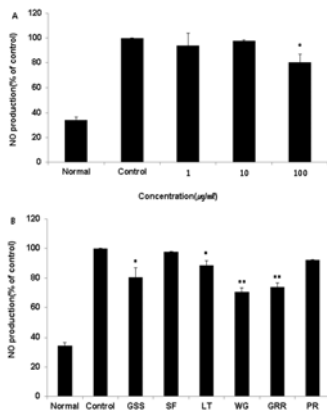


Fig. 4. Effect of GCE and individual -extraction of GSS on NO production in RAW 264.7 cells.

The amount of nitric oxide in supernatant was measured using Griess reagent. The results were expressed as mean \pm S.D from three independent experiments (Significance of results, ^{***}: $p < 0.01$, ^{*}: $p < 0.05$). A; Cells were treated with 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) of GSS and LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ for 24hr. B; Cells were treated with 100 $\mu\text{g/ml}$ of individual-extraction and LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ for 24hr.

5. Cytokine 생성량에 미치는 영향

1) IL-1 β

GSS의 RAW 264.7 세포 내 IL-1 β 생성량을 측정한 결과, 대조군이 24.5 \pm 0.7 pg/ml로 나타났으며, 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 25.5 \pm 0.7, 21.5 \pm 0.7, 21.3 \pm 0.4 (pg/ml)로 나타났다(Fig. 5A). 또한, GSS를 구성하는 개별 약재 추출물의 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 SF, LT, WG, GRR, PR은 각각 25.5 \pm 0.7, 26.2 \pm 1.1, 23.0 \pm 0.1, 26.5 \pm 0.7, 27.2 \pm 1.1, 29.5 \pm 0.7 (pg/ml)로 나타났다(Fig. 5B).

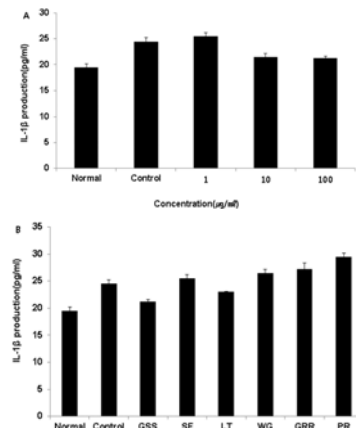


Fig. 5. Effect of GSS and individual -extraction of GSS on IL-1 β production in RAW 264.7 cells.

The IL-1 β production was analyzed by Luminex, A; Cells were treated with 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) of GSS and LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ for 24hr. B; Cells were treated with 100 $\mu\text{g/ml}$ of individual-extraction and LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ for 24hr.

2) IL-6

GSS의 RAW 264.7 세포 내 IL-6 생성량을 측정한 결과, 대조군이 2382.8 \pm 69.7 pg/ml로 나타났으며, 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 2256.0 \pm 318.9, 2394.2 \pm 94.4, 2402.3 \pm 59.0 (pg/ml)로 나타났다(Fig. 6A). 또한, GSS를 구성하는 개별 약재 추출물의 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 SF, LT, WG, GRR, PR은 각각 2478.0 \pm 65.1, 2535.5 \pm 321.0, 2469.0 \pm 419.0, 2480.5 \pm 111.7, 2437.8 \pm 75.3, 2519.8 \pm 43.5 (pg/ml)로 나타났다(Fig. 6B).

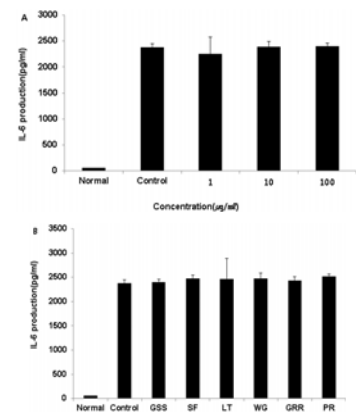


Fig. 6. Effect of GSS and individual -extraction of GSS on IL-6 production in RAW 264.7 cells.

The IL-6 production was analyzed by Luminex, A; Cells were treated with 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) of GSS and LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ for 24hr. B; Cells were treated with 100 $\mu\text{g/ml}$ of individual-extraction and LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ for 24hr.

3) TNF- α

GSS의 RAW 264.7 세포 내 TNF- α 생성량을 측정된 결과, 대조군이 9563.5 \pm 56.6 pg/ml로 나타났으며, 1, 10, 100 (μ g/ml) 농도에서 9563.5 \pm 12.0, 8335.3 \pm 135.4, 8522.5 \pm 132.2 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 10, 100 (μ g/ml) 농도에서 유의성 있는 (** $p < 0.01$) 감소가 나타났다(Fig. 7A). 또한, GSS를 구성하는 개별 약재 추출물의 100 μ g/ml 농도에서 SF, LT, WG, GRR, PR은 각각 9318.0 \pm 316.8, 9446.8 \pm 158.7, 7833.0 \pm 131.7, 9466.8 \pm 32.2, 9493.5 \pm 354.3, 9381.0 \pm 370.5 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 맥문동 개별 추출물에서 유의성 있는 (** $p < 0.01$) 감소가 나타났다(Fig. 7).

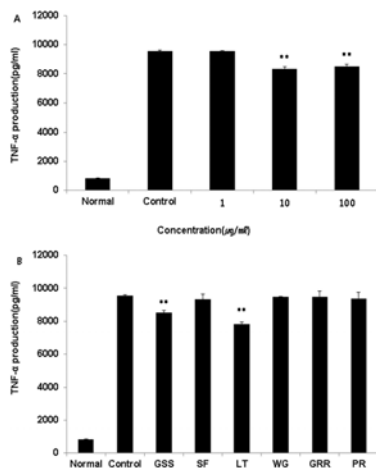


Fig. 7. Effect of GSS and individual -extraction of GSS on TNF- α production in RAW 264.7 cells. The TNF- α production was analyzed by Luminex. The results were expressed as mean \pm S.D from three independent experiments (Significance of results, ** : $p < 0.01$). A; Cells were treated with 1, 10, 100 (μ g/ml) of GSS and LPS 1 μ g/ml for 24hr. B; Cells were treated with 100 μ g/ml of individual-extraction and LPS 1 μ g/ml for 24hr.

고찰

한방적 관점에서 염증은 그 증상의 유사성을 보았을 때 癰, 疽, 瘡, 疔 등과 관계가 깊다. 『靈樞·癰疽篇』에서 "營氣가 경맥 속에 머무르면 營血이 응체되어 순행하지 못하고 순행하지 못하면 衛氣가 이를 따라 통하지 않으니, 衛氣가 막혀 순행할 수 없으므로 熱이 나고, 심한 熱이 몇지 않아서 熱이 왕성하면 肌肉이 腐爛되고, 肌肉이 腐爛되면 化膿된다¹²⁾." 고 하여 營氣와 衛氣의 불통을 염증의 기전을 제시하고 있다. 또한 염증의 발열 및 혈관확장은 한방적으로 熱證의 속성을 가지고 있으므로 熱證의 속성을 가진 化膿과 그 속성이 유사함을 알 수 있다. 膿血이란 피고름이 섞여 있는 것을 말하며, 膿血病은 이질에 의해 피고름이 섞인 대변을 누는 증상을 나타낸다. 이는, 濕熱毒이 大腸에 몰려 氣와 血이 傷하게 되어 일반 痢疾 증상과 함께 大便에 피와 고름이 섞여 나오는 증상으로 주로 瘡瘍이 터져 泄瀉와 함께 나오는 것으로 볼 수 있을 것이다¹³⁾. 瘡瘍에는 腫瘍과 癰, 疽 등이 포함되며, 주로 邪毒이 침입하여 생긴 邪熱로 인해 血이 상하게 되어 氣血이 몰려있는 것으로 한방적으로 熱證의 속성을 가지고 있다. 한 방에서는 '諸痛瘡瘍皆屬於火'라고 하여 모든 痛, 瘡瘍은 火의 성질을 가진다고 하였다. 瘡瘍에 동반되어 나타나는 火, 즉,

熱證의 속성은 인체의 氣가 邪氣와 다투는 과정에서 나타나는 면역반응으로 이것은 염증과 그 양상이 유사함을 알 수 있다. 또한 瘀血, 痰飲, 氣鬱 등이 지속되면 여러 조건에 의해 化火하여 內火로서 작용하여 인체의 恒常性도 깨뜨리게 된다¹⁴⁾.

본 연구에 사용된 加味生脈散(GSS)은 김⁷⁾과 문¹¹⁾ 등의 연구를 통해 항산화 및 항염증제로서의 효능을 나타낸 生脈散에 甘草와 桔梗을 가미한 처방이다. 이에 국내 연구를 통해 정¹⁶⁾은 길경 추출물을 이용한 염증성 사이토카인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 감소를 보고한 바가 있으며, 우¹⁷⁾ 등은 감초추출물의 항산화 효능을 보고한 바 있고, 서¹⁸⁾ 등은 감초추출물을 통한 항염증 효능을 보고한 바 있다.

실험에 앞서 GSS에 대한 세포 독성을 검사한 결과, GSS의 200 μ g/ml의 농도에서 독성이 검출되어 이후의 실험은 100 μ g/ml 농도까지 진행하였다. GSS를 구성하는 개별 약재 추출물들은 모두 100 μ g/ml 농도에서 안전한 것으로 확인되었다.

대식세포는 외부에서 이물질이나 바이러스, 병원 미생물등이 침입할 경우, 생체 방어를 보다 효과적으로 수행하기 위해 반응성이 높은 독성 물질인 활성산소(ROS)를 생산하게 된다. 즉, 활성산소의 제 1의 기능은 살균작용과 세포 상해작용이라 할 수 있다¹⁹⁾. 그러나 이러한 활성산소는 정상세포에 작용하면 심혈관계 질환, 암 등을 유발하고 피부 세포 및 조직 손상을 주도한다²⁰⁾. 이처럼 산화적 스트레스의 빠른 소거는 염증성 질환의 발생 빈도를 낮출 수 있는 결과를 반영할 수 있다. 본 연구에서 GSS와 개별 약재 추출물의 DPPH 라디칼 소거능과 ROS 생성량에 미치는 영향을 확인한 결과, GSS와 개별 약재 추출물은 100 μ g/ml 농도에서 가장 높은 라디칼 소거와 함께 활성산소를 유의성 있게 감소시켰고 이중 GSS가 가장 우수한 효능을 나타냈다. 상기한 항산화 효과는 산화적 손상이 노화를 비롯하여 암, 심혈관계 질환 유발에 기본적인 병리인자라는 점에서 GSS가 천연 항산화제로써 활용될 수 있음을 시사해주고 있다.

만성적인 염증 매개물질인 이산화탄소(nitric oxide, NO)의 생성은 염증인자로서 여러 가지 만성 염증성 질환을 유발하는 주요 원인이 되며²¹⁾, 염증이 발생하게 되면 대식세포가 활성화되어 NO를 생성하여 이에 의해 활성화된 백혈구와 대식세포에 의해 이물질을 제거한 후 조직재생을 통해 종료된다²²⁾. 또한, NO는 ROS와의 결합을 통해 신체에 있는 분자들을 더욱 산화시켜 질환을 더욱 악화시키기에 NO와 ROS의 활성 저해는 염증성 질환의 치료에 필수적이라 할 수 있다²³⁾. 본 연구에서 GSS와 개별 약재 추출물이 NO 생성량에 미치는 영향을 확인한 결과, GSS와 LT, WG, GRR은 100 μ g/ml 농도에서 NO 생성량을 유의성 있게 감소 시켰다. 이와 같은 결과는 GSS와 LT, WG, GRR이 대식세포의 염증 반응에서 활성산소와 NO 생성량을 동시에 감소를 나타내는 우수한 항염증제로서의 염증 관련 질환의 예방과 치료에 있어 효과적일 것이라 사료된다.

염증 반응에서 IL-1 β 는 interleukin 중에서 주요 염증유발 사이토카인의 하나로 대식세포, 호중구, 상피세포, 내피세포에 의해 생산되며, 호중구의 내피세포 접착을 항진시킨다²⁴⁾. 외부 감염이나 염증이 발생하였을 때 국소적으로 생산되며, LPS와 같은 박테리아 산물이나 TNF- α 와 같은 다른 사이토카인에 의해서도 유도된다.

IL-6는 친염증성 사이토카인으로, helper T세포, 대식세포, 비만세포, 중성구, 상피세포, 섬유아세포 등에서 분비되며 면역 반응에 관여하는 세포의 성장과 분화에 관여 한다²⁵⁾. 또한 감염이나 손상 등에 급성 반응을 보이며, 알레르기성 질병을 포함하여 염증성 질환을 만성적인 단계로 발달시킨다²⁶⁾.

Tumor necrosis factor(TNF)- α 는 중요한 염증성 사이토카인으로서, 주로 활성화 된 대식세포에서 분비되지만, 섬유아세포, T세포, B세포, 내피세포 및 상피세포에서도 분비된다²⁷⁾. 과량 생성이 되면, 급성 염증반응을 일으키고 악화시키는 인자로 작용하게 되며, 화학주성으로 염증관련 세포들의 활성화를 유도한다²⁸⁾. 이처럼 과도하게 분비된 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 는 면역계 항상성의 불균형을 초래하여 다양한 세포와 조직에 기능저해를 일으켜 제 2형 당뇨, 염증성 질환, 류마티스 관절염 등과 같은 만성염증 및 자가면역질환을 유발할 수 있다고 알려져 있어 염증 반응 시 위와 같은 사이토카인은 매우 중요한 인자이다²⁹⁻³¹⁾. GSS와 개별 약재 추출물이 사이토카인 생성량에 미치는 영향을 확인한 결과, IL-1 β 와 IL-6는 대조군에 비해 유의성 있는 감소가 나타나지 않았으나, GSS의 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도와 LT에서 TNF- α 를 유의성 있게 감소 시켰다. 이와 같은 결과는 김의 생脈散이 IL-6를 감소 시킨 것과 다른 결과를 나타내었는데 이는 원방인 생脈散에 비해 본 연구에서는 가미가 된 약재들에 의해 성분의 변화가 있었던 것이라 사료된다. 이는 추후 분석 연구를 밝혀내고자 한다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, GSS는 안전성 평가를 통해 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도까지 안전한 것으로 확인되었으며, GSS를 구성하는 개별 약재들에 비해서도 활성산소종 및 NO, TNF- α 등의 유의성 있는 감소 결과를 통해 항산화 및 항염증 효능이 객관적으로 증명되었다. 따라서 이와 같은 결과를 바탕으로 염증성 질환에 대한 보다 체계적인 전임상 단계의 연구를 진행하고자 한다. 다만, 생맥산의 원방에서 인삼을 사용한 것과 달리 본 연구에서는 백삼을 사용하였기에 이 역시 추후 연구를 통해 효능의 비교검증을 실시하고자 한다.

결론

본 연구에서는 加味生脈散의 안전성, 항산화 및 항염증 효능을 객관적으로 검증하기 위하여, 세포독성 검사 및 DPPH 라디칼 소거능, ROS 생성량, NO 생성량, 사이토카인 생성량에 대한 검사를 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 加味生脈散의 RAW 264.7 세포에서 독성 평가를 실시한 결과, 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도에서는 100% 이상의 생존율을 나타내어 안전한 것으로 확인되었으나, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 80% 이하의 세포 생존율을 나타내었다. 또한, 개별 약재 추출물은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 안전한 것으로 확인되었다.
2. 加味生脈散의 DPPH 라디칼 소거능을 측정된 결과, 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도에서 농도 의존적인 라디칼 소거능을 나타냈으며, 개별 약재 추출물과의 비교에서도 가장 우수한 소거능을 나타냈다.
3. 加味生脈散의 RAW 264.7 세포 내 Reactive oxygen species (ROS) 생성량을 측정된 결과, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 유의성 있는 감소를 나타내었으며, 개별 약재 추출물 모두 유의성 있는 감소를 나타내었다.
4. 加味生脈散의 RAW 264.7 세포 내 Nitric oxide (NO) 생성량을 측정된 결과, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 유의성 있는 감소를 나타내었으며, 개별 약재 추출물인 맥문동, 백삼, 감초 역시 유의성 있는 감소를 나타내었다.
5. 加味生脈散의 RAW 264.7 세포 내 cytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α) 생성량을 측정된 결과, TNF- α 생성을 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 유의성 있는 감소를 나타내었으며, 개별 약재 추출물인 맥문동 역시 유의성 있는 감소를 나타내었으나, IL-1 β 와 IL-6의 생성량은 加味生脈散 및 개별 약재 추출물 모두 유의성 있는 감소가 나타나지 않았다.

이상의 결과들로 보아 加味生脈散은 항산화 및 항염증의 주요 인자들에 대한 감소 효능이 실험적으로 규명되었다. 보다 구체적인 기전은 향후 보다 심도있는 연구를 통하여 보완되어야 할 것으로 보이나 이와 같은 결과는 加味生脈散이 산화적 손상 및 염증성 질환의 치료제로서 사용될 수 있을 것이라 사료된다.

References

1. Galli SJ, Gordon JR, Wershil BK. Mast cell cytokines in allergy and inflammation. Agents Actions Suppl. 1993 ; 43(1) : 209-20.
2. Cheon MS, Yoon TS, Choi GY, Kim SJ, Lee AY, Moon BC, Choo BK, Kim HK. Comparative Study of Extracts from Rhubarb on Inflammatory Activity in Raw 264,7 Cells. Korean J Medicinal Crop Sci. 2009 ; 17(2) : 109-114.
3. Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Supresion of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. Carcinogenesis. 1999 ; 20(10) : 1945-52.
4. Lee DW. Dongwonsipjongeuiseo. Seoul : Daeseongmunhwasa. 1983 : 41, 90-1, 339.
5. Oriental-Medicine dictionary Compilation committee. Oriental-Medicine dictionary. Seoul : Jungdam. 2001 : 712.
6. Lee ES. Effect of Saengmaeksan impact on exercise performance and hematological changes as a sports drink. Kyunghee University. 1989.
7. Kim YS. Effect of Wingsaengmaek-San Extract on Antioxidative acticity and Anti-Fatigue. Kyunghee University. 2009.
8. Park DH. (The) effects of Saengmaeksankaminokgak

- on the recovery of exercise induced fatigue, Donggeui University, 2009.
9. Kim JY. (The) Effects of kami-saengmaeksan on the recovery of exercise induced fatigue, Donggeui University, 1999.
 10. Kim ES, Yoo DY. Protective Effect of Processed Saengmaek-san(SM) on Cell Damage in UV-exposed HaCaT Cell, J Orient Obste Gynecol, 2011 ; 24(2) : 33-51.
 11. Moon H, Hwang CY, Hong SH, Hong CH, Kim NK, Jo GW, Lim KS. A Comparative Study on the Effects of Saengmaeksan and Saengmaeksan-gamibang on Atopic Dermatitis in NC/Nga mouse. J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol, 2012 ; 25(1) : 33-54.
 12. Bae BC. Commentary on Nei-Jing, Seoul : Sungbosa, 200, 725-8.
 13. Donguihak Dictionary Compilation Committee. New donguihak Dictionary, Seoul : Yeo Gangchulpansa, 2003 : 218.
 14. Mum RM. Documentary Consideration about Stress, J Orient Neuropsychiatry, 1991 ; 2(1) : 38-50.
 15. LIM JS, KANG OH, SEO YS, KWON DY. Effects of *Haedokgumhwa-san* Water Extracts on LPS-induced Inflammatory Response in Macrophage, Kor J Herbol, 2015 ; 30(5) : 67-74.
 16. Jung HK. Development of functional food material containing antiallergy activity by *Houttuynia Cordata* and *Platycodon grandiflorum*, ChungNam University, 2010.
 17. Woo KS, Hwang IG, Noh YH, Jeong HS. Antioxidant activity of Heated Licotice Extracts in Korea, J Korean Soc Food Sci Nutr, 2007 ; 36(6) : 689-95.
 18. Seo SH, Choi MO. Research Paper : Glycyrrhizae Radix Suppresses Human TNF- α -induced Inflammation Via Blockade of p38 Activation in HaCaT Cells, J Korean Soc Cosmetol, 2013 ; 19(2) : 207-14.
 19. Choi BK, Jung SY, Park KS, Jo JH. Reactive Oxygen Substances and Diseases, Seoul : SinIlBooks, 2004 : 34-7.
 20. Jung HS, Song YS, No KH, Jo YH, Park JY, Choi CY, Kwon TY. Effect of buchu (*Allium tuberosum*) on lipid peroxidation and antioxidative defense system in streptozotocin-induced diabetic rats, J Life Sci, 2003 ; 13(3) : 333-42.
 21. Kim KA, Lee HS, Yoon HJ, Park SD. Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effect of Fractionated Extracts of *Cynomorium Songaricum*, Korean J Orient Physiol Pathol, 2009 ; 23(6) : 1320-31.
 22. Mantovani A. Cancer: inflaming metastasis, Nature, 2008 ; 457(7225) : 36-7.
 23. Choi IP. Oxygen free radical and Cancer, Hanyang Med Rev, 2013 ; 33(2) : 118-22.
 24. Ryu IH, Cho HB, Kim SB, Seo YJ, Choi CM. The inhibitory effect of *Picrasmae Lignum* on inflammatory responses, J Orient Obste Gynecol, 2011 ; 24(1) : 1-14.
 25. Tak MJ, Tak MR, Kang KH, Ko WS, Yoon HJ. The Inhibitory Effects of Yang Geouk San Hwa-Tang on LPS-stimulated inflammation in RAW 264.7 macrophage cells, J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol, 2010 ; 23(1) : 118-34.
 26. Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation, Arthritis Res Ther, 2006 ; 8 : S3.
 27. Kwak CS, Lee JH. In vitro Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Ethanol Extracts from Sprout of Evening Primrose (*Oenothera laciniata*) and Gooseberry (*Actinidia arguta*), J Korean Soc Food Sci Nutr, 2014 ; 43(2) : 207-15.
 28. Zhang Y, Ramos BF, Jakschik BA. Neutrophil recruitment by tumor necrosis factor from mast cells in immune complex peritonitis, Science, 1992 ; 258(5092) : 1957-9.
 29. Gabay, C. Interleukin-6 and chronic inflammation, Arthritis Res Ther, 2006 ; 8 : S3.
 30. Wang, X, Luo Y, Liao WB, Zhang J, Chen TM. Effect of osteoprotegerin in combination with interleukin-6 on inhibition of osteoclast differentiation, Chin J Traumatol, 2013 ; 16(5) : 277-80.
 31. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation, Nature, 2008 ; 454(7203) : 428-35.