

LPS로 염증유도된 RAW 264.74 세포에 대한 흑삼 첨가 경옥고의 항염증 효과

박명재^{1#}, 김정수^{1#}, 이아름², 노성수², 권오준³, 서영배^{1*}

1 : 대전대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 3 : 경북지역사업평가단

Inhibition of Inflammation by Kyeongok-go with Black ginseng in LPS-induced RAW 264.7 Macrophages

MyungJae Park^{1#}, Jeong-Soo Kim^{1#}, AhReum Lee², Seong-Soo Roh²,
OJun Kwon³, Young-Bae Seo^{1*}

1 : College of Korean Medicine, Daejeon University, Republic of Korea
2 : College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Republic of Korea
3 : Gyeongbuk Institute for Regional Program Evaluation, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : The aim of this study was to examine effect of anti-oxidant and anti-inflammation activity of the Kyeongok-go with various processing methods that was manufactured by heating mantle.

Methods : Commercial Kyeongok-go (K0) was purchased and Kyeongok-go with ginseng (K1), Kyeongok-go with black ginseng (BK), ginseng fermentation Kyeongok-go (KF), black ginseng fermentation Kyeongok-go (BKF) were manufactured by heating mantle. To examine anti-oxidant effect, DPPH radical and production of NO and ROS in RAW 264.74 cell were used. Furthermore, to determined anti-inflammation effect, measured pro-inflammatory mRNA such as NOS-II, COX-2, IL-1 β , IL-6, TNF- α in RAW 264.74 cell treated with K0, K1, KF, BK, and BKF.

Result : K1 scavenged DPPH radical effectively than K0. The most DPPH radical scavenging activity was BKF. In the RAW 264.74 cells stimulated with LPS, NO and ROS production were measured. As a results, K1 was decreased NO, ROS production compared with K0, and BKF was reduced similarly to cyclosporine A (positive control). Expression of pro-inflammatory mRNA such as NOS-II, COX-2, IL-1 β , IL-6 showed a significant decrease in BK or BKF. But, there was no significant in expression of TNF- α in all extract treatment groups.

Conclusions : According to the above results, it is considered that Kyeongok-go with fermented black ginseng (BKF) manufactured by heating mantle is effective material that have anti-inflammation and anti-oxidant activities. Our finding indicate that BKF may be an effective agent for anti-inflammation through anti-oxidant effect.

Key words : Black ginseng fermentation Kyeongok-go, Heating-mantle, RAW264.74 cell, Anti-oxidant, Anti-inflammation.

*Corresponding author : Young-Bae Seo, College of Korean Medicine, Daejeon University, 62 Daehak-ro, Dong-gu, Daejeon 34520, Republic of Korea,

· Tel : +82-42-280-2625 · Fax : +82-42-280-2644 · E-mail : genin@dju.ac.kr

#First author : MyungJae Park, College of Korean Medicine, Daejeon University, 62 Daehak-ro, Dong-gu, Daejeon 34520, Republic of Korea,

· Tel : +82-42-280-2625 · Fax : +82-42-280-2644

Jeong-Soo Kim, College of Korean Medicine, Daejeon University, 62 Daehak-ro, Dong-gu, Daejeon 34520, Republic of Korea,

· Tel : +82-42-280-2625 · Fax : +82-42-280-2644

- These authors are contributed equally a this manuscript.

· Received : 11 April 2017 · Revised : 4 May 2017 · Accepted : 20 May 2017

I. 서론

경옥고는 공진단, 우황청심원과 함께 3대 비약 중의 하나로 《洪氏集驗方》에 처음 소개되어 “養陰潤肺 治虛勞乾咳 咽燥咯血”이라 기록했고¹⁾ 《東醫寶鑑》에 “填精 補髓 調眞養性 返老還童. 補百損 除百病 萬神俱足 五藏盈溢 髮白復黑齒落更生 行如奔馬 日進數服 終日不飢渴 功效不可盡述”이라 기록되어 있으며²⁾ 《方藥合編》에는 “填精 補髓 髮黑, 齒生, 萬神俱足, 除百病” 등으로 기록되어 滋陰潤肺하고 益氣補脾하는 효능이 있다³⁾. 또한 경옥고 및 경옥고 가미방에 관한 선행연구로는 경옥고 가미방의 항치매 효과⁴⁾, 고지혈증 억제 효과⁵⁾, 결핵균(結核菌) 내성도 감소⁶⁾ 및 항염증 활성⁷⁾, 항산화 활성⁸⁾에 관한 연구결과가 보고된 바 있다. 이와 같이 경옥고 및 가미방 등은 임상으로는 폐결핵, 기관지확장 등의 질환에 응용하고 있으며 약리 연구에서 치매 예방, 고지혈증 억제, 결핵균 치료, 항산화 및 항염작용의 효능에 대한 내용이 활발히 연구됨을 알 수 있다.

경옥고는 일반적으로 3일 중탕 후 1일을 식히고 다시 1일을 중탕하는 방식을 전통방식이라 여기고 있어²⁾, 시중에서 판매되는 대부분의 경옥고는 이러한 중탕방식에 의해 제조되고 있다. 최근에는 복잡하고 장시간이 걸리는 경옥고 제조 공정을 개량하여 시간단축과 제작방법 등을 개선하려는 연구결과가 보고되고 있다. 황 등⁹⁾은 Water bath 상에서 일정시간 가열하여 이용하였고, 김 등¹⁰⁾은 구성약재를 혼합 후 121℃에서 3시간 가열하여 사용하는 등 각각의 연구내용에 맞추어 제조 이용하였다.

이와 같이 경옥고가 한방제제 중에서 중요한 위치를 차지하고 있으나, 중탕 방식에 의한 제조과정에 어려움이 있어 다양한 방식의 개선방안이 연구되었음에도 불구하고 획기적인 제조방식이 개발되지 않았다. 이에 저자는 히팅 맨틀이 중탕과 유사한 효과를 나타낼 수 있다는 점에 착안하여, 히팅 맨틀을 이용하여 제조시간이 단축되고 제조과정이 편리하게 되는 경옥고를 제조하였고, 이의 효능을 검증하고자 시중 유통 경옥고(K0)와 인삼 경옥고(K1), 히팅 맨틀로 제조한 인삼경옥고(K1)와 인삼발효경옥고(KF), 흑삼경옥고(BK), 흑삼발효경옥고(BKF)을 실험군으로 구분하여, DPPH 라디칼 소거능에 의한 항산화 활성, Raw 264.74 세포에 대한 항산화 및 항염 효과를 살펴본 바 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 시약은 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), diethyl pyrocarbonate (DEPC), Naphthylethylene diamine dihydrochloride, Sulfonamide, 2', 7'-Dichlorofluorescein diacetate, Sodium Nitrite, chloroform, trichloroacetic acid, isopropanol, Tris-HCl, KCl, MgCl₂, Dubecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배양액, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), sulforhodamin B (SRB), 2-isopropanol, sodium dodecyl sulfate (SDS), Streptomycin은 Sigma Aldrich (MO,

USA) 제품을 사용하였다. IL-4 (R4000) ELISA kit는 R&D system (MN, USA) 제품을, IL-13 (ab100766) ELISA kit는 AbCam (Cambridge, UK) 제품을, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Gibco (Paisley, UK) 제품을, RNase inhibitor 과 M-MLV RT는 Invitrogen (CA, USA) 제품을, RNAsolB는 Tel-Test (TX, USA) 제품을 사용하였다. Mouse GAPDH probe set (VIC / MGB Probe, 4352339E), Taqman master mix와 SYBR master mix는 ABi (CA, USA)사 제품을 EZ-Cytox는 대일바이오텍 (Suwon, Korea), cyclosporin A는 중외제약 (Seoul, Korea) 제품을 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

2. 시료 제조

실험에 사용된 人蔘, 白茯苓 등은 한약규격품을 대전대학교 본초학교실에서 감정한 후 분쇄하여 시료 제조에 사용하였으며 黑蔘은 금산지역에서 재배된 4년생 수삼을 생산자 증명이 확인된 금산인삼농협에서 구입한 후, 90℃에서 2시간 증숙 하는 과정을 9회 반복하여 제조하였다. 地黃은 금산지역에서 생산된 生地黃을 구입하였고 녹즙기 (Angelia 7700, Angel co., Busan, Korea)로 汁을 취하여 시료 제조에 사용하였다. 실험에 사용될 경옥고는 人蔘 50g, 白茯苓 100g, 地黃 600g, 꿀 300g 등의 비율로 혼합하여 제조하였고, 실험 시료에 따라 黑蔘으로 제조하는 경우, 발효과정을 거친 경우 등으로 구분하였으며, 실험 대조를 위하여 시중에서 중탕 방식으로 생산되어 유통 중인 경옥고를 구입하여 사용하였다 (Table. 1).

Table 1. Main composition of experiment materials

Item	Main composition
Kyeongok-go (K0)	Kyeongok-go by Barunhanyak Ginseng Radix (<i>Panax ginseng</i> C.A.Meyer) 50 g
Kyeongok-go with ginseng (K1)	Poria Sclerotium (<i>Poria cocos</i>) 100 g Rehmanniae Radix (<i>Rehmannia glutinosa</i>) 600 g Mel 300 g
Ginseng fermentation Kyeongok-go (KF)	Ginseng Radix (<i>Panax ginseng</i> C.A.Meyer) 50 g* Poria Sclerotium (<i>Poria cocos</i>) 100 g* Rehmanniae Radix (<i>Rehmannia glutinosa</i>) 600 g* Mel 300 g*
Kyeongok-go with black ginseng (BK)	Black Ginseng 50 g, Poria Sclerotium 100 g, Rehmanniae Radix 600 g, Mel 300 g Poria Sclerotium (<i>Poria cocos</i>) 100 g Rehmanniae Radix (<i>Rehmannia glutinosa</i>) 600 g Mel 300 g
Black ginseng fermentation Kyeongok-go (BKF)	Black Ginseng (<i>Panax ginseng</i>) 50 g* Poria Sclerotium (<i>Poria cocos</i>) 100 g* Rehmanniae Radix (<i>Rehmannia glutinosa</i>) 600 g* Mel 300 g*

* Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*

혼합된 시료는 히팅 맨틀에 스테인리스 용기 하부와 반응조

상부 뚜껑을 부착하고 중앙에 냉각기 및 에에 캡을 설치하여 전탕과 농축이 편리하도록 하였다. K1과 BK 등은 히팅 맨틀 외부온도 90℃로 설정하여 끓어 넘치지 않는 정도로 약 18-22시간 가열하였고, 농축은 동일한 온도에서 반응조 상부 캡을 모두 제거하여 약 1시간 40분 내외로 농축하였다. KF와 BKF 등은 발효 후 K1과 BK 등과 같은 과정을 거쳐 제조되었는데, 발효는 올리고당 30g과 이스트 3g을 투입한 후 히팅 맨틀 외부 온도 30℃에서 2시간 40분 반응시키는 과정을 통하여 시료 제조에 사용되었다.

3. DPPH 라디칼 소거능에 의한 항산화 활성

DPPH free radical 소거능에 의한 항산화 활성 시험을 위하여 DPPH 16 mg을 100 mL 에탄올 용액에 용해하고 20초간 진탕한 후 517 nm에서 흡광도가 0.93~0.97이 되도록 에탄올을 가하였다. DPPH 용액 2 mL과 K0, K1, KF, BK, BKF 추출물 (0, 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 각각 2 mL을 시험관에 취하고 vortex mixer로 5초간 진탕하여 517 nm 에서 반응시간에 따른 K0, K1, KF, BK, BKF 추출물의 환원성을 측정하였다¹¹⁾. 양성 대조용 시료로서는 동일 농도로 제조한 ascorbic acid (0, 10, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 사용하였다.

4. RAW 264.74 세포를 이용한 항염 효능 평가

1) 세포주 및 세포배양

마우스 대식세포주 (RAW 264.74)는 한국 세포주은행 (Seoul National University, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 생쥐 대식세포주 (RAW 264.74)를 10 % FBS과 1 % penicillin이 첨가된 DMEM 배지에서 37 °C의 온도와 5 % CO² 조건이 유지되는 CO² 배양기 (Forma Sci, OH, USA)에서 배양하였다.

2) 세포 독성 측정

RAW 264.74세포를 37℃, 5% CO² 배양기에서 1시간 배양한 후 K0, K1, KF, BK, BKF 추출물 (최종 농도 10, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 24시간, 48시간, 72시간 동안 처리하였다. 배양 종료 6시간 전에 EZ-Cytox 용액 10 μL 씩 각 well에 가하고 실험 종료 시까지 배양하였으며 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader에서 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Nitric Oxide (NO) 생성량 측정

10% FBS 및 1% penicillin이 포함된 2 mL의 DMEM 배지와 RAW 264.74 세포 (2×10^6 cells/well)를 6-well culture plate에 넣고 standard incubator conditions (37℃, 5% CO² / 95% air environment)에서 24시간 배양한 다음, 상층액을 제거했다. 여기에 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 LPS를 처리하여 NO를 유발하였고, K0, K1, KF, BK, BKF 추출물 (각각 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 포함한 DMEM 배지를 각 2 mL씩 넣고, 다시 24시간 배양한 후 상층액을 분리하였다. 이때, 양성대조군으로는 cyclosporin A (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 사용하였다. NO 생성량을

측정하기 위한 시약인 Griess 시약은 용액 A (0.2% Naphthylethylene diamine dihydrochloride in D.W.)와 용액 B (2% Sulfonamide in 5% H₃PO₄)를 제조하고 냉암소에 보관하며, 사용 직전에 두 용액을 1:1로 혼합하여 혼합용액을 사용하였다. 배양이 종료된 후 배양 상층액 100 μL 를 96 well plate에 분주하고 다시 혼합용액 100 μL 를 분주한 뒤 ELISA reader를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준 검량 곡선은 Sodium Nitrite를 0-80 μM 사이에서 측정하였다.

4) 세포내 Reactive Oxygen Species (ROS)의 분석

LPS를 처리한 RAW 264.74 세포내의 ROS를 측정하기 위하여 24 well plate의 각 well에 5×10^5 cells씩 첨가하고, K0, K1, KF, BK, BKF 추출물 (각각 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 처리한 후 세포를 37℃에서 24시간 배양하였다. 배양이 종료된 후 DCFH-DA 50 μM 을 처리하고 5분간 배양하고 2회 수세한 후 Flow cytometer로 세포내 형광 DCF (2', 7'-dichlorofluorescein) 또는 ROS를 FACS를 이용하여 측정하였다.

5) Real-time PCR을 통한 유전자 발현 분석

LPS를 처리한 RAW 264.74 세포내의 염증 사이토카인을 측정하기 위하여 24 well plate의 각 well에 5×10^5 cells씩 분주하고, K0, K1, KF, BK, BKF 추출물 (각각 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 처리한 후 세포를 37℃에서 6시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후 Trizol 500 μL 를 넣고 homogenizer로 세포들을 분쇄하였으며 여기에 chloroform (CHCl₃) 100 μL 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리하였고 약 200 μL 의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μL 와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80 % EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 20 mL의 증류수에 녹여 heating block 75 °C 에서 불활성화시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

Raw 264.74 대식세포에서 추출된 total RNA 3 μg 을 75°C 에서 10분 동안 변성시킨 다음 이에 2.5 mL의 10 mM dNTPs mix, 1 mL random sequence hexanucleotides (25 pmole/25 mL), RNA inhibitor로서 1 mL RNase inhibitor (20 U/mL), 1 mL 100 mM DTT, 4.5 mL 5 × RT buffer (250 mM tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 mL의 M-MLV RT (200 U/mL)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 mL가 되도록 하였다. 이 20 mL의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5 초간 원심 침강하여 37°C heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 PCR에 사용하였다.

Real-time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7,500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA) 을 이용하여 수행하였고 실험에 사용한 primer sequence는 Table 2와 같다.

Table. 2의 mRNA 유전자 발현은 TaqMan probe (FAM dye-labeled, ABl, USA)를, internal standard를 마우스 GAPDH probe set; Endogenous Control (VIC® / MGB Probe, Probe limited) from Applied Biosystems (4352339E) 를 사용하였고, primer의 최종 농도가 200 nM 이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은 pre-denaturation은 50 °C에서 2 분간, 94 °C에서 10 분간, 그리고 40 cycles을 95 °C에서 15초간 및 60 °C에서 1분간 수행하였다. 실험군과 대조군은 internal standard로 GAPDH 를 사용하였다.

Table 2. Primer sequences for real-time PCR analysis (pro-inflammatory gene)

Target gene	Primer/probe	Sequences
IL-1 β	FAM	5'-CTGTGTAATGAAAGACGGCACCACC-3'
	Forward	5'-CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG-3'
NOS-II	Reverse	5'-CAGCTGGGCTGTACAAACCTT-3'
	Forward	5'-ATG GAT CGA AGA CTA CGT GCA A-3'
COX-2	Reverse	5'-GGG ATT TCC CAT AAG TCC TTT C-3'
	FAM	5'-CACGTCGTAGCAAACCAAGTGA-3'
TNF- α	FAM	5'-CAGAAATGCAATGCACAACCTCTTTTCTCA-3'
IL-6	FAM	5'-CAGAAATGCAATGCACAACCTCTTTTCTCA-3'

5. 통계분석

모든 실험 결과의 통계처리는 SAS 통계 프로그램을 이용하여 분석하였으며, 그 결과는 평균값과 표준오차로 표시하고 통계적 유의성($p < 0.05$)은 ANOVA로 검증하였다.

III. 결 과

1. DPPH 라디칼 소거능에 의한 항산화 활성

Ascorbic acid 및 K0, K1, BK, KF, BKF 추출물의 농도별 (10, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$) DPPH 라디칼 소거활성을 측정할 결과, 양성 대조군인 Ascorbic acid 처리군은 50 $\mu\text{g/ml}$ 이상부터 100% 이상 ($p < 0.001$)의 활성이 나타났고, K0와 K1의 전자공여능을 비교해보았을 때, 기존 경옥고인 K0보다 히팅 맨틀을 이용하여 제조한 경옥고인 K1이 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 농도 의존적으로 유의성 있게 증가하였다 ($p < 0.001$).

또한 K1, KF, BK, BKF (50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$) 추출물은 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거능이 유의성 있게 증가하였으며 ($p < 0.001$), BKF가 가장 높은 DPPH 라디칼 소거능을 가지는 것을 알 수 있었다 ($p < 0.001$)(Fig. 1).

2. 세포독성

RAW 264.74 세포에 K0, K1, KF, BK, BKF 추출물을 농도별 (10, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$)로 처리하여 각각 24시간, 48시간, 72시간 배양한 결과, 대조군에 비하여 큰 세포독성이

나타나지 않았다. 이러한 결과들로 RAW 264.74 세포에서 K0, K1, KF, BK, BKF 추출물은 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지 세포 독성이 없는 것으로 판단하여 항염증 실험을 진행하였다.

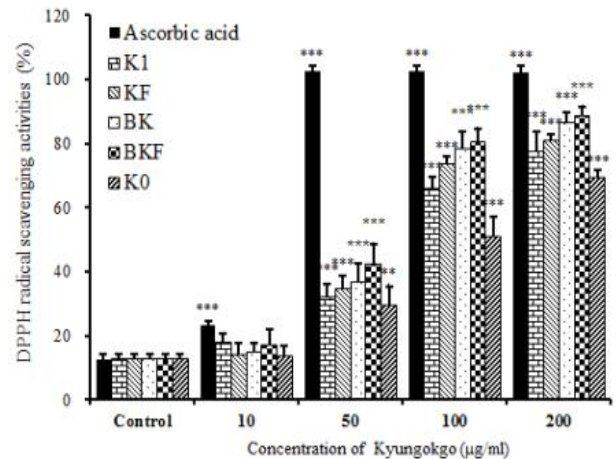


Fig. 1. DPPH radical scavenging activities of K0, K1, KF, BK, and BKF

DPPH solution were pre-mixed with commercial Kyeongok-go (K0), Kyeongok-go with ginseng (K1), Kyeongok-go with black ginseng (BK), Kyeongok-go with fermented ginseng (KF), Kyeongok-go with fermented black ginseng (BKF), and ascorbic acid (10, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ or vehicle control). Values are the means \pm standard error of three determinations. Significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to control without the extract.

3. RAW264.74 세포에서 항산화 측정

1) NO 생성량 측정

RAW 264.74 대식세포를 배양한 후 LPS로 자극하여 NO를 유발하였다. 그 후 NO 생산량을 ELISA로 측정할 결과, LPS를 처리하지 않은 정상군은 $7.2 \pm 0.42 \mu\text{M}$ 이었고, LPS를 처리한 대조군은 $72.3 \pm 5.84 \mu\text{M}$ 로 정상군에 비해 약 10배 이상 증가되었다. 양성대조군인 CsA처리군의 NO 생산량이 각각 $4.11 \pm 1.20 \mu\text{M}$ 으로 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다 ($p < 0.001$). LPS를 처리한 RAW 264.74 대식세포에 경옥고 추출물을 적용하였을 때, 모든 군에서 유의성 있는 감소를 보였으며, 흑삼을 가미하여 발효시킨 경옥고인 BKF ($p < 0.001$) 군에서 가장 큰 감소를 나타내었다 (Fig. 2).

2) ROS 생성량 측정

RAW 264.74 세포 배양 후 LPS로 자극하여 ROS를 유발한 뒤, FACS를 이용하여 ROS 생산량을 측정할 결과, LPS를 처리하지 않은 정상군에 비하여 LPS를 처리한 대조군에서 유의성 있게 증가되었다. K0, K1 처리군에서 ROS 생성량은 모두 감소하였으나, 기존의 경옥고인 K0보다 히팅 맨틀을 사용하여 제조한 경옥고인 K1이 비교적 더 크게 감소한 것으로 나타났다 (Fig. 5A). 또한 경옥고 가미방인 BK, BKF, KF 모두 ROS 생성량이 대조군에 비하여 감소하였으며 그 중 흑삼가미발효 경옥고인 BKF가 가장 크게 감소한 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5B).

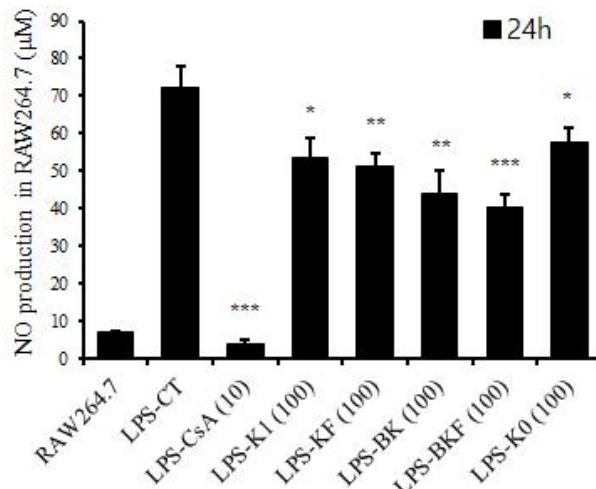


Fig. 2. Effect of K0, K1, KF, BK, and BKF on the NO production in RAW 264.74 cell line. Non treated RAW 264.74 cells ;RAW 264.74, RAW 264.74 cells treated with LPS ;LPS-CT, RAW 264.74 cells were pretreated with 10 µg/ml of cyclosporine A ;LPS-CsA(10), RAW 264.74 cells were pretreated with 100 µg/ml of Kyeongok-go with ginseng (K1) ;LPS-K1 (100), RAW 264.74 cells were pretreated with 100 µg/ml of fermented ginseng (KF) ;LPS-KF (100), RAW 264.74 cells were pretreated with 100 µg/ml of Kyeongok-go with black ginseng (BK) ;LPS-BK(100), RAW 264.74 cells were pretreated with 100 µg/ml of Kyeongok-go with fermented black ginseng (BKF) ;LPS-BKF (100), RAW 264.74 cells were pretreated with 100 µg/ml of Kyeongok-go (K0) ;LPS-K0 (100). Significance : **p* <0.05, ***p* <0.01, ****p* <0.001 compared with RAW 264.74 cells treated with LPS.

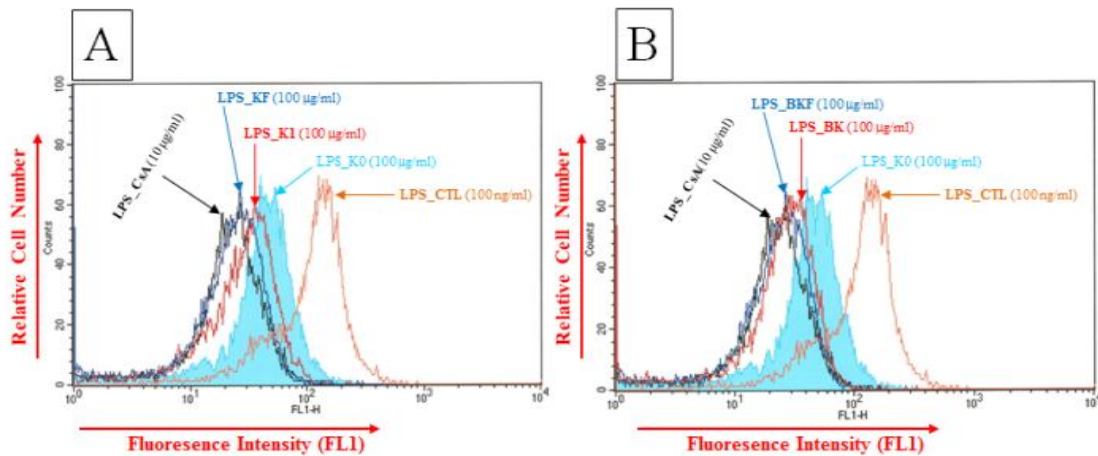


Fig. 3. Inhibitory effect of K0, K1, KF, BK, and BKF on the ROS production in RAW 264.74 cell line. RAW 264.74 cells treated with LPS ;LPS-CTL, RAW 264.74 cells were pretreated with 10 µg/ml of cyclosporine A ;LPS-CsA (10 µg/ml), RAW 264.74 cells were pretreated with 100 µg/ml of Kyeongok-go with ginseng (K1) ;LPS_K1(100 µg/ml), RAW 264.74 cells were pretreated with 100 µg/ml of fermented ginseng (KF) ;LPS_KF(100 µg/ml), RAW 264.74 cells were pretreated with 100 µg/ml of Kyeongok-go with black ginseng (BK) ;LPS_BK(100 µg/ml), RAW 264.74 cells were pretreated with 100 µg/ml of Kyeongok-go with fermented black ginseng (BKF) ;LPS_BKF(100 µg/ml), RAW 264.74 cells were pretreated with 100 µg/ml of Kyeongok-go (K0) ;LPS K0(100 µg/ml).

3) Quantitative Real Time PCR을 이용한 염증성 사이토카인 유전자 발현 분석

염증성 사이토카인 유전자 발현 분석을 위해 정상 RAW 264.74 세포를 LPS로 활성화시킨 후 Quantitative real time PCR을 사용하여 측정하였으며 그 결과 NOS-II mRNA는 LPS 처리군에서 3배 이상 증가하였고, 양성대조군인 CsA 10 µg/ml 처리군은 대조군 (LPS-CTL)에 비하여 2배 이상 NOS-II mRNA 유전자 발현이 감소하였다 (*p*<0.01).

경옥고 처리군인 K0와 K1에서 NOS-II mRNA 유전자 발현을 살펴본 결과, K1은 유의성이 없었으며 K0 (*p*<0.05)에

서는 유의성 있는 감소를 보였다. 경옥고 가미방 중에서는 BKF (*p*<0.01)가 NOS-II mRNA 유전자 발현이 가장 크게 감소하였고, BK (*p*<0.01), KF (*p*<0.05) 순으로 유의성 있게 NOS-II mRNA 유전자 발현 감소를 확인하였다 (Fig. 5).

COX-2 mRNA 유전자는 RAW264.74 세포보다도 LPS 처리군에서 4배 이상 증가하였고, 양성대조군인 CsA (10 µg/ml) 은 대조군 (LPS-CTL)에 비하여 3배 이상 COX-2 mRNA 유전자 발현이 감소하였다 (*p*<0.01).

경옥고 처리군인 K0와 K1에서 COX-2 mRNA 유전자 발현은 감소하였으나 유의성이 없었고, 경옥고 가미방은 BK

($p < 0.01$), BKF ($p < 0.01$), KF ($p < 0.05$) 순으로 유의성 있게 COX-2 mRNA 유전자 발현이 감소하였다 (Fig. 5).

IL-1 β mRNA 유전자 발현은 정상 RAW 264.74 세포에 비해 LPS 처리군이 6배 이상 증가하였고, 양성대조군인 CsA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)은 대조군 (LPS-CTL)에 비하여 2배 이상 IL-1 β

mRNA 유전자 발현이 감소하였다 ($p < 0.01$). 경옥고 처리군 K0와 K1에서 IL-1 β mRNA 유전자 발현은 유의성이 없었고, 경옥고 가미방 처리군에서는 BK ($p < 0.05$)가 가장 감소하였고, BKF ($p < 0.01$), KF ($p < 0.05$) 순으로 유의성 있게 IL-1 β mRNA 유전자 발현 감소를 확인하였다 (Fig. 6).

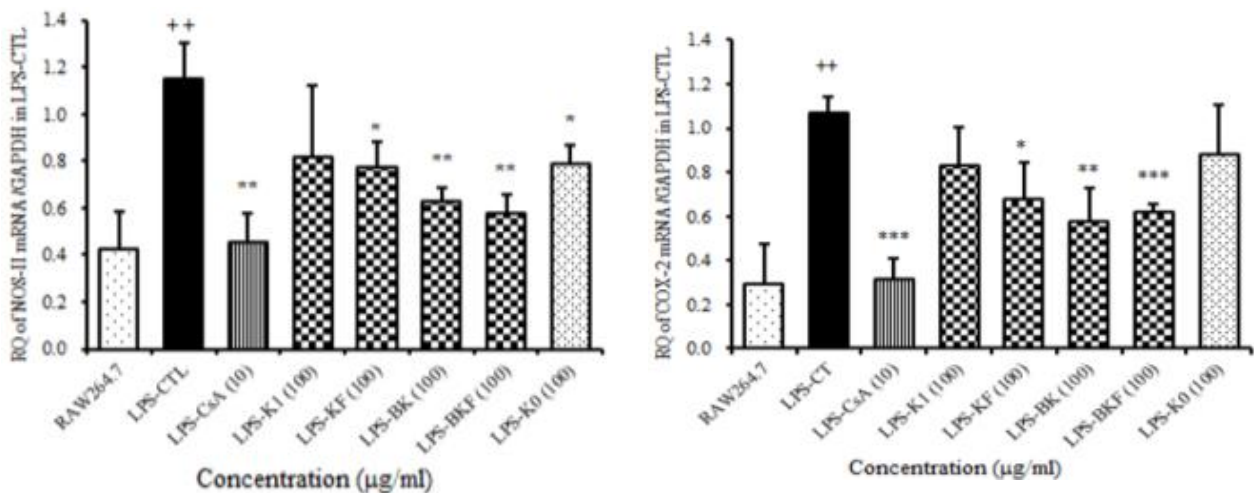


Fig. 5. Effect of K0, K1, KF, BK, and BKF on pro-inflammatory NOS-II, COX-2 mRNA in RAW 264.74 cell line. Non treated RAW 264.74 cells ;RAW 264.74, RAW 264.74 cells treated with LPS ;LPS-CT, RAW 264.74 cells were pretreated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of cyclosporine A ;LPS-CsA(10), RAW 264.74 cells were pretreated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Kyeongok-go with ginseng (K1) ;LPS-K1 (100), RAW 264.74 cells were pretreated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of fermented ginseng (KF) ;LPS-KF (100), RAW 264.74 cells were pretreated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Kyeongok-go with black ginseng (BK) ;LPS-BK(100), RAW 264.74 cells were pretreated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Kyeongok-go with fermented black ginseng (BKF) ;LPS-BKF(100), RAW 264.74 cells were pretreated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Kyeongok-go (K0) ;LPS-K0 (100). Significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with RAW 264.74 cells treated with LPS. ++ $p < 0.01$ compared with non treated RAW 264.74 cells.

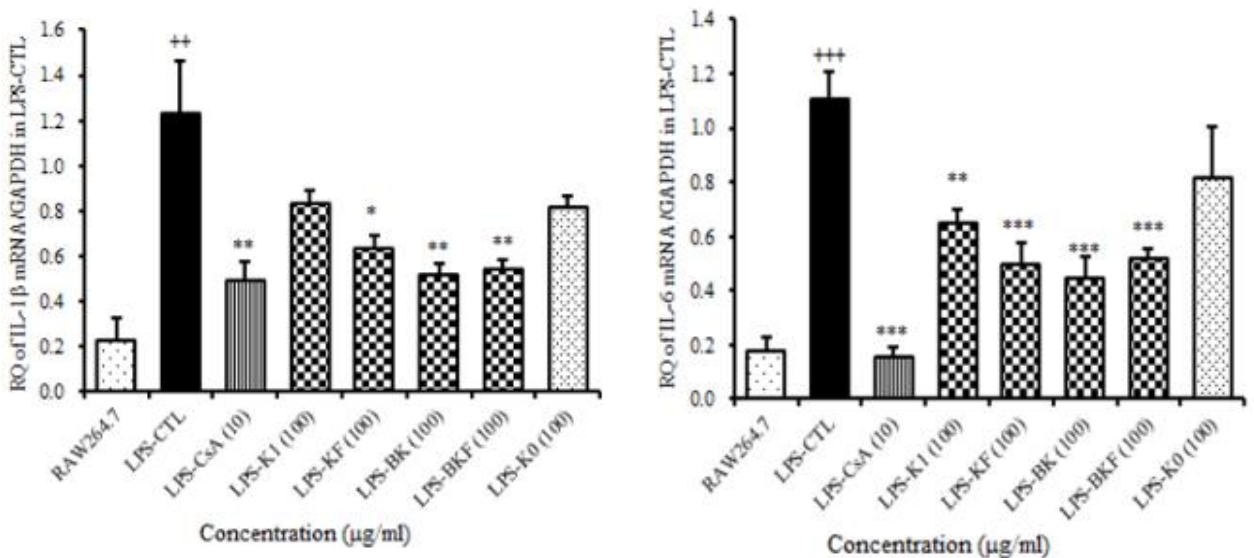


Fig. 6. Effect of K0, K1, KF, BK, and BKF on pro-inflammatory IL-1 β , IL-6 mRNA in RAW 264.74 cell line. Non treated RAW 264.74 cells ;RAW 264.74, RAW 264.74 cells treated with LPS ;LPS-CT, RAW 264.74 cells were pretreated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of cyclosporine A ;LPS-CsA(10), RAW 264.74 cells were pretreated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Kyeongok-go with ginseng (K1) ;LPS-K1 (100), RAW 264.74 cells were pretreated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of fermented ginseng (KF) ;LPS-KF (100), RAW 264.74 cells were pretreated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Kyeongok-go with black ginseng (BK) ;LPS-BK(100), RAW 264.74 cells were pretreated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Kyeongok-go with fermented black ginseng (BKF) ;LPS-BKF(100), RAW 264.74 cells were pretreated with 100 mg/mL of Kyeongok-go (K0) ;LPS-K0 (100). Significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with RAW 264.74 cells treated with LPS. ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ compared with non treated RAW 264.74 cells.

IL-6 mRNA 유전자 발현은 정상 RAW264.74 세포보다도 LPS 처리군에서 IL-6가 5배 이상 증가하였고, 양성대조군인 CsA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)은 대조군 (LPS-CTL)에 비하여 4배 이상 유전자 발현이 감소하였다 ($p < 0.001$). 히팅 맨틀로 제조한 경옥고인 K1 ($p < 0.01$) 처리군에서 IL-6 mRNA 유전자 발현은 유의성 있게 감소하였지만, 기존 경옥고인 KO 처리군에서는 유의성이 없었다. 경옥고 가미방은 BK ($p < 0.001$), KF ($p < 0.001$), BKF ($p < 0.001$) 순으로 유의성 있게 IL-6 mRNA 유전자 발현 감소를 확인하였다 (Fig. 6).

TNF- α mRNA 유전자 발현을 분석한 결과, 정상 RAW 264.74 세포보다도 LPS 처리군에서 TNF- α 가 3배 이상 증가하였고, 양성대조군인 CsA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 처리군은 대조군 (LPS-CTL)에 비하여 3배 이상 TNF- α mRNA 유전자 발현이 감소하였다 ($p < 0.05$). KO와 K1에서 TNF- α mRNA 유전자 발현은 유의성이 없었고, 경옥고 가미방 처리군 모두에서 TNF- α mRNA 유전자 발현은 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 7).

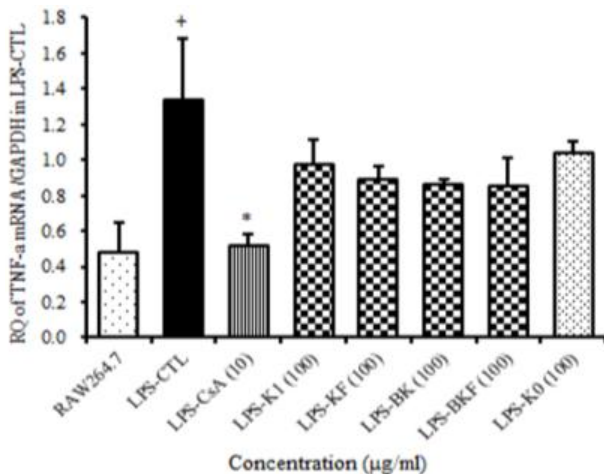


Fig. 7. Effect of KO, K1, KF, BK, and BKF on pro-inflammatory TNF- α mRNA in RAW264.74 cell line.

Non treated RAW 264.74 cells ; RAW 264.74 cells treated with LPS ; LPS-CTL, RAW 264.74 cells were pretreated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of cyclosporine A ; LPS-CsA(10), RAW 264.74 cells were pretreated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Kyeongok-go with ginseng (K1) ; LPS-K1 (100), RAW 264.74 cells were pretreated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of fermented ginseng (KF) ; LPS-KF (100), RAW 264.74 cells were pretreated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Kyeongok-go with black ginseng (BK) ; LPS-BK(100), RAW 264.74 cells were pretreated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Kyeongok-go with fermented black ginseng (BKF) ; LPS-BKF(100), RAW 264.74 cells were pretreated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Kyeongok-go (KO) ; LPS-KO (100). Significance : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with RAW 264.74 cells treated with LPS. + $p < 0.05$ compared with non treated RAW 264.74 cells.

IV. 고찰

경옥고는 《洪氏集驗方》에 “養陰潤肺 治虛勞乾咳 咽燥咯血”이라 처음 소개되었고 《東醫寶鑑》에 “填精 補髓 調眞養性 返老還童. 補百損 除百病 萬神俱足 五藏盈溢 髮白復黑齒落更生 行如奔馬 日進數服 終日不飢渴 功效不可盡述”이라 기록되어 滋陰潤肺하고 益氣補脾하는 유용한 처방으로 精과 髓를

보하여 노화를 방지하고 除百病 한다고 알려져있다¹²⁾.

이처럼 경옥고는 뛰어난 효능을 가지고 있어 치료를 위한 처방 제제나 연구목적으로 제조하여 다양하게 사용되고 있으나 전통의 중탕 방식처럼 제조과정이 까다로워 이용 과정에서 번거로움을 겪고 있는 실정하기에 보다 편리하고 개선된 제조방법의 필요성이 있었으며 획기적인 제조방식이 개발되지 않았다¹³⁾.

이에 특별히 히팅 맨틀에 의한 제조방식이 중탕의 방식과 유사한 효과를 나타낼 수 있다는 점에 착안하여 제조시간이 단축되고 복잡한 제조과정을 개선하여 효율성 있는 히팅 맨틀을 이용한 가미 경옥고를 제조하여 항산화와 항염증작용의 효능을 검증하고자 하였다.

DPPH는 그 자체가 매우 안정한 Free radical로서 517 nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 보라색 화합물이다. 라디칼은 알코올 등의 유기용매에서 매우 안정하며, 특히 여러 가지 항산화 기작 중 Proton-radical scavenger에 의하여 탈색되기 때문에 항산화 활성을 육안으로 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있다. α -tocopherol과 같은 전형적인 천연 항산화제는 본 DPPH에 의하여 매우 민감하게 활성이 관측된다¹⁴⁾.

DPPH 라디칼 소거능을 이용한 항산화 활성 분석결과 BKF, BK, KF, K1 순으로 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 농도 의존적으로 유의성 있는 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었다. 특히 흑삼가미발효경옥고가 유의성 있는 전자공여능을 나타냈으며, 이는 인삼을 발효하였을 때 항산화 활성이 증가한다는 도 등¹⁵⁾의 연구결과를 보았을 때, 흑삼가미 경옥고가 발효의 영향으로 항산화 효능이 증가된 것으로 사료된다.

체내의 염증 반응은 상처나 세균 감염 등의 물리적, 화학적 자극이 일어날 때 손상 부위를 복구시키는 신체 방어 기전 중 하나이며, 자극이 가해지면 국소적으로 혈관 활성 물질들이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증을 유발 한다¹⁶⁾. 대식세포는 염증 반응에 관여하는 주요 세포로 알려져 있으며, 자극에 노출되거나 면역세포들이 분비하는 사이토카인 등에 의해 활성화되고, 감염 초기에 nitric oxide (NO)와 cytokine을 생산하여 생체방어에 중요한 역할을 한다¹⁷⁾. 그람 음성균의 세포 외막에 존재하는 내독소로 잘 알려진 Lipopolysaccharide (LPS)는 대식세포 또는 단핵구를 자극하여 Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), Interleukin- 1β (IL- 1β) 및 IL-6와 같은 염증 매개성 cytokine들의 분비를 촉진한다. 이러한 염증 매개 물질들의 형성은 Arachidonic acid가 Cyclooxygenase (COX)의 작용을 거쳐 Leukotriene, Thromboxane, Prostaglandin 등으로 바뀌는 과정 및 Nitric oxide (NO)의 대량 생성에 관여하게 되며, 숙주에 치명적 결과를 초래한다고 알려져 있다¹⁸⁾. 산화질소 (nitric oxide, NO)는 저분자량의 높은 반응성을 갖는 수명이 짧은 기체 분자로 혈관세포와 다른 조직에서 국지성 화학 작용제, 평활근 이완, 신경전달물질 등 긍정적인 측면도 있지만 활성산소를 생성하여 지질과 단백질에 해를 입힌다¹⁹⁾.

RAW 264.74 세포를 LPS로 자극한 후, 추출물을 처리하여 NO 생성량을 측정한 결과 기존 경옥고인 KO 보다 히팅 맨틀로 제조한 경옥고인 K1 처리군에서 NO 생성량이 감소하였고 가미경옥고 중에서는 BKF 처리군에서 가장 크게 감소한 것을 확인 할 수 있었다. 이는 흑삼이 NO 생성량을 감소시킨다는 기존의 연구 결과²⁰⁾과 일치하며, 기존 경옥고보다 흑삼을 가미하거나 발효하였을 때 항산화 작용이 증가됨을 알 수 있다.

세포는 계속해서 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)에 노출되어 산화 스트레스를 받고 있고, 산화제와 항산화제의 균형이 깨어져 ROS가 과도하게 발생되면 세포나 조직이 손상을 받게 된다²¹⁾. 세포 내 redox를 측정하기 위하여 대표적으로 Carboxydichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)를 사용하는데 DCFH-DA는 비극성 화합물로서 세포에 침투 후 세포 내 esterase에 의하여 막 비투과적 non-fluorescent polar 유도체로 전환이 되어 진다. 이렇게 전환된 DCFH는 연차적으로 세포내 hydrogen peroxide에 의하여 fluorescent 2', 7'-dichlorofluorescein으로 산화되어진다. 세포내에서 산화되어진 DCFH는 polyphenol을 처리 후 510 nm에서 FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA)로 측정이 되어 진다²²⁾. RAW 264,74 세포를 LPS로 자극한 후 추출물을 처리하여 ROS 생성량을 분석한 결과, K0와 K1을 비교하였을 때 기존 경옥고인 K0처리군보다 히팅 맨틀로 제조한 경옥고인 K1 처리군에서 ROS가 감소하였으며, 가미 경옥고 중 BKF 처리군은 양성대조군인 CsA군 과 유사하게 ROS 생산량을 유의하게 감소시켰다. 항산화 활성 관련 실험 결과를 종합적으로 보았을 때, 기존 경옥고 보다 히팅 맨틀로 제조한 경옥고가 더 높은 항산화 활성을 가지는 것으로 확인되었으며, 가미 경옥고 중 흑삼가미발효경옥고가 가장 높은 항산화 활성을 보이는 것으로 나타났다.

염증 반응은 자극에 대한 방어로 조직의 구조와 기능을 정상적으로 회복하기 위해 필수적으로 일어나는 반응으로 정상적인 염증반응은 시간이 지남에 따라 염증 촉진성 매개체 (pro-inflammatory mediators)의 생성은 감소되고, 항염증성 매개체 (anti-inflammatory mediators)는 증가됨으로써 스스로 염증반응이 제한되는 조절 과정을 가지고 있다²³⁾. 대식 세포는 Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin IL-1 β , IL-6, Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)와 같은 염증 촉진성 사이토카인 (cytokines) 등의 자극에 노출됨으로써 활성화 된다²⁴⁾. 염증 사이토카인 유전자 중 IL-1 β 생성량 감소에는 홍삼이 비교적 크게 영향을 미치고 IL-6 생성량은 흑삼이 유의적으로 감소시키며 백삼, 홍삼, 흑삼 추출물 모두 TNF- α 생성량에는 영향을 미치지 않았다는 연구결과가 보고되어 있다²⁰⁾. 본 실험에서는 LPS로 자극한 RAW 264,74 세포에 경옥고 추출물을 처리하여 염증 사이토카인 유전자 발현을 분석한 결과, 기존 연구결과와 일치하게 TNF- α 생성량은 유의성이 없었다. 그러나 COX2, IL1 β , IL6, NOS-II mRNA에서 흑삼가미경옥고 및 흑삼가미발효경옥고가 뛰어난 항염 효능을 나타냈다.

본 실험 결과를 종합하여 보면 기존의 유통되고 있는 경옥고인 K0 보다 히팅 맨틀로 제조한 경옥고인 K1은 높은 항산화 활성을 나타내는 것으로 확인되었으나 항염증 효능을 유사하게 나타냈다. 또한 히팅 맨틀로 제조한 경옥고 중에서도 제조의 가열 방법보다는 재료 및 재료의 가공방법(흑삼, 발효 등)에서 효능의 차이가 발생하는 것으로 나타났다. 이에 흑삼을 가미한 경옥고나 발효를 한 경옥고가 항산화 효능 및 항염증작용이 증대하였음을 알 수 있었고 특히 흑삼가미발효경옥고의 항산화 효능 및 항염증작용이 증가되었음을 확인하였다.

V. 결 론

본 연구에서는 히팅 맨틀로 제조한 경옥고와 기존의 경옥고의 효능을 비교하였을 뿐 아니라, 제조의 방법을 다양화하여 항산화 및 항염증 효능을 검증하였다. 실험 방법에는 DPPH 라디칼 소거능에 의한 항산화 활성 및 RAW 264,74 세포주를 배양하여 세포에 미치는 항산화 및 항염작용을 사용하였으며 실험 결과를 고찰 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DPPH 소거능에 의한 항산화 활성은 기존의 경옥고 보다 히팅 맨틀로 제조한 경옥고가 더 높은 효능을 나타내었고, 흑삼을 가미하고 발효하였을 때, 이보다 더 높은 항산화 효능을 나타내었다.
2. RAW 264,74 세포에서 NO 생성량 측정 결과 또한 DPPH 라디칼 소거능 결과와 일치하게 기존의 경옥고 보다 히팅 맨틀로 제조하였을 때 NO 생성량이 감소하였고 인삼과 흑삼을 가미하여 발효시킨 후 처리했을 때 더 크게 NO 생성량이 감소하였다.
3. RAW 264,74 세포에서 ROS 생성량은 흑삼가미발효경옥고에서 양성 대조군과 유사한 수준으로 현저하게 감소되었다.
4. 염증 사이토카인 인자인 NOS-II, COX-2, IL-1 β , IL-6, mRNA 유전자 분석 결과에서 기존의 경옥고와 히팅 맨틀로 제조한 경옥고가 유전자 발현이 유사하게 감소하였으나 유의성이 없었고, 흑삼가미발효경옥고는 유의한 감소를 보여 뛰어난 항염증 효능을 나타내었다. TNF- α mRNA 유전자 분석 결과에서는 발현 감소는 하였으나 모든 군에서 유의성은 나타나지 않았다.

결과적으로 경옥고 각각은 항산화와 항염증 작용을 갖고 있으며 기존의 경옥고 보다 히팅 맨틀로 제조하였을 때 더 높은 효능을 나타내었다. 히팅 맨틀로 제조한 경옥고 중 특히 흑삼가미발효경옥고는 뛰어난 항산화 및 항염증 효능을 나타내어 천연 항염증 작용제로서 충분하다고 판단되어 질병의 예방 및 치료약물로 이용하고 제조의 편리성을 갖춘 경옥고 제조가 기대 된다.

References

1. Li JW. Dictionary of Chinese medicine. Beijing : People's Health Publishing House, 2004 : 1669.
2. Heo J. Donguibogam naegyeongpyeon. Seoul : Gyemyeong Publishing House, 1993 : 78.
3. Hwang DY. Daeyeog dongmaeg bangyaghabpyeon. Seoul : Namsandang, 1977 : 191.
4. Shin BY. Anti-amnesic effects of a herbal medicinal prescription modified from Kyung-Ok-Ko on Scopolamine- or transient forebrain Ischemia-Induced

- Memory Impairment. Kyung Hee University. 2011 : 1-53.
5. Kim JB, Song HN. Effects of Kyeongok-go and Its Two Added Precipitations on Hyperlipidemic Rats Induced by High-fat Diet. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2014 ; 28(4) : 371-8.
 6. Jung HJ, Jung SK, Rhee HK, Jeon SB. Experimental Studies of the effects of Kyungok-go against Mycobacteria tuberculosis. *Korean J. Orient Int. Med*. 2000 ; 21(4) : 555-63.
 7. Lee KS, Kim GH, Kim HH, Seong BJ, Kim SI, Han SH, Kang EJ, Yoo YC. Qualities and Anti-inflammatory Activity of Kyungokgos Sold in Local Markets. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2013 ; 42(3) : 335-41.
 8. Lee SY, Shin YJ, Park JH, Kim SM, Park CS. An Analysis of the Gyungokgos Ingredients and a Comparison Study on Anti-oxidation Effects According to the Kinds of Extract. *Kor. J. Herbology*. 2008 ; 23(2) : 123-36.
 9. Whang WK, Oh IS, Kim YB, Shin SD, Kim IH. The Physiological Activities of KYUNG OK-KO(III)-Effects on Inflammation, Gastric Ulcer, Analgesic and Homothermics. *Kor. J. Pharmacogn*. 1994 ; 25(2) : 153-9.
 10. Kim JH. The Anti-fatigue effect of modified kyungohkgo composition oriental medicines, Wonkwang University. 2011 : 1-35.
 11. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958 ; 181(4617) : 1199-1200.
 12. Lee JH, Seo YB, Kim BS. A study of modern application of Kyungohkgo through historical analysis of its virtues. *Kor. J. Oriental Medicine Institute*. 2016 : 24(2) : 25-34.
 13. Kwon SU, Lee HY, Xin MG, Il JY, Cha JY, Kim HJ, Kwak WR, Go CK, Kim DK, Lee YM. Preparation of Kyungohkgo suspension beverage containing cultivated wild ginseng. *Korean. J. Oriental Physiology & Pathology*. 2013 ; 27(2) : 233-8.
 14. Ann SW, Kim YC, Hwang IS, Cho JW, Kim MS, Lee JK, Eum WY. Effect of seafood amino acid fertilizer and Korean effective microorganisms on the fruit quality of fuji apple. *Journal of Environmental Science International*. 2010 ; 19(10) : 1293-99.
 15. Doh ES, Chang JP, Lee KH, Seong NS. Ginsenoside Change and Antioxidation Activity of Fermented Ginseng. *Korean J. Medicinal Crop Sci*. 2010 ; 18(4) : 255-65.
 16. Lee ST, Jeong YR, Ha MH, Kim SH, Byun MW, Jo SK. Induction of nitric oxide and TNF- α by herbal plant extract in mouse macrophage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. 2000 ; 29(2) : 342-8.
 17. Jeong JB, Hong SC, Jeong HJ, Koo JS. Anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction from *Cnidium officinale* Makino on LPS-stimulated RAW 264.74 and THP-1 cells. *Korean J. Plant Res*. 2012 ; 25(3) : 299-307.
 18. Kim DH, Park SJ, Jung JY, Kim SC, Byun SH. Anti-inflammatory effects of the aqueous extract of Hwangnyenhaedoktang in LPS-activated macrophage cells. *Kor. J. Herbology*. 2009 ; 24(4) : 39-47.
 19. Sherwood L. *Fundamentals of Human Physiology*. Massachusetts : Cengage Learning Publishing. 2011 : 35.
 20. Jang AY, Sueng YC, Ji JG. The comparative study on physiological activity of White ginseng, Red ginseng and Black ginseng extract. *Journal of Digital Convergence*. 2016 ; 14(5) : 459-71.
 21. Shin SH, Shin YO, Lee JY, Lee AR, Kim MY, Park CH, Seo BI, Roh SS. Ethanol-Heated Processed *Scutellariae Radix* Improve Inflammatory Response through an Inhibitory Effect against Oxidative Stress in Mice with the Lipopolysaccharide-induced Intestine Injury of Mice. *Kor. J. Herbology*. 2015 ; 30(4) : 81-8.
 22. Lee EI, Oh EH, Song HJ, Choi WJ, Baek JO, Lee JR, Roh JY. Oxidative Damage to Macromolecules in Atopic Dermatitis Patients. *Kor. J. dermatology*. 2015 ; 53(6) : 456-61.
 23. Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2002 ; 2(10) : 787-95.
 24. Xie QW, Whisnant R, Nathan C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 1993 ; 177(6) : 1779-84.