

오령산 정제 개발 및 항염증 효과

김세진 · 임현희 · 남원희 · 손수미 · 최혜민 · 김명진 · 김정옥 · 이화동*

한국한의학진흥원 한의기술 R&D 2팀

Effect of Anti-inflammation on Oryeong-san Formulation
for Mix Extract TabletSe Jin Kim, Hyun Hee Leem, Won Hee Nam, Su Mi Son, Hye Min Choi, Myung Jin Kim,
Jung Ok Kim, Hwa Dong Lee*

Korean Medicine R&D Team 2, National Institute for Korean Medicine Development

Oryeong-san (ORS) is a traditional Korean herbal medicine widely used for renal associated diseases, composed of five medicine herbs: *Atractylodes japonica* Koidzumi, *Cinnamomum cassia* Presl, *Polyporus umbellatus* Fries, *Poria cocos* Wolf and *Alisma orientale* Juzepzuk. We studied to improve the convenience of intake and portability by developing modernized dosage forms, and examined the effect on anti-inflammation of ORS. In order to develop the tablet formulation of ORS (ORS-F), the tablets were evaluated on the basis of physical characteristics include diameter, thickness, weight variation, hardness, friability and disintegration. To analyze the marker components of ORS-F, eight index markers from five herbal medicines were chosen. And the method using high performance liquid chromatography (HPLC) with diode-array detector method was established for the simultaneous analysis. The biological activities were examined the effect of ORS-F on pro-inflammation mediated by LPS-stimulation. The production of nitric oxide (NO) and cytokines were determined by reacting cultured medium with griess reagent and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible NO synthase (iNOS) were investigated by Western blot and RT-PCR. The anti-oxidant activities of OJS-F increased markedly, in a dose-dependent manner, and, The total phenolic compound and flavonoids contents of OJS-F were $10.20 \pm 0.09 \mu\text{g}/\text{mg}$ and $12.86 \pm 0.86 \mu\text{g}/\text{mg}$. OJS-F which is LPS has diminished in the LPS-induced release of inflammatory mediators (NO, iNOS, COX2 and PGE₂) and pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6 and IL-1 β) from the RAW264.7 macrophages. Therefore, the developed formulation for tablet of ORS-F provide efficiency and usability, and indicated effect of anti-inflammation.

keywords : *Oryeong-san* (ORS)(五苓散), Tablet, Simultaneous analysis, Anti-inflammation, Cytokines

서 론

오령산(五苓散)은 임상 한의학 전문서적으로 수많은 한의학 이론과 한약 처방의 원류가 된 최고의 한의학 서적이자, 중국 고서인 상한론(傷寒論)에서 처음 기재된 처방으로, 부종, 현기증, 구토 외에도 신장질환과 관련된 증상들에 사용되어왔다. 또한 임상적 연구에서 이뇨, 혈압강하, 신장보호 및 일차성 불면증과 월경통에 효과가 있음이 임상적 연구를 통하여 보고된바 있다.¹⁻⁵⁾ Kim 등의 보고에 따르면 국내에서는 신장기능 개선에 대한 연구가 가장 많고, 비만억제 및 간보호, 당뇨 개선에 관한 연구가 이루어졌고, 중국 또한 신장기능 개선 연구가 가장 많으며 고혈압 개선, 위장관, 설사, 당뇨개선에 관한 연구가 보고되어 있으며, 일본의 경우 고혈압 개

선에 관한 연구가 가장 많이 보고되었고, 신장 기능 개선, 간보호, 안구기능 개선, 당뇨 및 설사, 해열에 관한 연구가 보고된 것으로 알려져 있다.⁶⁾

한약은 과거에서부터 현재까지 많은 사람들의 건강을 책임지고 있으며, 구시대적으로 치부되던 한약의 약효에 대해 세계적으로 인정되고 있는 추세이다. 그럼에도 불구하고 한약의 전통적인 복용방법인 탕약에 대한 불편함과 품질에 대한 불신이 여전히 문제점으로 제기되고 있는 실정이다. 또한 다양한 탕전방법은 추출 시 물질들 간의 다양한 화학반응의 수반으로 추출법에 따라 복용 시 효과에 영향을 미칠 수 있음을 보고하고 있다. 중국에서는 중약제제의 세계시장 선점을 위해 현대화와 고품질화, 제조공정 및 장비 향상, 유통관리를 위해 GMP 도입과 제형의 변화를 추구하여 왔고, 일본

* Corresponding author

Hwa Dong Lee, National Institute for Korean Medicine Development, Gyeongsangbuk-do 38540, Republic of Korea

E-mail : herb@nikom.or.kr ·Tel : +82-53-810-0332

Received : 2020/10/12 ·Revised : 2020/12/01 ·Accepted : 2020/12/11

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2020.12.34.6.348>Available online at <https://kmpath.jams.or.kr> & <http://jppkm.org>

은 한방 엑기스 제제로 간편성, 편리성 및 제품의 표준화를 통해 국내외 시장에서 경쟁력을 확보하고 있다.⁷⁻⁹⁾ 이에 따라 국내에서도 한약제제에 대한 품질 신뢰와 경쟁력 강화를 위해 정제, 연조엑스제 등 다양한 제형의 한약제제들에 대한 건강보험 적용으로 한약제제의 제형개발과 품질 표준화에 대한 요구가 지속되고 있는 있다.¹⁰⁻¹²⁾

한약제제에 대한 연구는 약리효과에 대한 보고가 주를 이루고 있으며, 제제화에 대한 연구는 시판제제와 전탕액과의 비교연구가 대부분으로 미비한 실정이다.¹³⁻¹⁵⁾ 본 연구는 오령산을 대상으로 보관과 복용이 편리한 현대적 제형으로 개발하고, 주요성분의 동시분석법 개발하여 품질관리법을 확보하였으며, 항산화, 항염증 실험을 통하여 오령산 정제의 약리효능을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 한약재

실험에 사용된 오령산의 구성 한약재 중 백출(白朮), 육계(肉桂), 저령(豬苓), 복령(茯苓) 및 택사(澤瀉)는 (주)휴먼허브(Gyeongsan, Korea)에서 구입하여 전문가 감별 후 사용하였다. 각각의 구성 한약재들의 표본은 한국한의약진흥원 한의기술 R&D2팀의 한약재보관실에 보관하였다.

2. 시약 및 기기

정제 제조를 위한 첨가제인 Lactose, Starch, Vivasol, SiO₂, Magnesium stearatesms (주)화일약품(seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

시료 전처리 및 HPLC 분석을 위한 아세토니트릴과 메탄올은 액체크로마토그래피용(J.T. Baker, USA)으로 구입하였고, phosphoric acid는 Junsei (Japan)에서 구입하여 사용하였다. 표준물질로 사용한 3,4-Dihydroxybenzaldehyde, Coumarin, polyporusteron B, Cinnamic acid, Polyporusterone A, Cinnamaldehyde, Atractylenolide III 및 Alisol B 23-acetate은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였으며, 각 표준물질의 순도는 95% 이상이었다. HPLC는 Agilent 1260 series를 사용하였고, YMC C18 (5 μ m, 4.6x250 mm, phenomenex, Torrance, CA, USA) column으로 분리하였다.

세포배양을 위해 Fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), Penicillin-streptomycin, Pospbate buffered saline (PBS)는 Hyclone (USA), Lipopolysaccharide (LPS), Ehtanol, Chloroform, 2,2-diphenyl-1-picrylhygrazy (DPPH)은 Sigma-Aldrich (USA), TNF- α , IL-1 β 및 IL-6에 대한 Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA) kit는 R&D Systme (USA)에서 구입하여 사용하였다.

단백질 분석을 위해 사용한 1차 항체인 iNOS는 BD Bioscience (USA), β -actin과 2차 항체인 goat anti-Mouse IgG-HRP는 Santa Cruze (USA)에서 구입하였다. Total RNA extraction을 위해 사용한 RNAiso는 TaKaRa (Japan)에서, cDNA

합성과 PCR에 사용한 모든 시약은 Intron (Korea)에서 구입하여 사용하였다.

3. 오령산 정제(ORS-F) 제조

오령산의 구성은 Table 1과 같다. 오령산 정제를 제조하기 위해 오령산을 구성하는 한약재 즉, 백출, 육계, 저령, 복령 및 택사를 각각 단일 칭량한 후 중량의 10배에 해당하는 정제수를 넣고 100°C에서 3시간 동안 추출, 여과 및 농축한 다음 진공 건조하여 단일 건조엑스를 얻었다. 각각의 건조엑스는 Table 1의 비율대로 혼합하여 정제 제조에 사용하였다. 오령산 정제 (ORS-F)는 Table 2의 비율에 따라 각각의 건조엑스와 첨가제를 칭량한 후 균일하게 혼합한 다음 단발타정기(TRB 16, Ereweka, Germany)를 사용하여 직접 타정법을 통해 제조하였으며, 제조된 정제는 데시케이터에 보관하였다.

Table 1. Composition of *Oryeong-san*

Name	Amount (g)	Yield (%)	Dry extract (g)	Source
<i>Attractylodes japonica</i> Koidzumi	1.88	23.0	0.432	Dongbei, china
<i>Cinnamomum cassia</i> Presl	0.63	3.2	0.020	Yen Bai, Vietnam
<i>Polyporus umbellatus</i> Fries	1.88	1.7	0.032	Sichuan, China
<i>Poria cocos</i> Wolf	1.88	1.0	0.019	Hubei, China
<i>Alisma orientale</i> Juzepzuk	3.13	10.3	0.322	Suncheon, Korea
Total amount	9.40		0.825	

Table 2. Pre-formulation of the Oryeong-san tablets

Component	F1		F2		F3		F4	
	Ratio (%)	Weight (g)	Ratio (%)	Weight (g)	Ratio (%)	Weight (g)	Ratio (%)	Weight (g)
ORS powder	85.0	0.825	85.0	0.825	85.0	0.825	85.0	0.825
Lactose	-	-	2.0	0.019	12.0	0.116	10.0	0.097
Starch	12.0	0.116	10.0	0.097	-	-	2.0	0.019
Croscarmellose sodium	2.0	0.019	2.0	0.019	2.0	0.019	2.0	0.019
SiO ₂	0.5	0.005	0.5	0.005	0.5	0.005	0.5	0.005
Magnesium stearate	0.5	0.005	0.5	0.005	0.5	0.005	0.5	0.005
합 계	100	0.970	100	0.970	100	0.970	100	0.970

4. 정제 물성평가

오령산을 구성하는 각 한약재의 건조엑스와 첨가제를 혼합한 후 물성평가를 위해 겉보기 밀도(Bulk density, ρ_{bulk})와 탭 밀도(Tap density, ρ_{tapped})를 측정하였고, 그 측정값으로 Hausner ratio 값을 구하여 흐름성을 평가하였다.

$$\text{Hausner ratio} = \frac{\rho_{tapped}}{\rho_{bulk}}$$

제조된 오령산 정제는 무게, 직경, 두께, 경도를 Hardness Tester (TBH 325, Ereweka, Germany)를 통해 측정하였으며, 이때 모든 평가는 3회 측정값의 평균으로 계산하였다. 마손도는 10개의 정제를 Friability Tester (TAR 120, Ereweka, Germany)에서 25 rpm으로 4분 동안 회전시킨 후, 손실된 무게를 측정하여 다음의 수식으로 계산하였다.

$$\% \text{ Friability} = \frac{\text{Initial weight of tablets} - \text{Final weight of tablets}}{\text{Initial weight of tablets}} \times 100$$

붕해도 시험은 Disintegration Tester (Disintegration 3100, DISTEK, USA)를 사용하여 37 ± 0.5°C의 정제수에서 시험하였고, 붕해시간은 검체의 잔여물이 유리관 안에 존재하지 않거나 남아있더라도 원형을 나타내지 않는 연질의 물질이 존재할 때까지의 시간으로 하였다.

5. 성분분석

8종의 지표물질은 methanol (MeOH)을 용매로 하여 1 mg/mL의 농도로 제조하여 4°C에 보관하였고, 각 지표물질을 혼합하여 100 µg/mL 농도로 희석하여 표준액으로 사용하였다. 오령산 정제 1회 해당량을 칭량한 후 50% MeOH을 첨가하여 100 mL로 맞추어 30분간 초음파 추출한 다음 원심분리된 상층액을 0.2 µm membrane 여과 후 검액으로 사용하였다. 유속은 1.0 mL/min으로 하였고 시료 주입량은 10 µL였다. 8종 지표성분의 검출은 PDA 검출기를 이용하여 210 nm, 254 nm 및 280 nm의 파장에서 분석하였다. 이동상은 Table 3에서와 같이 기울기 용매 조건으로 최적의 분리조건을 확립하였다.

Table 3. Solvent Gradient conditions for HPLC-PDA Analysis

Time (min)	Solvent A *	Solvent B +
0	95	5
5	95	5
30	88	12
35	83	17
53	60	40
60	60	40
75	0	100
80	0	100

* A : 0.05% H₃PO₄ in water + B : 0.05% H₃PO₄ in Acetonitrile

6. 시료조제

활성평가를 위한 오령산 정제 시료(ORS-F)는 100 mg으로 정확히 측정된 후 50% DMSO 에 넣어 1 mL로 맞추어 후 0.2 µm membrane 여과 후 사용하였다.

7. 항산화 활성 평가

항산화 활성을 평가하기 위하여 Blios의 방법을 변형하여 DPPH (1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma Aldrich, USA) radical 소거능을 측정하였다.¹⁶⁾ ORS-F는 100, 200, 500, 1000 µg/mL로 희석하여 96 well plate에 100 µL를 주입하고 0.2 mM DPPH 50 µL를 첨가하여 혼합한 후 실온에서 30분 동안 반응시켜 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화능은 희석 용매인 정제수를 대조군으로 하고, 활성비교를 위하여 양성대조군으로 Butylated hydroxyanisole (BHA)를 사용하였다. 총 폴리페놀함량은 Folin-Ciocalteu reagent (Sigma Aldrich, USA)가 추출물의 폴리페놀성 화합물에 의해 환원되어 청자색으로 발색하는 것을 원리로 분석하였다. 표준물질로는 tannic acid (Sigma Aldrich, USA)를 이용하여 검량선을 작성하였다. 플라보노이드 함량은 Singleton VL 등의 방법¹⁷⁾을 변형하여 측정하였고, 표준물질로 quercetin

(Sigma Aldrich, USA)를 이용하여 검량선을 작성하였다.

8. NO 및 PGE₂ Cytokine 의 농도 측정

RAW 264.7세포를 12 well plate에 5×10⁴ cell/well로 분주하고 ORS-F를 50, 100, 200 µg/mL로 1시간 전처리를 하였다. 이 후 LPS를 100 ng/mL로 처리한 후 24시간동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하고 배양 상층액을 취해 각 실험에 사용하고 세포는 cell extraction을 위하여 사용하였다. NO 측정을 위해서 배양액 100 µL에 동량의 Griess reagent (Sigma, USA)를 넣고 10분간 반응시킨 후 microplate reader (Tecan Infinite M200)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite의 standard curve와 비교해 계산하였다. PGE₂ 사이토카인 분비측정을 위해 ELISA kit (BD, USA)를 사용하였고, 제조사의 방법에 따라 그 양을 측정하였다. 양성 대조군으로 Dexamethasone을 사용하였다.

9. Cytokine (IL-1β, IL-6 및 TNF-α) 측정

RAW 264.7세포를 12 well plate에 5×10⁴ cell/well로 분주하고 ORS-F를 50, 100, 200 µg/mL로 1시간 전처리를 하였다. 이 후 LPS를 100 ng/mL로 처리한 후 24시간 동안 배양하고 배양 상층액을 실험에 사용하였다. 전 염증성 사이토카인의 염증매개물질은 배양 상층액에서 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)법으로 사용하였으며, 사이토카인 분비측정을 위해 ELISA kit (BD, USA)를 사용하였고, 제조사의 방법에 따라 그 양을 측정하였다. 양성 대조군으로 Dexamethasone을 사용하였다.

10. RT-PCR Assay

RNA 분리를 위해 RAW 264.7세포를 12 well plate에 5×10⁴ cell/well로 분주하고 ORS-F를 50, 100, 200 µg/mL로 1시간 전처리를 하였다. 이 후 LPS를 100 ng/mL로 처리한 후 2시간 및 6시간 동안 배양하고 이 후, RNA iso reagent를 이용해 제조사의 방법에 따라 Total RNA를 취하였다. Total RNA는 Maxime RT PreMix Kit (iNtRON, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였고, 유전자 증폭을 위해 특정 primer를 넣고 각 primer에 따른 PCR 조건에 따라 실시하였다. 사용한 primer는 다음과 같다.

COX-2	F: 5'-GAGGCCACTGATACCTATTG-3'
	R: 5'-ACAAAGAAGGTTCCCAATT-3'
iNOS	F: 5'-CCTCCTCCACCCTACCAAGT-3'
	R: 5'-CACCCAAAGTGCTTCAGTCA-3'
IL-1β	F: 5'-TCATTACACAGGACAGGTAT -3',
	R: 5'-CATTAACAACCTGCACTACA-3'
IL-6	F: 5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAG-3',
	R: 5'-GGAAATTGGGGTAGGAAGGA-3'
TNF-α	F: 5'-GGCAGGTCTACTTTGGAGTC-3'
	R: 5'-ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG-3'
GAPDH	F: 5'-CAACTCCCACTCTTCCACCT-3'
	R: 5'-CTTGCTCAGTGCTCTTGCTG-3'

각 DNA는 1.5% agarose gel에 전기 영동시킨 후 UV 검출기로 확인하였다.

11. 통계처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 유의성 검사는 one way ANOVA test를 실시한 후 Turkey test로 사후 검증하였다. P<0.05 이상일 때만 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결 과

1. 오령산 정제(ORS-F) 제조 및 물성 평가

오령산 정제 제조를 위하여 첨가제의 비율별로 혼합하여 혼합물의 흐름성을 겔보기 밀도, 탭 밀도(Table 4)를 측정하여 Hausner ratio에 의해 평가하였다. Hausner ratio는 Excellent (1.00~1.11), Good (1.12~1.18), Fair (1.19~1.25), Passible (1.26~1.34), Poor (1.35~1.45), Very poor (1.46~1.59), Very very poor (>1.60)의 총 7개 등급으로 나누어 흐름성을 평가하였다. 또한 오령산 정제의 첨가제 혼합비에 따른 경도, 마손도 및 봉해도를 측정된 결과는 Table 4와 같다. F1~F4 혼합물의 Hausner ratio 값은 각각 1.16, 1.15, 1.15 및 1.15로 흐름성은 모두 우수한 것으로 나타났으며, 제조된 정제의 경도는 21.44, 15.77, 8.56 및 11.42 KP로 F3을 제외한 정제에서 10 KP 이상의 경도를 보여주었다. 봉해도 측정결과 F3과 F4에서의 15분 이내에 모두 봉해되는 것으로 나타났다. 이상의 측정결과 우수한 제제학적 특성을 나타낸 F4를 오령산 정제 제조를 위한 최적 배합비로 설정하였다.

Table 4. Post-compression parameters of the Oryeong-san tablets

Parameters	F1	F2	F3	F4
Weight (mg)	485	485	485	485
Diameter (mm)	13.9	13.92	13.93	13.91
Thickness (mm)	4.71	4.93	4.96	4.83
Hardness (KP)	21.44	15.77	8.56	11.42
Friability (%)	0.69	0.73	0.72	0.60
Disintegration (min)	< 22	< 19	< 14	< 15
Hausner ratio	1.16	1.15	1.15	1.15
Flow Character	Good	Good	Good	Good

2. 오령산 정제(ORS-F)의 성분분석

HPLC-PDA를 이용하여 오령산 구성 한약재 중 백출의 atractylenolide III, 육계의 coumarin, cinnamic acid 및 cinnamaldehyde, 저령의 3,4-dihydroxybenzaldehyde, polyporusterone A 및 polyporusterone B, 그리고 택사의 alisol B 23-acetate 등 총 8종의 지표물질에 대한 동시분석법을 확립하였다(Fig. 1). 이동상인 water와 acetonitrile에 0.05% phosphoric acid를 첨가함으로써 분리능을 높였으며, 각 지표물질의 최대흡수 파장을 검토한 결과, atractylenolide III, alisol B-23-acetate는 210 nm, coumarin, polyporusterone B, cinnamic acid, polyporusterone A는 254 nm, 3,4-dihydroxybenzaldehyde, cinnamaldehyde는 280 nm를 최적분석파장으로 설정하였다. ORS-F와 표준액 8종 피크의 UV spectrum 탐색 결과, 모두 동일 스펙트럼으로 각기 다른 성분들의 피크에 간섭 없이 분리됨을 확인하였다.

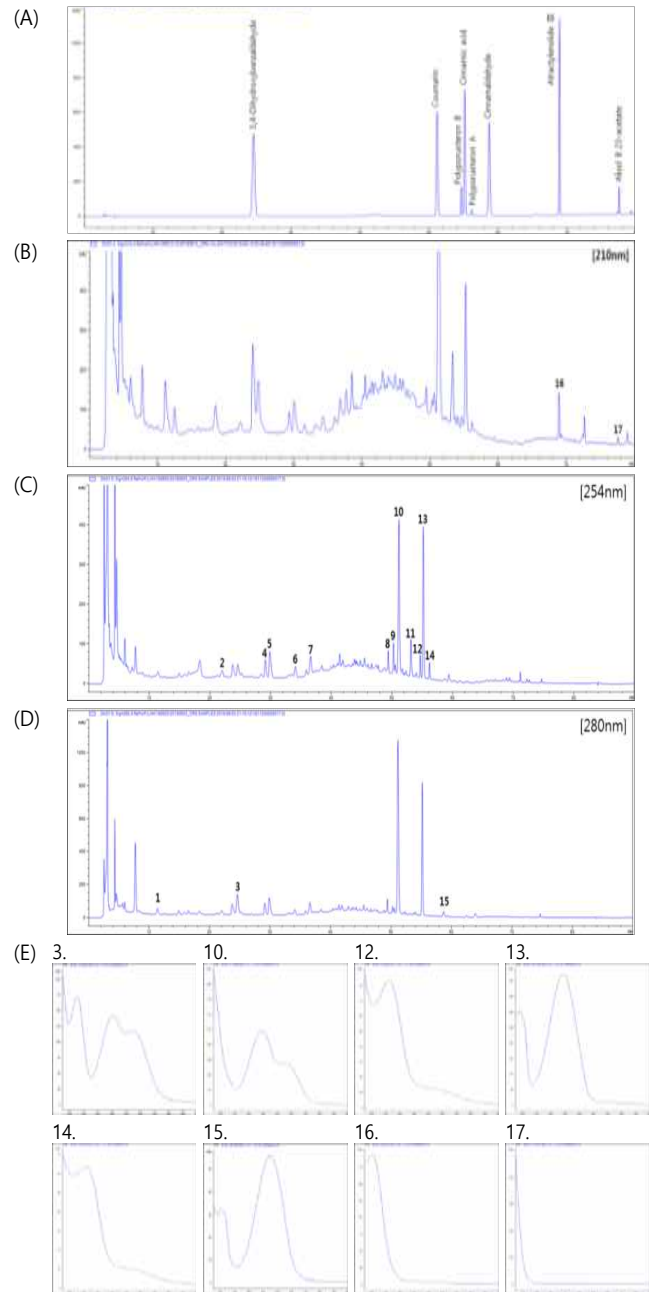


Fig. 1. Simultaneous analysis used HPLC method. (A) Standard mixture and (B-D) Oryeong-san tablets (ORS-F) are HPLC chromatogram. (E) Identification of components used to compare with UV spectrum of standard mixture and ORS-F; 3, 3,4-Dihydroxybenzaldehyde, 10. Coumarin, 12. Polyporusterone B, 13. Cinnamic acid, 14. Polyporusterone A, 15. Cinnamaldehyde, 16. Atractylenolide III, 17. Alisol B-23-acetate.

3. 오령산 정제(ORS-F)의 항산화 활성

DPPH 및 ABTS assay를 이용하여 라디칼 소거능을 확인하였고, 또한 항산화 물질인 polyphenol과 flavonoid 함량을 확인하였다. DPPH 라디칼 소거능에서 ORS-F의 EC₅₀값은 396.69 µg/mL이고, 대조군으로 사용한 BHA의 EC₅₀값은 18.31 µg/mL로 ORS-F가 대조군과 비교하였을 때 약 22배 낮은 라디칼 소거능을 보였고, ABTS 라디칼 소거능에서 ORS-F의 EC₅₀값은 277.99 µg/mL, BHA의 EC₅₀값은 19.68 µg/mL로 약 14배 낮은 라디칼 소거능을 보였고

다(Fig. 2). 또한 ORS-F의 총 폴리페놀 함량은 10.20±0.09 µg/mg, 플라보노이드 함량은 12.86±0.86 µg/mg으로 확인되었다(Table 5).

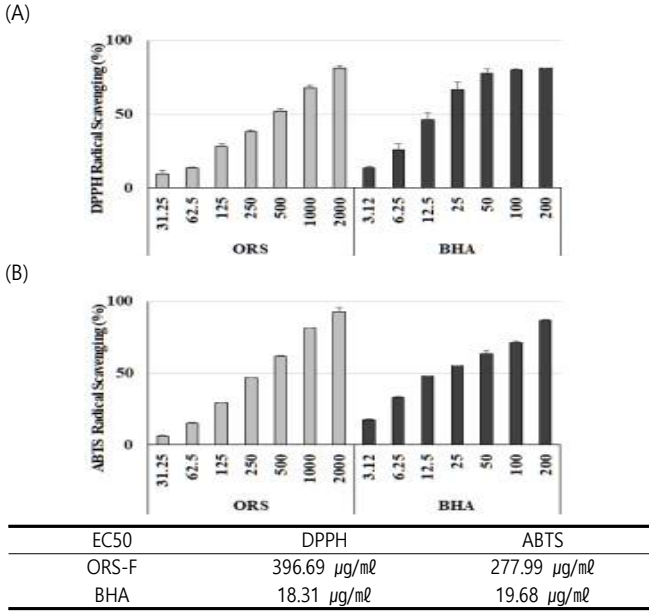


Fig. 2. DPPH radical scavenging effect of *Oryeong-san* tablets (ORS-F).

Table 5. Content of total polyphenol and flavonoid in *Oryeong-san* tablet (ORS-F)

	Polyphenol	Flavonoid
Content (µg/mg)	10.20 ± 0.09	12.86 ± 0.86

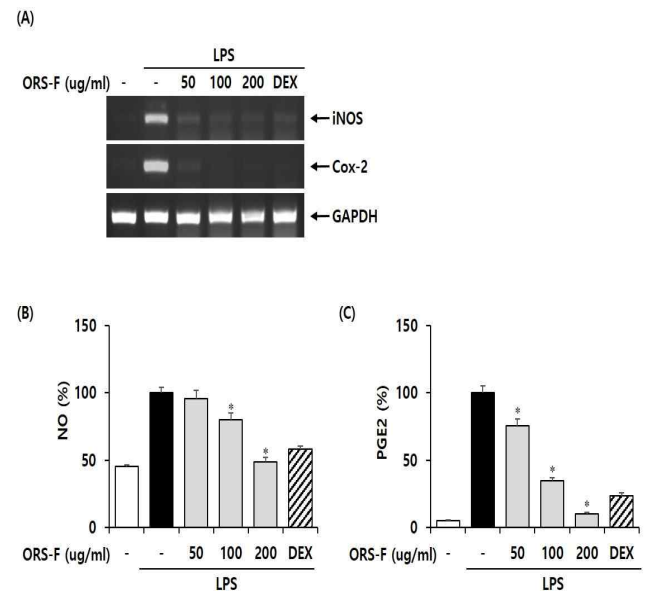


Fig. 3. Inhibition of NO and PGE₂ production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by *Oryeong-san* tablet (ORS-F). The cells were pre treated with ORS-F as various concentrations (50, 100, 200 µg/ml) for 1h, and then incubated with LPS (0.1 µg/ml) for 2hours and 24hours. The effect of 2hour were LPS-induced ORS-F was measured on the mRNA levels of (A) iNOS and COX-2. In addition, induced by LPS for 24 hours were measured by (B) NO production and (C) PGE₂ production. Data are means of three independent experimnt. *P < 0.05 vs. LPS treatment alone.

4. iNOS와 COX-2 발현 억제를 통한 NO 및 PGE₂ 생성 억제 효과

RAW264.7 세포에 약물을 처리하고 LPS를 처리하여 약물의 농도 의존적으로 iNOS와 COX-2 발현 억제를 통한 NO 및 PGE₂ 생성억제 효과를 확인하였다. 그 결과 ORS-F는 농도 의존적으로 NO (Fig 3A)와 PGE₂ (Fig 3B)의 생성을 억제하였으며, 대조군 DEX보다 더 높은 억제율을 나타내는 것으로 확인되었다. NO와 PGE₂의 생성을 유도하는 iNOS와 COX-2의 발현억제를 확인하기 위해 RT-PCR 기법을 사용하여 단백질과 유전자 발현을 조사한 결과 ORS-F는 NO와 PGE₂의 생성과 유사하게 iNOS, COX-2의 단백질과 유전자 발현 모두 농도 의존적으로 억제하였다(Fig 3C and D).

5. 염증성 사이토카인의 유전자 발현과 생성 억제 효과

염증 유발 사이토카인 중 대표 사이토카인으로 TNF-α와 IL-1β, IL-6에 대한 유전자 발현(Fig 4A) 및 생성(Fig 4B) 억제효과를 확인하였다. LPS를 처리한 RAW264.7 세포에서의 염증반응 유도 로 인한 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 mRNA 발현 및 생성이 증가되었고, ORS-F에 의해 농도 의존적으로 이들 사이토카인의 발현 및 생성을 억제시켰다. IL-1β의 생성과 유전자 발현 또한 ORS-F 100 µg/ml에서 DEX와 유사한 억제율을 나타내었고, 200 µg/ml에서 급격한 유전자 발현 억제 효과를 나타내었다. IL-6의 생성은 ORS-F 200 µg/ml에서 DEX보다 뛰어난 억제율을 나타내었으며, 유전자 발현에서는 100 µg/ml에서 DEX와 유사한 억제율을 확인하였다. TNF-α의 생성과 유전자 발현의 경우 ORS-F 100 µg/ml에서 DEX와 유사한 억제율을 나타냄을 확인하였다.

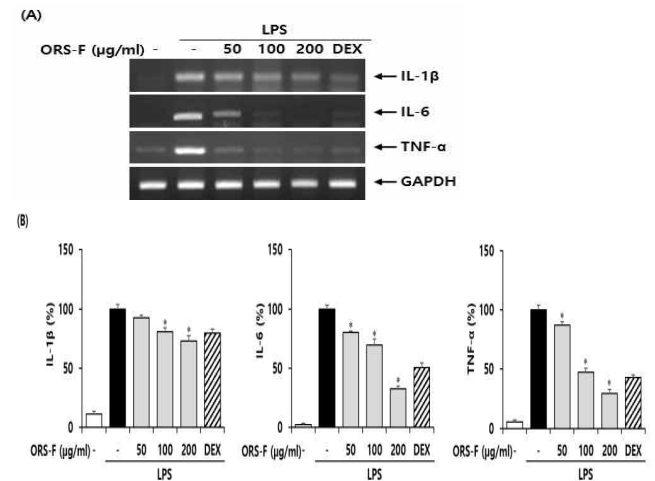


Fig. 4. Inhibition of production of inflammatory cytokine in RAW 264.7 with *Oryeong-san* tablet (ORS-F). The cells were pre-treated with ORS-F for 1hrs before being induced inflammation with LPS for 6hrs (A) and 24hrs (B). mRNA expression (A) and production (B) of inflammatory cytokines such as IL-1β, IL-6 and TNF-α were measured by RT-PCR and ELISA. Data are means of three independent experimnt. *P < 0.05 vs. LPS treatment alone.

고 찰

오령산은 한국, 중국, 일본에서 체내 수분 대사를 촉진시키는 처방으로 주로 사용되어져 왔다. 오령산의 5가지 구성 약재인 택사,

저령, 복령, 육계 및 백출 모두 체내 수분을 조절하여 부종을 제거한다고 알려져 있다.¹⁸⁾ 본 연구에서는 오령산 정제의 제조를 통해 주요성분과 활성을 확인하고자 하였다. 정제의 제조를 위해 겉보기 밀도, 탭 밀도 등으로 혼합물의 우수한 흐름성을 판단하고 제조된 정제의 경도, 마손도, 붕해도 등을 확인을 통하여 물성평가를 진행하였다. Hausner ratio값의 측정을 통해 정제 제조에 적합한 흐름성의 혼합물을 제조하였으며, 경도, 마손도 및 붕해도의 확인으로 제제학적으로 우수한 물성을 가지는 배합비의 정제를 제조하였다. 오령산의 주요성분인 atractylenolide III, coumarin, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 3,4-dihydroxybenzaldehyde, popyporusterone A, popyporusterone B 및 alisol B 23-acetate 8종의 분석을 위해 HPLC-PDA를 이용하여 다른 성분들에 영향을 주지 않으면서 동시에 효과적으로 확인할 수 있는 동시분석법을 확립하였다. 오령산의 주요성분 동시분석법은 기존 지표성분들을 개별적으로 분석하는 것보다 효율적으로 분석이 가능하여 품질관리를 위한 기초자료로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

염증반응이 일어나게 되면 대식세포와 같은 염증세포들은 nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂)를 생성하게 되며, 통증, 부종, 열과 같은 염증반응이 일어나며 염증매개인자들이 생성된다.¹⁹⁾ NO는 반응성이 높은 생체 생성분자이며, nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성으로 신경전달, 혈관의 이완 및 세포매개성 면역반응에 관여하며, 특히 LPS로 자극된 대식세포에서 iNOS의 발현으로 NO가 생성하게 된다.²⁰⁻²²⁾ 또한, cyclooxygenase (Cox)는 효소로서 arachidonic acid를 prostaglandin 변화를 촉진시키며, 신체의 항상성 유지에 관여하는 Cox-1과 염증이나 면역 반응시 cytokine에 의해 염증 부위의 세포 내 발현이 증가하는 COX-2가 있다.²³⁾ 그중 cyclooxygenase (Cox) 2는 arachidonic acid으로부터 PGE₂가 합성되며, 염증부위에서 합성된 PGE₂는 통증이 유발되는 것으로 알려져 있다.²⁴⁾ 대식세포에서 LPS 자극은 iNOS의 발현으로 다량의 NO를 생성시켜 대식세포의 종양, 박테리아 파괴능력과 같은 면역반응에 관여하는 것으로 알려져 있으며,²⁴⁾ 또한, PGE₂는 COX-2에 의해 형성되어 염증반응에 중요한 역할을 하게 되며, 혈관 생성을 유도하여 종양생성에 기여한다.²⁵⁾ 이러한 다양한 염증 질환 및 병리학적 상태에 관여하는 염증매개인자들은 오령산 정제를 전 처리한 후 LPS로 대식세포를 자극하였을 때 개선되었음을 확인하였다.

염증을 나타내는 지표로 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인은 다양한 염증매개체들을 유도하거나 면역반응의 조절에 있어 중요한 역할을 한다.¹⁹⁾ 오령산 정제를 전 처리한 후 LPS를 대식세포에 처리한 군에서 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인 유전자의 발현 및 생성이 억제되어 오령산 정제가 염증 반응 억제에 유효한 반응을 나타냄을 확인하였다.

한약제제는 제조사마다 사용되는 원료, 추출법 및 제형 등 제조방법에 대한 차이가 있어 전탕액과의 동등성과 제제의 품질에 대한 논란이 빈번하게 제기되어 왔다. 이에 오령산을 기존의 탕액보다 보관 및 복용 편의성이 높은 현대적인 제형인 정제로 개발하였으며, 오령산 정제의 주요성분 및 활성을 확인하였다. 본 연구의 결과를 통해서 얻어진 오령산의 주요성분에 대한 동시분석법과 활

성평가 결과는 한약제제에 대한 제형개발과 표준화 연구를 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

결론

오령산의 정제(ORS-F) 제조를 위하여 겉보기 및 탭 밀도를 측정하여 흐름성이 우수한 혼합물을 제조하고, 경도, 마손도 및 붕해도 등 제제학적 물성평가를 통해 제제학적으로 우수한 정제의 배합비를 설정하였다.

오령산 정제(ORS-F)의 주요성분의 확인을 위해 HPLC-DAD를 이용하여 오령산의 8가지 지표성분인 atractylenolide III, coumarin, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 3,4-dihydroxybenzaldehyde, popyporusterone A, popyporusterone B 및 alisol B 23-acetate의 동시분석법을 확립하였다.

오령산 정제(ORS-F)는 농도 의존적으로 NO 및 PGE₂ 생성을 억제하였다.

오령산 정제(ORS-F)는 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 와 같은 전염증성 cytokine의 생성을 단백질 및 mRNA 수준에서 억제하였다.

이상의 결과로 개발 제형인 오령산 정제(ORS-F)의 주요성분에 대한 동시분석법과 항염증 효과는 다양한 처방의 한약제제에 대한 제형개발 및 품질관리를 위한 연구에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. Park J, Lim EK. Research about application of Shanghanlun disease pattern identification diagnostic system to 2 cases treated by Oreong-san. J of KMediACS. 2018;10:81-94.
2. Oh YC, Jeong YH, Ha JH, Cho WK, Ma JY. Oryeongsan inhibits LPS-induced production of inflammatory mediators via blockade of the NF-kappaB, MAPK pathways and leads to HO-1 induction in macrophage cells. BMC Complement Altern Med. 2014;14:242-53.
3. Jeon WY, Lee MY, Shin IS, Lim HS, Shin HK. Protective effects of the traditional herbal formula Oryeongsan water extract on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. Evid Based Complement Alternat Med. 2012;2012:438191.
4. Park JK. A case report of primary insomnia treated by Oryeong-san decoction. J of KMediACS. 2015;7:45-52.
5. Heo J. A case report of dysmenorrhea treated by Oryeong-san based on Shanghanlun provisions. J of KMediACS. 2014;6:63-70.
6. Kim JH, Shin HK. Analysis of biological experiment on Oryeong-san (Wuling-san). Korean J. Orient. Int. Med. 2012;33:69-82.
7. Baek KY, Kim SJ, Kim JB, Lee JH, Moon SO, Lee HD.

- Comparison of marker components and biological activities of socheongryong-tang by different extract methods. *Kor. J. Pharmacogn.* 2018;49:349-61.
8. Choi SM, Kim BW. Theoretical chemical reaction for herb medicine. *J. Kor. Pharmacopuncture instit.* 2002;5:116-19.
 9. Son S. M. (2007) Demand and preference for the modification of dosage forms of oriental herbal medicines by 20s~30s younger consumers. M.S Thesis. Chung-Ang Univ; 2007.
 10. Park SJ, Kim SH, Kim KS, Kim HS, Lee AY, Kim HK, Kim YK. A quantitative analysis of marker compounds in single herb extracts by the standard of KHP. *Kor. J. Herbology.* 2014;29:35-42.
 11. Choi SI, Ahn EJ, Lee MY. Research trend for the formulation of traditional chinese medicine. *Kor. Herb. Med. Inf.* 2016;4:11-9.
 12. Kim SJ, Lee JB, Choi HM, Lee HY, Kim MJ, Lee MH, Kim JO, Lee HD. Evaluation on Pharmacological effects and component analysis of hwanggeumjakyak-tang formulation for tablet. *Kor. J. Pharmacogn.* 2018;49:362-71.
 13. Jee EH, Kim HJ, Jeong SH, Moon JH, Jang YP. Assessment of quality variance among commercial Hwang-Ryun-Hae-Dok-Tang by simultaneous analysis of characterizing compounds. *Kor. J. Pharmacogn.* 2010;41:161-5.
 14. Kim Y, Kim OS, Seo CS, Shin HK. Comparison of the ingredient quantities and biological activities of Hwangryunhaedok-tang (Hwanglianjiedu-tang) decoction and commercial extractive granules. *Kor. J. Pharmacogn.* 2013;44:22-9.
 15. Kim OS, Seo CS, Kim Y, Shin HK. Comparative study on chemical composition and biological activities of Samchulkunbi-tang decoction and commercial herbal medicine. *Formula Science.* 2012;20:1-11.
 16. Bosis MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958;181:1199-200.
 17. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic- Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 1965;16:144-58.
 18. Kobayashi H, Takahachi K, Mizuno N, Kutsuna H, Takahachi M. An alternative approach to atopic dermatitis: part I-case-series presentation. *eCAM.* 2004;1:49-62.
 19. Choi SB, Bae GS, Jo IJ, Park KC, Seo SH, Kim DG, Shin JY, Gwak TS, Lee JH, Lee GS, Park SJ, Song HS. The anti-inflammatory effect of Lithospermum Erythrorhizon on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. *Kor. J. Herbology.* 2013;28:67-73.
 20. Kwamata H, Ochiai H, Mantani N, terasawa K. Enhanced expression of inducible nitric oxide RAW264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am J Chin Med.* 2000;28:217-26.
 21. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF.) Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW264.7 macrophages. *Life Sci.* 2001;69:625-35.
 22. Kim MS, Jeong JS, Lee HY, Ju YS, Bae GS, Seo SW, Cho IJ, Park SJ, Song HJ. The anti-inflammatory effect of *Achyranthes japonica* on lipopolysaccharide-induced inflammatory activity in murine macrophages. *Kor. J. Herbology.* 2011;26:51-7.
 23. Jung YS, Eun CS, Jung YT, Kim HJ, YU MH. Anti-Inflammatory Effects of *Picrasma Quasioides* (D.DON) BENN Leaves Extract. *Journal of Life Science.* 2013;23:629-36.
 24. Rocca B, FitzGerald GA. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *International Immunopharmacology.* 2002;2:603-30.
 25. Bishop-Bailey D, Calatayud S, Warner TD, Hla T, Mitchell A. Prostaglandins and the regulation of tumor growth. *J Environ Pathol Tox Oncol.* 2002;21:93-101.