

## 참당귀, 중국당귀, 일당귀의 헤모글로빈 활성도 비교

이장천<sup>1#</sup>, 조수인<sup>1</sup>, 김형우<sup>1</sup>, 김정훈<sup>1</sup>, 성대동<sup>2</sup>, 이부균<sup>1\*</sup>

1 : 부산대학교 한의학전문대학원 약물의학부, 2 : 고려대학교 신소재화학과

### Comparison of Hemoglobin Activity of *Angelica gigas*, *Angelica sinensis* and *Angelica acutiloba* roots

Jang-Cheon Lee<sup>1#</sup>, Suin Cho<sup>1</sup>, Hyungwoo Kim<sup>1</sup>, Jung-Hoon Kim<sup>1</sup>  
Dae Dong Sung<sup>2</sup>, Boo-Kyun Lee<sup>1\*</sup>

1 : Division of Pharmacology, School of Korean Medicine, Pusan National University  
2 : Department of Advanced Chemistry, Korea University

#### ABSTRACT

**Objectives** : *Angelicae gigas*, *A. sinensis* and *A. acutiloba* are three types of plants used as *Angelicae Radix* (Dang-Gui). Many doctors of Korean medicine want to know the difference in clinical use of these three species. This study aimed to compare the hemoglobin-related activity of the extracts of *Angelicae gigas*, *A. sinensis* and *A. acutiloba* roots by measuring the intensity of binding oxygen to hemoglobin using Raman spectroscopy.

**Methods** : Hemoglobin activity was measured by chemical analysis and Raman spectroscopy to compare the pharmaceutical efficacy of three *Angelica* root extracts. The oxygenated hemoglobin intensity, blood decursinol and acetylcholinesterase(AChE) concentration in mice were measured. In addition, the effects of three *Angelica* root extracts on oxygenated hemoglobin intensity, decursinol and AChE concentration in red blood cells (RBC) from human were also investigated.

**Results** : The contents of decursin, decursinol and decursinol angelate, which affected physiological activity and RBC properties, were higher in the extract of *A. gigas* root than in those of *A. sinensis* and *A. acutiloba* roots. Moreover, oxygenated hemoglobin intensity in the *A. gigas* extract was higher than that of other two species in the blood of mice and human RBCs. Also, the blood decursinol and AChE concentrations of *A. gigas* root extract were higher than that of *A. sinensis* and *A. acutiloba* roots.

**Conclusions** : These results suggest that *A. gigas* is more effective in treating disease related oxygen deficiency in RBC deformation under oxidative stress.

**Key words** : *Angelica gigas*, *Angelica sinensis*, *Angelica acutiloba*, oxygenated hemoglobin, Raman spectroscopy

## I. 서 론

當歸는 《神農本草經》에 처음 기재된 이후 시대를 거치면서 본초서마다 그 효능에 관한 내용이 점차 추가되어 기록되고

있는 한의학에서 많이 사용하고 있는 한약재 중 하나이다. 현재 산형과(繖形科, Umbelliferae)에 속한 참당귀 *Angelica gigas* Nakai와 중국당귀 *A. sinensis* (Oliv.) Diels의 뿌리는 當歸로 사용되고<sup>1,2)</sup>, 일당귀 *A. acutiloba* (Siebold & Zucc.) Kitag.의

\*Corresponding author : Boo-Kyun Lee, Division of Pharmacology, School of Korean Medicine, Pusan National University, 49, Busandaehak-ro, Mulgum-eup, Yangsan-si, Gyeongsangnam-do, 50612, Republic of Korea.

· Tel : +82-51-810-8460 · Fax : +82-51-810-8460 · E-mail : samzon58@pusan.ac.kr

#First author : Jang-Cheon Lee, Division of Pharmacology, School of Korean Medicine, Pusan National University, 49, Busandaehak-ro, Mulgum-eup, Yangsan-si, Gyeongsangnam-do, 50612, Republic of Korea.

· Tel : +82-51-810-8459 · Fax : +82-51-810-8460 · E-mail : jcl7788@pusan.ac.kr

· Received : 07 July 2020 · Revised : 16 July 2020 · Accepted : 25 July 2020

뿌리는 日當歸로 사용된다<sup>3)</sup>. 當歸는 補血和血, 調經止痛, 潤燥滑腸의 효능으로 月經不調, 經閉腹痛, 癥瘕結聚, 崩漏, 血虛頭痛, 眩暈, 痿痺, 腸燥便難, 癰疽瘡瘍, 跌打損傷 등을 치료한다<sup>4)</sup>.

《東醫寶鑑》중 당귀가 배합된 처방(四物湯 또는 四物가미 처방들 포함)은 69개의 병증門에 걸쳐 1,000개가 넘게 사용되었으며, 빈도순으로 보면 婦人門, 胞門, 風門, 癰疽門 虛勞門과 眼門의 질환을 치료하기 위해 사용되었고, 주로 부인과 관련된 질환의 치료에 제일 많이 사용되고 있다. 이렇게 다양한 당귀 배합처방을 혈과 관련된 질환을 치료하기 위하여 사용한 용어(이하 治血 용어라 한다)로는 養血安神湯, 當歸補血湯, 瀉血湯 등 처방 이름에 포함된 것들을 포함하여 養血, 補血, 生血, 滋血, 益血, 活血, 和血, 調血, 通血, 勻血, 行血, 血運, 導血, 涼血, 清血, 瀉血, 止血, 破血, 下瘀血 등이 있다<sup>5)</sup>.

3종 당귀의 대표적인 유효성분을 살펴보면, 참당귀는 decursin과 그의 이성질체인 decursinol angelate, 중국당귀와 일당귀의 경우 z-ligustilide, n-butylidenephthalide 및 ferulic acid로 알려져 있다<sup>6)</sup>. 참당귀의 약리작용은 뿌리의 decursin과 decursinol에 의해 발현되는 것으로 알려져 있으며, decursin과 decursinol은 혈관 내피의 성장인자로서 혈관 형성 제어 기능에 관여하는 중요한 역할을 한다<sup>7)</sup>. 또한, 혈액 내에서 산소분자들(oxygen species)의 헤모글로빈 결합능력에 관여하는 중요한 화합물로 알려져 있다<sup>8)</sup>.

이에 저자들은 임상에서 당귀를 사용함에 있어 질환의 특성에 맞게 선택적으로 사용하여야 치료효과를 높일 수 있을 것이라 생각하여 3종 당귀의 활성 비교 연구를 기획하였다. 이러한 연구는 이전 연구자들에게 의해서도 수행된 바 있다<sup>6,9)</sup>. 김 등은 당귀 및 구성 성분에 대한 약리학적 작용에 대한 고찰에서 중국당귀와 일당귀의 주요 유효성분은 유사하지만 참당귀는 약간 다른 것으로 나타났으며, 3종 당귀의 효과는 대체로 공통적이거나 작용 기전에 차이가 있다고 하였다<sup>6)</sup>. 송 등은 hydrocortisone acetate로 유발된 어혈 병태 모델에서 참당귀가 다른 2종의 당귀에 비해 약간 더 우수한 효과를 보이는 것으로 판단했다<sup>9)</sup>.

본 연구에서는 참당귀, 중국당귀, 일당귀 뿌리 추출물이 헤모글로빈의 산소분자 활성화 정도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각 당귀 추출물의 decursin 계열 성분을 분석하였고 라만 스펙트럼(Raman spectroscopy) 상에서 나타나는 oxygenated hemoglobin(O-Hb)의 상대적 농도의 크기로부터 헤모글로빈의 산소분자 활성화 정도를 알아보았으며, decursinol과 acetylcholinesterase(AChE)의 농도에 미치는 영향을 관찰하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료의 준비

본 실험에 사용된 참당귀, 중국당귀, 일당귀 뿌리는 건조된 상태로 (주)광명당(울산, 한국)에서 구입하여 세척한 후 진공 건조하였다. 참당귀와 일당귀는 각각 경북 봉화와 충남 서산

에서 재배된 것을 사용하였으며, 중국당귀는 쓰촨성(四川省)에서 재배된 것을 수입하여 사용하였다. 구입된 시료는 이장천 교수가 동정하여 기원을 확인하였다. 시료는 vortex mixer (Gilson, Middleton, WI, USA)를 이용하여 분말로 만든 다음 추출에 사용하였다. 500 g의 참당귀, 중국당귀, 일당귀 분말을 증류수 25%와 정제된 에틸알코올( $C_2H_5OH$ ) 75% 혼합용매에서 16시간 속슬릿(Sохhlet) 추출기를 이용하여 환류 추출한 후 진공회전증발기를 이용하여 농축하였다. 최종적으로 얻는 건조 분말은 참당귀, 중국당귀, 일당귀 각각 7.13 g, 9.06 g, 6.84 g으로 수율은 각각 1.43, 1.81, 1.37%였다. 3종 당귀의 추출물은 3차 증류수에 녹여 3% 농도로 사용하였다.

### 2. 실험동물

생후 6개월, 체중 25~30 g인 수컷 BALB/C 생쥐 20 마리를 두얼바이오텍 (서울, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 이들 생쥐들은  $25 \pm 10^\circ C$ , 습도  $55 \pm 1\%$ , 환기횟수 2~3회/시간과 사료와 물을 자유롭게 먹을 수 있는 환경에서 사육되었다. 시료의 채취는 24시간 동안의 절식 이후에 이루어졌다. 모든 생쥐는 국제실험동물사육법(The Guide for Care and Use of Laboratory Animals)과 미국 보건성(National Institute of Health, NIH)의 규정을 준수하여 관리되었고, 동물실험의 프로토콜은 고려대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 진행하였다(승인번호 : KUIACUI-2020-17).

### 3. 인체 혈액시료

건강한 사람의 적혈구(Red Blood Cell, RBC)는 Cedarlane 사(Ontario, Canada)로부터 구입하여 사용하였다. 이들의 평균 혈액지수(hematological parameters)는 RBC가  $4.6 \pm 0.07 \times 10^{12}/L$ , 헤모글로빈(Hb)은  $136.1 \pm 4.34 g/L$ 였다. 모든 측정은 세계의사협회(WMA)의 헬싱키 선언 규칙을 준수하였다.

### 4. 화학분석법

각 당귀 시료에 함유된 성분을 분리할 때 사용한 HPLC는 ThermoFisher제 UltiMateTM 3000 RSLCnano System에서 수행하였다. 시료 성분의 분자 확인에 사용한 1H-NMR과 13C-NMR 스펙트럼은 Bruker Fourier 300HD를 사용하여 얻었고, 분자량은 Shimadzu, LCMS-9030과 ThermoFisher제 Q ExactiveTM HF Hybrid Quadrupole-OrbitrapTM Mass Spectrometer를 사용하였다. 시료 성분 분자 확인에 사용한 FT-IR과 UV/vis 분광광도계는 PerkinElmer제 Spectrum TwoTM L160000T와 Shimadzu제 UV-2700 UV/vis spectrophotometer를 사용하였다. Raman 스펙트럼은 BioPAT®Spectro Raman Spectroscopy에서 얻었다.

### 5. 생쥐의 혈액시료 채취

증류수에 녹인 3종 당귀 추출액 3% 시료를 10  $\mu l/g$ 의 양으로 생쥐의 정맥에 주사하고 30분 후 미정맥에서 혈액을 채

취하였다. 이후 15초 이내에 라만분광기를 이용하여 스펙트럼을 얻었다.

### 6. 인체 유래 RBC의 처리

RBC에 대한 처리는 두 그룹으로 나눈 다음 Oktyabrsky 등의 방법<sup>10,11)</sup>에 따라 수행하였다. 간략히 정리하면, 3종 당귀의 시료는 dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹여 0.3 mM 농도로 하였다. 시료의 평균 몰농도는 Natural Compound Molecular Fingerprint program (NC-MFP)를 이용하여 구하였다. 이것을 RBC에 분산시켜 최종 농도가 3 μM이 되게 하고 37°C에서 30분간 배양하였다. 배양은 두 그룹으로 나눠 진행하였다. 첫 번째 그룹은 참당귀, 중국당귀, 일당귀 시료를 가하여 배양시켰다. 두 번째 그룹은 3종 당귀 각 시료를 추가한 후 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유발하였다. 여기에 10 mM의 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>와 3.5 mM의 KCl, 1.5 mM의 MgCl<sub>2</sub>, 145 mM의 NaCl과 NaHCO<sub>3</sub> 6 mM를 가하여 10배 희석한 다음 30분 동안 배양하였다. 산화적 스트레스에 대한 반응을 측정하기 위해 20 μM 농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 배양액에 가하였다.

### 7. 헤모글로빈의 라만분광법 측정

Hemoporphyrin의 테트라피롤 고리(tetrapyrrolic ring) 구조 변화를 보기 위하여 라만분광법을 V. V. Revin et.al. 방법<sup>12)</sup>에 의거하여 측정하였다. 이 때 사용한 레이저는 DL7 140 Sanyo 다이오드레이저로 100× lens, 100 mW의 최대 광출력에서 532 nm파장의 라만 스펙트럼을 여기시켰다 (excitation). 각 시료에 15 mW 광원을 조사하였으며, 100 × 1.3 NA 유침(oil immersion)장치에 연결된 Nikon TE-U 위상차현미경에 다이오드 레이저로부터 나오는 레이저빔을 쏘여주었다. 스펙트럼은 Peltier 냉각장치로 -1,200C까지 냉각하면서 1024 × 256 픽셀의 CCD 검출기로 1,800 lines/mm grating에서 측정하였다. 스펙트럼은 4 cm<sup>-1</sup> 스펙트럼 해상도로 측정하였고, OriginPro 2015 software를 이용하여 기준선을 보정하였다. 시료의 라만분광 측정치는 각각 세 번씩 측정하여 평균값으로 제시하였다.

### 8. Oxygenated Hemoglobin(O-Hb)의 상대적 크기 관찰

생쥐와 인간 유래 RBC에 상기한 바와 같이 3종 당귀 시료를 30분간 처리한 후, 라만분광기의 1,124 cm<sup>-1</sup> 파장에서 스펙트럼을 얻고 각 당귀 시료별로 산소화 헤모글로빈 (O-Hb)의 상대적 크기를 구하였다. 또한, 과산화수소 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 산화적 스트레스를 가하여 각 당귀 뿌리 추출물과 함께 배양시킨 후 O-Hb의 상대적 크기를 구하였다.

### 9. Decursinol 농도 측정 및 AChE 농도 환산

생쥐와 인간 유래 RBC에 상기한 바와 같이 3종 당귀 시료를 30분간 처리한 후, decursinol의 라만스펙트럼 피크인 1,620

과 1,718 cm<sup>-1</sup>의 크기 변화로부터 decursinol의 농도를 측정하였다. AChE의 농도는 532 nm 광원을 이용하였을 때 나타나는 광 여기 (photo-excitation) 현상을 관찰하여 구하였으며, 1,620과 1,718 cm<sup>-1</sup> 위치의 라만스펙트럼 피크의 크기를 측정하여 환산하였다.

### 10. 통계 처리

연구로부터 얻어진 결과는 SPSS (Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 처리 되었으며 One way ANOVA로 유의성을 검정하였다.

## III. 결 과

### 1. 참당귀, 중국당귀 및 일당귀의 decursin 계열 성분에 대한 분석 결과

참당귀의 decursin의 함량이 2449.3 μg × 10<sup>-3</sup>/g로 중국당귀와 일당귀에 비해 높게 나타났다. Decursinol의 함량은 1876.5 μg × 10<sup>-3</sup>/g, decursinol angelate는 1230.2 μg × 10<sup>-3</sup>/g의 함량을 보였다. 중국당귀에서 decursin의 함량은 38.2 μg × 10<sup>-3</sup>/g, decursinol의 함량은 46.9 μg × 10<sup>-3</sup>/g로 참당귀에 비해 낮게 나타났다. 일당귀에서 decursin의 함량은 29.7 μg × 10<sup>-3</sup>/g, decursinol angelate의 함량은 37.5 μg × 10<sup>-3</sup>/g로 역시 참당귀에 비해 낮게 나타났다(Table 1).

Table 1. Chemical Components of decursin, decursinol, and decursinol angelate in the extracts of *Angelica gigas*, *A. sinensis* and *A. acutiloba* roots (μg × 10<sup>-3</sup>/g: ppt)

Chemical component	<i>A. gigas</i>	<i>A. sinensis</i>	<i>A. acutiloba</i>
Decursin	2449.3	38.2	29.7
Decursinol	1876.5	46.9	-
Decursinol angelate	1230.2	-	37.5

### 2. 참당귀, 중국당귀 및 일당귀의 헤모글로빈 활성도 라만스펙트럼

헤모글로빈이 각 당귀 뿌리 추출물 존재 하에서 활성 산소 (reactive oxygen species, ROS)와 반응하여 산소화 헤모글로빈(O-Hb)을 형성하는 과정을 라만분광기로 측정하였다. 당귀 추출물 시료를 가한 헤모글로빈 분자를 532 nm 레이저빔으로 여기(excitation)시켰을 때 산소와 결합한 포르피린 (porphyrin) 분자구조인 oxygenated hemoglobin(O-Hb)의 진동은 1642, 1607, 1590, 1378, 1248, 1124, 756 cm<sup>-1</sup> 파장의 라만스펙트럼에서 관측되었다. 헤모글로빈만 측정했을 때는 1638, 1605, 1585와 1360 cm<sup>-1</sup>에서 피크가 관측되었다. 헤모글로빈의 테트라피롤(Tetrapyrrole) 포르피린의 라만스펙트럼을 Fig. 1에 표시하였다 (Fig. 1).

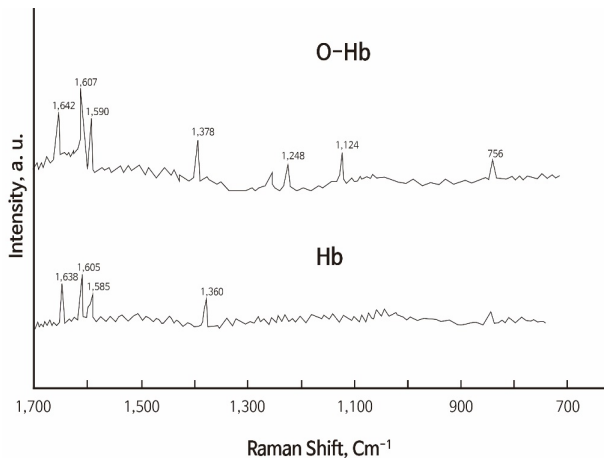


Fig. 1. Raman spectra of hemoglobin and oxygenated hemoglobin in human blood before and after treatment of the extract of *Angelica gigas* roots. O-Hb, oxygenated hemoglobin; Hb, hemoglobin; a.u., arbitrary unit.

### 3. 3종 당귀가 헤모글로빈의 산소 결합력에 대한 상대적 강도에 미치는 영향

본 연구에서는 1124  $\text{cm}^{-1}$  피크의 상대적 크기로 참당귀, 중국당귀 및 일당귀 뿌리 추출물의 각 시료에 반응하는 O-Hb 활성을 측정하였다. 3종 당귀가 산소와 Hb 결합의 상대적 강도에 미치는 영향을 살펴본 결과, 참당귀가 다른 두 종의 당귀에 비해 Hb와 산소의 결합을 강화시키는 것으로 나타났다. 과산화수소를 이용하여 산화적 스트레스를 유발한 경우에도 참당귀가 다른 두 종의 당귀에 비해 우수한 산소 결합력을 유지하였다. 이러한 경향은 생쥐의 혈액과 인간의 RBC에서 유사하게 나타났다 (Table 2).

Table 2. Oxygenated hemoglobin intensity with or without oxidative stress

		<i>A. gigas</i>	<i>A. sinensis</i>	<i>A. acutiloba</i>
Mouse	without $\text{H}_2\text{O}_2$	0.284	0.191	0.197
	with $\text{H}_2\text{O}_2$	0.0182	0.0093	N.D.
Human	without $\text{H}_2\text{O}_2$	0.381	0.182	0.023
	with $\text{H}_2\text{O}_2$	0.0196	0.0127	N.D.

Oxygenated hemoglobin intensity is shown as the average value of the relative size of the peak. N.D., not detected.

### 4. 3종 당귀가 혈중 decursinol 함량에 미치는 영향

혈중 당귀 추출물 농도를 알아보기 위하여 당귀에 포함된 decursin이 대사과정에서 생성되는 대표적인 생리활성 화합물인 decursinol을 라만분광법으로 측정하였다. 당귀 추출물 중 decursinol의 라만스펙트럼 피크는 1,620과 1,718  $\text{cm}^{-1}$ 에서 크게 나타났다 (Fig. 2).

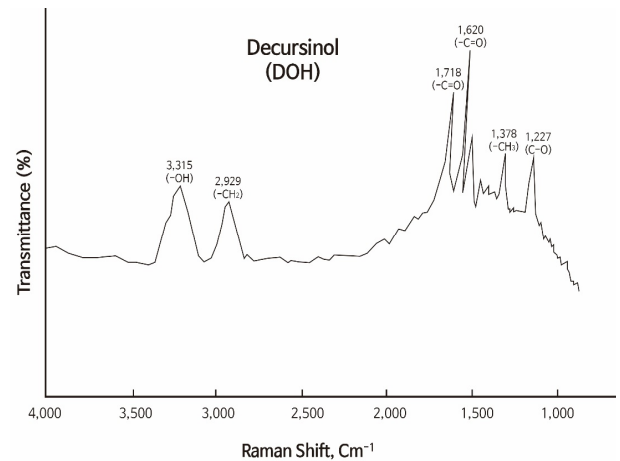


Fig. 2. Raman spectra of decursinol

3종 당귀가 혈중 decursinol 함량에 미치는 영향을 살펴본 결과, 참당귀가 다른 두 종의 당귀에 비해 더 높은 혈중 decursinol 함량을 보였다. 이는 산화적 스트레스 환경에서도 마찬가지였으며, 생쥐의 혈액과 인간의 RBC를 이용한 연구에서도 유사한 경향을 보였다 (Table 3).

Table 3. Blood decursinol concentration with or without oxidative stress (mmol/dL)

		<i>A. gigas</i>	<i>A. sinensis</i>	<i>A. acutiloba</i>
Mouse	without $\text{H}_2\text{O}_2$	18.7	9.36	6.28
	with $\text{H}_2\text{O}_2$	4.92	2.05	0.348
Human	without $\text{H}_2\text{O}_2$	19.3	15.3	4.29
	with $\text{H}_2\text{O}_2$	6.20	2.04	0.092

Blood decursinol concentration is shown as the average value of the peaks.

### 5. 혈액 내 AChE 농도에 미치는 영향

3종 당귀가 혈중 AChE 함량에 미치는 영향을 살펴본 결과, 참당귀가 다른 두 종의 당귀에 비해 더 높은 혈중 AChE 함량을 보였다. 이는 산화적 스트레스 환경에서도 마찬가지였으며, 생쥐의 혈액과 인간의 RBC를 이용한 연구에서도 유사한 경향을 보였다 (Table 4).

Table 4. Blood AChE concentration with or without oxidative stress (mmol/dL)

		<i>A. gigas</i>	<i>A. sinensis</i>	<i>A. acutiloba</i>
Mouse	without $\text{H}_2\text{O}_2$	5.78	2.06	1.82
	with $\text{H}_2\text{O}_2$	1.04	0.023	N.D.
Human	without $\text{H}_2\text{O}_2$	9.26	4.35	2.62
	with $\text{H}_2\text{O}_2$	3.19	2.06	0.073

Blood AChE concentration is shown as the average value of the peaks. AChE, acetylcholinesterase; N.D., not detected.

## IV. 고 찰

《中華本草》에는 참당귀와 중국당귀, 일당귀를 각각 朝鮮當歸, 當歸, 東當歸라는 명칭으로 수재하고 있다. 저서의 내용에 따르면 참당귀는 祛風通絡, 活血止痛의 효능으로 風濕痺痛, 跌打腫痛 등의 증상을 치료하고, 중국당귀는 補血, 活血, 調經止痛, 潤燥滑腸의 효능으로 血虛諸證, 月經不調, 經閉, 痛經, 癥瘕結聚, 崩漏, 虛寒腹痛, 痿痺, 肌膚麻木, 腸燥便難, 赤痢後重, 癰疽瘡瘍, 跌打損傷 등의 증상을 치료하며, 일당귀는 중국당귀와 효능과 적응증이 비슷하다<sup>13)</sup>. 이렇듯 3종 당귀의 효능을 祛風通絡과 補血의 개념으로 대별하고 참당귀는 祛風通絡의 효능 위주로, 중국당귀와 일당귀는 補血 위주의 효능을 위주로 기술하고 있다.

《東醫寶鑑》의 다양한 治血 용어도 補血, 調血, 活血, 破血(祛瘀血)로 대별할 수 있을 것이며, 현재 활용되고 있는 혈과 관련된 동물 모델의 가장 대표적인 것은 血虛 모델과 瘀血 모델이다. 血虛 동물 모델로 대표적인 것으로 失血 모델과 혈액 세포계 항암제를 이용한 모델이 있다. 전 등은 실험 동물 모델에서의 활성 산소 및 항산화력에 미치는 영향을 연구하여 발표한 바 있으며, 피부 특성을 포함한 일반적 특성에 대한 영향을 제시한 바 있다<sup>14,15)</sup>. 김 등은 참당귀가 포함된 當歸補血湯이 실험로 유발된 흰쥐의 RBC count와 Hematocrit의 수치를 유의한 수준으로 개선하였음을 발표한 바 있다<sup>16)</sup>.

최근에는 瘀血에 관한 다양한 연구가 시도되어 순환 장애에 의하여 유발되는 貧血, 鬱血, 血栓, 水腫 등과 염증으로 인한 조직의 삼출, 변성, 괴사, 위축 혹 증식, 대사 장애로 일어나는 조직의 반응 등을 어혈의 병태와 유사하다고 판단하고 있다<sup>17)</sup>. 현재 endotoxin을 이용한 어혈 병태 모델이 가장 많이 이용되고 있으며, 이 외에도 hydrocortisone acetate나 dextran을 이용한 고점도 혈중 모형, 타박을 이용한 외상 모형 등이 활용되고 있다<sup>17)</sup>. 송 등은 和血活血의 기능을 비교하기 위해 hydrocortisone acetate을 이용한 고점도 혈중 어혈 병태 모델에서 3종 당귀의 효능을 비교 분석하여 3종 당귀 중에서 참당귀가 약간 더 우수한 것으로 판단하고 있다<sup>9)</sup>.

RBC는 혈액의 혈구 세포 중 가장 많은 수를 차지하고 있으며 고도의 산소 보유 능력을 가진 헤모글로빈(Hb)을 포함하고 있다. 헤모글로빈은 폐로부터 산소를 공급받아 산소-헤모글로빈의 형태로 결합한 후 신체 각 부위의 조직으로 이동한 후 이러한 조직들에 산소를 공급하는데 중요한 역할을 한다<sup>18)</sup>. 헤모글로빈의 산소화 상태는 또한, 헤모글로빈과 막 단백질간의 상호작용, 효소활동과 세포내 이온 농도를 포함한 중요한 RBC의 특성에 영향을 끼친다<sup>19)</sup>. RBC의 형태에 따라 산소-헤모글로빈의 친화도는 달라질 수 있으며 이는 RBC의 형태가 그 기능에 영향을 미칠 수 있음을 나타낸다. 이러한 RBC의 기능을 관찰하는데 라만 스펙트로스코피 분석법이 효율적으로 활용될 수 있다<sup>20)</sup>.

최근 Bin 등이 중약 또는 중성약이 심혈관질환 개선, 뇌신경 보호, 항염증 작용 등을 나타내는 기전 중에 헤모글로빈과 산소의 결합에 관여하는 단백질인 heme oxygenase 1(HO-1)이 주요하게 작용한다는 연구 결과를 발표한바 있다<sup>21)</sup>. 이는 헤모글로빈과 산소의 결합능이 다양한 질환의 개선에 활용될 수 있음을 시사한다.

Decursin은 AchE의 활성화를 촉진시켜 혈액의 산소 공급 능력을 증대시켜 주는 화합물이다<sup>19)</sup>. AChE는 헤모글로빈의 Fe<sup>2+</sup>이온농도를 유지하기 위해 아세틸콜린을 분해하여 콜린(Choline)이 되게 하며, RBC 노화 시 RBC 막막 재형성에 관여한다. 최근 연구에서 건강한 사람의 혈액 내의 AChE 효소 작용이 활성화 되어 있음이 보고된 바 있다<sup>8)</sup>. 당귀 중에 포함된 decursin은 인체 내 간 미소체 대사과정을 통하여 O-Hb를 활성화시켜주는 decursinol로 변한다. Decursinol과 decursinol angelate는 O-Hb를 활성화시키는데 관여한다. 본 연구에서 참당귀의 decursin 함량은 2449.3  $\mu\text{g} \times 10^{-3}/\text{g}$ 로 중국당귀와 일당귀보다 높았다. Decursinol의 함량은 1876.5  $\mu\text{g} \times 10^{-3}/\text{g}$ 이며, decursinol angelate는 1230.2  $\mu\text{g} \times 10^{-3}/\text{g}$ 로 이 역시 중국당귀와 일당귀에 비해 높다 (Table 1). 이는 decursin 및 이와 관련한 화합물의 함량이 높은 참당귀가 헤모글로빈과 산소의 결합력 강화에 중국당귀나 일당귀보다 더 많은 영향력이 있음을 시사한다.

본 연구에서는 생쥐를 이용한 *in vivo*연구와 사람 유래의 RBC를 이용한 *in vitro* 연구의 두 가지 방법을 이용하였다. 생쥐에는 3종 당귀 추출물 3% 시료를 10  $\mu\text{l}/\text{g}$  농도로 주사하였다. 이는 추출물을 기준으로 대략 0.3 g/kg 분량에 해당한다.

천연물 추출물과 같이 복합성분을 희석하여 낮은 농도로 처리 할 때는 평균 몰 농도를 사용할 수 있다. 평균 몰 농도는 평균 몰 질량(Average Molar Mass)과 용매의 양으로 계산할 수 있는데 평균 몰 질량은 Molecular ACCess System key fingerprint (MACCS)나 본 연구에서 사용한 NC-MFP 등의 프로그램에 분석된 성분의 종류와 함량을 입력함으로써 계산이 가능하다. 본 연구에서 RBC를 이용한 시험관내 연구에 최종 농도 3  $\mu\text{m}$ 을 사용하였는데 이는 대략적으로 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 해당한다. 저자들은 다양한 농도를 이용한 예비 연구를 통하여 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도가 최적의 스펙트럼을 보여주는 농도임을 확인하였다 (data not shown). 또한, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 적정 처리 시간을 정하기 위하여 투여 시간을 달리하며 예비 시험을 시행한 결과 30분 투여군에서 최적 스펙트럼을 보여주었다 (data not shown).

Fig. 1에서 보는 바와 같이 Hb의 피크는 헤모글로빈이 산소종과 결합하면 장파장 쪽으로 이동하여 나타난다. Hb의 피크, 1585  $\text{cm}^{-1}$ 는 O-Hb에서 1590  $\text{cm}^{-1}$ 로 5  $\text{cm}^{-1}$  정도 이동하고 있으며 피크 1605  $\text{cm}^{-1}$ 는 O-Hb에서 1607  $\text{cm}^{-1}$ 로 2  $\text{cm}^{-1}$  정도 이동하였다. 또한 피크 1638  $\text{cm}^{-1}$ 는 O-Hb에서 1642  $\text{cm}^{-1}$ 로 4  $\text{cm}^{-1}$  정도 이동하였고, 피크 1360  $\text{cm}^{-1}$ 는 O-Hb에서 1378  $\text{cm}^{-1}$ 로 18  $\text{cm}^{-1}$  정도 이동하였다. William 등의 연구<sup>22,23)</sup>에 의하면 헤모글로빈에 산소종이 결합하면 라만스펙트럼 상에서 헤모글로빈에 결합한 산소종의 진동에 의하여 스펙트럼 피크는 파장이 큰 방향으로 이동한다고 하였다. Fig.1의 O-Hb의 라만스펙트럼은 헤모글로빈 분자에 산소가 결합하여 산소종과 헤모글로빈 분자의 진동이 장파장 쪽으로 이동하였음을 잘 설명해 준다. Thomas 등<sup>24)</sup>의 연구 결과에서도 글루코스가 헤모글로빈과 결합하여 나타내는 라만 스펙트럼 피크가 같은 경향으로 변화하고 있다. 본 연구의 결과에서 헤모글로빈에 산소가 결합하여 나타나는 O-Hb의 진동은 1642, 1607, 1590, 1378, 1248, 1124와 756  $\text{cm}^{-1}$  파장의 스펙트럼 띠에서 낮는데, 이러한 결과는 Hidetosh 등의 결과<sup>25,26)</sup>와 일치한다.

생쥐 혈액의 라만스펙트럼에서 O-Hb의 피크 상대적 크기는 참당귀 추출물은 0.284로 중국당귀나 일당귀 추출물 보다 약 1.44 ~ 1.49 ± 0.04 배 가량 많았고, 인간의 RBC를 이용한 연구의 라만스펙트럼에서는 0.381로 나타나 중국당귀나 일당귀에 비해 약 2.1 ~ 16.6 ± 0.06 배 가량 많다 (Table 2). 이는 참당귀 뿌리 추출물을 투여한 경우 중국당귀와 일당귀보다 헤모글로빈의 산소 결합능력이 커졌음을 보여준다. 이는 3종 당귀의 decursin 계열 성분 분석을 통하여 예측한 결과 (Table 1)와 일치한다. RBC는 superoxide dismutase(SOD) 등의 효소를 가지고 있어 강력한 산화적 스트레스 제거 활성을 가지고 있다. 또한, 당귀를 포함한 많은 한약재들이 항산화 효과를 가지는 성분을 함유하거나 직접적으로 항산화 작용을 하는 것으로 있다. 따라서, 산화적 스트레스 환경에서 헤모글로빈의 산소결합력 차이 여부를 살펴볼 필요가 있다. 본 연구의 결과를 살펴보면, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 존재하는 환경 내에서 모든 실험군의 산소 결합 능력이 크게 감소하였음을 알 수 있다. 이는 당귀 자체 혹은 당귀의 항산화 효과를 가진 성분이 20 μm의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 발생하는 산화적 스트레스가 헤모글로빈의 산소 결합 능력을 감소시키는 것에 대하여 특별한 억제 효과를 발휘하지 못한다는 것을 시사한다.

천연물과 한약의 많은 활성 성분들이 생체 내에서 대사되어 구조가 바뀐다. 또한, 일부 성분들은 대사되어 사라지게 된다. 그런 이유로 표적 장기에 도달하는 대사체의 종류와 양은 효능에 직접적인 영향을 미칠 수 있다. 본 연구에서는 decursin의 대사체인 decursinol의 혈중 함량을 관찰하였다. 당귀 추출물 중 decursinol의 라만스펙트럼 피크는 1,620과 1,718 cm<sup>-1</sup>에서 크게 나타났다. 이 두개의 피크는 decursinol 분자에 있는 카르보닐기 (-C=O)의 진동에 의한 것임을 알 수 있다 (Fig. 2).

3종 당귀 추출물을 투여한 후 decursinol 혈중 함량을 비교한 결과 생쥐 혈액 내 decursinol의 농도는 참당귀, 추출물에서 18.7 mmol/dl로 다른 당귀에 비해 2.0 ~ 3.0 ± 0.03 배 가량 큰 농도를 보였으며, 인간의 RBC를 이용한 연구에서는 19.3 mmol/dl로 중국당귀에 비해 1.26 ± 0.07 배 많고 일당귀에 비해 4.5배 가량 많았다 (Table 3). 이는 참당귀에 함유된 decursin과 decursinol이 생체 내에서 대사되어 사라지지 않고, 일정 기간 혈중에 존재함으로써 표적 장기에 도달할 수 있음을 시사한다.

산화적 스트레스 환경에서는 모든 군에서 decursinol 농도가 떨어졌다. 생쥐의 혈액에서 참당귀의 decursinol함량은 4.92 mmol/dl로 약 26.3% 수준으로 감소했으며, 중국당귀는 21.9%, 일당귀는 5.5%로 나타났다. 인간의 RBC를 이용한 연구에서는 참당귀, 중국당귀, 일당귀가 각각 32.1%, 13.3%, 2.1% 수준을 보여 약간의 차이를 보였다 (Table 3). 이는 사람의 RBC를 이용한 결과에서 참당귀를 투여한 경우 산화적 스트레스에 의해 감소되는 대사활성을 억제한 것처럼 보이며, 생쥐 혈액의 결과와 상이하다. 이러한 결과는 사람의 항산화 효소 체계에 영향을 미칠 가능성으로 해석될 수 있으나 후속 연구를 통하여 재확인할 필요가 있다.

생쥐 혈액 내 AChE의 농도는 참당귀에서 5.78 mmol/dl로 다른 당귀에 비해 2.8 ~ 3.2 ± 0.06 배 가량 큰 농도로 나타나며, 인간의 RBC를 이용한 연구에서는 9.26 mmol/dl로 중국당귀 뿌리 추출물에 비해 약 2.1배 많고 일당귀 뿌리 추

출물에 비해 약 3.5 ± 0.05 배가량 많다 (Table 4). 이는 참당귀 뿌리 추출물이 중국당귀, 일당귀 뿌리 추출물에 비해 헤모글로빈의 산소 결합능력을 돕는 AChE 대사가 더 활발하게 진행됨을 뜻한다.

## V. 결 론

참당귀, 중국당귀, 일당귀 뿌리 추출물이 헤모글로빈의 산소분자 활성화 정도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각 당귀의 decursin 계열 성분을 분석하였고 생쥐에 3종 당귀 추출물을 투여하거나 인간의 RBC에 직접 처리한 후 라만 스펙트럼 상에서 나타나는 oxygenated hemoglobin의 활성화 정도와 혈중 decursinol 및 acetylcholinestrase(AChE)의 농도를 알아보았다.

1. 성분 분석 결과에서 decursin과 decursinol 및 decursinol angelate함량은 참당귀에서 각각 2449.3 μg × 10<sup>-3</sup>/g, 1876.5 μg × 10<sup>-3</sup>/g, 1230.2 μg × 10<sup>-3</sup>/g로 중국당귀와 일당귀보다 높았다.
2. 생쥐와 인간의 RBC 모두에서 헤모글로빈의 산소 결합력은 참당귀에서 다른 두 종의 당귀보다 상대적으로 크게 나타났다.
3. 생쥐와 인간의 RBC 모두에서 decursin의 유도체인 decursinol의 함량은 참당귀에서 다른 두 종의 당귀보다 높았다.
4. 생쥐와 인간의 RBC 모두에서 acetylcholinestrase (AChE) 함량은 참당귀에서 다른 두 종의 당귀보다 높았다.

이상의 결과로부터 참당귀는 중국당귀나 일당귀에 비해 적혈구의 산소결핍으로 인한 질환, 산화스트레스에 의한 적혈구 변형에 따른 질환 등을 치료하는데 더 효과적일 것으로 짐작할 수 있다.

## 감사의 글

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업 (2년)에 의하여 연구되었음.

## References

1. Korea Food&Drug Administration, The Korean Herbal

- Pharmacopoeia, The KFDA Notification, 2019-102, 2019 : 24-25.
2. Pharmacopoeia Commission of the People's Republic of China, Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2015 ed, Beijing: China Medical Science Press, 2015 : 133-134.
  3. Korea Food and Drug Administration, The Korean Herbal Pharmacopoeia, The KFDA Notification No, 2020-12.
  4. Herbology editorial committee of Korean medicine school, Herbology, Seoul : Yeonglimsa, 2017 : 630-632.
  5. Heo Jun, DongUiBoGam, Translated by Dongui Literature Research Office, Seoul : Bubnbooks, 2009:278, 285, 289, 305, 321, 447, 450, 455, 502, 518, 583, 673, 857, 1173, 1508, 1786, 1809.
  6. Sun Ae Kim, Hye Kyung Oh, Ji Young Kim, JinWoo Hong, Su In Cho, A Review of Pharmacological Effects of *Angelica gigas*, *Angelica sinensis*, *Angelica acutiloba* and Their Bioactive Compounds, Journal of Korean Medicine, 2011 ; 32(4) :1-24.
  7. Seung Hwa Son, Mi-Jeong Kim, Won-Yoon Chung, Ju-Ah Son, Yeong Shik Kim, Young-Choong Kim, Sam Sik Kang, Sang-Kook Lee, Kwang-Kyun Park, Decursin and Decursinol Inhibit VEGF-Induced Angiogenesis by Blocking the Action of Extracellular Signal-Regulated Kinase and c-Jun N-Terminal Kinase, Cancer Letters, 2009 ; 280 : 86-92.
  8. Sook-Jin Kim, Se-Mi Ko, Eun-Jeong Choi, Seong-Ho Ham, Young-Dal Kwon, Yong-Bok Lee, Hea-Young Cho, Simultaneous Determination of Decursin, Decursinol Angelate, Nodakenin, and Decursinol of *Angelica gigas* Nakai in Human Plasma by UHPLC-MS/MS : Application to Pharmacokinetic Study, Molecules, 2018 ; 23 : 1-14.
  9. Seung-Hyun Song, Bu-Il Seo, Ho-Kyoung Kim, Ji-Ha park, The Effects of *Angelicae Gigantis Radix*, *Angelicae Acutilobae Radix* and *Angelicae Sinensis Radix* Extract on Hydrocortisone Acetate-Induced Model of Blood Stasis, The Korea Journal of Herbology, 2004 ; 19(1) : 13-22.
  10. Oktyabrsky ON, Smirnova G V, Redox Regulation of Cellular Functions, Biochemistry, 2007 ; 72 (2) : 132-145.
  11. Samokhvalov VA, Smetanina MD, Museikina, Effect of Low Concentration of Hydrogen Peroxide on Metabolism of Blood Cells, Biomeditsinskaia Khimiia, 2003 ; 49 : 122-127.
  12. Victor V Revin, Natalia V Gromova, Elvira S Revina, Anastasia Yu, Samonova, Alexander Yu, Tychkov Stetlana, Bochkareva S, Alexander A Moskovkin, Tatyana P. Kuzmenko, The Influence of Oxidative Stress and Natural Antioxidants on Morphometric Parameters of Red Blood Cells, the Hemoglobin Oxygen Binding Capacity, and the Activity of Antioxidant Enzymes, BioMed Research International, 2019 : 1-12.
  13. Editorial Board for Chinese Materia Medica, State Administration of Traditional Chinese Medicine of the People's Republic of China, Chinese Materia Medica, Shanghai:Shanghai Scientific & Technical Publishers,1999 : 874-875, 888-889, 893-903.
  14. Sun-Woo Jeon, Yoon-Bum Kim, A Study on Active Oxygen and Antioxidant capacity of Qi Deficiency and Blood Deficiency Animal Model, The Journal of Korean Oriental Ophthalmology & Otorhinolaryngology & Dermatology, 2009 ; 22(2) : 74-81.
  15. Yoon-Jin Shin, Yoon-Bum Kim, A Study on the Skin Characteristics of Qi Deficiency and Blood Deficiency Animal Model, The Journal of Korean Oriental Ophthalmology & Otorhinolaryngology & Dermatology, 2009 ; 22(1) : 76-88.
  16. Yong Mi Kim, Dalyong Choi, Studies on the effects of Tanggwibohyol-t'ang on Hyol-deficiency symptom of white rats induced by losing blood, Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology, 1988 ; 3 : 78-83.
  17. Kyeong Mo Park, Jong Hyun Park, Kyu Suk An, A Study of Developing Pathologic Models of Blood Stasis, Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology, 1999 ; 13(1) : 25-35.
  18. Stéphane Longeville & Laura-Roxana Stingaciu, Hemoglobin difusion and the dynamics of oxygen capture by red blood cells, Scientific Reports, 2017 ; 7(1) : 10448, DOI:10.1038/s41598-017-09146-9.
  19. Barvitenko NN, Adragna NC, Weber RE, Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance, Cell, Physiol, Biochem 2005 ; 15 :1-18.
  20. Aniket Chowdhury, Raktim Dasgupta, and Shovan K. Majumdera, Changes in hemoglobin-oxygen affinity with shape variations of red blood cells, Journal of Biomedical Optics, 2017 : 22(10) ; 105006.
  21. Bin Lia, M.I. Nasser, Muqaddas Masoode, Salah Adlate, Yufei Huangb, Baoling Yangb, Chaochao Luoc, Nan Jiang, Efficiency of Traditional Chinese medicine targeting the Nrf2/HO-1 signaling pathway, Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020 ; 126 : 110074, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110074
  22. William H, Woodruff, Thomas G Spiro, Takahashi Yonetani, Resonance Raman Spectra of Cobalt-Substituted Hemoglobin : Cooperativity and

- Displacement of the Cobalt Atom upon Oxygenation, Proceedings of National Academy of Science USA, 1974 ; 71 (4) : 1065–1069.
23. Horst Brunner, Heinrich Sussner, Resonance Raman Scattering on Hemoglobin, *Biochimica et Biophysica Acta-Protein in Structure*, 1973 ; 310 (1) : 20–31.
  24. Thomas G Spiro, Thomas C Streakas, Resonance Raman Spectra of Hemoglobin and Cytochrome C : Inverse Polarization and Vibronic Scattering, Proceedings National Academy Science USA, 1972 ; 69 (9) : 2622~2626.
  25. Hidetosh Sato, Hironori Chiba, Excitation Wavelength-Dependent Changes in Raman Spectra of Whole Blood and Hemoglobin : Comparison of the Spectra with 514.5-, 720-, and 1064-nm Excitation, *Journal of Biomedical Optics* . 2001 ; 6(3) : 366–370.
  26. Hu S, Smith KM, Spiro TG. Assignment of Protoheme Resonance Raman Spectrum by Heme Labeling in Myoglobin, *Journal of the American Chemical Society*, 1996 ; 118 : 12638~12646.