

越婢加朮湯의 항산화 및 항염증 효과에 대한 연구

임승규* · 설재욱* · 김선종* · 정재민* · 선운권† · 최진봉*

동신대학교 한의과대학 한방재활의학교실*, 침구학교실†

The Study on Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Effects of Wolbigachul-tang

Seung-Kyu Im, K.M.D.*, Jae-Uk Sul, K.M.D.*, Seon-Jong Kim, K.M.D.*, Jae-Min Jeong, K.M.D.*, Yun-Gwon Seon, K.M.D.†, Jin-Bong Choi, K.M.D.*

Departments of Korean Medicine Rehabilitation*, Acupuncture & Moxibustion Medicine†, College of Korean Medicine, Dongshin University

RECEIVED December 16, 2022

REVISED December 29, 2022

ACCEPTED January 6, 2023

CORRESPONDING TO

Jin-Bong Choi, Department of Korean Medicine Rehabilitation, Dongshin University Naju Korean Medicine Hospital, 14 Gyoyuk-gil, Naju 58326, Korea

TEL (061) 338-7815

FAX (061) 338-7888

E-mail jy1907@gmail.com

Copyright © 2023 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

Objectives This study was conducted to find out the antioxidant and inflammatory improvement effects of Wolbigachul-tang.

Methods To evaluate the antioxidant and anti-inflammatory effects of wolbigachul-tang, the total polyphenol and flavonoid contents were measured. And radical scavenging function was measured. In addition reactive oxygen species, nitric oxide, cytokines productions were measured by treating wolbigachul-tang in the lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells. We also measured the gene expression of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, cytokines too.

Results Radical scavenging experiments showed significant concentration-dependent scavenging capacity increase. The amount of reactive oxygen species, nitric oxide, cytokines production in the cell all showed a significant concentration-dependent decrease compared to the control group. The gene expression of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and cytokines also showed a significant concentration-dependent decrease compared to the control group.

Conclusions In conclusion, it is believed that wolbigachul-tang can be applied to various inflammatory diseases. (J Korean Med Rehabil 2023;33(1):1-12)

Key words Wolbigachul-tang, Antioxidants, Anti-inflammatory

서론»»»»

Reactive oxygen species (ROS)는 체내에서 산소를 대사하는 과정에서 발생하는 것으로, 과산화물 및 자유 radical을 형성하여 세포 단백질, 세포막, 세포 지질, DNA 등 세포의 모든 구성요소에 독성을 일으킬 수 있다¹⁾. 이러한 ROS에 의한 산화 스트레스는 암, 심혈관 질환, 호흡기 질환, 류마티스성 관절염, 신장 질환, 사춘기 지연과도 연관²⁾이 있어 ROS를 조절하는 것에 대한

연구가 지속되고 있다.

염증 반응이란 유해 자극에 대한 생체반응으로 체내의 면역을 담당하는 여러 세포와 염증 매개체들이 연관되어 나타나는 방어 및 보호 시스템이다. 염증의 목적은 세포의 손상을 최소화하고, 파괴 및 괴사한 세포들을 제거하며, 동시에 조직을 재생하는 것이다³⁾. 염증 반응에 관여되는 매개 물질은 대표적으로 interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 beta (IL-1β), tumor necrosis factor alpha (TNF-α) 등의 cytokine으로, cytokine의 분비에 의해 염증 반응이 시작된다⁴⁾. 이후 염증 부위의 혈관 이완 및

모세혈관의 투과성 증가로 발적과 열감이 발생하고 조직에 체액이 축적되어 부종이 생긴다. 또한, 신경 말단을 자극하는 histamine과 같은 신경전달물질이 분비되어 통증을 느끼게 되며 이러한 반응들이 지속되면 세포 및 조직의 기능 저하와 상실을 야기할 수 있다⁵⁾.

越婢加朮湯은 金匱要略에 “裏水者，一身面目黃腫，其脈沈，小便不利，故令病水。假如小便不利，此亡津液，故令渴也，越婢加朮湯主之.”⁶⁾라고 기재되었으며, 처방 구성은 越婢湯에 蒼朮을 가한 것으로 麻黃, 石膏, 蒼朮, 大棗, 生薑, 甘草이다. 越婢湯의 宣肺泄熱하고 利水消腫하는 효능에 燥濕健脾의 작용을 높이는 蒼朮을 가미하여 麻黃과 配伍됨으로써 表裏의 濕을 燥하는 효능을 가진다. 또한, 越婢加朮湯의 구성약물인 石膏는 性味가 辛甘하고 大寒하여 實熱을 解毒하고 除煩의 효능이 있다⁷⁾. 염증의 대표적인 임상적 징후는 발적 및 발열, 종창, 통증, 기능 저하이므로⁸⁾, 越婢加朮湯의 泄熱 작용과 燥濕 작용이 염증 반응을 억제하고 치료하는 데 효과가 있을 것이라 예상되어 실험을 진행하였다.

본 실험에서는 越婢加朮湯의 항산화 및 염증 개선 효과를 알아보기 위해 대식세포 RAW264.7을 이용하여 실험을 진행하였고 유의한 결과를 얻어 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법»»»»

1. 재료

1) 시료

본 연구에 사용된 wolbigachul-tang (WGT)의 구성 약재는 한약재 유통업체인 (주)옵니허브(Daegu, Korea)에서 검수된 한약재를 구입하여 사용하였으며, 각 처방의 구성은 아래와 같다(Table I).

2) 시약과 기기

본 연구에서 시료 추출 시 extraction mantle (Misung Scientific, Daejeon, Korea), rotary vacuum evaporator (EYELA, Tokyo, Japan), freeze dryer (ilShinBioBase, Dongducheon, Korea), deep-freezer (Sanyo, Osaka, Japan)

Table I. The Prescription of Wolbigachul-tang

Scientific name	Origin	Weight (g)
Gypsum	China	8
<i>Ephedra sinica</i> Stapf	China	6
<i>Atractylodes chinensis</i> Koidzumi	China	4
<i>Zizyphus jujuba</i> Miller	Korea	4
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Korea	3
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	Korea	2
Total amount		27

기기를 사용하였으며, 세포 배양 시 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Grand Island, NY, USA), penicillin-streptomycin, trypan blue, lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA), Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS; Welgene, Geongsan, Korea) 시약과 CO₂ incubator (Sanyo), clean bench (Vision Scientific, Daejeon, Korea), autoclave (Sanyo), vortex mixer (Vision Scientific), centrifuge (Vision Scientific) 기기를 사용하였다. 세포 생존율 측정 시 EZ-cytox (Daeilab, Seoul, Korea) 시약과 micro plate reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) 기기를 사용하였다. 총 polyphenol 함량 측정 시 gallic acid, sodium carbonate (Sigma-Aldrich), folin-ciocalteu's phenol reagent (Merck, Darmstadt, Germany) 시약과 micro plate reader (Molecular Devices) 기기를 사용하였으며, 총 flavonoid 함량 측정 시 quercetin, aluminium nitrate nonahydrate, potassium acetate solution (Sigma-Aldrich), ethanol (Merck) 시약과 micro plate reader (Molecular Devices) 기기를 사용하였다. DPPH radical 소거능 측정 시 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH; Sigma-Aldrich), ethanol (Merck) 시약과 micro plate reader (Molecular Devices) 기기를 사용하였으며, ABTS radical 소거능 측정 시 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS; Sigma-Aldrich) 시약과 micro plate reader (Molecular Devices) 기기를 사용하였다. ROS 생성량 측정 시 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA; Sigma-Aldrich) 시약과 flow cytometry system (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) 기기를 사용하였으며, nitric oxide (NO) 생성량 측정 시 nitric oxide plus detection kit (Intronbio, Seongnam, Korea) 시약과 micro plate

reader (Molecular Devices) 기기를 사용하였다. Cytokine 생성량 측정 시 prostaglandin E₂ (PGE₂) parameter assay kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), mouse IL-1 β enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit, mouse IL-6 ELISA kit, mouse TNF- α ELISA kit (Komabiotech, Seoul, Korea) 시약과 ice-maker (Vision Scientific), plate shaker (Lab-Line, Dubuque, IA, USA), micro plate reader (Molecular Devices) 기기를 사용하였으며, 유전자 발현량 측정 시 easy-spinTM total RNA extraction kit (Intronbio, Korea), accupower[®] cyclescript RT premix (dT20) (Bioneer, Deajeon, Korea), qPCRBIO SyGreen Blue Mix Lo-ROX (PCR Biosystems, Wayne, PA, USA), DEPC-DW (Bioneer) 시약과 nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), polymerase chain reaction (PCR) cycler (alpha cycler 1 PCRmax; PCRmax, Staffordshire, UK) real-time PCR cycler (ExicyclerTM 96; Bioneer) 기기를 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

2첩 분량의 WGT (54 g)를 1 L의 증류수에 넣어 3시간 동안 100°C에서 추출하였으며, 여과지를 사용하여 추출물을 여과하였다. 여과된 추출물은 rotary vacuum evaporator를 사용하여 감압 농축하고 freeze dryer를 사용하여 동결건조를 진행하였다. 동결건조 완료 후, 9.76 g (수득률: 18.07%)의 분말을 얻었고, -20°C에 보관하면서 실험 당일 소분하고 증류수에 용해하여 사용하였다.

2) 세포 배양

생쥐 유래 대식세포주인 RAW264.7 세포는 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank; KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 10%의 FBS가 추가된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건이 유지되는 세포배양기에서 배양하였다. 세포의 계대 배양은 2~3일 주기로 진행하였다.

3) 세포 생존율 측정

RAW264.7 세포를 48 well plate에 2 \times 10⁴ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하고 WGT를 100, 200, 400,

800 μ g/mL의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 모든 배양이 종료된 후 배양액 100 μ L당 10 μ L의 EZ-Cytox 용액을 첨가하여 세포 배양기에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

4) 항산화 효능 평가 실험

(1) 총 polyphenol 함량 측정

WGT를 1 mg/mL 농도로 준비하였으며, 50% Folin-Ciocalteu's phenol reagent 0.5 mL를 시료 1 mL에 가하여 실온에서 3분간 반응시켰다. 반응용액에 7.5 mL 증류수와 Na₂CO₃ 포화용액 1 mL를 혼합하여 30분간 정치시킨 뒤, 14,000 g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취해 760 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 총 phenol 함량은 gallic acid를 표준물질로 이용하여 작성한 검량선에 따라 함량을 구하였다.

(2) 총 flavonoid 함량 측정

WGT를 1 mg/mL 농도로 준비하였으며, 80% 에탄올 0.9 mL와 시료 0.1 mL를 혼합한 혼합물 0.5 mL에 10% aluminium nitrate, 1 M potassium acetate 0.1 mL, 80% 에탄올 4.3 mL를 가하여 실온에 40분 정치한 뒤 415 nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며, quercetin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

(3) 2,2-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) radical 소거능 측정

WGT의 농도를 1, 10, 100, 1,000 μ g/mL로 희석했으며, 시료 100 μ L와 에탄올에 용해한 0.2 mM의 DPPH 용액 150 μ L를 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 517 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 대조군은 증류수를 넣었으며, DPPH 용액의 대조군으로는 에탄올을 넣어 보정 값을 얻었다. DPPH radical 소거능은 아래의 식에 따라 계산하였다.

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

(4) 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical 소거능 측정

WGT의 농도를 1, 10, 100, 1,000 μ g/mL로 희석했으며, ABTS 용액은 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium

persulfate를 제조한 후, 암소에 하루 동안 정치하여 양이온 (ABTS⁺)을 형성시킨 다음 732 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도 값이 1.5 이하가 나오도록 희석하고, 희석된 ABTS⁺ 용액 150 μL와 시료를 5 μL씩 혼합하고, 실온에서 10분간 반응시킨 후, 732 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. ABTS radical 소거능은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}\right) \times 100$$

(5) ROS 생성량 측정

RAW264.7 세포를 6 well plate에 1×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하고 WGT를 100, 200, 400 μg/mL의 농도로 처리하고 200 ng/mL의 lipopolysaccharides (LPS)를 추가하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 모든 배양이 종료된 후 원심분리하여 얻은 세포는 차가운 PBS로 세척 후, 10 μM의 DCF-DA를 이용하여 세포배양기에서 15분간 반응시키고 다시 차가운 PBS로 세척하여 남아있는 DCF-DA를 제거하였다. 이후, flow cytometry system을 통해 ROS 생성량을 분석하였다.

5) 항염증 효능 평가 실험

(1) NO 생성량 측정

RAW264.7 세포는 48 well plate에 2×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하고 WGT를 100, 200, 400 μg/mL의 농도로 처리하고 200 ng/mL의 LPS를 추가하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 모든 배양이 종료된 후 N1 buffer 100 μL를 추가하여 상온에서 10분간 반응시켰으며, 반응 후 N2 buffer 100 μL를 추가하여 상온에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) Cytokine (PGE₂, IL-1β, IL-6, TNF-α) 생성량 측정

RAW264.7 세포를 6 well plate에 1×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하고 WGT를 100, 200, 400 μg/mL의 농도로 처리하고 200 ng/mL의 LPS를 추가하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 모든 배양이 종료된 후, 분리한 세포 배양액 100 μL를 96 well plate에 넣고 상온에서 2시간 반응시켰다. 반응 후 plate에 있는 시약은 버리고 washing buffer를 넣어 4회 세척하였다. 세척

후 detection antibody를 100 μL씩 추가하여 상온에서 2시간 반응시켰다. 반응 후 plate에 streptavidin-HRP 100 μL씩 추가하여 상온에서 30분 반응시켰다. 반응 후 TMB or pink-ONE solution 100 μL씩 각 well에 넣은 후 15분간 반응시키고 100 μL의 stop solution을 추가하여 micro reader를 통해 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준곡선을 기준으로 절댓값으로 나타내었다.

(3) 유전자 발현량 측정

RAW264.7 세포를 6 well plate에 1×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하고 WGT를 100, 200, 400 μg/mL의 농도로 처리하고 200 ng/mL의 LPS를 추가하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 모든 배양이 종료된 후, 원심분리하여 얻은 세포와 total RNA prep kit를 사용하여 RNA를 추출하였으며, 추출한 RNA는 reverse transcription premix와 혼합하고 PCR cycler를 사용하여 45°C에서 60분, 95°C에서 5분간 반응을 통해 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA로부터 특정 유전자를 증폭시켜 확인하기 위해 real-time PCR을 진행하였으며, cDNA와 특정 유전자에 맞는 primer, SYBR green premix를 혼합하여 95°C에서 2분 동안 반응시키고 95°C에서 5초, 62.5°C에서 30초를 40회 반복하여 특정 유전자를 증폭시켰다. 유전자 발현량은 대조군의 유전자 발현량을 기준으로 상대정량하였으며, 사용된 primer들의 정보는 Table II와 같다.

3. 통계처리

연구 결과는 mean±standard error of mean으로 나타내었으며, SPSS Statistics ver. 21.0 (IBM, Seoul, Korea)을 이용하였으며, 먼저 두 그룹 간의 통계적 비교는 independent sample t-test를 사용하여 수행하였고 여러 그룹 간의 통계적 비교는 one-way analysis of variance를 사용하여 수행하였다. 그룹 간의 사후비교는 Tukey's honest significant difference test를 통해 유의수준 0.05로 설정하여 유의성을 검정하였다.

Table II. Real-Time PCR Primer Sequences

Gene name	Size (bp)	F/R	Sequences
iNOS	127	F	GCTCCAGCATGTACCCTCAG
		R	AAGGCATCCTCCTGCCCACT
COX-2	128	F	CCGTGGGGAATGTATGAGCA
		R	GGGTGGGCTTCAGCAGTAAT
IL-1β	135	F	GCCACCTTTTGACAGTGATGAG
		R	ATGTGCTGCTGCGAGATTTG
IL-6	141	F	CCCCAATTTCCAATGCTCTCC
		R	CGCACTAGGTTTGCCGAGTA
TNF-α	129	F	GATCGGTCCCCAAAGGGATG
		R	TTTGCTACGACGTGGGCTAC
β-actin	102	F	CACTGTCGAGTCGCGTCC
		R	CGCAGCGATATCGTCATCCA

PCR: polymerase chain reaction, F: forward, R: reverse, iNOS: inducible nitric oxide synthase, COX-2: cyclooxygenase-2, IL-1β: interleukin-1β, IL-6: interleukin-6, TNF-α: tumor necrosis factor α.

결과

1. 총 polyphenol과 총 flavonoid 함량

Galic acid를 표준물질로 하여 WGT에 존재하는 총 polyphenol 함량을 측정한 결과 68.82±2.70 (mg GAE/g)으로 나타났고 quercetin을 표준물질로 하여 WGT에 존재하는 총 flavonoid 함량을 측정한 결과 23.63±1.74 (mg QE/g)로 나타났다.

2. DPPH radical 소거능

DPPH radical 소거능을 측정한 결과, WGT 1, 10, 100, 1,000 µg/mL의 농도에서 각각 7.19±0.68%, 11.02±1.96%, 29.26±3.22%, 83.91±1.73%로 농도 의존적인 소거능 증가를 보였다(Fig. 1).

3. ABTS radical 소거능

ABTS radical 소거능을 측정한 결과, WGT 1, 10,

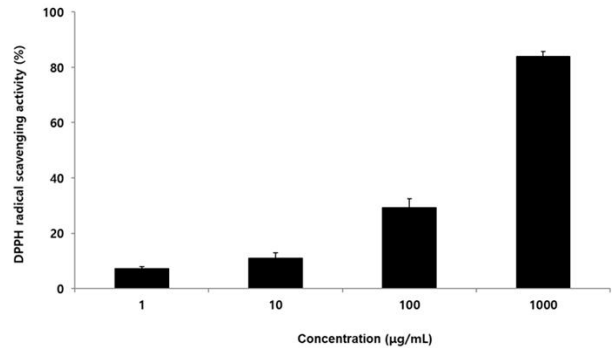


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of WGT. The results were expressed as mean±standard error of mean from three independent experiments. DPPH: 2,2-diphenyl-2-picryl-hydrazyl, WGT: wolbigachul-tang.

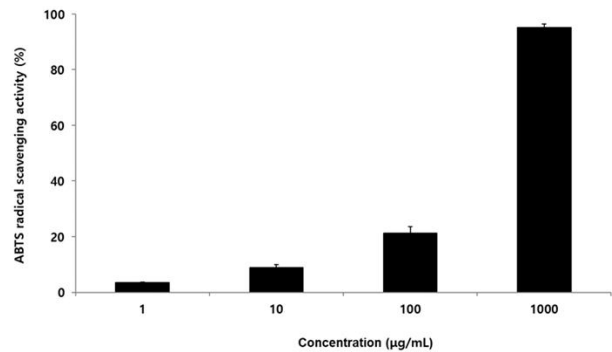


Fig. 2. ABTS radical scavenging activity of WGT. The results were expressed as mean±standard error of mean from three independent experiments. ABTS: 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), WGT: wolbigachul-tang.

100, 1,000 µg/mL의 농도에서 각각 3.60±0.02%, 8.87±1.01%, 21.27±2.28%, 95.11±1.29%로 농도 의존적인 소거능 증가를 보였다(Fig. 2).

4. 세포 생존율

세포 생존율을 측정한 결과, WGT 400 µg/mL 이하의 농도에서 세포에 대한 증식이 나타났으며, 800 µg/mL 이상의 농도에서 독성이 나타나 이후 실험에서는 400 µg/mL 농도까지 진행하였다(Fig. 3).

5. ROS 생성량

ROS 생성량은 대조군을 100.00±3.57%로 나타냈을

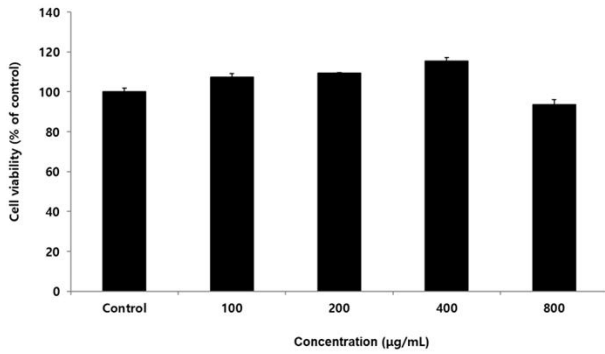


Fig. 3. Cell viability of WGT in RAW264.7 cells. The result were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments. WGT: wolbigachul-tang, Control: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells, 100, 200, 400, 800: lipopolysaccharides-induced and WGT (100, 200, 400, 800 µg/mL) treated RAW264.7 cells.

때, 정상군이 29.64±4.77%, WGT 100, 200, 400 µg/mL 농도 처치군이 각각 89.51±3.47%, 70.74±4.07%, 44.09±6.13%로 나타났으며 WGT 100 µg/mL 이상의 농도에서 농도 의존적으로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다 (Fig. 4).

6. NO 생성량

NO 생성량은 대조군을 100.00±6.76%로 나타냈을 때, 정상군은 35.33±2.40%, WGT 100, 200, 400 µg/mL 농도 처치군은 각각 79.13±3.27%, 68.61±3.62%, 56.19±3.09%로 나타났으며 WGT 100 µg/mL 이상의 농도에서 농도 의존적으로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다 (Fig. 5).

7. Cytokine 생성량

1) PGE₂

PGE₂ 생성량은 정상군이 266.08±69.74 pg/mL, 대조군이 2,059.92±92.82 pg/mL, WGT 100, 200, 400 µg/mL 농도 처치군이 각각 1,796.79±81.28 µg/mL, 1,426.60±80.04 µg/mL, 1,195.06±71.49 µg/mL로 나타났으며 WGT 100 µg/mL 이상의 농도에서 농도 의존적으로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 6).

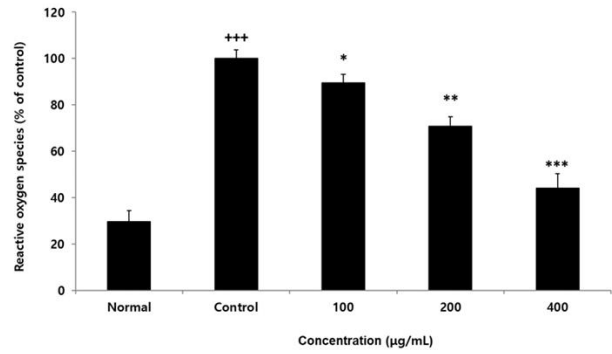


Fig. 4. Effect of WGT on reactive oxygen species level in RAW264.7 cells. The result were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments (significance of results: +++p<0.001 compared to normal, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to control). WGT: wolbigachul-tang, Normal: non lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells, Control: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells, 100, 200, 400: lipopolysaccharides-induced and WGT (100, 200, 400 µg/mL) treated RAW264.7 cells.

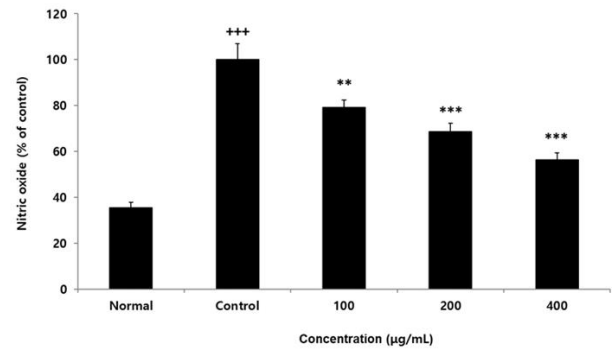


Fig. 5. Effect of WGT on nitric oxide level in RAW264.7 cells. The result were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments (significance of results: +++p<0.001 compared to normal, **p<0.01, ***p<0.001 compared to control). WGT: wolbigachul-tang, Normal: non lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells, Control: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells, 100, 200, 400: lipopolysaccharides-induced and WGT (100, 200, 400 µg/mL) treated RAW264.7 cells.

2) IL-1β

IL-1β 생성량은 정상군이 63.84±9.58 pg/mL, 대조군이 272.60±15.90 pg/mL, WGT 100, 200, 400 µg/mL 농도 처치군이 각각 251.61±22.72 pg/mL, 235.81±12.39 pg/mL, 175.27±12.01 pg/mL로 나타났으며 WGT 200 µg/mL 이상의 농도에서 농도 의존적으로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 7).

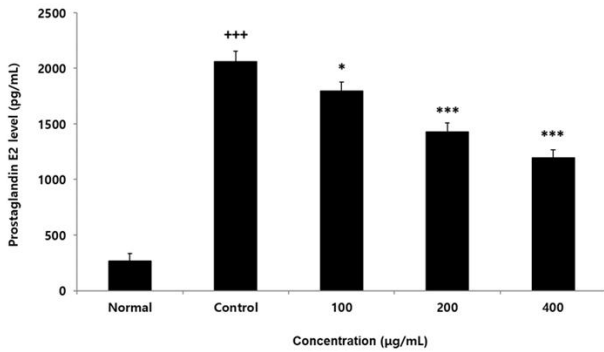


Fig. 6. Effect of WGT on prostaglandin E₂ level in RAW264.7 cells. The result were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments (significance of results: +++p<0.001 compared to normal, *p<0.05, ***p<0.001 compared to control). WGT: wolbigachul-tang, Normal: non lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells, Control: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells, 100, 200, 400: lipopolysaccharides-induced and WGT (100, 200, 400 µg/mL) treated RAW264.7 cells.

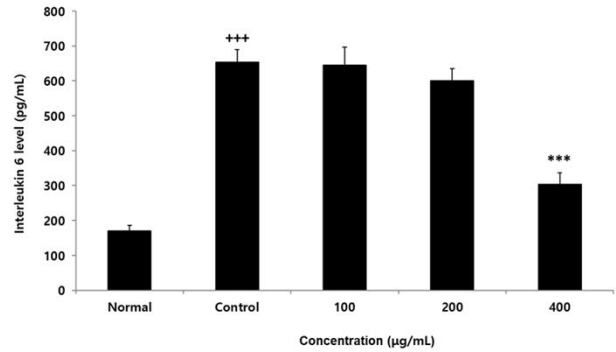


Fig. 8. Effect of WGT on interleukin 6 level in RAW264.7 cells. The result were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments (significance of results: +++p<0.001 compared to normal, ***p<0.001 compared to control). WGT: wolbigachul-tang, Normal: non lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells, Control: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells, 100, 200, 400: lipopolysaccharides-induced and WGT (100, 200, 400 µg/mL) treated RAW264.7 cells.

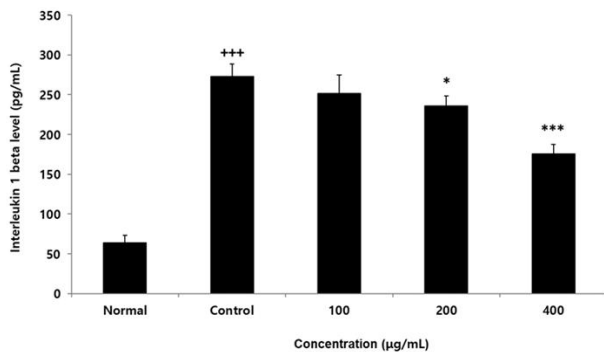


Fig. 7. Effect of WGT on interleukin 1 beta level in RAW264.7 cells. The result were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments (significance of results: +++p<0.001 compared to normal, *p<0.05, ***p<0.001 compared to control). WGT: wolbigachul-tang, Normal: non lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells, Control: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells, 100, 200, 400: lipopolysaccharides-induced and WGT (100, 200, 400 µg/mL) treated RAW264.7 cells.

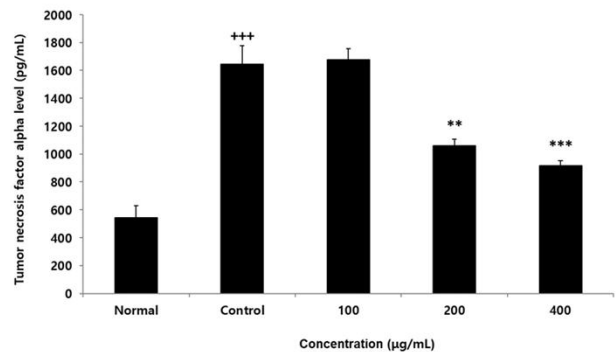


Fig. 9. Effect of WGT on tumor necrosis factor α level in RAW264.7 cells. The result were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments (significance of results: +++p<0.001 compared to normal, **p<0.01, ***p<0.001 compared to control). WGT: wolbigachul-tang, Normal: non lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells, Control: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells, 100, 200, 400: lipopolysaccharides-induced and WGT (100, 200, 400 µg/mL) treated RAW264.7 cells.

3) IL-6

IL-6 생성량은 정상군이 170.30±15.82 pg/mL, 대조군이 653.80±35.59 pg/mL, WGT 100, 200, 400 µg/mL 농도 처치군이 각각 644.82±52.16, 601.05±33.19, 302.85±33.15 pg/mL로 나타났으며 WGT 400 µg/mL 농도에서 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 8).

4) TNF-α

TNF-α 생성량은 정상군이 544.44±86.06 pg/mL, 대조군이 1,644.64±133.39 pg/mL, WGT 100, 200, 400 µg/mL 농도 처치군이 각각 1,675.47±81.52 pg/mL, 1,061.57±45.07 pg/mL, 916.94±36.55 pg/mL로 나타났으며 WGT 200 µg/mL 이상의 농도에서 농도 의존적으로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 9).

8. 유전자 발현량

1) iNOS

iNOS 유전자 발현량은 β -actin을 housekeeping gene 으로 사용하여 상대정량하였고, 대조군을 1.00 ± 0.03 로 나타냈을 때 정상군이 0.04 ± 0.04 , WGT 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ 농도 처치군이 각각 0.76 ± 0.04 , 0.72 ± 0.04 , 0.53 ± 0.04 로 나타났으며 WGT 100 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 농도 의존적으로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 10).

2) COX-2

COX-2 유전자 발현량은 β -actin을 housekeeping gene 으로 사용하여 상대정량하였고, 대조군을 1.00 ± 0.05 로 나타냈을 때 정상군이 0.18 ± 0.05 , WGT 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ 농도 처치군이 각각 0.76 ± 0.04 , 0.62 ± 0.04 , 0.48 ± 0.05 로 나타났으며 WGT 100 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 농도 의존적으로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 11).

3) IL-1 β

IL-1 β 유전자 발현량은 β -actin을 housekeeping gene 으로 사용하여 상대정량하였고, 대조군을 1.00 ± 0.05 로 나

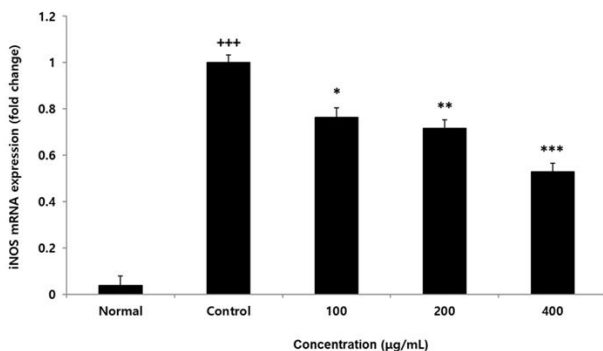


Fig. 10. Effect of WGT on iNOS mRNA expression level in RAW264.7 cells. The result were presented by the mean \pm standard error of mean from three independent experiments (significance of results: +++ $p < 0.001$ compared to normal, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to control). WGT: wolbigachul-tang, iNOS: inducible nitric oxide synthase, Normal: non lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells, Control: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells, 100, 200, 400: lipopolysaccharides-induced and WGT (100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$) treated RAW264.7 cells.

타냈을 때 정상군이 0.04 ± 0.01 , WGT 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ 농도 처치군이 각각 0.99 ± 0.07 , 0.86 ± 0.05 , 0.73 ± 0.01 로 나타났으며 WGT 200 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 농도 의존적으로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 12).

4) IL-6

IL-6 유전자 발현량은 β -actin을 housekeeping gene으

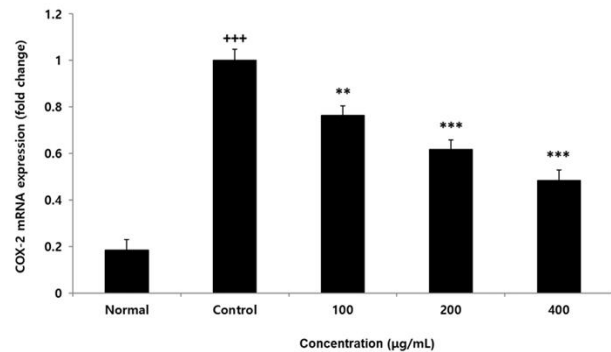


Fig. 11. Effect of WGT on COX-2 mRNA expression level in RAW264.7 cells. The result were presented by the mean \pm standard error of mean from three independent experiments (significance of results: +++ $p < 0.001$ compared to normal, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to control). WGT: wolbigachul-tang, COX-2: cyclooxygenase-2, Normal: non lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells, Control: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells, 100, 200, 400: lipopolysaccharides-induced and WGT (100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$) treated RAW264.7 cells.

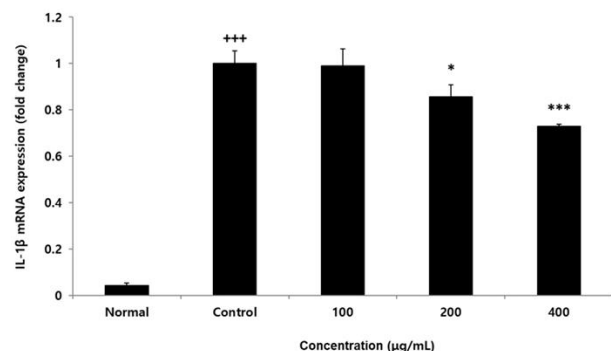


Fig. 12. Effect of WGT on IL-1 β mRNA expression level in RAW264.7 cells. The result were presented by the mean \pm standard error of mean from three independent experiments (significance of results: +++ $p < 0.001$ compared to normal, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ compared to control). WGT: wolbigachul-tang, IL-1 β : interleukin-1 β , Normal: non lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells, Control: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells, 100, 200, 400: lipopolysaccharides-induced and WGT (100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$) treated RAW264.7 cells.

로 사용하여 상대정량하였고, 대조군을 1.00±0.05로 나타냈을 때 정상군이 0.11±0.06, WGT 100, 200, 400 µg/mL 농도 처치군이 각각 0.94±0.05, 0.84±0.06, 0.52±0.07로 나타났으며 WGT 200 µg/mL 이상의 농도에서 농도의존적으로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 13).

5) TNF-α

TNF-α 유전자 발현량은 β-actin을 housekeeping gene

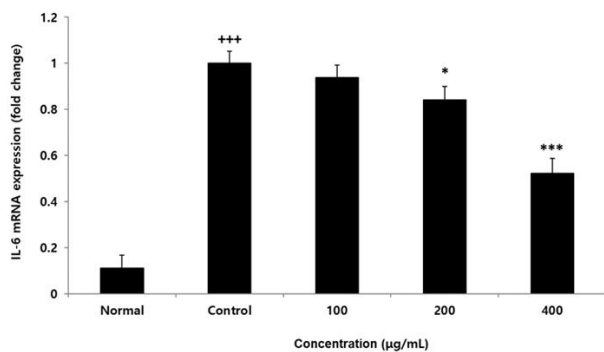


Fig. 13. Effect of WGT on IL-6 mRNA expression level in RAW264.7 cells. The result were presented by the mean± standard error of mean from three independent experiments (significance of results: +++p<0.001 compared to normal, *p<0.05, ***p<0.001 compared to control). WGT: wolbigachul-tang, IL-6: interleukin-6, Normal: non lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells, Control: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells, 100, 200, 400: lipopolysaccharides-induced and WGT (100, 200, 400 µg/mL) treated RAW264.7 cells.

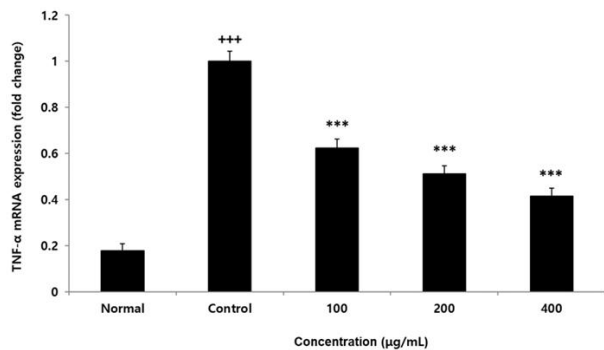


Fig. 14. Effect of WGT on TNF-α mRNA expression level in RAW264.7 cells. The result were presented by the mean± standard error of mean from three independent experiments (significance of results: +++p<0.001 compared to normal, ***p<0.001 compared to control). WGT: wolbigachul-tang, TNF-α: tumor necrosis factor α, Normal: non lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells, Control: lipopolysaccharides-induced RAW264.7 cells, 100, 200, 400: lipopolysaccharides-induced and WGT (100, 200, 400 µg/mL) treated RAW264.7 cells.

으로 사용하여 상대정량하였고, 대조군을 1.00±0.04로 나타냈을 때 정상군이 0.18±0.03, WGT 100, 200, 400 µg/mL 농도 처치군이 각각 0.62±0.04, 0.51±0.03, 0.41±0.03으로 나타났으며 WGT 100 µg/mL 이상의 농도에서 농도의존적으로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 14).

고찰>>>>

越婢湯은 金匱要略에 “風水, 惡風, 一身悉腫, 脈浮不渴, 續自汗出, 無大熱, 月婢湯主之.”라 기재되어 있다. 이는風水로 惡風이 있고 온몸이 다 부으며 脈이浮하고 口渴이 없고 自汗이 계속 있되 熱이 크게 있지 않으면 越婢湯으로 다스린다는 말이다. 여기에서風水는表虛로 인한浮腫이 아닌實證으로 인해 온몸이 붓는 증상을 나타내는 것이다. 또한 自汗이 계속되는 것은裏에 熱이 있기 때문인데 심한 熱이 아닌 것은陽明病의 경우처럼 찌는 듯한 熱을 의미하는 것이라 볼 수 있다. 즉, 越婢湯은 表를 다스리는 한편 裏의 熱까지 다스릴 수 있는 처방이다⁹⁾. 越婢加朮湯은 越婢湯에 蒼朮을 가한 것으로 蒼朮은 性이 溫하고, 味는 辛苦하다. 燥濕健脾, 水腫, 風濕痺痛 등을 치료하는 효능이 있는데 外로는 風濕의 邪氣를 제거하고, 內로는 脾胃의 濕邪를 化濕시키므로 燥濕健脾 시키고 祛風을 시키는 要藥이다. 그러므로 濕邪로 인하여 병이 된 모든 증에 上下表裏를 막론하고 응용할 수 있다⁷⁾. 따라서 越婢加朮湯은 金匱要略 “裏水者, 一身面目黃腫, 其脈沈, 小便不利, 故令病水. 假如小便不利, 此亡津液, 故令渴也, 越婢加朮湯主之”⁶⁾이라는 문구에서 볼 수 있듯이 越婢湯에 朮을 가해 利尿작용을 겸하게 하여, 온몸이 누렇게 붓고 소변이 잘 통하지 않는 裏水를 다스리는 처방이라 볼 수 있다⁹⁾.

이에 裏熱을 다스리고 裏水 및 風水를 다스리는 越婢加朮湯의 효능이 항산화 및 염증 개선에 효과가 있는지 알아보려고 실험을 진행하였다.

생명체는 호흡하면서 필요한 에너지를 얻게 되는데 대사 과정에서 호흡한 산소의 3% 정도가 radical을 띠는 산소, 즉 ROS로 전환되는 것으로 추정되고 있다¹⁰⁾. 인체의 영향을 끼치는 ROS의 종류로는 hydroxyl radical (HO[•]), superoxide radical (O₂^{•-}), hydrogen peroxide (H₂O₂),

singlet oxygen (1O_2) 등이 있다¹¹⁾. ROS는 세포막의 불포화 지방산들과 반응하여 새로운 radical을 형성하고 이것들이 연쇄반응을 일으켜 세포막을 산화시켜 액체성을 감소시키고 투과성을 증가시킨다. 또한 이러한 radical은 혈액을 타고 다른 부위의 과산화를 일으킬 수 있다. 이렇듯 ROS는 여러 장기의 기능적 손상과 질병을 유발할 수 있다^{2,12)}. 우리 몸에는 ROS로 인한 유해에 대항하여 생체막 기능을 정상으로 회복하고 세포 대사물을 처리하는 여러 가지 항산화 방어시스템이 존재한다. 항산화 방어시스템은 크게 두 가지로 나눌 수 있는데, 효소에 의한 방어기전과 비효소적 방어기전이다¹³⁾. 효소를 통한 방어기전으로는 크게 superoxide dimutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX)가 있다. SOD의 경우 세포질에 있는 CuZn-SOD, 세포 외에 존재하는 SOD, 미토콘드리아에 있는 Mn-SOD로 총 3가지 종류로 분류되어 있고 이는 산소의 대사 과정에서 일어나는 ROS를 제거하는 역할을 한다. CAT의 경우 SOD의 작용으로 radical이 분해될 때 생성하는 H_2O_2 를 물과 산소로 변환하여 제거하는 역할을 한다. GPX의 경우 flavonoid, vitamin E 등의 도움을 받아 hydroxyl radical을 제거하는 역할을 한다. 비효소적 방어기전으로는 uric acid, bilirubin, vitamin C, E 등이 효소의 도움을 받지 않고 hydroxyl radical 및 singlet oxygen 등과 반응하여 이들의 독성을 제거하는 방법이 있다¹²⁾.

체내의 자체 효소인 SOD, CAT, GPX는 생체 컨디션이나 노화 등 여러 요인에 따라 분비량이 일정하지 않기 때문에 비효소적인 항산화 물질을 섭취하여 체내의 항산화 시스템을 견고하게 하는 것이 필요하다¹²⁾.

Polyphenol은 채소와 과일뿐만 아니라 커피나 차, 음료 등에도 함유되어 있는 화학물질로 항산화, 항염증, 신경 퇴행성 질환의 완화 등 질병 치료와 유전자 발현의 조절 및 체내의 미생물 균형에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 polyphenol은 크게 flavonoid와 non-flavonoid로 구분할 수 있다¹⁴⁾. Flavonoid는 많은 식물체에서 발견할 수 있는데, 이것은 식물의 2차 대사산물로 사람이 섭취하는 가장 흔한 polyphenol 화합물 중 하나다. Flavonoid는 유리기 제거제로서의 작용이 강하고 특히 hydroxyl radical과의 반응성이 뛰어나 자연에서 얻을 수 있는 강력한 항산화제로 알려져 있다¹⁵⁾.

항산화 효과를 측정하는 방법 중 가장 대표적인 것으

로는 DPPH, ABTS radical 소거능 측정을 뽑을 수 있다. DPPH radical의 경우 자색을 띠는 비교적 안정한 free-radical로써 음이온 radical을 소거하는 활성정도를 측정하는 방법이며, 항산화제에 의해 환원되어 색이 탈색되는 특징이 있다. ABTS radical의 경우 친유성(親油性)과 친수성(親水性)을 띠는 항산화 물질의 측정이 가능한 것으로 알려져 있으며, 양이온 radical을 소거하는 활성정도를 측정하는 차이가 있다. 따라서 기질과 반응물질과의 결합 정도 차이에 따라 두 방법에서의 측정값에 차이가 있을 수 있다¹⁶⁾.

이에 WGT의 항산화 효능을 평가하기 총 polyphenol, 총 flavonoid, DPPH radical, ABTS radical 소거능 그리고 세포 내의 ROS 생성량을 측정하였다. WGT의 총 polyphenol 함량은 68.82 ± 2.70 mg GAE/g으로 측정되었고, 총 flavonoid의 함량은 23.63 ± 1.74 mg QE/g으로 측정되었다. DPPH radical 소거능과 ABTS radical 소거능의 측정 결과 WGT는 농도 의존적은 소거능의 증가가 나타났으며 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 급증하는 추세를 보였고 각각 $83.91 \pm 1.73\%$, $95.11 \pm 1.29\%$ 의 소거능을 보였다(Figs. 1, 2). LPS로 유도된 RAW246.7 cell에 WGT를 처리하여 ROS 생성량을 측정하기에 앞서 WGT의 Raw264.7 cell에 대한 세포 생존을 실험을 하였다. 측정 결과 WGT는 400 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도에서 세포에 대한 증식이 나타났으며, 800 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 독성이 나타나 이후 실험에서는 400 $\mu\text{g/mL}$ 농도까지 진행하였다(Fig. 3). ROS 생성량을 측정한 결과, WGT는 100 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 농도 의존적이고 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 보였고, 400 $\mu\text{g/mL}$ 에서 $44.09 \pm 6.13\%$ 의 ROS 생성량 감소를 확인할 수 있었다(Fig. 4). 고농도에서의 WGT는 radical 소거능 급증과 더불어 ROS의 생성량도 유의미하게 감소시키는 실험 결과를 확인할 수 있었다. 다만 DPPH, ABTS radical 소거능이 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 급증하였고 WGT의 RAW246.7 cell에 대한 세포독성이 800 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 나타난 것으로 보아 저농도에서의 WGT의 항산화 효능 평가를 위해서는 추가적인 실험이 필요하리라 생각된다.

염증의 발생은 LPS나 알레르겐과 같은 항원, 온도 변화, 신경 자극 등 다양한 단계를 통해 유도된다. 자극의 종류에 따라 다양한 receptor가 활성화되며, 그에 대응하는 신호 물질들이 분비된다. 대식세포의 경우 LPS로

인한 자극이 발생하면 염증성 cytokine인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 들을 생성하여 염증 반응을 유도한다¹⁷⁾. IL-1 β , TNF- α 는 감염 부위의 혈관내피세포 변화를 유발하여 혈관의 직경을 증가하게 하고 혈류속도를 낮추어 백혈구와 같은 면역세포들이 감염조직으로 이동할 수 있도록 한다. IL-6는 근육 및 지방세포의 대사를 활발하게 하여 감염조직 부위의 열을 발생하게 한다¹⁸⁾. 이러한 자극으로부터 발생하는 손상을 방지하기 위해 우리 몸은 신호전달 과정을 억제하는 전략을 사용하는데, 이 과정에서는 COX-2 효소의 발현이 염증 발현 단계에 핵심적인 역할을 한다고 알려져 있다. COX-2는 arachidonic acid를 PGE₂로 전이시키는 과정에 직접적으로 관여하는 효소로 알려져 있으며¹⁹⁾, PGE₂는 염증 유발 신호물질로 시상하부에 작용하여 발열을 일으킨다¹⁸⁾.

NO는 체내의 생리와 병리 모두에서 복합적으로 작용을 하는 ROS의 한 종류이다. NO 합성효소 NOS에 의해 L-arginine이 L-citrulline으로 변환되면서 NO가 형성된다. 이 과정을 매개하는 NOS 중 유도성 NOS (inducible NOS, iNOS)는 LPS 자극을 받은 각종 세포에서 나타나고 세균에 감염된 상피세포 또는 cytokine의 자극에 의해서도 발현이 된다²⁰⁾. iNOS의 발현에 의해 발생하는 NO는 염증 반응을 유발하고, IL-6과 같은 cytokine과 COX-2와 같은 매개 물질을 형성하여 과도한 면역반응을 유발하여 염증 반응을 심화시킨다²¹⁾.

WGT의 염증 개선 효과를 실험하기 위하여 LPS로 유도된 대식세포 RAW264.7 cell을 이용하였다. LPS로 유도된 RAW264.7 cell에 WGT를 처리하고 NO, PGE₂, IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성량을 측정하였다. NO 생성량을 측정한 결과, WGT 100 μ g/mL 이상의 농도에서 농도 의존적이고 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 5). PGE₂, IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성량 측정 결과, 각각 WGT 100, 200, 400, 200 μ g/mL 이상의 농도에서 농도 의존적이고 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 보였다(Figs. 6-9). 또한, NO와 PGE₂ 합성에 핵심적인 관여를 하는 iNOS와 COX-2의 유전자 발현량을 측정하였고, IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 유전자 발현량을 측정하였다. 실험 결과 iNOS, COX-2 유전자 발현량은 WGT 100 μ g/mL 이상의 농도에서 농도 의존적이고 대조군에 비해 유의성 있는 감소가 나타났다(Figs. 10, 11). IL-1 β , IL-6의 유전자 발현량 모두 WGT 200 μ g/mL 이상의 농

도에서, TNF- α 의 유전자 발현량의 경우 WGT 100 μ g/mL 이상의 농도에서 농도 의존적이고 대조군에 비해 유의한 감소를 보였다(Figs. 12-14).

이상의 실험에서 WGT가 항산화 및 염증 개선 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었고 임상에서 여러 염증성 질환에 적용 가능할 것이라 생각된다. 하지만 위의 실험이 세포 실험이라는 한계점이 있으며 WGT의 구성 약재인 麻黃, 石膏, 蒼朮, 大棗, 生薑, 甘草 중 어떠한 약재가 항산화 및 항염증 효능에 핵심 역할을 하였는지 알기는 어렵다. 이에 단일 약재에 대한 in vitro 실험이 진행되길 기대하며, 더 나아가 임상에서 흔히 접할 수 있는 염증성 질환인 골관절염 및 류마티스성 관절염에 대한 in vivo 실험의 설계 및 연구가 이루어지길 바란다.

결론»»»»

WGT를 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에 처리하여 항산화 및 염증 개선 효과를 실험한 결과, 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. WGT에 존재하는 총 polyphenol과 flavonoid의 측정 값은 68.82 \pm 2.70 mg GAE/g, 23.63 \pm 1.74 mg QE/g 이었다.
2. WGT는 DPPH, ABTS radical 소거능 실험에서 농도 의존적인 소거능의 증가를 보였다.
3. WGT의 세포 내 ROS, NO의 생성량은 대조군에 비해 유의하게 감소하였다.
4. WGT의 염증성 사이토카인(PGE₂, IL-1 β , IL-6, TNF- α) 생성량은 대조군에 비해 유의하게 감소하였다.
5. WGT의 iNOS, COX-2, IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 유전자 발현량은 대조군에 비해 유의하게 감소하였다.

References»»»»

1. Ji NR, Park KY. Stress-induced biphasic ethylene and ROS biosynthesis are synergistically interacted in cell

- damage. *Journal of Plant Biotechnology*. 2011;38(1):22-9.
2. Gabriele P, Natasha I, Mariapaola C, Giovanni P, Federica M, Vincenzo A, Francesco S, Domenica A, Alessandra B. Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;2017:8416763.
 3. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clinical and Experimental Immunology*. 2007;147(2):227-35.
 4. Abdulkhaleq LA, Assi MA, Abdullah R, Zamri-Saad M, Taufiq-Yap YH, Hezmee MNM. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: a review. *Veterinary World*. 2018;11(5):627-35.
 5. Jeong WJ, Kim CY. The neurotransmitter pathway of itching. *Journal of Life Science*. 2017;27(5):600-10.
 6. Jeong RA, Yeon KK, Dong HC, In SL, Sonn SS, Jeong HG, Lee HY, Lee HR. WBCEX1 reduces feeding efficiency ratio and visceral obesity in obese mice induced by high fat diet. *J Korean Med Rehabil*. 2011;21(1):1-22.
 7. National Oriental Medicine College Collaborative Textbook Compilation Committee. *Herbology*. 3th ed. Seoul:Young Lim Publishing. 2014:331-2.
 8. Tracy RP. The five cardinal signs of inflammation: calor, dolor, rubor, tumor ... and penuria. *The Journals of Gerontology*. 2006;61(10):1051-2.
 9. Hu XS. *Lecture of synopsis of golden chamber*. 1st ed. Paju:FishWood. 2017:301-4.
 10. Cho HC, Kim JK, Han JH, Kim JP, Ahn CS, Hong Y. The effect of propolis intake duration and concentration on free radical scavenging activity, peroxide value and fatigue variables induced by exercise. *Physical Activity and Nutrition*. 2006;10(1):27-35.
 11. Yeon SH, Ham HM, Sung JH, Kim YH, Namkoong SG, Jeong HS, Lee JS. Antioxidant activities of hot water extract from *Cornus walteri* Wanger against oxidative stress induced by tert-Butyl hydroperoxide in HepG2 cells. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2013;42(10):1525-32.
 12. Hong GG. A study on skin aging caused by free-radical and on efficacy of antioxidant vitamins. *Korean Journal of Aesthetics and Cosmetics Society*. 2009;2(18):51-62.
 13. Yoon HJ, Park YS. Effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on lipid metabolism and antioxidant defense system in rats fed high fat diet. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2010;39(2):219-26.
 14. Kim MG, Oh MS, Jeon JS, Kim HT, Yoon MH. A study on antioxidant activity and antioxidant compound content by the types of tea. *Journal of Food Hygiene and Safety*. 2016;31(2):132-9.
 15. Lee JE, Park SY. Effects of flavonoids on skin according to their structural characteristics: a review. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*. 2022;20(1):133-43.
 16. Lee SM, You YH, Kim KM, Park JJ, Jeong CS, Jhon DY, Ju WJ. Antioxidant activities of native Gwangyang *Rubus coreanus* Miq. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2012;43(3):327-32.
 17. Jung HH, Cho UM, Hwang HS, Cho K, Lee SR, Kim MS. Effect of steviol β -glucopyranosyl ester on the production of nitric oxide and inflammatory cytokines in RAW 264.7 cells. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 2018;44(3):239-47.
 18. Kim TY, Leem KH. Effect of cheongpyesagan-tang on LPS induced inflammation in RAW 264.7 cells. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*. 2019;33(1):31-8.
 19. Lim JW, Kim HY, Kim KH. Nuclear factor- κ B regulates cyclooxygenase-2 expression and cell proliferation in human gastric cancer cells. *Laboratory Investigation*. 2001;81(3):349-60.
 20. Yim CY. Nitric oxide and cancer. *The Korean Journal of Medicine*. 2010;78(4):450-6.
 21. Kim CM, Park YK. The effects of different extracts of *Ostericum koreanum* on the production of inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *The Korea Journal of Herbology*. 2009;24(1):169-78.