

황금, 어성초를 배합한 익수영진고가미 한약재배합물의 베타글루칸, 진세노사이드 함량, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl Free Radical 소거 활성, 항염 활성 및 안전성 연구

김명훈*¹ · 문양선^{†1} · 강상미* · 김형석[†] · 김선중[§] · 나창수*

동신대학교 한의과대학 경혈진단학교실*, (유)나우리[†], 페토바이오[†], 동신대학교 한의과대학 한방재활의학교실[§]

A Study on β -glucan, Ginsenoside Content, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl Free Radical Scavenging Activity, Anti-inflammatory Activity and Safety of Herbal Medicine Mix - Iksooyoungjingogami with *Scutellariae Radix* and *Houttuynia cordata* Thunb

Myeong-Hun Kim, Ph.D.*¹, Yang-Seon Moon, M.S.^{†1}, Sang-Mi Kang, M.S.*[†], Heyong-Seok Kim, M.S.[†], Seon-Jong Kim, K.M.D.[§], Chang-Su Na, K.M.D.*

Department of Meridian & Acupoint · Diagnosis of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Dongshin University*, Nawoori (Ltd.)[†], Petobio (Ltd.)[†], Department of Korean Medicine Rehabilitation, College of Korean Medicine, Dongshin University[§]

¹These authors contributed equally to this study.

This study was supported by a grant of the SME R&D project for the start-up & grow stage company, Ministry of SMEs and Startups (S2975868).

RECEIVED February 17, 2022

REVISED February 24, 2022

ACCEPTED February 28, 2022

CORRESPONDING TO

Chang-Su Na, Department of Meridian & Acupoint · Diagnosis of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Dongshin University, 120-9 Dongshindae-gil, Naju 58245, Korea

TEL (061) 330-3522

FAX (061) 330-3519

E-mail nakugi@hanmail.net

Copyright © 2022 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

Objectives This study was conducted to investigate the beta-glucan & ginsenoside content, antioxidant activity, anti-inflammatory effect and safety of herbal medicine mix.

Methods The marker compounds contents, antioxidant activity and safety of herbal medicine mix were tested. The contents of beta-glucan and ginsenoside Rg3 were measured, the antioxidant activity was measured using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity, anti-inflammatory and a safety test was conducted via single dose toxicity assessment.

Results Analyzing the contents of marker compounds showed 362.3 mg/g of beta-glucan, and 0.4184 mg/g of ginsenoside Rg3. In the DPPH free radical scavenging activity, the IC50 of herbal medicine mix, was 0.146%. The scavenging activity of herbal medicine mix was 88.28% activity at 0.5% concentration, and 90.61% activity at 5% concentration. In the lipopolysaccharides (LPS) anti-inflammatory test, the herbal re-mix showed a significant decrease in tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) compared to the LPS-induced group. In the single dose toxicity test of herbal medicine mix, a dose of 2,000 mg/kg body weight (BW) was set at its highest capacity and observed after oral administration to female and male rats. No toxicological findings were recognized. It was observed that the resulting lethal dose can be set to 2,000 mg/kg BW or higher for both females and males.

Conclusions The results of the experiment on herbal medicine mix showed that the marker compounds contents were beta-glucan and ginsenoside Rg3, that antioxidant activity was observed through the DPPH free radical scavenging activity, anti-inflammatory effect was observed through TNF- α and IL-6 measurement, and safety was confirmed through the single dose toxicity assessment. (**J Korean Med Rehabil 2022;32(2):1-17**)

Key words Herbal medicine, Beta-glucans, Ginsenoside Rg3, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Tumor necrosis factor-alpha, Interleukin-6

서론»»»»

체 내에서 생성되는 활성산소(reactive oxygen species)는 고혈압, 당뇨, 심혈관 질환, 근골격계 질환 등 다양한 질환과 매우 밀접한 관계가 있다. 활성산소는 산화력이 강하여 체 내에서 제거되지 못하게 되면 산화적 스트레스를 유발시켜 지질과산화물을 유도하고 단백질, 세포막 등을 손상할 수 있다¹⁻³⁾.

체 내에 활성산소가 발생하면 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD), catalase, peroxidase 등이 산화적 스트레스로부터 세포를 보호한다. 항산화 방어체계가 비정상적으로 작동하거나 산화적 스트레스를 억제하지 못하면 인체 노화와 각종 질병을 유발한다. 합성 항산화제인 butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole 등은 세포대사, 체내 에너지 생산 및 호흡작용을 방해할 수 있으며, 암을 유발하는 등 독성과 부작용이 있다⁴⁻⁶⁾. 천연 한의약 자원인 phytochemicals은 식물의 2차 대사산물로서 독성이 거의 없고, 각종 질병의 예방과 치료에 효과가 있어서 천연물 유래 항산화제에 관한 관심이 증가하고 있다^{7,8)}.

익수영진고(益壽永眞膏)는 인삼, 복령, 생지황, 봉밀로 구성된 경옥고(瓊玉膏)에 補陰, 補肝腎할 수 있는 천문동, 맥문동, 지골피가 배합되어서 益精의 효능을 극대화한 제제이며, 『동의보감』에 “瓊玉膏, 填精補髓...衛生方生地黃八斤 人蔘三十二兩 白茯苓二十四兩 白蜜五斤, 本朝永樂中太醫院會議加天門冬麥門冬地骨皮八兩 進御服食賜號益壽永眞膏”라고 하였다^{9,10)}. 익수영진고는 填精補髓, 益精의 효능이 있어 면역력, 항병력 저하로 인한 각종 질환의 예방과 치료에 응용할 수 있는 제제로서 익수영진고 효모발효물이 피부노화를 억제할 수 있음을 보고한 바 있고¹¹⁾, 익수영진고 재료의 70% 주정 추출물이 산화 스트레스로 인한 신경 세포 손상의 진행 속도를 둔화시키는 효과가 있음을 보고한 바 있으며¹²⁾, 익수영진고가미방에 지황박, 복령피 배합과 발효한 제제가 면역활성을 향상하는 효과가 있음이 보고된 바 있다¹³⁾.

본 연구진은 경옥고 원방에 천문동, 맥문동, 구기자를 배합한 익수영진고를 기본 제제로 하고 꽃송이버섯을 추가한 익수영진고꽃송이버섯 제제가 항산화 효과를 증강시키고 면역력 조절과 연관성 있는 전염증성 인자를 억제하는 효과가 있음을 보고하였고¹⁴⁾, 또한 익수영진고꽃송

이버섯 제제의 배합비를 조정하고 노루궁뎅이버섯을 추가한 제제가 높은 수준의 β -glucan을 함유하고 있고, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 소거능 활성이 우수하여 항산력이 높고, 안전성 시험에서도 위대한 인자가 발생하지 않았음을 보고한 바 있다¹⁵⁾.

한편 황금(*Scutellariae Radix*)은 꿀풀과(*Labiatae*)에 속하는 다년생 초본인 속썩은풀(*Scutellaria baicalensis Georgi*)의 뿌리를 벗긴 뿌리를 건조한 것으로 주요 성분인 flavonoid계 화합물은 항염증 및 항산화 작용을 한다고 보고되어 있고, 마른기침, 토혈, 변비, 고열 등에 사용하는 소재이며¹⁶⁻¹⁸⁾, 어성초(*Houttuynia cordata Thunb*)는 삼백초과(*Saururaceae*)의 여러해살이풀 약모밀의 전초로서 해독, 항균, 이뇨, 진통, 지혈, 조직 재생 촉진 등의 작용이 있는 소재이다⁹⁾. 황금과 어성초는 항산화 효과와 항염 효과를 지니고 있어서 본 연구에서도 배합 재료로 선정하여 적용하였다.

이에 본 연구에서는 기존의 경옥고를 기반으로 한 익수영진고에 꽃송이버섯·노루궁뎅이버섯을 가미한 제제에 추가적으로 항염 효과가 있는 황금과 어성초를 배합한 한약재배합물에 대하여 Good Laboratory Practice (GLP) 인증 기관에서 β -glucan과 ginsenoside의 지표 분석, DPPH 소거활성 시험, 항염 시험을 측정하고, 아울러 급성단회독성 안전성 시험을 시행한바 다음과 같은 지견을 얻었다.

재료 및 방법»»»»

1. 배합재료, 한약재배합물의 배합 및 제조방법

1) 배합재료

홍삼(*Red ginseng radix*)은 정천고려홍삼(금산, 한국), 백복령(*Poria cocos*), 천문동(*Asparagi radix*), 맥문동(*Liriopsis tuber*), 구기자(*Lycii fructus*), 어성초(*Houttuynia cordata Thunb*), 황금(*Scutellariae Radix*)은 자애인(서울, 한국), 꽃송이버섯(*Sparassis crispa*)은 (주)바이오글루칸(평택, 한국), 노루궁뎅이버섯(*Hericium erinaceum*)은 (영)씨엔지유기농(세종, 한국)에서 생지황(*Rehmanniae radix*)은 (영)금산지황(금산, 한국), 봉밀(*Honey*)은 백화양봉(정읍, 한국)에서 국내산으로 구입하여 사용하였다.

2) 한약재배합물의 배합 및 제조방법

재료별 함량은 고행재료로 홍삼 180 g, 백복령 720 g, 천문동 30 g, 맥문동 30 g, 구기자 120 g, 꽃송이버섯 40 g, 노루궁뎅이버섯 220 g, 어성초 180 g, 황금 180 g으로 정하였고, 액상 재료로 생지황즙 2,000 g, 붕밀 30 g을 사용하였다(Table 1).

제조방법은 동의보감에 제시된 방법을 준용하였다⁹⁾. 생지황즙액을 얻기 위해서 생지황 3,000 g을 분쇄기(동방, 대전, 한국)에 넣어 마쇄하고, 마쇄된 상태에서 착즙기(동방)에 넣어 생지황즙 2,000 g을 얻었다(수율 66.6%). 생지황과 붕밀을 제외한 나머지 고행재료 1,700 g은 미세분말화 하였고, 이를 생지황즙 2,000 g과 붕밀 30 g을 함께 균일하게 혼합된 시료 1,700 g을 반죽하였고, 온도와 급수가 자동으로 조절되면서 웅기가 장착된 증탕기(double boiling apparatus; 반도식품기계, 부산, 한국)에 넣었다. 3일 동안 100±2°C로 유지하면서 1차 증탕을 시행하였고, 1차 증탕이 끝난 후 1일 동안 실온에 방치하면서 1차 숙성시켰다. 다시 1일 동안 1차 증탕과 같은 조건으로 2차 증탕을 시행하였고, 이후 1일 동안 1차 숙성과 같은 조건으로 2차 숙성 과정을 진행하였다. 이러한 일련의 과정을 거쳐서 고행태의 한약재배합물 시료 3,680 g (수율 98.7%)을 제조하였다(Fig. 1)³⁾.

Table 1. Material Content of Herbal Medicine Mix

Category	Scientific name	Amount (g)
Solid materials (A)	<i>Red ginseng radix</i>	180
	<i>Poria cocos</i>	720
	<i>Asparagi radix</i>	30
	<i>Liriopsis tuber</i>	30
	<i>Lycii fructus</i>	120
	<i>Sparassis crispa</i>	40
	<i>Hericium erinaceum</i>	220
	<i>Scutellariae Radix</i>	180
	<i>Houttuynia cordata Thunb</i>	180
	Sub total	1,700
Liquid materials (B)	<i>Rehmanniae radix</i> (Juice)	2,000
	Honey	30
	Sub total	2,030
Total (A+B)		3,730

2. 한약재배합물 함유 주요 성분 β-glucan, ginsenoside 분석

1) 개요

한약재배합물에 함유된 β-glucan과 ginsenoside 함량 측정은 공인인증기관인 한국기능식품연구원에서 시행하였으며(번호 D2020022259), β-glucan 분석은 ‘건강기능식품공전 제4. 건강기능식품 시험법 3. 개별성분별 시험법 3-25-1 베타글루칸1법’에 따라 시행하였고, ginsenoside 분석은 ‘건강기능식품공전(신) 제4 건강기능식품 시험법 3-54 ginsenoside 4. 시험과정 4.2 시험용액의 조제 4.2.2 농축액’에 따라 시행하였다.

2) 한약재배합물 내 β-glucan 측정

(1) 시험재료

β-glucan 측정에 사용된 시험물질은 한약재배합물이며, 표준물질은 D-(+)-glucose (Sigma Aldrich Co., Ltd., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

(2) 시험 및 검사 방법

① 표준용액의 조제

표준물질 53.42 mg을 채취하여 최종 부피가 100 mL이 되도록 증류수에 완전히 녹여 532.5974 ug/mL 농도의 표준원액으로 만들었으며, 검량선 작성을 위해 표준원액을 증류수로 희석하여 11.0958, 16.6437, 33.2873, 66.5747, 133.1494 ug/mL 농도의 표준용액으로 만들었다.

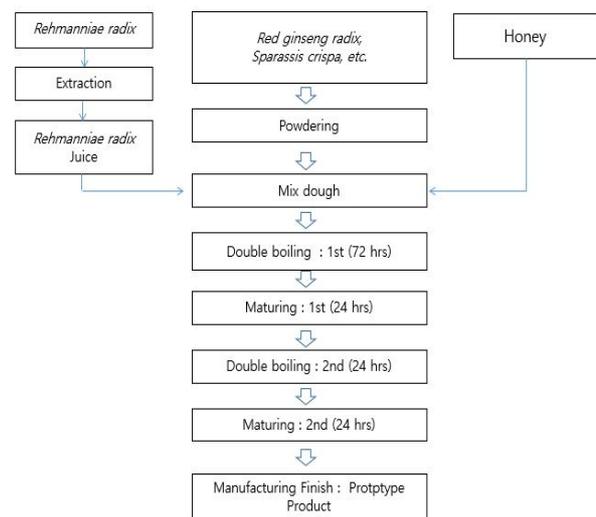


Fig. 1. Manufacturing process of herbal medicine mix.

② 시험용액의 조제

가. 전처리 과정

시험은 두 개의 시료 및 공시험을 동시에 실시하였다. 시료 일정량을 삼각플라스크에 넣어 지방이 10% 이상인 경우 탈지하고, 당을 많이 함유한 경우 85% 에탄올 용액으로 시료 20 mg당 10 mL씩으로 세척하고 증류수 10 mL을 가한다. 이 후 아밀라아제(20,000-60,000 U/mL)를 약 0.1 mg을 취하고, 0.1 N 수산화나트륨 용액을 이용하여 pH 6.9로 한 후 20°C에서 2시간동안 진탕하여 효소분해한다. 0.1 N 염산용액으로 pH 5.0으로 맞추고 셀룰라아제(1,600 U/mL)를 0.1 mL 넣고 37°C에서 2시간 동안 진탕하여 효소분해시킨다. 프로테아제(600~1,300 U/mL)를 약 0.1 mL를 넣고 0.1 N 수산화나트륨 용액으로 pH 7.5로 한 후 37°C에서 2시간 동안 진탕하여 효소분해한다. 아밀로글루코시다제(10,000 U/mL)를 약 0.1 mL 넣고 0.1 N 염산용액으로 pH 4.8로 한 후 60°C에서 2시간 동안 진탕하여 효소 분해한다. 효소분해물에 95% 에탄올 40 mL를 가하여 4°C에서 12시간 동안 침전시킨 후 용액을 원심분리(3,000 rpm, 20분)하여 시료의 침전물을 취한다. 시료의 침전물에 80% 에탄올 50 mL를 가하여 4°C에서 1시간 동안 침전시켜 용액을 원심분리(3,000 rpm, 20분)하고, 원심분리된 침전물에 증류수 10 mL를 가한 후 침전물을 혼합하여 균질화한다. 균질화된 용액을 증류수로 50 mL가 되도록 한 후이를 적정농도가 되도록 희석하여 시험용액으로 한다.

나. 발색 과정

25 mL 시험관을 농도별 표준용액과 시험용액(공시험 포함)으로 구분하여 각각 5% 페놀용액 1 mL를 넣는다. 농도별 표준용액을 각각 1 mL씩 가하고, 시험용액은 시험용액 0.1 mL과 증류수 0.9 mL를 가한다. 공시험은 증류수 1 mL을 가하여 용액들을 10초간 잘 흔들어 섞는다. 시험관에 각각 황산 5 mL을 가하여 혼합하고 실온에서 20분간 반응시킨 후 분광광도계를 이용하여 470 nm에서 흡광도를 측정한다. 분석결과는 아래의 계산식을 이용하여 산출하였다.

$$\beta\text{-glucan} = \frac{\text{시험용액의 농도}(ug/mL) \times \text{최종부피}(mL) \times \text{희석배수} \times 0.9 \times 10}{\text{시료채취량}(g) \times 1,000} \times \text{규격}$$

* β -glucan 전환계수(162/180) = 0.9

3) 한약재배합물 내 ginsenoside 측정

(1) 시험재료

Ginsenoside 측정에 사용된 시험물질은 한약재배합물을 사용하였으며, 표준물질은 ginsenoside Rb1 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan), ginsenoside Rg1 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), ginsenoside Rg3 (Chromadex, Los Angeles, CA, USA)를 사용하였다.

(2) 시험 및 검사 방법

① 표준용액의 조제

각 표준물질을 Rg1 9.13 mg, Rb1 7.08 mg, Rg3 9.04 mg을 채취하여 최종 부피가 10 mL이 되도록 완전히 녹여 Rg1 911.17 ug/mL, Rb1 700.21 ug/mL, Rg3 812.69 ug/mL 농도의 표준원액으로 만들었으며, 검량선 작성을 위해 표준원액을 25 mL 70% 메탄올에 완전히 용해하고 25 mL 총 50 mL로 정용한 후 멤브레인 필터(0.45 um)로 여과한 것을 ginsenoside Rg1은 1.2149, 6.0745, 30.3725, 151.8623, 303.7247 ug/mL로 ginsenoside Rb1은 0.9336, 4.6681, 23.3404, 116.7020, 233.4040 ug/mL로 ginsenoside Rg3는 1.0836, 5.4180, 27.0899, 135.4493, 270.8987 ug/mL 농도의 시험용액으로 만들어 사용하였다.

② 시험용액의 조제

시료 일정량을 70% 메탄올 25 mL로 완전히 용해하고 총 50 mL로 맞추는 후 멤브레인 필터(0.45 um)로 여과한 것을 시험용액으로 하였다.

③ 분석(측정) 조건

분석을 위해 S-DAD/FLD HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan)을 활용하였으며, Supelco discovery C18 column (4.6×250 mm; Sigma Aldrich Co., Ltd.)을 장착하여 분석을 진행하였다. 주입된 시료는 10 μ L였으며, 온도는 40°C로 유지되었고 1 mL/min 속도로 70분간 진행하였다. 이동상은 acetonitrile과 증류수가 사용되었으며 5분(20:80), 20분(23:77), 25분(30:70), 30분(40:60), 35분(50:50), 60분(85:15), 62분(85:15), 65분(20:80), 70분(20:80)으로 설정하고, 분석결과는 아래의 계산식을 이용하여 산출하였다.

수식 1

3. 한약재배합물의 DPPH free radical 소거활성 측정

1) 시험재료

(1) 시험물질

본 시험에 사용된 시험물질은 한약재배합물이며, 시험 기간 실온(1~30°C)에 보관하였고, 멸균증류수를 이용하여 조제하였다.

(2) 양성대조물질 및 기타시약

항산화 측정을 위한 양성대조물질은 L-ascorbic acid (Sigma Aldrich Co., Ltd.)를 사용하였으며, 시험에 사용된 시약은 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Alfa Aesar, Ward Hill, MA, USA)와 ethanol (Duksan Company, Ansan, Korea)이 사용되었다.

2) 시험절차

(1) 시험물질 및 시약 조제

한약재배합물을 순도환산하지 않고 그대로 이용하였으며, 한약재배합물은 0.05%, 0.5%, 1%, 5%, L-ascorbic은 0.0005%, 0.001%, 0.0015%, 0.002% 농도로 각각 멸균증류수를 이용하여 조제하였다. DPPH는 ethanol을 이용하여 0.2 mM 농도로 조제하였다.

(2) 시험군 구성

시험군은 한약재배합물과 L-ascorbic acid의 각 처리 농도로 구성하였다(Table II).

Table II. Group Composition

Group	Name	Concentration (%)
G1 (TS)	Herbal medicine mix	0.05, 0.5, 1, 5
G2 (PC)	L-ascorbic	0.0005, 0.001, 0.0015, 0.002

TS: test substance, PC: positive control.

(3) 시료액 반응 및 흡광도 측정

96 well plate에 각 농도별 조제물과 0.2 mM DPPH 및 ethanol을 1:1로 혼합하여 넣은 후 실온에서 30분간 차광상태로 반응시키고 원심분리하여 상층액을 취한 뒤 517 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. DPPH free radical 소거 활성률(%)은 아래의 식을 이용하여 산출하였다.

3) 통계처리

각 실험 결과는 3회 반복 측정하여 평균과 표준편차를 나타내었으며, SPSS 통계 프로그램(Ver. 19.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 이용하여 통계분석을 수행하였다. 먼저, Levene's test를 수행한 후 one way analysis of variance (ANOVA) test를 실시하여 실험군간 유의성이 확인 되면 분산의 동질성 유무에 따라 사후검정(분산이 동질한 경우 Duncan's 다중검정, 분산이 이질한 경우 Dunnett's T3)을 실시하였으며 신뢰구간은 95%로 설정하였다.

4) GLP statement

시험제목 '한약재배합물의 DPPH free radical 소거활성 측정시험'으로서 시험번호는 'TNK -2021-000423'이며, 모든 절차는 GLP 규정에 준수하여 실시하였다. 한국화학융합시험연구원 'DPPH를 이용한 free radical 소거활성 측정시험' protocol과 연구방법에 준하여 수행하였다.

4. 한약재배합물의 항염 유효성 시험

1) 시험 재료

(1) 시험물질

본 시험에 사용된 시험물질은 한약재배합물이며, 시험 기간 실온(1~30°C)에 보관하였고, 배양액을 이용하여 조제하였다.

$$\text{Ginsenoside} = \frac{\text{시험용액의 농도}(ug/mL) \times \text{최종부피}(mL) \times \text{희석배수}}{\text{시료채취량}(g) \times 1,000} \times \frac{1}{1,000}$$

수식 2

$$\text{DPPH free radical scavenger activity (\%)} = 1 - \frac{\text{Sample O.D.}}{\text{Control O.D.}} \times 100$$

수식 3

(2) 세포주 및 기타 시약

본 시험에 사용된 Raw 264.7 (TIB-71) 세포는 American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 세포실험에 사용된 시약으로는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL., Carlsbad, CA, USA), Dulbecco's phosphate-buffered saline (Lonza, Walkersville, MD, USA), heat inactivated fetal bovine serum (Gibco BRL.), penicillin-streptomycin (Gibco BRL.), thiazolyl blue tetrazolium bromide (Sigma Aldrich Co., Ltd.)를 사용하였다.

2) 시험절차

(1) 세포 배양

Murine의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 ATCC에서 구입하여 사용하였으며, DMEM에 10% inactivated fetal bovine serum과 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 배지를 배양액으로 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 실험하는 동안 사용한 모든 세포는 70~80% 정도의 밀도로 자랐을 때 계대 배양하였으며, 20 passages를 넘기지 않은 세포만 사용하였다.

(2) 세포 독성 측정

시료의 세포 독성을 평가하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 실시하였다. RAW 264.7 cell을 96 well plate에 1×10⁵ cells/mL 농도로 분주하여 24시간 동안 배양(37°C, 5% CO₂)한 후, 시험물질인 한약재배합물을 농도별(0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 mg/mL)로 무혈청 배지로 교체하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다.

배양 후 0.5 mg/mL MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide; Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액을 첨가하고 3시간 배양하였다. 배양이 끝나면 배지를 제거해주고 dimethyl sulfoxide 용액을 200 µL/well 넣고 plate shaker에서 10~20분 추출하였다. 추출이 끝나고 570 nm 파장에서 ELISA 측정하였으며, 세포 생존율은 다음의 식에 따라 산출하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{Sample O.D. at 570 nm}}{\text{Control O.D. at 570 nm}} \times 100$$

(3) 염증성 cytokine 발현 측정

Lipopolysaccharides (LPS)에 의해 염증이 유도된 RAW 264.7 cell로부터 생성된 염증 관련 사이토카인의 분비량

측정은 다음과 같이 실시하였다. DMEM 배지를 이용하여 2×10⁵ cells/mL로 24 well plate에 접종하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 후 LPS와 시험물질인 한약재배합물 0.625, 1.25, 2.5, 5 mg/mL 농도별로 포함된 무혈청 배지로 교체하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 세포배양액 내의 tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), interleukin-6 (IL-6)의 사이토카인의 분비량을 mouse ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다.

3) 통계처리

본 시험에서는 염증성 cytokine 발현 측정 결과에 대해서 SPSS 통계 프로그램(Ver. 19.0)을 이용하여 통계분석을 수행하였다. 먼저 분산의 동질성을 평가하기 위해 Levene's test를 수행한 후 one way ANOVA test를 실시하여 각 시험군간 유의성을 확인하였다. One way ANOVA test 수행한 결과, 시험군간 유의성이 확인되지 않으면 추가적인 통계처리를 수행하지 않았다. 시험군 간의 유의성이 확인될 경우 분산의 동질성 유무에 따라 사후검정(분산이 동질한 경우 Scheffe 다중검정, 분산이 이질한 경우, Dunnett's T3)을 실시하였다.

5. Rat에 대한 한약재배합물의 단회 경구투여 독성 시험

1) 실험 재료

(1) 실험동물

실험은 Sprague Dawley (SD) rat를 이용하였으며, 투여 시 성별 및 동물 수는 수컷 20마리, 암컷 20마리 6주령 rat로 체중 범위는 수컷 168.6~190.8 g, 암컷 121.9~134.9 g 이었다. 본 시험은 동물보호법 [법률 제16977호(2020-02-11, 일부개정)] 및 실험동물에 관한 법률 [법률 제15944호(2018-12-11, 일부개정)]에 근거한 (재)한국화학융합시험연구원 화순의 동물윤리위원회의 승인을 받았다(IAC-2020-0871).

(2) 실험 약물

본 실험에 사용된 시험물질은 한약재배합물이며, 본 시험물질을 칭량한 후 부형제로는 멸균증류수(주사용수)를 사용하였다.

(3) 사육 환경

각 Stainless steel cage (310W×500D×200H) 당 3마리 이하를 사육하였으며, 평균 온도 21.3~22.3°C, 상대습도 45.5~54.8%, 환기횟수 10~20회/h, 조명주기 12시간 간격으로 광암 조건을 주었으며(광 08:00~20:00/암 20:00~08:00), 조도 150~300 Lux를 유지하였고, 사료는 방사선 멸균된 Rodent Diet 20 5053 (Labdiet, St. Louis, MO, USA)를, 음수는 R/O수를 자유롭게 섭취시켰다.

2) 용량결정 및 투여 방법

(1) 약물 조제

한약재배합물을 순도 환산하지 않고 그대로 이용하여 본 시험물질을 칭량한 후 부형제인 멸균중류수에 50, 100 및 200 mg/mL 농도로 조제하여 사용하였다.

(2) 용량 설정 및 군 구성

본 시험의 시험물질 투여량은 식품의약품안전처 고시 중 “의약품등의 독성시험기준”²⁰⁾에 근거하여 고용량 투여군을 2,000 mg/kg BW로 설정하고, 공비를 2로 하여 중용량은 1,000 mg/kg BW, 저용량은 500 mg/kg BW으로 각각 설정하였다. 대조군으로는 시험물질 투여군과 동일한 액량의 부형제를 투여하는 부형제 대조군을 두었다(Table III).

3) 관찰 항목

(1) 일반 증상

모든 동물은 1일 1회 관찰하였으며 투여 후 14일간 관찰하였다. 단 투여 당일에는 투여 후 0.5, 1, 2, 3 및 4시간에 관찰하였다.

(2) 체중 변화

체중은 도입 시, 군 분리 시, 시험물질 투여 개시 직전, 투여 개시 후 7일 및 14일째에 측정하였다.

(3) 부검조건

투여 후 14일째 모든 생존동물의 외관 검사를 실시한 후 isoflurane (아이프란액; 하나제약, 서울, 한국) 마취 하에 방혈치사하여 육안으로 장기를 검사하였다. 이상 장기는 발생하지 않아 조직병리학적 검사는 실시하지 않았다.

(4) 통계처리

본 시험에서는 체중 데이터에 대해 SPSS 통계 프로그램 (ver 19.0)을 이용하여 통계처리를 하였다. 먼저 Levene’s test를 통해 동질성 검정을 수행하였고, 이후 one way ANOVA 검사를 수행하였다.

4) GLP Statement

본 시험(시험번호 TGK -2020-0063)의 모든 절차는 GLP 규정에 따라 식품의약품안전처 고시 제2018-93호(2018-1-21) “비임상시험관리기준”과 OECD “Principles of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM (98) 17 (as revised in 197)”을 준수하여 진행하였으며, 시험방법은 식품의약품안전처 고시 제2017-71호(2017-08-30) “의약품등의 독성시험기준”, [별표1] 단회투여독성시험을 기준으로 시행하였다²⁰⁾.

Table III. Group Separation of Single Dose Oral Toxicity

Group	Sex	Number	Number of animals	Administration volume (mg/kg BW)	Administration liquid measure (mL/kg BW)	Administration route
G1	Male	1101-1105	5	0	10	Oral
	Female	2101-2105	5			
G2	Male	1201-1205	5	500		
	Female	2201-2205	5			
G3	Male	1301-1305	5	1,000		
	Female	2301-2305	5			
G4	Male	1401-1405	5	2,000		
	Female	2401-2405	5			

G1: control group, G2~G4: administered herbal medicine mix group. Four different dosages of herbal medicine mix were orally administered in this study respectively (G1: 0 mg/kg, G2: 500 mg/kg, G3: 1,000 mg/kg, G4: 2,000 mg/kg), BW: body weight.

결과»»»»

1. 한약재배합물 함유 β-glucan과 ginsenoside 분석

1) β-glucan 성분 분석

한약재배합물의 β-glucan 성분을 분석한 결과 362.3 mg/g의 함유량이 관찰되었다(Table IV, Fig. 2).

2) Ginsenoside Rb1, Rg1, Rg3 성분 분석

한약재배합물의 ginsenoside Rg1, Rb1, Rg3 성분을 분석한 결과, Rg3는 0.4184 mg/g 함유량이 관찰되었고, Rg1, Rb1은 검출되지 않았다(Table V, Fig. 3).

2. 한약재배합물의 DPPH free radical 소거활성 측정

1) 한약재배합물의 DPPH free radical 소거활성률(%)

시험물질 한약재배합물(G1)을 농도별(0.05%, 0.5%, 1% 및 5%)로 처리하여 DPPH free radical 소거활성도를 측정한 결과 39.51%, 88.28%, 81.51% 및 90.61%의 활성을 보였으며, IC50 (50% 활성을 나타내는 농도)을 산출한 결과, 0.146%의 농도로 산출되었다(Table VI, Fig. 4).

2) L-ascorbic acid의 DPPH free radical 소거활성률(%)

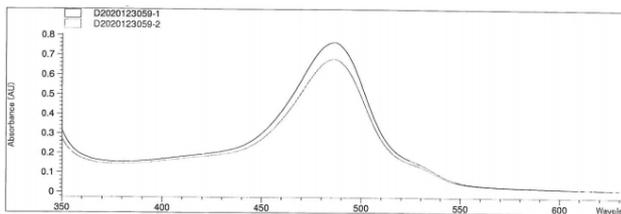
양성대조 L-ascorbic acid (G2)을 농도별(0.05%, 0.5%, 1% 및 5%)로 처리하여 DPPH free radical 소거활성도를 측정한 결과 20.02%, 44.25%, 68.20% 및 88.88%의 활성을 보였으며, IC50 (50% 활성을 나타내는 농도)을 산출한 결과 0.0011%의 농도로 산출되었다(Table VI, Fig. 4).

Table IV. Analysis of β-glucan Content Contained Herbal Medicine Mix

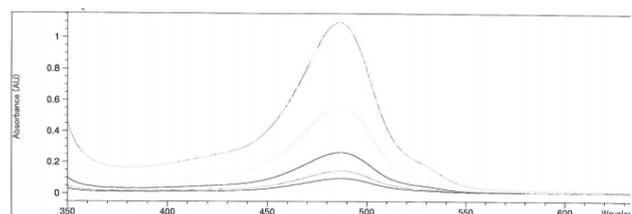
β-glucan	Concentration (ug/mL)	Volume (mL)	Sampling (g)	Dilution	Result (mg/g)
1	97.0510	50	0.1178	10	363.10
2	84.8330	50	0.1056	10	361.50
Average					362.30

Table V. Ginsenoside Rg1, Rb1 & Rg3 Contained Herbal Medicine Mix

Ginsenoside	Concentration (ug/mL)	Volume (mL)	Sampling (g)	Dilution	Result (mg/g)
Rg1	0.0000	50	3.3743	1	0.0000
Rb1	0.0000	50	3.3743	1	0.0000
Rg3	28.2331	50	3.3743	1	0.4184
Rb1, Rg1, Rg3 total					0.4184

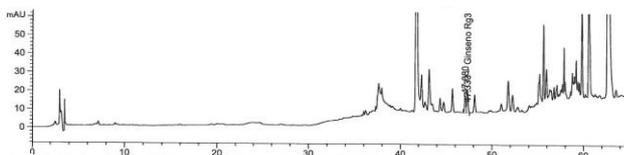


[β-glucan containing herbal medicine mix]

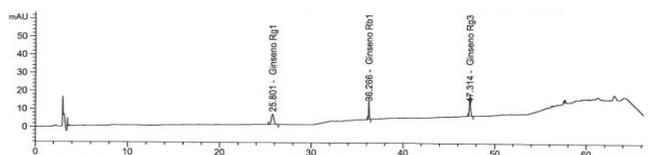


[β-glucan standard]

Fig. 2. High-performance liquid chromatography analysis of beta-glucan level contained herbal medicine mix.



[Ginsenoside Rg1, Rb1 & Rg3 containing herbal medicine mix]



[Ginsenoside Rg1, Rb1 & Rg3 standard]

Fig. 3. High-performance liquid chromatography analysis of ginsenoside Rg1, Rb1 and Rg3 contained herbal medicine mix.

Table VI. DPPH Free Radical Scavenging Activity of Herbal Medicine Mix

Group	N	Concentration	DPPH free radical scavenger activity (%)	
			OD715 Mean±SD	Mean±SD
G1 (TS)	3	0	0.755±0.006	-
	3	0.05	0.457±0.003	39.51±0.90*
	3	0.5	0.088±0.010	88.28±1.44*
	3	1	0.140±0.008	81.51±1.02*
	3	5	0.071±0.033	90.61±4.27*
G2 (PC)	3	0	0.715±0.027	-
	3	0.0005	0.572±0.028	20.02±1.24*
	3	0.001	0.398±0.007	44.25±3.12*
	3	0.0015	0.227±0.010	68.20±0.64*
	3	0.002	0.080±0.008	88.88±0.67*

N: number of well, SD: standard deviation, TS: test substance, PC: positive control, -: not applicable.

*Significantly difference from Control at p<0.05.

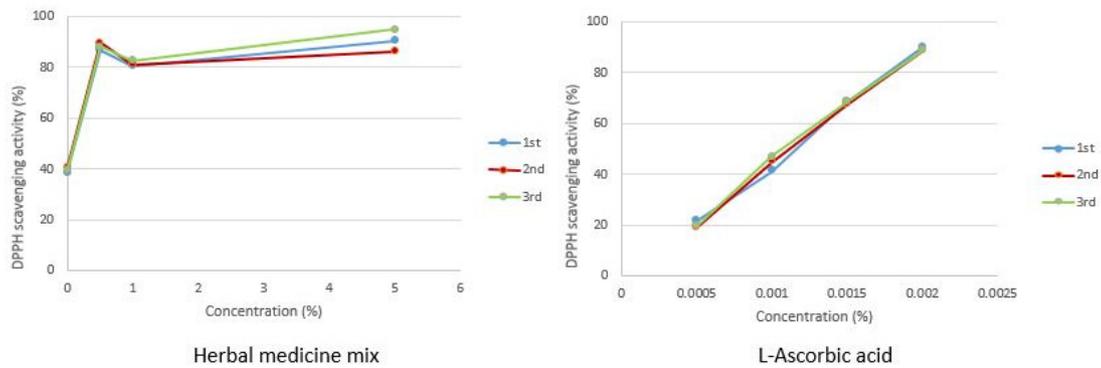


Fig. 4. Analysis of DPPH free radical scavenger activity in herbal medicine mix and L-ascorbic acid. DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

3. 한약재배합물의 항염 활성 측정

1) 세포 MTT assay 평가

한약재배합물을 0.25~5 mg/mL의 농도로 RAW 264.7 cell에 처리하여 MTT 방법으로 세포독성을 확인하였다. MTT 측정 결과 대조군과 0.25~1 mg/mL 농도까지는 세포독성이 없음을 확인하였고, 2.5 mg/mL의 농도에서 5.34%의 세포생존을 감소를 나타내었고, 5 mg/mL의 농도에서 16.78%의 세포생존을 감소를 나타내었다(Table VII, Fig. 5).

2) Pro-inflammatory cytokines 분비 억제 효과

TNF- α 발현에서 염증유발 물질 LPS 200 ng/mL의 농도로 처리한 결과, G2 group은 626.40±19.12 pg/mL로 발현

되어 G1 group에 비하여 유의한 증가를 나타내었다. 한약재배합물을 0.625 mg/mL, 1.25 mg/mL, 2.5 mg/mL, 5 mg/mL의 농도로 처리한 결과, 각각의 농도에서 608.21±13.9 pg/mL, 591.59±13.32 pg/mL, 581.10±13.72 pg/mL, 508.36±19.94 pg/mL로 발현되었으며, G2 group에 비하여 1.25 mg/mL (G4 group), 2.5 mg/mL (G5 group), 5 mg/mL (G6 group)의 농도로 처리한 군에서 유의한 감소를 나타내었다(Table VIII, Fig. 6).

3) IL-6 측정

IL-6 발현에서 염증유발 물질 LPS 200 ng/mL의 농도로 처리한 결과, G2 group은 458.44±15.64 pg/mL로 발현되어 G1 group에 비하여 유의한 증가를 나타내었다. 한약재배합물을 0.625, 1.25, 2.5 mg/mL 및 5 mg/mL의 농도로 처리

Table VII. Cell Viability of Herbal Medicine Mix Extract in RAW 264.7 Cells

Group	Substance	Dose(mg/mL)		OD value (507 nm)	% of Control (%)
G1	Control	-	Mean	2.663	100.00
			SD	0.092	3.46
			N	9	9
G1	Herbal medicine mix	0.25	Mean	2.705	101.58
			SD	0.068	2.57
			N	9	9
G2		0.5	Mean	2.683	100.75
			SD	0.091	3.40
			N	9	9
G3		1	Mean	2.642	99.19
			SD	0.111	4.15
			N	9	9
G4		2.5	Mean	2.521	94.66
			SD	0.096	3.59
			N	9	9
G5		5	Mean	2.216	83.22
			SD	0.036	1.34
			N	9	9

G1: negative control group, G2: induced control group, G3~G5: test substance treatment group, SD: standard deviation, N: number of well.

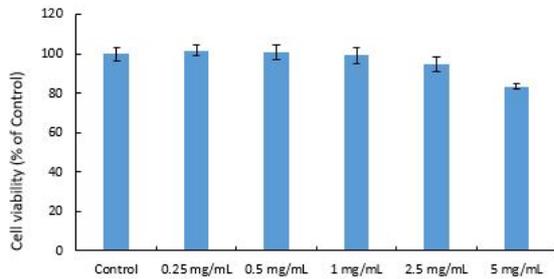


Fig. 5. Cell viability of herbal medicine mix extract in RAW 264.7 cells.

Table VIII. TNF-α Expression

Group	Substance	Dose (ng/mL)	TNF-α (pg/mL)
			Mean±SD
G1	Control		49.14±1.86
G2	LPS	200	626.40±19.12*
G3	Herbal medicine mix	0.625	608.21±13.91
G4		1.25	591.59±13.32 [†]
G5		2.5	581.10±13.72 [†]
G6		5	508.36±19.94 [†]

G1: negative control group, G2: induced control group, G3~ G6: test substance treatment group, TNF-α: tumor necrosis factor-alpha, SD: standard deviation, LPS: lipopolysaccharide.

*Significant differences as compared with G1 (p<0.05),

[†]Significant differences as compared with G2 (p<0.05).

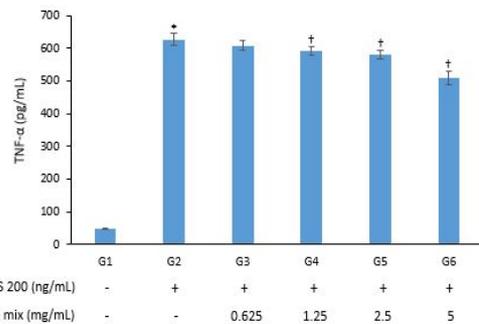


Fig. 6. TNF-α expression of herbal medicine mix extract in RAW 264.7 cells. G1: negative control group, G2: induced control group, G3~G6: test substance treatment group, TNF-α: tumor necrosis factor-alpha, LPS: lipopolysaccharide. *Significant differences as compared with G1 (p<0.05), [†]Significant differences as compared with G2 (p<0.05).

한결과, 각각의 농도에서 375.71±6.03 pg/mL, 310.39±3.35 pg/mL, 168.53±4.30 pg/mL 및 14.20±1.67 pg/mL로 IL-6로 발현되어 G2 group에 비하여 0.625 mg/mL (G3 group), 1.25 mg/mL (G4 group), 2.5 mg/mL (G5 group), 5 mg/mL (G6 group)의 농도로 처리한 군 모두에서 유의한 감소를 나타내었다 (Table IX, Fig. 7).

Table IX. IL-6 Expression Herbal Medicine Mix Extract in RAW 264.7 Cells

Group	Substance	Dose (ng/mL)	IL-6 (pg/mL)
			Mean±SD
G1	Control		11.50±1.28
G2	LPS	200	458.44±15.64*
G3		0.625	375.71±6.03 [†]
G4	Herbal medicine mix	1.25	310.39±3.35 [†]
G5		2.5	168.53*±4.30 [†]
G6		5	14.20±1.67

G1: negative control group, G2: induced control group, G3~G6: test substance treatment group, IL-6: interleukin-6, SD: standard deviation, LPS: lipopolysaccharide.

*Significant differences as compared with G1 (p<0.05),

[†]Significant differences as compared with G2 (p<0.05).

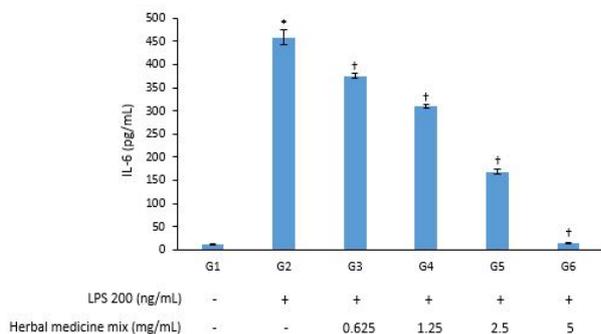


Fig. 7. IL-6 expression of herbal medicine mix. extract in RAW 264.7 cells. G1: negative control group, G2: induced control group, G3~G6: test substance treatment group, IL-6: interleukin-6, LPS: lipopolysaccharide. *Significant differences as compared with G1 (p<0.05), [†]Significant differences as compared with G2 (p<0.05).

4. Rat에 대한 한약재배합물의 급성단회독성 안전성 시험

1) 사망률 및 일반증상

실험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았다. 일반증상 관찰 결과, 모든 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다(Tables X, XI).

2) 체중 변화

체중측정 결과, 모든 투여군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었다(Table XII).

Table X. Mortality after Administration of Herbal Medicine Mix

Group	Dose (mg/kg BW)	Mortality	
		Male	Female
G1	0	0% (0/5)*	0% (0/5)
G2	500	0% (0/5)	0% (0/5)
G3	1,000	0% (0/5)	0% (0/5)
G4	2,000	0% (0/5)	0% (0/5)

G1: control group, G2~G4: administered herbal medicine mix group. Four different dosages of herbal medicine mix were orally administered in this study respectively (G1: 0 mg/kg, G2: 500 mg/kg, G3: 1,000 mg/kg, G4: 2,000 mg/kg), BW: body weight.

*Number of dead animals/number of tested animals.

Table XI. Clinical Signs after Administration of Herbal Medicine Mix

Group	Dose (mg/kg BW)	Sex	Number of animals	Clinical signs
G1	0	Male	5	Normal
		Female	5	Normal
G2	500	Male	5	Normal
		Female	5	Normal
G3	1,000	Male	5	Normal
		Female	5	Normal
G4	2,000	Male	5	Normal
		Female	5	Normal

G1: control group, G2~G4: administered herbal medicine mix group. Four different dosages of herbal medicine mix were orally administered in this study respectively (G1: 0 mg/kg, G2: 500 mg/kg, G3: 1,000 mg/kg, G4: 2,000 mg/kg), BW: body weight.

3) 부검소견

주요 장기에 대한 육안적 검사 결과, 모든 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다(Table XIII).

Table XII. Body Weight after Administration of Herbal Medicine Mix

Group	Dose (mg/kg BW)	Sex		Day(s) after administration		
				0	7	14
G1	0	Male	Mean	196.2	291.9	345.9
			SD	6.0	9.1	9.1
		Female	Mean	157.0	210.6	230.0
			SD	6.7	13.6	10.5
G2	500	Male	Mean	192.6	288.6	341.2
			SD	3.9	13.4	18.6
		Female	Mean	156.1	203.7	225.9
			SD	5.2	14.3	15.8
G3	1,000	Male	Mean	199.2	295.7	354.9
			SD	7.4	10.7	16.1
		Female	Mean	155.9	202.7	230.2
			SD	7.5	12.3	13.0
G4	2,000	Male	Mean	195.3	292.7	345.3
			SD	5.7	10.1	15.1
		Female	Mean	155.7	206.2	228.7
			SD	4.5	14.9	22.6

G1: control group, G2~G4: administered herbal medicine mix group. Four different dosages of herbal medicine mix were orally administered in this study respectively (G1: 0 mg/kg, G2: 500 mg/kg, G3: 1,000 mg/kg, G4: 2,000 mg/kg). BW: body weight, N: number of animals, SD: standard deviation.

Table XIII. Necropsy Findings after Administration of Herbal Medicine Mix

Group	Dose (mg/kg BW)	Sex	Necropsy findings	
			External findings	Internal findings
G1	0	Male	No gross findings (5)*	No gross findings (5)
		Female	No gross findings (5)	No gross findings (5)
G2	500	Male	No gross findings (5)	No gross findings (5)
		Female	No gross findings (5)	No gross findings (5)
G3	1,000	Male	No gross findings (5)	No gross findings (5)
		Female	No gross findings (5)	No gross findings (5)
G4	2,000	Male	No gross findings (5)	No gross findings (5)
		Female	No gross findings (5)	No gross findings (5)

G1: control group, G2~G4: administered herbal medicine mix group. Four different dosages of herbal medicine mix were orally administered in this study respectively (G1: 0 mg/kg, G2: 500 mg/kg, G3: 1,000 mg/kg, G4: 2,000 mg/kg). BW: body weight. *number of animals.

고찰»»»»

질병과 노화에 관련된 유해물질 중 하나인 활성산소는 대사과정이나 생체 방어를 위해 생성되는 전자쌍을 이루

지 못한 자유라디칼(free radical)을 가진 불안정한 산소화합물로서 반응성이 큰 특징이 있다²¹⁾. 활성산소는 superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase 등과 같은 인체 내 항산화 효소에 의해 제거됨으로써 산화-항산화 시스템의 균형이 유지되고 있다. 그러나 이러한 산화

항산화 시스템의 균형이 깨지면 구조적으로 불안정한 활성산소는 체 내의 불포화지방산, 지질, 콜레스테롤 등을 산화시켜 인체 내 세포를 파괴하는 과산화지질을 생성하고 혈관벽에 부착되어 혈류의 흐름을 방해하거나 혈관을 손상시켜 뇌졸중, 알츠하이머, 심장질환, 동맥경화, 당뇨, 암 등의 다양한 질병을 유발할 수 있을 뿐만 아니라 노화를 초래하게 된다²²⁻²⁵).

염증은 활성화된 대식세포에서 분비되는 염증매개체와 사이토카인에 의해서 조절된다. 체 내에 염증반응이 발생하면 LPS, reactive nitrogen species (RNS), cytokine 등에 의하여 염증반응이 활성화되어 nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE2) 등의 염증인자와 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등의 염증성 사이토카인을 생성한다. NO는 RNS의 일종으로 inducible nitric oxide synthase 단백질에 의해 조절되고, O₂-와 반응하여 peroxynitrite를 생성한다. Peroxynitrite는 지질과 단백질의 과산화를 유도시켜 세포독성을 일으킨다²⁶⁻²⁸). 대식세포는 체내 모든 조직에 존재하는 것으로 면역기능과 항상성을 유지시켜 신체를 보호하며, 염증 매개 물질을 분비하여 바이러스, 세균 등의 유해물질을 외부로 배출한다^{29,30}). 염증반응이 지속해서 발생하면 대식세포가 과도하게 반응하여 염증 매개 물질인 NO의 생성이 많아져 세포독성, 염증 반응의 항진, 혈관 확장, 상처 치유 억제, 신경조직, 종양, 자가면역질환, 당뇨, 동맥경화, 암, 관절염, 염증성 장 질환 등을 일으킨다^{29,31,32}).

근육·뼈대계 통증은 주요한 임상 문제인데, 이 중에서 염증성 관절질환은 젊은 나이에서 관절 통증을 일으키는 주요한 원인이며, 골관절염은 노인에게서 우세하게 발생하는 관절 통증의 원인이다³³). 지속된 염증은 골다공증, 골관절염, 근육감소증과 같은 나이와 관련된 병리를 포함하는 많은 근골격계 질환의 발생기전에 관련되어 있다³⁴).

RAW 264.7과 같은 대식세포 또는 단핵구는 그람 음성균의 세포외막에 존재하는 내독소인 LPS의 자극에 의해 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6와 같은 pro-inflammatory cytokine과 NO, PGE2를 비롯한 여러 염증매개 인자의 분비를 촉진한다³⁵). 따라서 사이토카인의 억제는 항염증 효능의 지표라 할 수 있다. 현재 염증반응의 억제제로 사용하고 있는 다양한 스테로이드 및 비스테로이드성 항염증제는 장기간 복용 시 여러 부작용을 야기할 수 있는 가능성을 가지고 있어 최근 천연물 유래의 대체제를 찾으

려는 노력이 증가하고 있는 실정이다³⁶).

본 연구에서는 익수영진고기꽃송이버섯·노루궁뎅이버섯 제제에 황금과 어성초를 추가한 한약재배합물에 대하여 염증 예방 및 개선에 도움이 되는 유효성에 대한 기초 연구로서 지표성분의 함량을 분석하고, 항산화 효과 및 항염 활성을 관찰하고, 급성단회독성 안전성 평가를 시행 및 분석하였다.

지표성분분석은 GLP 인증기관에서 β -glucan과 ginsenoside의 함량을 측정하였다. β -glucan 측정은 건강기능식품공전의 건강기능식품 시험법의 개별성분별 시험법 가운데 β -glucan 측정법에 근거하여 시험을 시행하였으며, 측정된 결과 β -glucan은 362.3 mg/g의 함량을 나타내었는데, 이는 Lim 등³⁷)의 연구에서 유산균 및 홍국균 발효 꽃송이버섯의 β -glucan의 함량을 219~244 mg/g으로 보고한 것보다 높은 수준으로 나타났고, 이전의 보고에서 β -glucan 함량이 351.75 mg/g이었는데¹⁵), 이번 배합제에서는 좀더 향상된 함량을 나타내었다. Ginsenoside 측정은 건강기능식품공전의 건강기능식품 시험법의 ginsenoside-시험과정-시험용액의 조제-농축액 측정법에 근거하여 시험을 시행하였으며, 측정된 결과 ginsenoside Rg3는 0.4184 mg/g을 나타내었으며, 이전의 보고에서도 ginsenoside Rb1 함량이 0.0327 mg/g 정도로 적은 양이 검출되었고, ginsenoside Rg1 함량은 미검출되어 본 연구와 동일한 결과를 나타내었다⁵). 이는 시료의 성질, 측정 방법 등에 대한 사항에 의한 것으로 추정되는데 추후 재검증이 필요한 것으로 생각한다.

체 내에서 합성되는 superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase 등의 항산화 효소와 vitamin C, E 및 vitamin B complex, β -carotene, rutin, quercetin, catechin 등의 화합물과 Se, Mn, Cu, Zn, Mg 등의 항산화제들은 활성산소에 전자를 주어 환원시키고 자신은 radical 형태에서도 안전한 구조를 유지할 수 있어야 하며, 활성산소에 전자를 줄 수 있는 능력이 클수록 항산화능이 크다고 할 수 있고, 항산화능이 클수록 활성산소의 제거 능력이 크다고 할 수 있다. 생물체 내에서 생성되는 활성산소는 호흡 과정에서 들어오는 산소 중 일부가 활성산소로 변해 free radical 상태로 체 내에 존재하여 생체 조직 및 세포를 손상시키는 산화력이 강한 독성물질로 작용하게 되며 이러한 free radical을 제거하게 되는 작용을 항산화 작용이라 한다³⁸). 본 시험에서는 한약재배합물에 대한 항산화

효과를 평가하기 위해 DPPH를 이용하여 free radical 소거활성 측정시험을 GLP 인증기관에서 실시하였다.

이에 항산화 효과 관찰을 위하여 양성대조물질 L-ascorbic acid 0.0005%, 0.001%, 0.0015% 및 0.002% 농도에서 DPPH free radical 소거활성률을 관찰한 결과, 20.02%, 44.25%, 68.20% 및 88.88%로 나타났고, IC50은 0.0011%의 농도로 산출되었다. 본 연구의 한약재배합물에 대한 0.05%, 0.5%, 1% 및 5% 농도에서 항산화 효과를 관찰하기 위해 DPPH free radical 소거활성률을 관찰한 결과, 39.51%, 88.28%, 81.51% 및 90.61%의 활성을 보였고, IC50은 0.146%의 농도로 산출되었다.

이의 결과에서 알 수 있듯이 본 연구의 한약재배합물은 0.5% 농도에서 88.28%의 활성을 보여 DPPH free radical 소거 활성이 높은 수준으로 발현됨을 관찰할 수 있었으며, IC50은 0.146% 수준이었고, 5% 농도에서 90.61%의 소거능을 나타낸 것으로 보아 항산화 활성이 우수한 것으로 생각된다. 이는 이전의 보고¹⁵⁾와 비슷한 결과로서 본 연구에서 황금과 어성초를 배합한 한약재배합물도 항산화력이 우수함을 제시하는 결과로 생각한다.

TNF- α , IL-6와 같은 전염증성 사이토카인의 증가는 초기 염증반응의 발달에 중요한 역할을 한다. LPS에 의해 자극된 단핵구와 대식세포에서 생성된 TNF- α 는 자기면역 질환, 류마티스 관절염, 염증성 장 질환 등 주요 염증 질환과 관련되어 있기 때문에 염증반응에 있어 중요한 역할을 한다. 또한 TNF- α 는 다른 사이토카인의 생성을 유도함으로써 염증반응을 지속시키게 된다. IL-6도 LPS에 의해 염증반응이 과다하게 분비하게 되면 발열 증상을 나타내게 된다. 따라서 항염증 치료에 있어 pro-inflammatory cytokines 분비량을 감소시키는 것이 중요하다³⁹⁾.

본 연구에서 한약재배합물에 대한 세포 독성 및 항염 활성을 확인하기 위해 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 이용한 MTT assay 및 TNF- α 및 IL-6의 cytokine 발현을 관찰하였다. 세포 독성 시험에서 한약재배합물을 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2.5 mg/mL, 5 mg/mL의 농도로 처리한 결과, 각각의 농도에서 101.58 \pm 2.57%, 100.75 \pm 3.40%, 99.19 \pm 4.15%, 94.66 \pm 3.59%, 83.22 \pm 1.34%로 세포 생존율이 관찰되었다. 이에 TNF- α , IL-6 발현에 대한 한약재배합물의 항염시험의 최대 농도를 5 mg/mL로 정하였고, 공비로 2.5 mg/mL, 1.25 mg/mL, 0.625 mg/mL의 농도를 설정하여 시험에 적용하여 발현을 관찰하였다. LPS를 200 ng/mL

로 처리하였을 시에 비하여, TNF- α 의 경우 1.25 mg/mL, 2.5 mg/mL, 5 mg/mL에서 유의한 감소를 나타내었으며, IL-6의 경우 0.625 mg/mL, 1.25 mg/mL, 2.5 mg/mL, 5 mg/mL에서 모두 유의한 감소를 나타내었다. 발현 정도에서 TNF- α 의 경우 2.5 mg/mL에서 약 7.2%의 감소를, 5 mg/mL에서 약 18.9%의 감소를 나타내었고, IL-6의 경우 2.5 mg/mL에서 약 63.4%의 감소를, 5 mg/mL에서 약 97.0%의 감소를 나타내어 TNF- α 보다 IL-6 발현에 보다 효과적으로 작용하는 것으로 나타났다.

IL-6는 면역 매개 염증성 질환에서 핵심적 역할을 담당하는 전염증성 사이토카인으로 IL-6가 과도하게 생성되는 것은 염증성 면역 매개 질환과 관련이 있는 것으로 IL-6와 전환성장인자 베타(TGF- β)는 naïve T세포를 Th17세포로 분화하기 위해 필요하며, Th17세포는 염증을 발생시키게 된다. IL-6는 TNF- α 및 IL-1과 함께 급성 염증 반응 및 급성 염증에서 후천성 면역 또는 만성 염증성 질환으로의 전환을 유도한다. 조절 능력이 떨어지면 비만, 염증성 장 질환, 관절염의 만성 염증이 발생할 수도 있다⁴⁰⁾. 이러한 결과로 보아 본 연구에서 IL-6의 경우 한약재배합물 2.5 mg/kg 투여 시 63.4%로, 높은 수준으로 발현을 감소시키는 것으로 보아 염증 신호 전달에 있어 한약재배합물이 이를 억제할 수 있어 염증 발생을 차단하는데 효과적으로 역할을 발휘할 수 있을 것으로 생각한다.

한약재배합물에 대한 단회경구투여독성시험을 실시하기 위해 “의약품 등의 독성시험기준”²⁰⁾에 따라, SD계 rat를 사용하여 2,000 mg/kg body weight (BW)을 고용량으로 설정하였고, 공비 2로 두어 1,000 및 500 mg/kg BW으로 중용량 및 저용량을 설정하여 암·수 각각에 단회경구투여하였다. 한약재배합물 투여 후 14일간 사망률, 일반증상, 체중변화를 관찰하였으며, 생존동물은 부검하여 육안적으로 장기의 이상 유무를 검사하였다. 실험기간 중 한약재배합물 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았고, 일반증상 관찰 결과, 모든 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다. 체중측정 결과, 한약재배합물 투여군 모두에서 부형제 투여 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의적인 차이는 관찰되지 않았으며 부검소견 결과, 모든 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다. 이의 결과로부터 rat에 한약재배합물 단회경구투여 시 관련된 독성학적 소견이 인정되지 않았으므로 개략의 치사량은 암·수 모두 2,000 mg/kg BW 이상으로 볼 수 있고, 안전성을 확인할

수 있었다. 이의 결과는 이전의 결과와 동일한 결과로서 본 연구에서 황금과 어성초를 배합한 한약재배합물도 안전함을 확인시켜준 결과로 생각한다.

이상의 결과로 볼 때 한약재배합물은 높은 수준의 β -glucan 함량을 가지고 있다는 것과 DPPH free radical scavenging activity가 0.5% 농도에서 88% 수준으로 효과적인 항산화 활성을 보이는 것, TNF- α 및 IL-6 염증성 cytokine 발현 억제에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 아울러 급성단회독성 안전성시험에서도 위대한 인자가 발현되지 않았으며, 이는 한약재배합물은 면역력 향상과 염증 예방 및 개선에 도움이 될 수 있는 안전한 제제임을 확인할 수 있었으며, 이에 다양한 분야의 활성 소재로 활용할 수 있을 것으로 생각한다.

결론»»»»

본 연구에서는 면역활성 증강 효과가 있는 한약재배합물에 대하여 GLP 인증을 받은 기관에서 제제 내 포함되어 있는 β -glucan과 ginsenoside의 지표를 분석하였고, 제제의 DPPH 항산화 효과와 Raw 264.7 세포를 이용하여 항염 유효성 평가를 시행하였다. 아울러 급성독성시험을 통한 안전성을 평가한바 다음과 같은 결론을 얻었다.

한약재배합물의 지표 성분 분석에 있어서 β -glucan은 362.3 mg/g 수준의 함량을 나타내었고, ginsenoside Rg3는 0.4184 mg/g을 나타내었다. DPPH free radical 소거활성에 있어서 익수영진고한약재배합물의 IC50은 0.146% 이었고, 한약재배합물 0.05%, 0.5%, 1% 및 5% 농도에서 소거능 활성은 39.51%, 88.28%, 81.51% 및 90.61%를 나타내었다.

한약재배합물의 항염증성 효과를 알아보기 위해 전염증성 사이토카인을 ELISA kit를 이용하여 분석한 결과 염증성 cytokine인 TNF- α 의 경우 대조군에 비하여 1.25 mg/mL, 2.5 mg/mL 및 5 mg/mL 시험물질 처리군에서 유의한 감소를 나타내었으며, IL-6의 경우 대조군에 비하여 0.625 mg/mL, 1.25 mg/mL, 2.5 mg/mL, 5 mg/mL 시험물질 처리군에서 유의한 감소를 나타내었다.

본 실험에서 사용된 한약재배합물은 높은 수준의 β -glucan 함량과 양호한 수준의 항산화 효과를 가지고 있

고, 대식세포에서 LPS로 유도된 염증반응에 대한 억제 효능이 세포수준에서 확인된바 한약재배합물이 염증 예방 및 개선에 도움이 되는 소재로써 활용 가능성을 관찰할 수 있었다.

References»»»»

1. Aiyegoro OA, Okoh AI. Preliminary phytochemical screening and in vitro antioxidant activities of the aqueous extract of *Helichrysum longifolium* DC. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2010;10(1):1-8.
2. Kim JH, Jeong CH, Choi GN, Kwak JH, Choi SG, Heo HJ. Antioxidant and neuronal cell protective effects of methanol extract from *Schizandra chinensis* using an in vitro system. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 2009;41(6):712-6.
3. Sim MO, Lee HJ, Jang JH, Lee HE, Jung HK, Kim TM, No JH, Jung J, Jung DE, Cho HW. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Spiraea prunifolia* Sieb. et Zucc. var. *simpliciflora* Nakai in RAW 264.7 cells. *Korean Journal of Plant Resources*. 2017;30(4):335-42.
4. Doh ES, Chang JP, Kil KJ, Choi MS, Yang JK, Yun CW, Jeong SM, Jung YH, Lee GH. Antioxidative activity and cytotoxicity of fermented *Allium victorialis* L. extract. *Korean Journal of Plant Resources*. 2011;24(1):30-9.
5. Je JY. Chitosan-phytochemical conjugates: preparation, antioxidant, and NO inhibition in LPS-stimulated macrophages. *J. Chitin Chitosan*. 2015;20(4):245-50.
6. Soory M. Relevance of nutritional antioxidants in metabolic syndrome, ageing and cancer: potential for therapeutic targeting. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*. 2009;9(4):400-14.
7. Kim JH. Identification and characterization of fibrinolytic compound from *Cornus officinalis* S. et Z. *Korean Journal of Plant Resources*. 2020;33(4):237-44.
8. Sakagami H, Kobayashi M, Chien CH, Kanegae H, Kawase M. Selective toxicity and type of cell death induced by various natural and synthetic compounds in oral squamous cell carcinoma. *In Vivo*. 2007;21(2):311-20.
9. Heo J. *Dongeuibogam*. Seoul:Namsandang. 1989:78.
10. Kim MD. The literature study on the efficacy and manufacturing process of Gyeongoggo. *Journal of Korean Medical Classics*. 2011;24(2):51-64.
11. Choi JH, Kim HM, Song YS, Park SG, Kim JJ, Lee CK. Anti-aging effects *Saccharomyces* fermented modified *Kyungohkgo* extract on skin. *The Korea Journal*

- of Herbolgy. 2007;22(4):219-25.
12. Park JH. Protective effects of Iksuyongjingo against neurotoxicity induced by 6-hydroxydopamine in PC12 cells [dissertation]. Seoul:Kyung-Hee University; 2009.
 13. Lee YM, Kim WI, Choi DH, Kim MR, Moon YS, Kim JE, Youn DH, Son HS, Na CS. The effect of prescriptions prepared by adding medicinal herbs(*Rehmannia glutinosa* Residue, *Poria cocos* Bark) and fermenting herbal materials based on formulas Iksuyongjingo on immunological activity. *Herbal Formula Science*. 2017;26(1): 13-26.
 14. Na CS, Shin W, Lee YM, Moon YS, Noh HK, Seo SH, Son HS. Effect of original kyungokgo & iksuyongjingo plus *Sparassis crispa* on antioxidant, immunity improvement and sensory evaluation. *The Korea Journal of Herbolgy*. 2016;31(4):43-51.
 15. Lee YM, Moon YS, Park HM, Kim HS, Ro WB, Na CS. A study on the β -glucan, ginsenoside content, DPPH free radical scavenging activity and single dose toxicity assessment of modified Kyungohkgo. *J Korean Med Rehabil*. 2021;31(1):95-108.
 16. Lim SC. Effects of Baikal Skullcap (*Scutellaria baicalensis* Georgi) extracts on the recovery of liver function in CCl₄-exposed rats. *Korean Journal of Plant Resources*. 2010;23(1):54-9.
 17. 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.
 18. Kim YH, Park YS. Effect of *Scutellaria baicalensis* water extract on antioxidative activity and epidermal thickness in DNCB-induced allergic contact dermatitis animal model. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2006;35(5):543-8.
 19. Proebstle A, Lotter H, Wagner-Redecker W, Matthiesen U, Bauer R. Identification of lipophilic constituents with antiinflammatory activity from *Houttuynia cordata*. *Planta Medica*. 1993;59(S1):A663-4.
 20. Ministry of Food and Drug Safety. Ministry of Food and Drug Safety White Paper. 2021 [cited 2021 Aug]. Available from: URL: https://www.mfds.go.kr/brd/m_218/view.do?seq=33414&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&.htm.
 21. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82(1):47-95.
 22. Halliwell B, Gutteridge JM. Roles of free radicals and catalytic metal ions in human disease. In: Fleischer S, Packer L, eds. *An overview, methods enzymol*. New York:Academic Press. 1990:186:1-85.
 23. Verckei A, Toncsev H, Feher J, Hajdu E. Relationship between the extent of coronary artery disease and indicators of free radical activity. *Clin Cardiol*. 1992;15(9): 706-7.
 24. Aitken RJ, Bukingham D, Harkiss D. Use of xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effect of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1993;97(2):441-50.
 25. Baublis AJ, Lu C, Clydesdale FM, Decker EA. Potential of wheat-based breakfast grains as a source of dietary antioxidants. *J Am Coll Nutr*. 2000;19(sup3):308S-11S.
 26. Cho W, Nam JW, Kang HJ, Windono T, Seo EK, Lee KT. Zedoarondiol isolated from the rhizoma of *Curcuma heyneana* is involved in the inhibition of iNOS, COX-2 and pro-inflammatory cytokines via the downregulation of NF- κ B pathway in LPS-stimulated murine macrophages. *Int Immunopharmacol*. 2009;9(9):1049-57.
 27. Lee JW, Kang YJ. Anti-inflammatory effects of *Abelophyllum distichum* flower extract and associated MAPKs and NF- κ B pathway in RAW 264.7 cells. *Korean J Plant Res*. 2018;31(3):202-10.
 28. Kim CH, Lee YK, Jeong JW, Hwang BS, Jeong YT, Oh YT, Cho PY, Kang CH. Anti-inflammatory effects of *Hemistepta lyrata* Bunge in LPS-stimulated RAW 264.7 cells through regulation of MAPK signaling pathway. *Korean J Plant Res*. 2021;34(1):23-30.
 29. Park JC, Han HS, Lee SB, Lee KT. Inhibitory effects of kaempferol-7-O- β -D-glucoside on LPS-induced NO, PGE₂ and inflammatory cytokines production in RAW 264.7 macrophages. *Kor J Pharmacogn*. 2016;47(4):295-300.
 30. Radi RB, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biology Chemistry*. 1991;266(7):4244-50.
 31. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci*. 2001;69(6):625-35.
 32. Min JY, Park YK. Effect of *Dipsaci Radix* water extract on LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 mouse macrophages. *Kor J Herb*. 2009;24(4):189-95.
 33. Arendt-Nielsen L, Fernández-de-las-Penas C, Graven-Nielsen T. Basic aspects of musculoskeletal pain: from acute to chronic pain. *J Man Manip Ther*. 2011;19(4): 186-93.
 34. Gallo J, Raska M, Kriegova E, Goodman SB. Inflammation and its resolution and the musculoskeletal system. *J Orthop Translat*. 2017;10:52-67.
 35. Jeong DH, Kim WR, Kim MJ, Kang BK, Ahn DH. Anti-inflammatory activity of methanol extract and nhexane fraction mojabanchromanol b from *Myagropsis myagroides*. *Life Sci*. 2014;114(1):12-9.
 36. Masaki M, Matsushita M, Wakitani K. Inhibitory effect of JTE-522, a novel prostaglandin H synthase-2 inhibitor, on adjuvant-induced arthritis and bone changes

- in rats. *Inflamm Res*. 1998;47(4):187-92.
37. Lim CW, Kang KK, Yoo YB, Kim BH, Bae SH. Dietary fiber and β -glucan contents of *Sparassis crispa* fruit fermented with *Lactobacillus brevis* and *Monascus pilosus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2012;41(12):1740-6.
 38. Yokozawa T, Chen CP, Dong E, Tanaka T, Nonaka G, Nishooka I. Study on the inhibitory effects of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2picrylhydrazyl radical. *Biochemical Pharmacology*. 1998;56:213-22.
 39. Woo HS, Lee SM, Heo JD, Lee MS, Kim YS, Kim DW. Anti-inflammatory activity of extracts of *Hovenia dulcis* on lipopolysaccharides-stimulated RAW264.7 cells. *Korean J Plant Res*. 2018;31(5):466-77.
 40. Abbvie Global. Dual variable domain immunoglobulin [Internet] 2019 [cited 2019 Feb 25]. Available from: URL: <https://www.abbvie.co.kr/our-science/therapeutic-focus-areas/immunology/immunology-discovery-development.html>.