

원저

## 九仙王道糕가 前脂肪細胞 3T3-L1의 増殖, 抗補體活性 및 細胞毒性에 미치는 영향

주영승\*, 최용휴\*, 김호경\*\*, 고병섭\*\*

\* 우석대학교 한의과대학, \*\* 한국한의학연구원

### Effects of Kuseonwangdого on the Proliferation of Preadipocyte 3T3-L1 Cells, the Anti-Complementary and the Cytotoxic Effects

Young-Sung Ju\*, Young-Heu Choi\*, Ho-Kyoung Kim\*\*, Byoung-Seob Ko\*\*

\* Woosuk Oriental Medical College \*\* Korea Institute of Oriental Medicine

To investigate the anti-complementary and cytotoxic effects of oriental prescription, Kuseonwangdого, on the proliferation of preadipocyte 3T3-L1 cells, we examined biological effects of Kuseonwangdого. The results obtained were as follows.

1. After 14 days, the body weight of rats treated with Kuseonwangdого decreased more than that in the control group ( $p < 0.05$ ). However, the weights of liver, spleen and kidney were unchanged.

In serum biochemical test, we examined the level of glucose (GLU) and glutamic pyruvic transaminase (GPT). The levels of GOT and CHOL in serum were decreased remarkably by the administration of Kuseonwangdого ( $p < 0.05$ ). The haematological examination of the tested group showed significant increment of white blood cells (WBC), hemoglobin concentration (HGB), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and monocyte (MO).

2. The effect of Kuseonwangdого on

the proliferation of 3T3-L1 cells was tested by the sulforhodamin B(SRB) assay. The high concentration ( $100\mu\text{l}$  and  $200\mu\text{l}$ ) of extracts inhibited the proliferation of 3T3-L1 cells. The  $p$ -value was  $< 0.01$ , respectively.

3. The extract of Kuseonwangdого showed a potent anti-complementary activity. It was suggested that the active principle may be a kind of polysaccharide molecule.

4. The cytotoxic effects of Kuseonwangdого and its composing herbs in human liver cells (WRL68) and monkey kidney cells (Vero) were examined by the SRB and 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay. Cytotoxic effects were not observed.

**Key words:** Kuseonwangdого, Anti-complementary, Preadipocyte 3T3-L1 cells, SRB assay, MTT assay

· 접수 : 2000년 1월 4일

· 채택 : 2000년 1월 28일

· 교신저자 : 주영승, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490 우석대 한의대 (T. 0652-290-1561)

# 이 논문은 1999학년도 우석대학교 학술연구비 지원을 받았음.

### I. 緒 論

오늘날 우리의 신체는 전반적인 環境危害物質로부터 노출 위험이 많아지고 있어서 인체면역기능이 과거에 비해 상당히 약화되고 있으며, 우리나라 평균수명은 점차 늘어나고 있는데 반해 老化和 老齡이 깊은 만성 퇴행성질환이 증가하는 추세에 있다. 최근에 들어서는 청소년들의 기초체력이 과거보다 상당히 떨어지고 있으며 이는 점차 사회문제화되고 있다. 우리 생체의 건강 기본은 恒常性 유지에 있으며, 恒常性的 유지는 호르몬계, 신경계, 생체방어계 및 각종 대사계등의 다양한 신체시스템이 적절히 작용하고 또한 서로 밀접하게 영향을 주고 받아 聯動하므로써 이루어지고 있다.

陰陽五行의 이론으로 상대적인 평형을 추구하는 한의학의 특징은 생체의 恒常性 유지와 같은 의미로 해석될 수 있으며 이는 그간 여러 연구에서 입증되어지고 있다. 예를 들면 氣血 陰陽의 雙補의 효력을 가지고 있는 十全大補湯의 경우에 면역계와 homopoietic계에 효과가 있으며, 유효성분은 장에서 흡수되어 장면역계에 있는 파이어 집선과 같은 장관림프관망상(lymphoreticular) 조직에 작용하여 약리적인 효과를 발휘한다고 발표된 바 있다<sup>1)</sup>.

九仙王道糕는 明의 《回春》에 처음 등장한 이래 《東醫寶鑑》<sup>2)</sup>雜病篇에 “養精神 扶元氣 健脾胃 進飲食 補虛損 生肌肉 除濕熱” 한다 하였다. 떡이나 미음으로 복용하여 元氣를 북돋아 脾와 胃를 健壯하게 하여 虛損을 補하는 效能을 가지고 있는 九仙王道糕는 옛부터 궁중에서 감기 예방을 위한 기능성 처방으로 사용하였다는 기록이 있다<sup>3)</sup>.

최근에 들어 食品과 藥品으로서의 九仙王道糕의 응용이 구체화되고 있는 시점에서 營養物質의 과다섭취로 인한 肥滿에 대한 우려가 있는 것이 사실이다. 대부분의 肥滿이 老化和 慢性퇴행성질환과의 연계성을 가지고 있는 것으로 나타난 바, 이에 대한 정리도 필요하다고 생각한다.

著者は 감기 예방 및 치료효과가 있는 感

冒처방들을 중심으로 influenza virus[A/Taiwan/1/86/ (H1N1)]형에서 활성효과를 검색하던 중<sup>4)</sup>, 九仙王道糕가 바이러스에 대해서는 직접적인 활성효과는 없지만 인체내에서 면역효과를 상승시켜 補氣의 역할을 함으로써 감기의 예방에 효과가 있음을 관찰하였다.

이에, 著者は 九仙王道糕에 대해 비만에 관련된 깊은 前脂肪細胞(preadipocyte) 3T3-L1에 대한 활성실험, 면역과 관련하여 抗補體活性실험, 그리고 處方 및 그 구성 韓藥材에 대한 細胞毒性등을 조사하여 보고하고자 한다.

### II. 材料 및 方法

#### 1. 재료

##### 1) 시료

##### 가. 약재구성

본 실험에 사용한 九仙王道糕의 구성과 분량은 표과 같고, 韓藥材는 경동시장과 생약협회 국산 韓藥材 전시판매장에서 구입한 후 감별하여 선정하였고, 구입시기 별로 각각의 韓藥材들에 일련 번호를 붙이고 100g씩 보관하였다. 그리고, 柿霜은 꽃감(상주산)을 구입하여 표면에 부착하여 있는 것을 모아 사용하였다.

표. 九仙王道糕의 構成

구 성	학 명	분량(g)	산 지
蓮子肉	NELUMBINIS SEMEN	160	중국
山藥(炒)	DIOSCOREAE RHIZOMA	160	한국, 안동
白茯苓	PORIA	160	한국, 홍천
薏苡仁	COICIS SEMEN	160	한국, 양양
麥芽(炒)	HORDEI FRUCTUS GERMINIATUS	80	한국, 제주
白扁豆(炒)	DOLICHORIS SEMEN	80	한국, 영천
芡仁	EURYALES SEMEN	80	중국
柿霜	SI-SANG	40	한국, 상주

##### 나. 시료제조

##### (1) 九仙王道糕의 제조

구성 韓藥材들과 白米(평택산 아끼바리)를 잘게 갈아서 가루 입자크기를 18mesh(1.0mm)로 만들었다. 白米가루 8kg에 물 500ml와 九仙王道糕 분말 920g을 넣고 잘 섞은 후, 18mesh 체에 걸러서 고운 가루로 만들었다.

점통 용기에 고르게 가루를 넣은 후 뚜껑을 닫고 45분 동안 찌고, 완성된 떡은 적당히 (15-20분) 식힌 후 3×4cm 크기로 절단하여, 熱風乾燥器를 이용하여 40℃에서 風乾하여 시료로 사용하였다.

(2) 煎湯液 분말 제조

九仙王道糕 92g에 증류수 920ml를 넣고 약탕기(대웅)에서 2시간 전탕한후 gauze로 여과하고 2000rpm으로 원심분리하여 上等液을 회전진공 농축기에서 감압농축한후 동결건조하여 분말시료를 만들었다.

2) 시약 및 기구

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco), Fetal bovin serum (FBS, Gibco), trypsin-EDTA(Gibco), Gentamycin(Gibco), Phosphate buffered saline(PBS, Sigma), Trichloroacetic acid(TCA), Acetic acid(Aldrich), Trizma base(Sigma), Sulforhodamin B(SRB, Sigma) Dimethyl sulfoxide(DMSO) 등이며, 사용기구로는 96-Well plate(Falcon), Disposable pipette(Falcon), ELIZA-Reader(Spectra), CO2 incubator(Fisher), Inverted microscope(Olympus)등을 사용하였다.

2. 동물실험

1) 동물

7週齡 雄性의 랫트(SD)를 대한실험동물센터(충북음성)로 부터 구입하여 2주일 순화시켰으며, 순화기간중 일반증상을 관찰하여 건강한 Rat를 선정하여 群분리(체중범위에 따른 무작위법)한 후 시험에 착수하였다. 개체 식별은 사육상자별로 tag 표시법 및 皮毛색소 마킹법<sup>5)</sup>을 이용하였다.

2) 사육환경

溫濕度 범위는 각각 온도 21±3℃, 상대습도 50±10%이었으며, 환기회수는 환풍기를 이용하여 공기를 24시간 배출하였으며, 형광등 조명으로 12시간 명암 cycle(점등 7:00 ~ 소등 19:00), 조도는 150 Lx로 조정하여 시험 전 기간동안 일정하게 유지하였다. 사료는 순화기간중에는 실험동물용 고형사료(삼양사료

주식회사)를, 음료수는 상수도수를 자유롭게 섭취시켰다.

3) 시험군의 구성과 투여량

雄性 랫트(SD)를 각 군당 10마리로 분류하고 무처치한 군을 대조군으로 하여 시험하였다. 시험군에서, 시험시료의 투여는 2주일간의 순화기간이 끝난 다음날(1일간) 絶食시킨 후 2주동안 九仙王道糕의 건조 시료를 자유롭게 섭취시켰으며, 대조군에는 실험동물용 고형사료(삼양사료주식회사)와 상수도수를 자유롭게 섭취시켰다.

4) 검사방법

관찰항목중 일반증상은 시험기간중 1일 1회 Irwin법<sup>6)</sup>을 중심으로하여 관찰하였으며, 체중을 측정하였다. 안구검사는 시험개시전 및 시험종료시 2번 관찰하였다. 부검은 에텔마취하여, 후대정맥에서 채혈한 후 방혈, 치사시켜 육안적으로 臟器를 검사하였고, 肝臟, 脾臟, 腎臟을 적출하여 중량을 측정하였다. 일반 생화학적 검사는 채취한 혈액의 일부를 30분간 방치하여 응고후 원심분리기를 이용하여 3,000rpm에 20분간 원심하여 분리된 혈청에 대하여 혈액생화학분석기 Arion 200(Crony Instruments, Italy)을 이용하여 GOT(glutamic oxaloacetic transaminase), GPT (glutamate pyruvate transaminase), GLU(glucose), TG(triglyceride), CHOL(total cholesterol)을 측정하였다.

혈액학적 및 혈액생화학적 검사에서 WBC(white blood cell), RBC(red blood cell), HGB(hemoglobin concentration), MCV(mean corpuscular volume), HCT(hematocrit), MCH(mean corpuscular hemoglobin), MCHC(mean corpuscular hemoglobin concentration), LY(lymphocyte), MY(monocyte), GR(granulocyte), MO(monocyte)등은 EDTA-2K 처리후 혈구 자동측정장치 CBC(Coulter JT, Miami, FL, USA)를 이용하여 측정하였다.

3. 前脂肪細胞 3T3-L1에 대한 活性실험

1) 細胞株

실험에 사용한 3T3-L1 세포는 일본 나고

야대학 농학부 생화학제어실 Y. Kitagawa 교수로부터 분양받아 사용하였다.

## 2) 細胞培養

실험에 사용된 3T3-L1 세포의 배양액은 DMEM이었으며, FBS, Gentamycine(100 units/ml), Streptomycin(100µg/ml) 등을 첨가하였다. 3T3-L1은 배양 3일 간격으로 배양 세포 표면을 PBS용액으로 씻어준 후 50ml flask당 1ml의 0.25% trypsin-EDTA용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37°C에서 5분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대배양하였다. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM배양액 10ml에 부유시킨 다음 새로운 배양용기(50ml culture flask)에 옮겨 1 : 20의 split ratio로 CO<sub>2</sub> 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다.

## 3) SRB법에 의한 세포 增殖能 측정

10% FBS가 첨가된 DMEM배지에서 3일간 3T3-L1을 배양하고 배양매지를 제거한 후, PBS로 세포표면을 세척하고 0.25% trypsin-EDTA 1ml를 첨가하여 1분간 반응시켰다. 0.25% trypsin-EDTA를 제거하고 10% DMEM 배양액 5ml를 첨가하여 피펫팅하고, 세포부유(cell suspension) 대 trypan blue(1%) = 1:1로 혼합하여 혈구계산기(Haema-cytometer)로 세포수를 계산하여  $5 \times 10^3$  cells/ml로 부유시켰다. 세포부유액 100µl씩을 96 well plate의 각 well에 분주하여 well당  $5 \times 10^3$  cells/ml의 세포가 접종되게 한 다음 5% CO<sub>2</sub> incubator(5% CO<sub>2</sub>, 37°C)에서 24시간 배양하여 세포를 부착시켰다. 각 well에 九仙王道糕 분말을 증류수로 희석된 농도의 검액시료로 첨가한 다음, CO<sub>2</sub> incubator에서 2일간 배양하여, 배양이 끝난 세포에 TCA(Trichloroacetic acid)를 최종 농도 10%가 되게 첨가하고, 4°C에서 1시간 배양하여 세포를 고정시켰다. 1% acetic acid에 녹인 0.1% SRB(Sulforhodamine B, Sigma S-9012) 용액 100µl를 가한 후 상온에서 30분 이상 두어 충분히 염색시킨 다음 1% acetic acid로 5회 반복하여 세포를 세척하고, 공기중에서 건조시켰다. 10mM unbuffered

Tris(pH 10.5)를 100ml를 첨가하여 10분간 용출시킨 후, ELISA reader 564nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 증식 정도를 측정하였다.

## 3. 抗補體活性 실험

抗補體活性은 Mayer법<sup>7)</sup>을 이용하여 補體 결합 반응(Complement fixation test)으로 측정하였다. 九仙王道糕 분말 시료 1,000µg/ml를 5% DMSO에 용해시켜 혈청(NHS, normal human serum)과 2% gelatin, 3mM Ca<sup>++</sup>, 10mM Mg<sup>++</sup>이 함유된 GVB<sup>++</sup>(Gelatin veronal buffered saline, pH 7.4) 완충액을 50 µl 혼합하여 GVB<sup>++</sup> 350µl를 가해 37°C에서 30분간 1차 반응 시키고 GVB<sup>++</sup> 350µl를 가해 10~100배 연속 희석하였다. 여기에 다시 GVB<sup>++</sup> 750µl를 가한 다음 感作적혈구(IgM haemolysin sensitized sheep erythrocyte) 250µl를 가해 37°C에서 60분간 2차 반응시킨 후 PBS(pH 7.4) 2.5ml를 넣어 반응을 정지시켰다. 반응액을 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 412nm에서 흡광도를 측정하였다. 抗補體活性은 總補體溶血阻止率(Inhibition of 50% total complement hemolysis, ITCH<sub>50</sub> %)로 나타냈다.

## 4. 細胞毒性

### 1) 細胞株 및 세포 배양

본 실험에서 사용한 사람의 간세포(WRL68)는 강원대학교 생명공학연구소로부터 분양받아 사용하였고, 원숭이의 신장세포(vero)는 한국세포주은행(KCLB)으로부터 분양 받아 사용하였다.

세포의 증식을 위해서는 조직배양용 플라스크(25cm<sup>2</sup>)에 0.2% sodium bicarbonate, 5% FBS와 gentamicin(50mg/ml)을 첨가한 RPMI medium 1640을 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 세포단층(monolayer)이 될 때까지 배양하였다. 세포를 계대배양하기 위해서는 조직배양용 플라스크(75cm<sup>2</sup>)에 배양한 세포를 PBS(pH 7.4)로 세척한 다음 최종 농도가 0.05% 되게 trypsin을 넣어 세포를 플라스크 바닥으로부터 분리시켜 조직배양용 플라스크(75 cm<sup>2</sup>)에 1 : 4로 분주하여 5% RPMI 1640

을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에 배양하였다.

2) 시료의 제조

九仙王道糕 구성 韓藥材 각각 5g에 3차 증류수 50ml을 넣어 2시간 동안 煎湯한 후, gauze를 이용하여 1차 여과하고 3000rpm에서 15분간 원심분리한 후 2차 여과하여 회전압 농축기로 농축시킨 후 동결건조하여 분말 시료를 사용하였고, 0.5% DMSO에 ml당 九仙王道糕와 구성 한약재의 분말 시료 50mg을 녹인 후, 0.45µm로 여과하여 검액으로 사용하였다.

3) 검색법

細胞毒性을 검색하기 위하여 SRB와 MTT 방법을 이용하여 비교하였고, 검색결과의 실험오차를 줄이고자 각 방법을 3회이상 반복 측정하였다.

가. 적정 접종 세포수 결정

사람의 간세포(WRL68) 및 원숭이의 신장 세포(vero)의 적정 접종 세포수(optimal seeding density)는 7×10<sup>3</sup>cells/ml이었다.

나. SRB법 (Sulforhodamine B Protein Assay)에 의한 세포독성

SRB검색은 Alley등<sup>9)</sup>과 Skehan<sup>10)</sup>등의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 한 well당 4×10<sup>4</sup>cells/ml가 포함된 100µl의 배지를 96well plate의 각 well에 첨가하며 한 칼럼에는 세포 부유액 대신 배지만을 가해 흡광도 측정 시 blank로 사용하였다. 96well plate를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양한 다음 九仙王道糕와 구성 韓藥材 검체를 PBS로 계단 희석하여 원하는 농도의 5배 용액(5×concentrate)으로 만들어 9가지 dose 농도(5000, 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 63, 32 µg/ml)로 하여 각 96well plate에 첨가하였다. 그리고 마지막 칼럼에는 검체 대신 PBS만을 25µl 첨가하여 100% 생존군으로 삼았다. 검체 투여가 끝난 plate를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 존재 하에서 48시간 더 배양하였다. 前脂肪細胞 3T3-L1의 SRB법에 의한 細胞 增殖能 측정과 동일한 방법으로 측정하였다.

다. MTT법 (Tetrazolium-based colorimetric

assay)에 의한 세포독성

SRB법 (Sulforhodamine B Protein Assay)에 의한 세포독성의 방법과 동일하게 九仙王道糕와 구성 韓藥材의 검체를 투여하고 배양하였다. 배양한 후 현미경으로 관찰하여 각 well에서의 세포상태를 관찰하여 체크하고 plate의 각 well에 0.1mg (50µl of 2mg/ml)의 MTT를 가해주고 다시 37°C에서 4시간 더 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 배양종료시 각 well에 배지를 제거하고 100µl의 DMSO를 첨가하여 이미 형성된 짙은 청색의 결정체인 formazan을 완전히 녹인후에 ELIZA plate reader로 흡광도 (test wavelength 540nm, reference wavelength 690 nm)를 측정하였다.

III. 結 果

1. 前脂肪細胞 3T3-L1에 대한 활성

1) 동물실험에서,

실험은 2주간 실시하였고, 결과의 통계분석은 이항검정 p-value로 처리하여 대조군에 대한 p<0.05(\*), p<0.01(\*\*), p<0.001(\*\*\*)로 판정하였다. 그리고, 실험중 일반증상, 부검소견, 안구검사를 통하여 확인하였다.

대조군을 포함하여 모든 군에서 외관 및 일반행동에서의 이상증상은 관찰되지 않았으며, 실험군에 시험시료를 투여한 직후의 행동이상 및 장기간 투여중 행동 이상도 관찰되지 않았다. 배변은 정상 소견이었으나, 섭취량은 실험동물용 고형사료(삼양사료주식회사)를 투여한 대조군보다 시험군에서 감소하는 경향을 보였다. 또한, 안구검사에서도 시험군에서 특별한 이상이 관찰되지 않았다. 그리고, 부검시 이상 소견이 대조군과 시험군에서 관찰되지 않았다.

각 군의 체중과 臟器 측정에서, 臟器는 肝臟, 脾臟, 腎臟을 적출하여 측정하여 각 동물의 체중에 대한 상대 장기중량을 백분율로 계산하여 T검정을 하였다. 체중은 5회측정(개시일, 3일, 7일, 10일과 14일)하였으며, 시험군에서 7일째와 10일째 감소하는 경향을

보였고, 14일째는  $p < 0.05(*)$ 로 유의성 있는 체중감소가 나타났다(Table 1).

Table 1. Effect of Kuseonwangdого on Body Weight Change in Rats

Group	after 1days	after 3days	after 7days	after 10days	after 14days
C (g)	15.17±14.04 <sup>a)</sup>	16.17±14.04	25.79±2.92	25.68±3.65	20.68±3.65
K (g)	14.62±5.79	15.72±12.79	22.27±2.95	20.58±6.99	15.58±1.39 <sup>*</sup>

a) Mean±Standard error, \*: Statistical significance compared with control data.  
\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , C : Control, K : Kuseonwangdого.

臟器의 무게는 시험군에서 臟器의 중량의 변화가 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 인정되지 않았다(Table 2).

Table 2. Effect of Kuseonwangdого on the Relative Weight of Liver, Kidney and Spleen to the Body Weight in Rats

Group	Liver	Kidney	Spleen
C (g)	3.01±0.43	0.82±0.10	0.19±0.03
K (g)	2.69±0.28	0.74±0.05	0.17±0.02

a) Mean±Standard error, \*: Statistical significance compared with control data.  
\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , C : Control, K : Kuseonwangdого.

시험군에 대한 혈액생화학적 검사항목은 GOT, GPT, GLU, TG, CHOL이었다. GOT는 대조군 비하여 九仙王道糕 투여군에서  $p < 0.05(*)$ 로 통계학적으로 유의성 있는 감소를 보였으나, GPT는 대조군 비하여 시험군에서 거의 변화가 없었다. GLU와 TG는 통계적 유의차는 없었으나, CHOL은 대조군 비하여 시험군에서  $p < 0.05(*)$ 로 통계학적으로 유의성 있는 감소를 보였다(Table 3).

Table 3. Effects of Kuseonwangdого on Serum Biochemical Values in Rats

Group	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)	GLU (mg/dl)	TG (mg/dl)	CHOL (mg/dl)
C	128.24±6.98	53.64±13.18	106.73±8.81	31.53±18.59	96.37±10.72
K	105.78±3.16 <sup>*</sup>	50.34±14.66	93.90±8.43	42.51±10.70	83.56±1.32 <sup>*</sup>

a) Mean±Standard error, \*: Statistical significance compared with control data.  
\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , C : Control, K : Kuseonwangdого.

혈액학적 분석 결과에서, 시험군은 WBC, MO, HGB와 MCH가  $p < 0.05(*)$ 로 통계학적으로 유의성 있는 증가를 보였다(Table 4).

Table 4. Effects of Kuseonwangdого on Hematological Changes in Rats

Group	WBC	LY	MO	GR	REC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC
C	9.87±0.53	83.45±6.53	9.12±1.93	5.17±1.79	7.84±0.36	16.34±0.94	46.83±3.06	59.71±0.68	20.86±0.85	34.92±1.27
K	11.49±1.62 <sup>*</sup>	79.55±4.08	11.12±1.34 <sup>*</sup>	6.33±3.91	7.85±0.44	15.94±0.47 <sup>*</sup>	45.14±1.75	59.36±1.77	22.6±0.71 <sup>*</sup>	34.71±0.93

a) Mean±Standard error, \*: Statistical significance compared with control data. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . C : Control, K : Kuseonwangdого.

2) 細胞株실험에서,

前脂肪細胞인 3T3-L1에 대한 활성은 前脂肪細胞가 증식에 미치는 영향을 4단계농도(1 $\mu$ l, 10 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 200 $\mu$ l)의 농도에서 조사하였고, 결과분석은 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 백분율로 환산하여 이항검정 p-value로 처리하였다. 九仙王道糕의 희석농도 100 $\mu$ l와 200 $\mu$ l에서 p-value가 <0.01로 유의성 높게 前脂肪細胞인 3T3-L1의 증식을 억제하였지만, 1 $\mu$ l와 10 $\mu$ l에서는 세포의 증식에 영향을 끼치지 않았다(Table 5).

Table 5. Anti-complementary Activity and Total Sugar of Kuseonwangdого

Method of extract	ITCH <sub>50</sub> % (1,000mg/ml)	total sugar(%)
Hot water	66	32
0.1N NaOH	83	43

\* ITCH<sub>50</sub> % : Inhibition of 50% total complement hemolysis.

2. 抗補體活性

抗補體活性은 대조군의 總補體溶血(50% total complement hemolysis, TCH<sub>50</sub> %)에 대한 總補體溶血沮止率(ITCH<sub>50</sub> %)로 나타냈고, 그 식은 아래와 같다.

$$ITCH_{50} (\%) = \frac{TCH_{50} \text{ of control} - TCH_{50} \text{ treated with sample}}{TCH_{50} \text{ of control}} \times 100$$

九仙王道糕의 抗補體活性은 ITCH<sub>50</sub>가 66%로 비교적 높은 활성을 나타냈으며, 九仙王道糕의 분말 시료를 알카리추출(0.1N NaOH)한 것은 83%로 높은 활성을 나타냈다. 이 결과들은 構成糖과의 관련이 높을 것으로 추정되어 glucose를 표준물질로 하여 총당함량을 phenol-sulfuric acid법<sup>10)</sup>으로 측정하여 비교하였다(Table 6).

Table 6. The Inhibition Effect of Kuseonwangdого on the Proliferation of 3T3-L1 Cells by SRB Assay

Group	Conc.	1μl	10μl	100μl	200μl
Control (%)		100±5.39			
Kuseonwangdого (%)		98.71	97.11	69.73	20.06
		101.73	98.79	43.69	14.38
		99.84	97.85	38.16	15.21
		100.09±1.3	97.92±4.1	50.52±16.6**	16.55±2.7**

\* Each value represents mean ± standard error of 3 determinations, respectively.

Significantly different from control group(\*: p<0.05,

\*\* : p<0.01)

3. 細胞毒性

九仙王道糕와 구성 韓藥材와의 細胞毒性은 시험군의 평균 OD<sub>540</sub>값을 구하여 대조군(100% 생존군)의 평균 OD<sub>540</sub>값에 대한 백분율을 산출하였다. SRB와 MTT법에서 사용한 dose 농도는 5000, 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 63, 그리고 32μg/ml이었고, IC<sub>50</sub>값이 5000μg/ml이상의 농도에서 나타난 것에 대해서는 세포독성이 없거나 미약한 것으로 판단하였다. 九仙王道糕와 구성 韓藥材와의 細胞毒性 실험 결과 5000μg/ml이상의 농도를 가지고 있어 細胞毒性의 영향은 받지 않고 있다고 판단하였다(Table 7.).

Table 7. IC<sub>50</sub> Values of Kuseonwangdого and its Composing Herbs for Monkey Kidney Cell (Vero) and Human Liver Cell(WRL68) by SRB and MTT Assay.

Scientific name of herb	IC <sub>50</sub> (μg/ml)			
	Vero		WRL68	
	SRB	MTT	SRB	MTT
Kuseonwangdого	ND	ND	ND	ND
NELUMBINIS SEMEN	ND	ND	ND	ND
DIOSCOREAE RHIZOMA(炒)	ND	ND	ND	ND
PORIA	ND	ND	ND	ND
COICIS SEMEN	ND	ND	ND	ND
HORDEI FRUCTUS GERMINIATUS(炒)	ND	ND	ND	ND
DOLICHORIS SEMEN	ND	ND	ND	ND
EURYALES SEMEN(炒)	ND	ND	ND	ND
SI-SANG	ND	ND	ND	ND

Note. SRB and MTT assay : Sulforhodamine B assay, IC<sub>50</sub> : 50% inhibition of cell growth, IC<sub>50</sub> values were calculated from PCS program. ND : not determined, IC<sub>50</sub> > 4mg/ml. Means ± standard deviation of triplicate experiments.

IV. 考 察

九仙王道糕는 《東醫寶鑑》<sup>2)</sup>雜病篇에 “養精神 扶元氣 健脾胃 進飲食 補虛損 生肌肉 除濕熱”이라고 기술되어 脾胃의 氣를 보강하는 작용이 있는 補氣劑로서 옛부터 궁중에서 감기 예방을 위해서 떡 또는 미음으로 먹었다는 기록이 있다<sup>3)</sup>. 九仙王道糕에 대해 influenza virus[A/ Taiwan/1/86/ (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>)]형을 모델로하여 감기억제 활성효과를 검색한 결과 50mg/ml에서 약한 활성을 나타내어 바이러스에 대해서는 직접적인 활성효과는 없지만 인체내에서 면역효과를 상승시켜 補氣의 역할을 함으로써 감기의 예방에 효과가 있다고 생각되었다. 이에 著者は 肥滿에 관련이 깊은 前脂肪細胞 3T3-L1에 대한 활성, 免疫에 관련하여 抗補體活性, 그 구성 韓藥材에 대한 細胞毒性을 조사하였다.

동물실험에서 九仙王道糕가 비만억제의 효과가 있음이 예견되어, 비만에 직접적인 효과를 가지고 있는지 확인하기 위해 前脂肪細胞 3T3-L1에 대한 증식에 미치는 영향을 조사하였다. 九仙王道糕의 동물실험 결과, 시험군에서 체중은 7일째부터 감소하는 경향을 보여 14일째는 p-value가 <0.05로 유의성 있는 체중감소가 나타났지만 臟器 무게의 감소가

일어나지 않고 있는 것과 혈액생화학적 검사에서도 CHOL인 p-value가 <0.05로 통계학적으로 유의성 있는 감소를 보인데 반해 비만에 관련이 있는 혈중 GLU와 TG가 감소하지 않고 있는 것은 臟器의 비대화에 관여하는 脂肪세포의 분화과정인 TG대사의 활성화에 九仙王道糕가 관여하지 않고 있는 것을 뒷받침해 주는 것이라고 생각된다. 前脂肪細胞 3T3-L1에 대한 활성화 실험에서 100 $\mu$ l와 200 $\mu$ l에서 p-value가 <0.01로 억제되는 결과는 이를 확인해 주었다(Fig. 1). 前脂肪細胞인 3T3-L1 세포는 지방조직 3T3 세포로부터 유래된 細胞株로서 그 생물학적 특성이 잘 밝혀져 있고, 적절한 조건하에서 배양하면 脂肪細胞(adipocyte cell)로 분화하는 성질을 갖고 있어 脂肪細胞의 대사과정은 물론 지방 축적과 당뇨, 비만을 연구하는데 널리 사용되고 있다<sup>11-13)</sup>. 비만은 에너지의 과잉섭취로 인한 과도한 지방생산과 축적을 하게 되는데, 비만 억제의 제어점으로 前脂肪細胞가 脂肪細胞로 이행하는 증식과정과 脂肪細胞에서 분화·성숙 과정을 거쳐 과생산되어 지방조직의 비대화 되는 과정으로 나눌 수 있다. 脂肪細胞의 분화과정은 새로운 지방합성 및 TG대사에 관련하는 효소활성을 급격히 증가시키며, 이 과정에서 지방합성 및 지방분해 유도 호르몬에 대한 감수성이 증가하고 지방합성 과정에 관여하는 脂肪細胞 특이 유전자의 발현량이 증가한다고 보고 되고 있다<sup>14)</sup>. 이상의 결과들을 종합해보면, 九仙王道糕의 비만 억제 효과는 脂肪細胞의 형성과정에서 前脂肪細胞로 증식하는 단계를 억제하고 있다고 생각되어진다.

또한 혈액학적 분석 결과에서 WBC, MO, HGB와 MCH가 p<0.05(\*)로 통계학적으로 유의성 있는 증가는 면역기능과 조혈기능을 반영하고 있음이 예견되었다. 특히, MO의 증가는 脾臟의 기능과 관련이 깊은 것으로 九仙王道糕가 脾胃의 기운을 북돋아 주는 효능을 가지고 있음을 뒷받침해 주고 있는 결과라고 생각된다. 그리고 혈액생화학 검사 결과에서 간기능에 관여하는 GOT의 유의성 있는 감소

(p<0.05)는 흥미로운 결과이었다. 본 실험에서 九仙王道糕의 효능이 직접 造血작용을 촉진시키고 그 지속기간이 얼마나 되는지는 확인하지 않았다.

補體가 면역반응에서 중요한 이유는 항원에 감작되지 않은 숙주에서 감염 미생물에 대한 초기 방어기작으로서 역할을 하기 때문이다. 즉, 補體는 항체가 존재할 때 활성화(classical pathway, CP)되거나 항체 없이도 외부 감염원을 직접적으로 인지하여 활성화(alternative pathway, AP)되어, 대부분의 enveloped viruses (herpes virus, myxoviruses, paramyxoviruses, retroviruses)와 G(-) bacteria 등은 활성화 최종생성물(membrane attack complex, MAC)에 의한 삼투용혈 작용으로 직접 제거될 뿐만 아니라, 활성화 과정중 생성되는 펩타이드(anaphylatoxins: C3a, C4a, C5a)가 염증세포(PMNs, macrophage, monocyte, lymphocyte, mast cell) 활성화와 작용을 하여 전반적인 면역반응(혈관 투과성 증가, 평활근 수축, 염증세포 유인, 탐식작용 유도, opsonin 작용)을 증가시키는 매개체 역할을 하는 것으로 보고되었다<sup>15)</sup>.

九仙王道糕의 抗補體活性은 ITCH<sub>50</sub>가 66%로 비교적 높은 활성을 나타냈는데, 알카리 추출시 抗補體活性이 증가한다는 보고가 있어<sup>16)</sup> 九仙王道糕의 분말 시료를 0.1N NaOH로 전탕하여 추출한 것에서 83%로 높은 활성을 나타냈다. 이 결과들은 構成糖과의 관련이 높을 것으로 추정되어 glucose를 표준물질로 하여 총당함량을 측정된 결과 각각 32%와 43%로 構成糖 함량이 높을수록 抗補體活性이 증진됨을 알 수 있었고, 抗補體의 활성 물질들은 추출조건에 많은 영향을 받고 있음이 확인되었는데, 알카리 추출이 효과적이라는 보고도<sup>17,18)</sup> 이런 면에서 해석이 가능하리라고 본다. 九仙王道糕의 抗補體活性 성분은 蛋白·多糖類와 같은 고분자물질이 관여하고 있다고 사료된다.

韓藥의 약효를 저분자 물질로만 설명하는 것은 곤란한데, 일본의 연구그룹에 의하면 버



섯균류 한약재 茯苓, 人蔘, 當歸, 柴胡 등에서 항종양성 다당으로서 1, 3-결합, 1, 4-결합, 1, 6-결합을 가지고 있는 올리고당등이 발견되어지고 있는데 이들의 활성은 암세포를 직접적으로 공격하지 않고 숙주의 면역계에 작용하여 생체방어력을 증가시키는 일종의 면역부활활성이라고 보고하고 있다<sup>19)</sup>. 이들 多糖類는 抗補體(complement system)활성, 식작용증강활성등과 같은 면역조절기능과 항응고활성, 혈당강하활성등의 여러 약리작용이 발견되고 있어 주목되고 있는데 이들은 주로 신체의 homeostasis(항상성)유지와 기능의 조절역할을 담당하는 BRM(biological response modifier)로써 작용하고 세포들의 receptor기능을 조절함으로써 치료 효과를 낸다고 알려져 있다<sup>20)</sup>. T. Okuda등<sup>21)</sup>은 다당류가 생체내의 補體系에 관여하여 macrophage의 활성화, target cell에 대한 cytolysis와 opsonization기능을 향진시킴으로서 항종양 효과를 나타낸다고 하며, 다당류에 의한 補體系의 활성화와 항종양효과의 상관관계를 밝히고 있다. 또한 Kitasato연구소의 H. Yamada는 韓藥에서 煎湯후 추출한 고분자 성분인 多糖類들이 抗補體活性등과 다양한 면역조절에 관여하고 있다는 점에 착안하여 실제로 十全大補湯 처방의 면역 조절 기능에는 22가지의 펙틴 多糖類가 관련된 것을 밝힌 바 있다<sup>22)</sup>.

九仙王道糕 및 구성 韓藥材에 대한 細胞毒性은 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 나타나지 않아  $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 산출할 수 없어 毒性은 없거나 굉장히 낮은 것으로 확인되었다.

이상의 결과에서, 九仙王道糕는 脾·胃에 관련된 肥滿抑制 및 臟免疫 증강에 밀접하게 영향을 주고 받아 恒常性 유지에 일조를 하고 있다고 생각된다. 아울러, 면역활성의 효능을 정확히 밝히기 위해서는 臟免疫系의 연구를 병행할 필요가 있다고 생각되어 진다.

## V. 結 論

九仙王道糕를 이용하여 肥滿에 관련이 깊은 前脂肪細胞 3T3-L1에 대한 활성, 면역에 관련하여 抗補體活性, 그 구성 韓藥材에 대한

細胞毒性을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 동물실험에서,
  - 1) 체중은 14일째에 유의성있게 감소하였으나 臟器무게의 변화는 없었다.
  - 2) 생화학검사상 血清에서 GOT와 CHOL의 유의성있는 감소가 있었다.
  - 3) 혈액학검사상 WBC, HGB, MCH, MO의 유의성있는 증가가 있었다.
2. 細胞株실험에서, 前脂肪細胞 3T3-L1에 대한 활성은 고농도(100 $\mu\text{l}$ 와 200 $\mu\text{l}$ )에서 억제되었다
3. 抗補體活性은 總補體溶血阻止率에서 비교적 높은 활성을 나타냈으며, 알칼리추출에서 높은 활성을 나타냈다.
4. 處方 및 구성 韓藥材의 세포독성은  $\text{IC}_{50}$  값이 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도로서 없거나 미약한 것으로 나타났다.

이상의 결과에서, 九仙王道糕는 抗肥滿과 免疫增進의 효과를 가지고 있는 것으로 나타난 바, 향후 이에 대한 추가연구의 필요성이 있다고 思料된다.

## 參考文獻

1. Yamada, H. : "Research on Kampo Medicines in Japan, New Technique and New Achievement", - Research trends on traditional oriental medicine and future strategy for its development, Seoul, KIOM ; 31-7, 1998.
2. 허준 : 雜病篇, 東醫寶鑑 ; 440. 1989.
3. 洪萬選(朝鮮)著, 柳重臨(朝鮮)增補 : 增補山林經濟, 奎12688 ; 16卷 12冊 ; 1767.
4. 정재득, 고병섭, 이형환, 최환수, 박갑주 : 한약 처방(복합제)의 influenza virus type I에 대한 항바이러스 활성 효과, 대한바이러스학회지 ; 제26권 제2호 ; 273-83, 1996.
5. 이영순 : 랫트 및 마우스에서 투여물질의 아 급성독성에 관한 연구. Korean J. Toxicol. ; 10(1) ; 37~48, 1994.
6. 이삼열 : 「임상병리검사법」. 서울 ; 연세대학교출판부, 182-230, 1982.
7. Kabat, E. A. and M. M. Mayer : Complement and complement fixation, In

- Experimental Immunology, Illinois, USA : 133, 1964.
8. Alley, M. C., Scudiro, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. I., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H. and Boyd, M. R. : Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay, *Cancer Res.* : 48 ; 589, 1988.
  9. Skehan, P., Strong, R., Scudiero D. A., Monks, A., McMahon, J., Vistica, A. D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenny, S. and Boyd, M. R. : New colorimetric cytotoxicity assay for Anticancer-Drug Screening. *J. Natl. Cancer Inst.* ; 82 ; 1107, 1990.
  10. Dubios, M. K. A., T. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. sonisth, Colorimetric method for determination of Sugar and related substances, *Anal. Chem.* : 28 ; 350-5, 1956.
  11. Student AK, Hsu RY, Lane MD. : Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.* ; 225 ; 4745-50, 1980.
  12. Rubin CS, Lai E, Rosen OM. : Acquisition of increased hormone sensitivity during in vitro adipocyte development. *J. Biol. Chem.* ; 252 ; 3554-7, 1977.
  13. Rubin CS, Hirsch A, Fung C, Rosen OM. : Development of hormone receptors and hormone responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.* ; 253 ; 7570-8, 1978.
  14. 杉本悦郎 : 建康・營養に關與する細胞機能の生化學的研究, 日本農藝化學會誌 ; 68(8) ; 1199-205, 1994.
  15. Gao, Q. P., H. Kiyohara, J. C. Cyong and H. Yamada, Chemical properties and Anti-complementary activities of heteroglycan from the leaves of *Panax ginseng* C. A. METER, *Planta Med.* ; 57 ; 132-7, 1991.
  16. 宮崎利夫 : 多糖の構造と生理活性, 日本東京 ; 朝倉書店, 134-81, 1990.
  17. Kwon, M. H. and H. C. Sung : Immuno-modulatory function by anti-complementary polysacchrides, *Food and Industry(Kor.)* ; 30 ; 30-43, 1997.
  18. 권미향, 임은정, 성하진, 양송이 버섯의 생물활성 다당류에 관한 연구, 한국농화학회지, 41/1, 60-6, 1998.
  19. Yamada, H., H. Kiyohar, J. C. Cyong and Y. Otsuka : Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba*-IV. Characterization of an anti-complementary arabinogalactan from the roots of *Angelica acutiloba* KITAGWA. *Molecular Immunology* ; 22 ; 295-302, 1985.
  20. Yamada, H., K. S. Ra, H. Kiyohara, J. C. Cyong, H. C. Yang and Y. Otsuka : Characterization of anti-complementary neutral polysaccharides from the roots of *Bupleurum falcatum*, *Phytochemistry* ; 27 ; 3163-8, 1988.
  21. Okuda, T., Ikekawa, Y., Chihara, G. and Nshioka, K. : Anti-complementary activity of anti-tumor polysaccharides, *Nature. New. Biol.* ; 238 ; 50-64, 1972.
  22. Yamada H. : Pectic polysacchalides from chinese herbs: Structure and biological activity, *Carhydr. Polymers* ; 25 ; 269-76, 1994.