

인삼패독산의 추출용매에 따른 성분함량 및 효능연구

임혜선[#], 하혜경, 서창섭, 진성은, 김예지, 전우영, 유새롬,
신인식, 김정훈, 김성실, 신나라, 이미영, 정수진, 김은순, 신현규^{*}

한국한의학연구원 한약기초연구그룹

Comparative study on efficacies and ingredient contents of different solvent extracts of *Insam-paedok-san*

Hye-Sun Lim[#], Hyekyung Ha, Chang-Seob Seo, Seong Eun Jin, Yeji Kim, Woo-Young Jeon,
Sae-Room Yoo, In-Sik Shin, Jung-Hoon Kim, Seong-Sil Kim, Na Ra Shin, Mee-Young Lee,
Soo-Jin Jeong, Ohn Soon Kim, Hyeun-Kyoo Shin^{*}

Basic Herbal Medicine Research Group, Herbal Medicine Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine.

ABSTRACT

Objectives : This study evaluated activities and ingredient contents concerning extracts according to extraction solvents of *Insam-paedok-san* (IS, *Renshen bai du-san*).

Methods : The herbal constituents of IS were extracted with water and 70% ethanol at 100° C for 2 hr. Using the HPLC system, the six ingredient contents of different solvent extracts of IS were analyzed. The nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂) production and proinflammatory cytokines were measured in RAW264.7 cells stimulated with lipopolysaccharide (LPS). The macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22) and regulated on activation normal T-cell expression and secreted (RANTES/CCL5) production were measured in HaCaT and BEAS-2B cells stimulated tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ). The activities of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) and leptin level were measured in 3T3-L1 cells.

Results : The calibration curves showed good linearity ($r^2=1.0000$) for different concentration ranges. The contents of liquiritin, naringin, hesperidin, neohesperirin and glycyrrizin in 70% ethanol extracts of IS were relatively higher than that of water extract, however the content of ferulic acid in 70% ethanol and water extract of IS were similar. The extraction solvents of water and 70% ethanol were evaluated inhibitory effect on the production of NO, PGE₂, TNF- α and IL-6 in RAW 264.7 cells. Their extractions were inhibitory effect on production of MDC/CCL22 and RANTES/CCL5 in HaCaT cell and BEAS-2B cell, respectively. In addition, evaluated reduced on GPDH activity and leptin level in 3T3-L1 preadipocyte cell.

Conclusions : Our results suggest that IS extracts were inhibitory effects of disease such as inflammation, allergies and obesity.

Key words : *Insam-paedok-san* (*Renshen bai du-san*), anti-inflammation, anti-allergy, anti-obesity

서 론

다양한 질환에 대한 한약재 및 한약처방의 치료효과를 검

증하는 연구가 한약재를 비롯한 동물이나 식물의 추출물 등을 이용하여 임상적 치료에 적용하고 이를 기초로 신약개발에 노력하고 있다¹⁾. 특히, 한약 추출물은 양약에 비하여 독성이 없

*교신저자 : 신현규, 대전광역시 유성구 유성대로 1672, 한국한의학연구원 한약기초연구그룹

· Tel : 042-868-9464 · E-mail : hkshin@kiom.re.kr

#제1저자 : 임혜선, 대전광역시 유성구 유성대로 1672, 한국한의학연구원 한약기초연구그룹

· Tel : 042-868-9354 · E-mail : qp1015@kiom.re.kr

· 접수 : 2012년 10월 8일 · 수정 : 2012년 11월 3일 · 채택 : 2012년 11월 7일

거나 낮고 부작용이 적으며 병변에 대한 약리적 활성이 뛰어나므로 치료적 효과가 매우 높다는 임상적 보고가 계속 이어지고 있다²⁾. 한약재로부터 유효 성분을 추출하는 경우 대부분 유기용매나 고온 및 고압 조건을 사용하지만, 한약재가 함유하고 있는 성분함량은 추출방법과 용매 종류에 따라 달라질 수 있다³⁾. 따라서 추출 조건에 따른 한약재의 성분함량에 대해 다양한 질환의 효능 비교 연구가 필요한 실정이다.

인삼패독산 (人蔘敗毒散)은 감기 증상을 치료하는데 사용되는 한약처방이다⁴⁾. 인삼(人蔘), 시호(柴胡), 전호(前胡), 강활(羌活), 독활(獨活), 지각(枳殼), 길경(桔梗), 천궁(川芎), 적복령(赤茯苓), 감초(甘草), 박하(薄荷) 및 생강(生薑)의 12 가지 한약재로 구성된 처방으로, 진통과 해열작용, 신체의 면역능 강화 및 알러지로 인한 염증증상 완화에 대한 효과가 있는 것으로 보고되었다^{4,5)}. 인삼패독산의 구성 약재 중 지각의 주요성분인 naringin, hesperidin 및 neohesperidin, 천궁의 주요성분인 ferulic acid 및 감초의 주요성분인 liquiritin과 glycyrrhizin 등이 있으며, 구성 약재들의 주요성분들 중에서 4종의 flavonoid 계열 liquiritin, naringin, hesperidin 및 neohesperidin은 항염증, 항바이러스, 항산화 및 항암작용과 같은 많은 생리적인 활성을 가지고 있다고 보고되었으며⁶⁻⁸⁾, phenolic acid 계열인 ferulic acid는 radical에 의한 세포손상 보호, 항산화, 항돌연변이 및 당뇨 유도 뒤의 혈중 지질 개선효과 등이 보고되었다⁹⁻¹¹⁾. 또한, triterpenoid saponin 계열인 glycyrrhizin은 항염증, 해독 및 steroid 작용 등의 효과가 있는 것으로 보고되었다¹²⁻¹³⁾. 이와 같이 인삼패독산의 구성 약재들의 주요 성분에 대한 생리 활성은 많이 알려져 있지만, 이들 연구에서는 물 추출물 또는 유기용매 추출물만을 사용하거나 하나의 세포주를 가지고 특정 질환에 대한 효과를 확인하여 보고한 것으로 추출용매에 따른 성분함량 및 다양한 세포주를 이용한 효능 비교에 대한 연구 결과는 보고된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 추출 용매에 따른 인삼패독산의 성분 함량의 차이와 다양한 세포 주를 이용하여 항염증, 항알러지 및 항비만의 효능을 평가하였다. 인삼패독산을 물과 70% ethanol로 추출한 후, 이에 대한 성분 함량 및 다양한 세포 주에서의 효능을 비교하기 위하여 대식세포인 RAW 264.7 세포에서 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하여 염증 반응을 유도한 후, 염증매개물질인 nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), tumor necrosis factor- α (TNF- α) 및 interleukin-6 (IL-6)의 생성량을 측정하였으며, 각질형성세포주인 HaCaT 세포와 기도상피세포주인 BEAS-2B 세포에서 TNF- α 와 interferon- γ (IFN- γ)를 이용하여 알러지 반응을 유도한 후, 알러지 반응에 있어 중요한 표적물질로 알려진 macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22) 및 regulated on activation normal T-cell expression and secreted (RANTES/CCL5)와 같은 케모카인의 생성량을 확인하였다. 또한, 지방전구세포주인 3T3-L1 세포에서 비만으로 인한 지방축적 현상에 영향을 미치는 glycerol-3-Phosphate dehydrogenase (GPDH) 활성도와 leptin 농도에 대해 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 인삼패독산의 구성 한약재 (Table 1)는 광명당제약 (Ulsan, Korea)에서 각각 구입하였다. 구입한 한약재는 이제현 교수 (Dongguk University, Gyeongju, Korea)와 서영배 교수 (Daejeon University, Daejeon, Korea) 2인의 전문가 감별 후 사용하였으며, 각각의 구성 한약재들의 표본 (2012-KE14-1 ~ 2012-KE14-12)은 한국한의학연구원 한약기초연구그룹에 보관하였다.

2) 시약

표준물질인 liquiritin, hesperidin 및 neohesperidin은 NPC BioTechnology Inc. (Daejeon, Korea), Biopurify Phytochemicals Ltd. (Chengdu, China), 및 ChromaDex (Irvine, CA, USA)로부터 각각 구입하였으며, ferulic acid, naringin 및 glycyrrhizin은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)로부터 구입하였다. HPLC를 이용하여 측정된 각 표준물질의 순도는 모두 98.0% 이상이었다. 시료 전처리 및 HPLC 분석을 위한 methanol, acetonitrile, ethanol 및 water는 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA), acetic acid는 특급시약으로 Junsei Chemical Co. (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

세포 배양액인 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), new born calf serum (NCS), penicillin-streptomycin, phosphate-buffered saline (PBS)은 Gibco BRL사 (NY, USA), Cell counting kit-8 (CKK-8)은 Dojindo (Kumamoto, Japan) 제품을 사용하였다. LPS, N^G-methyl-L-arginine (L-NMMA), indomethacin은 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) 제품, 3T3-L1 differentiation Medium은 Zenbio Inc. (USA) 제품, PGE₂ ELISA kit는 Cayman Chemical (USA) 제품, IL-6 ELISA kit와 TNF- α ELISA kit은 Invitrogen (USA) 제품을 사용하였다. TNF- α , IFN- γ , human-MDC/CCL22 ELISA kit 및 human-RANTES/CCL5 ELISA kit, mouse leptin immunoassay kit는 R&D systems (Minneapolis, MN, USA) 제품, glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity assay kit는 TAKARA (Tokyo, Japan) 제품을 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

2. 방법

1) 표준액 조제

6종의 표준품인 liquiritin, ferulic acid, naringin, hesperidin, neohesperidin 및 glycyrrhizin의 표준용액은 메탄올을 이용하여 1.0 mg/mL의 농도로 조제한 후 4°C에 보관하면서 사용 전에 희석하여 사용하였다. 검량선은 liquiritin과 glycyrrhizin 0.78-100.00 μ g/mL, ferulic acid와 hesperidin 0.39-50.00 μ g/mL 및 naringin과 neohesperidin은 각각 3.13-400.00 μ g/mL 및 1.56-200.00 μ g/mL의 농도범위에서 표준용액을 이용하여 작성하였다.

2) 인삼패독산 추출물 및 검액 조제

인삼패독산 추출물은 Table 1과 같이 구성한약재를 무게 비율로 배합하여 물과 70% ethanol을 시료무게의 10배 부피 (각각 450 mL)로 각각 첨가하여 2시간 전탕 한 후 동결건조 하여 물 추출물 9.4 g (수율 20.89%)과 70% ethanol 추출물 9.3 g (수율 20.17%)을 얻었다. HPLC 분석을 위하여 물 추출물과 70% ethanol 추출물에 대하여 각각 200 mg을 정확히 측정 한 후 물을 넣어 20 mL로 맞춘 후 0.2 μm membrane 여과 (Woongki Science, Seoul, Korea) 후 검액으로 하였다.

Table 1. Composition of *Insampaedok-san*.

Scientific name	Latin name	Amount (g)	Source
<i>Panax ginseng</i>	Ginseng Radix Alba	3.75	Geumsan, Korea
<i>Bupleurum falcatum</i>	Bupleuri Radix	3.75	China
<i>Angelica decursiva</i>	Angelicae Decursivae Radix	3.75	China
<i>Ostericum koreanum</i>	Osterici Radix	3.75	China
<i>Aralia continentalis</i>	Araliae Continentalis Radix	3.75	Yeongcheon, Korea
<i>Citrus aurantium</i>	Aurantii Fructus Immaturus	3.75	China
<i>Platycodon grandiflorum</i>	Platycodi Radix	3.75	Yeongcheon, Korea
<i>Cnidium officinale</i>	Cnidii Rhizoma	3.75	Yeongcheon, Korea
<i>Poria cocos</i>	Hoelen	3.75	China
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	Glycyrrhizae Radix	3.75	China
<i>Mentha arvensis</i>	Menthae Herba	3.75	Yeongcheon, Korea
<i>Zingiber officinale</i>	Zingiberis Rhizoma Crudus	3.75	Yeongcheon, Korea
Total amount		45.00	

3) HPLC 분석

인삼패독산 내 주요성분인 liquiritin, ferulic acid, naringin, hesperidin, neohesperidin 및 glycyrrhizin의 함량을 분석하기 위하여 Shimadzu사의 LC-20A 시스템을 사용하여 측정하였다. HPLC는 LC-20A 시스템 (Shimadzu Co., Kyoto, Japan)은 pump (LC-20AT), on-line degasser (DGU-20A3), column oven (CTO-20A), autosampler (SIL-20AC) 및 PDA detector (SPD-M20A)로 구성되어 있다. 분석 data는 LC solution software (Version 1.24)를 이용하여 처리하였다. 분석에 사용된 칼럼은 Gminin C₁₈ (5μm, 4.6×150 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) 칼럼을 사용하였고, 칼럼온도는 40℃로 유지하였다. 유속은 1.0 mL/min으로 흘러주었으며 주입량은 10 μl였다. 이동상은 A (1.0% acetic acid가 함유된 water)와 B (1.0% acetic acid가 함유된 acetonitrile)를 사용하여 기울기 용매조건 ((A)/(B) = 85/15 (0 min) → (A)/(B) = 35/65 (40 min) → (A)/(B) = 0/100 (45 min, hold for 5 min) → (A)/(B) = 85/15 (55 min, hold for 15 min))으로 흘러주었으며, 검출파장은 254 nm (glycyrrhizin), 280 nm (liquiritin, naringin, hesperidin 및 neohesperidin) 및 320 nm (ferulic acid)에서 검출하였다.

4) 세포배양

마우스 대식세포주인 RAW 264.7 (mouse macrophage cell line)과 기관지상피세포주인 BEAS-2B (human bronchial epithelial cell line)는 American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)로부터 분양 받았으며, 각질형성세포주인 HaCaT (human keratinocyte cell line)은 이나경 교수 (Sejong University, Seoul, Korea)로부터 분양 받았다. 세포배양을 위해 RAW 264.7 세포는 5.5% FBS, BEAS-2B와 HaCaT 세포는 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37℃, 5% CO₂조건에서 배양하였다.

지방전구세포주인 3T3-L1 (murine 3T3-L1 preadipocytes)는 ATCC에서 분양 받았으며, 세포배양을 위해 10% NCS를 포함한 DMEM 배지로 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 지방세포의 분화를 유도하기 위해 3T3-L1 세포에 분화 유도 물질인 5 μg/mL insulin, 1 μM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)가 포함된 3T3-L1 differentiation medium을 2일 동안 처리하였고 다시 10% FBS와 1 μg/mL insulin을 포함한 DMEM 배지로 교환하여 2일간 배양하면서 지방을 축적시켰다. 분화 유도 4일째부터는 10% FBS가 포함된 DMEM 배지로 교환하며 지방방울의 형성을 근거로 하여 2일에 한번씩 지방세포로 분화시켰다.

5) 세포독성 평가

물 추출물과 70% ethanol 추출물의 수율이 다르므로 모든 실험은 추출 전 건조약제의 양으로 맞추어 진행하였다. RAW 264.7 (3×10³ cells/well), HaCaT (1×10³ cells/well), BEAS-2B (6×10³ cells/well) 및 3T3-L1 (5×10⁴ cells/well) 세포를 96 well plate에서 18시간 배양한 후, 인삼패독산 추출물 (물과 70% ethanol)을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이어서 CCK-8 용액 10 μl를 첨가하여 4시간 동안 반응시킨 후 microplate reader (Benchmark Plus, Bio-Rad, MN, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 상대적인 세포 생존율 (% of control)을 계산하였다. 이후의 실험은 세포 독성이 나타나지 않는 최고 농도를 기준으로 진행하였다.

6) NO, PGE₂ 및 Cytokine 생성량 측정

RAW 264.7 (2.5×10⁵ cells/well) 세포를 48 well plate에 분주하고, 인삼패독산 추출물 (물과 70% ethanol)과 LPS (1 μg/mL)를 동시에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태를 통해 측정하였다. 세포배양 상등액 50 μl와 Griess 시약 [1% (w/v) sulfanilamid, 0.1% (w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (w/v) phosphoric acid] 100 μl를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 NO 생성 억제제인 L-NMMA를 사용하였다. 표준농도 곡선은 sodium nitrate (NaNO₂)를 연속 희석하여 얻었다 (1-100 μM).

NO 생성량 측정에 사용했던 동일한 세포배양 상등액을 PGE₂ 및 cytokine 측정에 사용하였으며, 각 ELISA kit의 제조사 방법에 따라 세포 배양액 내에 존재하는 PGE₂, TNF- α 및 IL-6의 생성량을 측정하였다. PGE₂의 생성억제에 대한 양성 대조군으로 indomethacin을 사용하였다.

7) 세포 배양액 내의 Chemokine 측정

HaCaT (1×10^6 cells/well)과 BEAS-2B (5×10^5 cells/well) 세포를 6 well plate에 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에 배양하였다. 18시간 배양한 후, serum-free DMEM 배지로 교체하고 HaCaT 세포는 인삼패독산 추출물(물과 70% ethanol)과 TNF- α 와 IFN- γ (각각 10 ng/mL)을 동시에 처리하였고, BEAS-2B 세포는 인삼패독산 추출물(Water와 70% ethanol)과 TNF- α (10 ng/mL)을 동시에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. ELISA kit를 이용하여 제조사의 방법에 따라 세포 배양액 내에 존재하는 MDC 및 RANTES의 분비량을 측정하였다.

8) GPDH 활성도 및 Leptin 농도 측정

3T3-L1 (1×10^5 cells/well) 세포를 48 well plate에 분주한 후, 인삼패독산 추출물(물과 70% ethanol)을 처리하여 분화를 유도하였다. GPDH 활성도를 측정하기 위해 분화 유도 후 배양액을 수거한 cell은 PBS로 2회 세척하고 enzyme extract buffer를 이용하여 세포단백질을 추출하였다. 추출된 동일한 양의 단백질을 2-mercaptoethanol이 포함된 dilution buffer로 희석한 뒤 substrate와 반응시켜 30°C에서 20분간 흡광도의 변화를 340 nm에서 측정하였다. 측정된 GPDH 활성도 단위는 1분당 1 nmol NADH를 산화시키는 것을 1 unit으로 하여 unit/mL로 나타내었다. 세포 배양액 내의 leptin 양을 측정하기 위해 ELISA kit를 이용하여 제조사의 방법에 따라 수행하였다.

3. 통계처리

모든 실험값은 Mean \pm S.E.M.으로 표시하였다. 실험결과에 대한 통계학적 유의성 검정은 ANOVA검정을 적용하였으며, Dunnett's multiple comparison test를 이용하여 P값이 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 분석 조건 확립

인삼패독산의 구성 약제 중 지각의 주요성분인 naringin, hesperidin 및 neohesperidin, 천궁의 주요성분인 ferulic acid 및 감초의 주요성분인 liquiritin과 glycyrrhizin을 분석 대상으로 HPLC 시스템을 이용하여 확인한 결과, 6종의 성분은 11.57, 12.78, 13.44, 13.90, 14.59 및 29.17분에 각각 검출되었다 (Fig. 1).

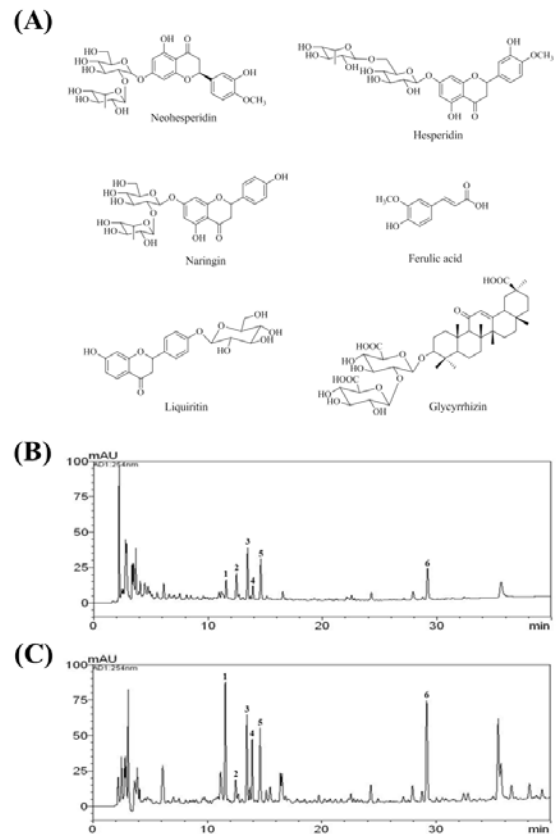


Figure 1. Chemical structures and HPLC chromatograms analysis in *Insam-paedok-san*. Structures of six constituents (A) and HPLC chromatograms of water (B) and 70% ethanol extract (C). Liquiritin (1), ferulic acid (2), naringin (3), hesperidin (4), neohesperidin (5), and glycyrrhizin (6).

2. 함량 분석

인삼패독산의 함량분석을 위한 표준용액의 검량선은 Table 2와 같으며 6종 모두 상관계수가 1.0000으로 아주 양호한 직선성을 나타내었다. 6종 성분의 검출한계 (LOD)와 정량한계 (LOQ)는 신호대 잡음비의 값으로 3과 10으로 각각 계산하였으며, 그 범위는 0.03-0.09 $\mu\text{g/mL}$ 과 0.09-0.31 $\mu\text{g/mL}$ 로 각각 나타났다. 또한 6종 성분의 피크 면적과 머무름 시간에 대한 재현성은 모두 상대표준편차가 1.00%와 0.03% 이내로 양호한 재현성을 나타내었다 (Table 2).

이상과 같이 확립된 조건으로 인삼패독산의 물 추출물과 70% ethanol 추출물 내의 liquiritin, ferulic acid, naringin, hesperidin, neohesperidin 및 glycyrrhizin 6종 성분에 대한 함량은 0.99-6.38 mg/g과 1.11-11.01 mg/g으로 각각 나타났다. 또한, ferulic acid를 제외한 5종 성분은 물 추출물보다 70% ethanol 추출물에서 높은 함량을 나타냈으며 ferulic acid는 두 추출물간의 함량차이가 거의 없었다 (Table 3).

Table 2. Linear ranges, regression equation, LOD, LOQ, and repeatability.

Component	Linear range (mg/mL)	Regression equation	Correlation coefficient (r^2)	LOD ^b (mg/mL)	LOQ ^c (mg/mL)	Repeatability (% RSD)	
						Retention time	Peak area
Liquiritin	0.78-100.00	$Y = 16,546.59x + 327.71$	1.0000	0.09	0.29	0.02	0.94
Ferulic acid	0.39-50.00	$Y = 46,824.31x - 4,190.75$	1.0000	0.03	0.09	0.03	0.73
Naringin	3.13-400.00	$Y = 15,866.42x + 3,406.43$	1.0000	0.08	0.27	0.03	0.26

Hesperidin	0.39-50.00	$Y = 18,561.95x - 244.18$	1,0000	0.08	0.26	0.02	0.98
Neohesperidin	1.56-200.00	$Y = 19,357.24x + 1,447.17$	1,0000	0.07	0.22	0.02	0.98
Glycyrrhizin	0.78-100.00	$Y = 8,513.98x + 1,124.60$	1,0000	0.09	0.31	0.01	0.92

^a Y = peak area (mAU) of the components. x = concentration (mg/mL) of the components.

^b LOD = 3' signal-to-noise (S/N) ratio.

^c LOQ = 10' signal-to-noise (S/N) ratio.

Table 3. Analytical results (mg/g herb) of the 6 compounds in Insampaedok-san.

Component	Water Extract			70% Ethanol Extract		
	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)
Liquiritin	1.75	0.01	0.52	9.35	0.02	0.19
Ferulic acid	1.17	0.01	0.43	1.11	0.00	0.28
Naringin	6.38	0.02	0.36	11.01	0.02	0.20
Hesperidin	0.99	0.01	0.91	2.64	0.01	0.48
Neohesperidin	5.08	0.01	0.26	9.17	0.02	0.24
Glycyrrhizin	2.29	0.01	0.27	7.68	0.01	0.07

3. 세포독성평가

RAW 264.7, HaCaT, BEAS-2B 및 3T3-L1 세포에 인삼패독산 물 추출물과 70% ethanol 추출물을 농도별 (15.6 ~ 1000 $\mu\text{g/mL}$)로 연속 희석하여 처리한 후, 24시간 동안 배양하고 CCK-8 방법을 이용하여 세포독성을 관찰하였다. 세포독성은 무처리군의 세포생존율 (cell viability; 100%)을 기준으로 RAW 264.7 세포는 인삼패독산 물 추출물과 70% ethanol 추출물 모두 250 $\mu\text{g/mL}$ 범위 내에서, HaCaT 과 BEAS-2B 세포는 물 추출물에서 500 $\mu\text{g/mL}$, 70% Ethanol 추출물에서 125 $\mu\text{g/mL}$ 범위 내에서 독성이 나타나지 않았으며, 3T3-L1 세포는 두 종류의 추출물 모두 1000 $\mu\text{g/mL}$ 범위 내에서 세포독성이 없는 것으로 나타났다 (data not shown). 따라서 이후 실험은 독성이 없는 농도 범위에서 수행하였다.

4. RAW 264.7 세포에서 NO, PGE₂ 및 염증성 Cytokine 생성량에 미치는 영향

대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 인삼패독산의 물 추출물과 70% ethanol 추출물에 대한 NO와 PGE₂ 생성억제효과를 평가하였다. LPS에 의해 증가되는 NO의 생성량이 인삼패독산 물 추출물과 70% ethanol 추출물에서 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었으며, LPS 처리군과 비교하여 인삼패독산 물 추출물과 70% ethanol 추출물의 최고 농도인 125 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 15.7%와 32.7%의 유의성 있는 NO 생성억제효과를 나타냈다 ($P < 0.01$, Fig. 2A). LPS에 의해 유도되는 PGE₂의 생성에 미치는 영향을 평가한 결과, RAW 264.7 세포에 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS를 처리했을 때, PGE₂ 생성량은 무처리군 (0.208 ± 0.007 ng/mL)과 비교하여 17배 (3.623 ± 0.077 ng/mL, $P < 0.01$) 이상 증가되었고 인삼패독산 물 추출물과 70% ethanol 추출물의 최고 농도 125 $\mu\text{g/mL}$ 에서 LPS 처리군과 비교하여 각각 36.3%, 84.9%의 PGE₂ 생성억제효과를 나타냈다 ($P < 0.01$, Fig. 2B). 인삼패독산 물 추출물과 70% ethanol 추출물이 LPS로 유도된 염증성 사이토카인 TNF- α 와 IL-6 생성량에 미치는 영향을 평가한 결과, 각각의 추출물에서 농도 의존

적으로 생성억제효과를 나타냈다. TNF- α 의 경우, 물 추출물과 70% ethanol 추출물의 최고 농도 125 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 57.8% ($P < 0.01$), 30.6% ($P < 0.05$)의 생성억제효과를 보였으며 (Fig. 2C), IL-6의 생성량 평가에서는 물 추출물과 70% ethanol 추출물의 최고 농도 125 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 63.7%, 68.6%의 유의적인 감소 효과를 나타냈다 ($P < 0.01$, Fig. 2D).

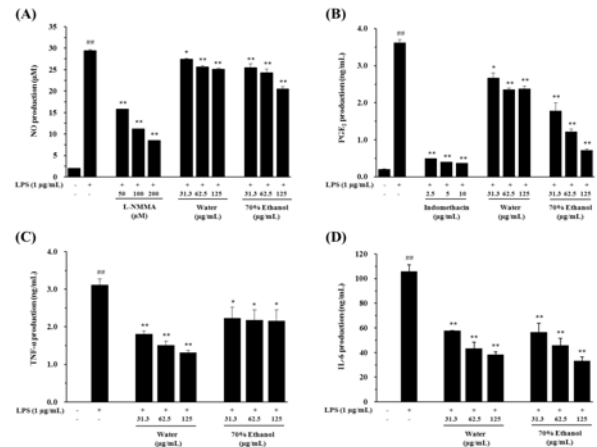


Figure 2. Effect of water and 70% ethanol extract on LPS-stimulated NO, PGE₂, TNF- α and IL-6 production in RAW 264.7 cells. The production of NO (A), PGE₂ (B), TNF- α (C) and IL-6 (D) was measured in culture medium of cells treated with water and 70% ethanol extract (31.3, 62.5, 125 $\mu\text{g/mL}$) and then co-stimulated with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) for 24h. L-NMMA (50, 100, 200 μM) and indomethacin (2.5, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$) were used as positive controls. Each bar represents the mean of three independent experiments. [#] $P < 0.01$ vs. vehicle control group; ^{*} $P < 0.05$ and $P < 0.01$ vs. LPS-treated cells, respectively.

5. HaCaT 세포와 BEAS-2B 세포에서 MDC 및 RANTES의 생성량에 미치는 영향

각질형성세포주인 HaCaT과 기관지상피세포주인 BEAS-2B 세포에서 인삼패독산 물 추출물과 70% ethanol 추출물이 MDC 및 RANTES 생성에 미치는 영향을 확인하였다. HaCaT 세포에 TNF- α 와 IFN- γ 처리시 MDC는 무처리군 (1.44 ± 0.45 ng/mL)과 비교하여 16배 (23.30 ± 0.79 ng/mL, $P < 0.01$) 이상 증가되었다. 인삼패독산 추출물을 처리한 결과, TNF- α 와 IFN- γ 처리군과 비교하여 물 추출물의 최고 농도 500 $\mu\text{g/mL}$ 에서 90.3%, 70% ethanol 추출물의 최고 농도 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 95.3%의 유의성 있는 MDC 생성억제효과를 나타냈다 ($P < 0.01$, Fig. 3A). 또한, RANTES의 경우 인삼패독산 물 추출물과 70% ethanol 추출물 처리시, TNF- α 와 IFN- γ 처리군과 비교하여 각각의 최고 농도 500 $\mu\text{g/mL}$ 과 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 47.4%, 97.8%의 유의적인 RANTES 생성억제효과를 나타냈다 ($P < 0.01$, Fig. 3B). BEAS-2B 세포에서 인삼패독산 추출물에 대한 RANTES 생성에 미치는 영향을 확인한 결과, TNF- α 단독 처리군 (286.8 ± 34.13 ng/mL, $P < 0.01$)과 비교하여 물 추출물의 최고 농도 500 $\mu\text{g/mL}$ 에서 17.9%의 감소 효과를 보였으며, 70% ethanol 추출물에서 농도 의존적으로 RANTES 생성을

억제하였다 ($P < 0.01$, Fig. 3C).

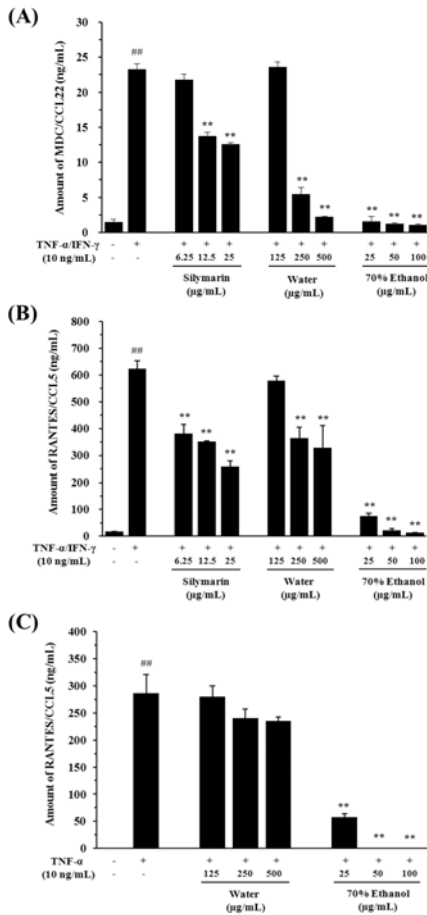


Figure 3. Effect of water and 70% ethanol extract on TNF- α and IFN- γ stimulated chemokine production in HaCaT cells and BEAS-2B cells. The production of MDC (A) and RANTES (B) on TNF- α and IFN- γ (each 10 ng/mL) co-stimulated in HaCaT cells and production of RANTES (C) on TNF- α (10 ng/mL) stimulated in BEAS-2B cells was measured in culture medium of cells treated with water extract and 70% ethanol extract (31.3, 62.5, 125 μ g/mL) for 24h. Silymarin (6.25, 12.5, 25 μ g/mL) is used as positive control drug. Each bar represents the mean of three independent experiments. $^{##}P < 0.01$ vs. vehicle control group; $^{*}P < 0.01$ vs. TNF- α and IFN- γ treated cells, respectively.

6. 3T3-L1 세포에서 GPDH 활성 및 leptin 농도에 미치는 영향

인삼패독산 추출물이 3T3-L1 지방전구세포에서 GPDH 활성 및 leptin 농도에 미치는 영향을 확인한 결과, GPDH 활성도 측정에서 대조군 (24.83 ± 0.68 μ g/mL)과 비교하여 물 추출물과 70% ethanol 추출물 모두 농도 의존적으로 유의성 있는 감소 효과를 확인하였다. 물 추출물과 70% ethanol 추출물 최고 농도 1000 μ g/mL에서 각각 79.3%, 95.9%의 GPDH 활성 억제효과를 나타냈다 ($P < 0.01$, Fig. 4A). Leptin 농도 측정결과에서 대조군 (2.52 ± 0.17 ng/mL)과 비교하여 인삼패독산 물 추출물의 최고 농도 1000 μ g/mL에서 65.2%의 감소 효과 ($P < 0.01$)를 보였

으나 농도 의존적인 효과는 나타나지 않았으며, 70% ethanol 추출물을 처리한 군의 최고 농도 1000 μ g/mL에서 94.4% ($P < 0.01$)로 농도 의존적으로 leptin 분비를 유의적으로 억제하는 것을 확인하였다 (Fig. 4B).

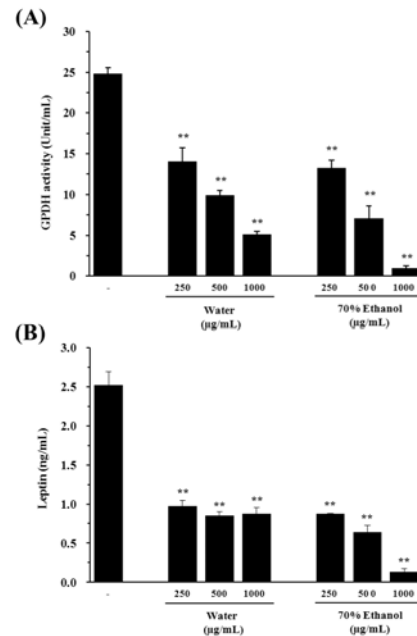


Figure 4. Effect of water and 70% ethanol extract on GPDH activity and leptin level in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 cells were treated with or without water and 70% ethanol extract during differentiation for 6 days after they had become confluent. The results are representative of three replicates per experiment and the experiment was replicated twice. GPDH activities (A) and leptin level (B) were measured as described in Materials and Methods. Control (-): no addition of water and 70% ethanol extract cells were differentiated on day 6. $^{**}P < 0.01$ vs. vehicle control group.

고찰

한방처방은 여러 종의 한약재를 배합하여 탕제, 환제, 엑스제 등으로 사용되어지며, 한약의 배합에 물을 가하여 끓인 후 그 성분을 용출시킨다¹⁴. 전통적으로 탕제는 물로 추출하는 것이 일반적이지만, 친수성 용매인 물과 소수성 용매인 에탄올을 적절히 이용한 추출법이 가장 효과적인 성분을 얻을 수 있다¹⁵. 그러나 약효물질은 세포안과 세포밖에 모두 위치하고 있으므로 세포막을 파괴하기 위해서는 70% ethanol로 추출하는 것이 가장 유용하다^{3,15}. 이에 따라 같은 한약재라도 추출되는 성분 혹은 성분함량의 차이에 따라서 효능이 달라질 수 있다. 본 연구에서는 인삼패독산의 추출용매에 따른 성분 함량 및 효능의 변화를 규명하기 위하여 인삼패독산의 물 추출물과 70% ethanol 추출물을 사용하여 다양한 세포주에 대해 효능을 검증하고 추출용매에 따른 효능을 비교하였다.

인삼패독산의 구성 약재 중 지각의 주요성분인 naringin, hesperidin 및 neohesperidin, 천궁의 주요성분인 ferulic acid 및 감초의 주요성분인 liquiritin과 glycyrrhizin에 대한 6종의 성분함량 분석을 실시한 결과, ferulic acid를 제외한 5종 성분들은 인삼패독산 물 추출물보다 70% ethanol 추출

물에서 1.6배 이상 함량이 높게 추출되었다. 이는 물 추출물과 비교하여 70% ethanol 추출물에 포함된 flavonoid 계열의 성분함량이 높게 분석된 차이인 것으로 판단된다.

대식세포는 선천성 면역에 중요한 역할을 담당하는 세포로서, 염증반응 시에는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해서 만들어지는 NO와 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해서 과량 만들어지는 PGE₂등과 같은 염증 촉진 인자들을 생성한다¹⁶⁾. 또한, LPS에 의해 유도된 대식세포에서 염증매개 물질인 TNF- α 와 IL-6 등과 같은 사이토카인을 생산하여 염증반응을 매개한다¹⁷⁾. RAW 264.7 세포에 24시간의 LPS 처리로 증가된 NO와 PGE₂생성량은 인삼패독산 물 추출물과 70%의 ethanol 추출물에 의해 유의적으로 억제되었고, 그 억제능은 물 추출물에 비해 70% Ethanol 추출물이 높은 것으로 확인되었다. 또한 TNF- α 와 IL-6도 물 추출물과 70% ethanol 추출물에 의해 유의적으로 억제되었으나 두 추출물 간의 뚜렷한 효과 차이는 나타나지 않았다. 인삼패독산 물 추출물에 비해 70% ethanol 추출물에서 상대적으로 높은 항염증 활성을 나타내었으며, 이는 항염증 활성을 갖는 성분들이 물 추출물에 비해 70% ethanol 추출물에서 높은 함량으로 인한 효과 차이로 판단된다.

염증 반응이 지속적으로 일어나게 되면 과민성 알러지 질환이나 만성 염증 질환, 순환기 장애 등과 같은 다양한 질환의 원인을 제공하게 된다¹⁸⁾. 이러한 반응은 각질형성세포나 기도상피세포의 T 림프구에서 분비하는 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IFN- γ 등에 의해서 활성화 된다고 알려져 있으며, 알러지성 질환의 발현과 진행에 있어 MDC 및 RANTES는 중요한 표적물질로 알려진 케모카인이다¹⁹⁾. MDC/CCL22는 CC 케모카인으로 macrophage, keratinocyte 및 epithelial cell에서 분비된다고 알려져 있으며²⁰⁾, RANTES/CCL5는 피부 섬유질과 아토피 환자에서 많이 분비되는 케모카인으로 kruppel-like factor 13 (KLF13)에 의해 T 세포를 조절한다고 보고되었다²¹⁾. 인삼패독산의 물 추출물과 70% Ethanol 추출물에 대해 각질형성세포 (HaCaT)와 기도상피세포 (BEAS-2B)의 MDC와 RANTES 생성의 억제효과를 확인한 결과, 두 추출물 모두 농도 의존적으로 유의적인 효과를 나타냈으며, 특히 물 추출물과 비교하여 70% ethanol 추출물에서의 억제효과가 더 높은 것으로 확인되었고, 이는 70% ethanol 추출 시 아토피 피부염 혹은 천식과 같은 항알러지 치료에 효과적인 성분들이 더 많이 추출되는 것으로 사료된다.

지방전구세포인 3T3-L1은 mouse fibroblast인 3T3 세포에서 유래된 세포주로서 adipocyte로 분화하는 성질을 가지고 있다²²⁾. 분화된 3T3-L1 세포는 지방세포로서의 형태를 나타내게 되며, 지방축적을 유도하는 효소의 활성화가 일어나게 된다²³⁾. 지방축적에 관여하는 효소 중 하나인 GPDH는 adipogenesis 과정이 진행되면서 그 활성이 증가하며 3T3-L1 세포가 지방세포로 전환되는 동안 GPDH 활성이 증가한다고 알려져 있다²⁴⁾. 또한, 지방세포에서 분비되고 체중 및 체지방 축적과 관련이 있는 leptin은 에너지 균형을 위한 뇌와 지방조직 사이의 신호전달물질로 알려져 있다²⁵⁾. 인삼패독산의 물 추출물과 70% ethanol 추출물의 지방세포 분화 억제 효과를 비교한 결과, GPDH 활성이 두 추출물 모두에 농도 의존적으로 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으며, 특히 70% ethanol 추출물에서 물 추출물에 비해 감소율이

높은 것으로 나타났다. 지방세포 배양액 중의 leptin의 분비량을 측정된 결과, 물 추출물을 처리한 군에서는 유의적인 감소 효과는 있으나 농도 의존적인 영향은 나타나지 않았고 70% ethanol 추출물을 처리한 군에서는 leptin의 농도가 농도 의존적으로 유의적인 감소 효과를 보였으며 물 추출물에 비해 높은 leptin 생성을 저해하였다. 따라서 인삼패독산 70% ethanol 추출물에서 항비만 활성을 갖는 성분들이 많이 포함되어 있는 것으로 판단된다.

결론

인삼패독산의 추출 용매에 따른 성분함량 및 효능 연구를 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 인삼패독산을 물과 70% ethanol를 이용하여 추출한 추출물을 대상으로 4종의 flavonoid류 (liquiritin, naringin, hesperidin 및 neohesperidin), 1종의 phenolic acid (ferulic acid) 및 1종의 triterpenoid saponin (glycyrrhizin)에 대하여 동시분석을 실시한 결과, 물 추출물보다 70% ethanol 추출물에서 4종의 flavonoid류 및 glycyrrhizin이 높은 함량을 나타내었다.
2. RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도되는 염증인자인 NO 및 PGE₂ 생성에 대한 효능을 확인한 결과, 물 추출물에 비해 70% ethanol 추출물에서 큰 억제 효과를 나타냈으며, 염증성 cytokines인 TNF- α 와 IL-6 생성량은 물 추출물과 70% ethanol 추출물을 처리시 억제 효과는 있으나 추출용매간의 효과 차이는 나타나지 않았다.
3. HaCaT 세포와 BEAS-2B 세포에서 TNF- α 와 IFN- γ 로 유도되는 알러지 질환의 표적물질로 알려진 MDC 및 RANTES 생성에 대한 효능을 비교한 결과, 두 가지의 추출물 모두 유의적인 효과를 확인하였으며, 그 중 물 추출물에 비해 70% ethanol 추출물을 처리한 군에서 높은 억제 효과를 확인하였다.
4. 3T3-L1 세포에서 지방 축적에 관여하는 활성 효소들에 대한 효과를 확인한 결과, 물 추출물과 70% ethanol 추출물에서 GPDH 활성과 leptin 농도를 유의적으로 저해하는 것을 확인하였다.

이러한 실험 결과로 미루어 볼 때, 인삼패독산은 염증, 알러지 그리고 비만과 같은 질환에 예방 및 치료 효과가 있을 것으로 사료되며, 이러한 효과는 물 추출물보다 70% ethanol 추출물에서 효과가 더욱 뚜렷하였다. 이러한 차이는 flavonoid 계열의 성분함량이 물 추출물과 비교하여 70% ethanol 추출물에서 높았기 때문일 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원에서 지원하는 '표준한방처방 EBM구축사업 (K12031)'에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Lee KA, chung HY. Biological activities of a korean traditional prescription nogyongdaebotang. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2004 ; 33(1) : 28-33.
- Deliza R, Rosenthal A, Abadio FBD, Carlos HO, Silva, Castillo C. Application of high pressure technology in the fruit juice processing: Benefits perceived by consumers. *J Food Eng*. 2005 ; 67(1-2) : 241-6.
- Kim TJ, Seo EY, Jang YS, Kim SH, Kim DH, Chu VM, Kim DH, Kang JS. Influential characteristics of decoction waters on extraction of components in corydalis tuber analyzed by multiple factor analysis. *Korean J Pharmacogn*. 2012 ; 43(1) : 16-21.
- Im GY, Hwang YH, Lee JH, Oh YC, Cho WK, Ma JY. Acute toxicity study on Insampaedok-san and fermented Insampaedok-san. *Korean J Oriental Prev Med Soci*. 2011 ; 15(3) : 141-52.
- Weon JB, Ma JY, Yang HJ, Ma CJ. Quantitative analysis of compounds in fermented Insampaedok-san and their neuroprotective activity in HE22 cells. *Nat Prod sci*. 2011 ; 17(1) : 58-63.
- Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Parmacol Ther*. 2002 ; 96(2) : 67-202.
- Jung UJ, Kim HJ, Lee JS, Lee MK, Kim HO, Park EJ, Kim HK, Jeong TS, Choi MS. Naringin supplementation lowers plasma lipids and enhances erythrocyte antioxidant enzyme activities in hypercholesterolemic subjects. *Clin Nutr*. 2003 ; 22(6) : 561-8.
- Kim HJ, Jung UJ, Lee MK, Park YB, Cho MS. Lipidlowering efficacy of hesperitin metabolites in high-cholesterol fed rats. *Clin Chim Acta*. 2003 ; 327(1-2) : 129-37.
- Ogiwara T, Satoh K, Murakami Y, Unten S, Atsu T, Sakagami H, Fujisawa S. Radical scavenging activity and cytotoxicity of ferulic acid. *Antican Res*. 2002 ; 22(5) : 2711-7.
- Chun HS, You JE, Kim IH, Cho JS. Comparative antimutagenic and antioxidative activities of rice with different milling fractions. *Korean J Food Sci Technol*. 1999 ; 31(5) : 1371-7.
- Balasubashini MS, Rukkumani R, Menon VP. Protective effects of ferulic acid on hyperlipidemic diabetic rats. *Acta Diabetol*. 2003 ; 40(3) : 118-22.
- Kim JY, Park SJ, Yun KJ, Cho YW, Park HJ, and Lee KT. Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-Induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF- κ B in Raw 264.7 macrophages. *Eur J Med Chem*. 2008 ; 584(1) : 175-84.
- Asada Y, Li W, and Yoshikawa T. Biosynthesis of the dimethylallyl moiety of glabrol in *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures via a non-mevalonate pathway. *Phytochemistry*. 2002 ; 55(4) : 323-6.
- Hong ND, Kim JW, Kim NJ, Kim JS, chang KS. Studies on quantities of components and the pharmacological activities in the preparational method of decoction of crud drugs preparations. *Korean J Pharmacogn*. 1991 ; 22(1) : 67-8.
- Kim KH, Roh SG, Li CR, Jin CF, Kin A, Choi WC. Anti-diabetic effects of banaba leaf extracts (*Lagerstroemia speciosa* Pers.) through solvents. *J life sci*. 2008 ; 18(9) : 1305-11.
- Hernández-Ledesma B, Hsieh CC, de Lumen BO. Antioxidant and anti-inflammatory properties of cancer preventive peptide lunasin in RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 ; 390(3) : 803-8.
- Abdelwahab SI, Hassan LE, Sirat HM, Yagi SM, Koko WS, Mohan S, Taha MM, Ahmad S, Chuen CS, Narrima P, Rais MM, Hadi AH. Anti-inflammatory activities of cucurbitacin E isolated from *Citrullus lanatus* var. *citroides*: Role of reactive nitrogen species and cyclooxygenase enzyme inhibition. *Fitoterapia*. 2011 ; 82(8) : 1190-7.
- Kay AB. Overview of 'allergy and allergic diseases: with a view to the future'. *Br Med Bull*. 2000 ; 56(4): 843-64.
- Vestergaard C, Bang K, Gesser B, Yoneyama H, Matsushima K, Larsen CG. A TH2 chemokine, TARC, produced by keratinocytes may recruit CLA+CCR4+ lymphocytes into lesional atopic dermatitis skin. *J Invest Dermatol*. 2000 ; 115(4) : 640-6.
- Jang SY, Han EH, Jeong HG, Kim DH. Effects of SJSBT on Various Immunological Factors in Skin Related to Pathogenesis of Allergic Dermatitis in DNCB Treated NC/Nga Mice. *Korean J Oriental Physiol Pathol*. 2007 ; 21(5) : 1099-107.
- Taha RA, Minshall EM, Leung DY, Boguniewicz M, Luster A, Muro S, Toda M, Hamid QA. Evidence for increased expression of eotaxin and monocyte chemoattractant protein-4 in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 ; 105(5) : 1002-7.
- Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and differenziarion in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*. 1975 ; 5(1) : 19-27.
- Kim HS, Liang L, Dean RG, Hausman DB, Hartzell DL, Baile CA. Inhibition of preadipocyte differentiation by myostatin treatment in 3T3-L1 cultures. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 ; 281(4) : 902-6.
- Grégoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*. 1998 ; 78(3) : 783-809.
- Isaia GC, D'amelio P, Di Bella S, Tamone C. Is leptin the link between fat and bone mass?. *J Endocrinol Invest*. 2005 ; 28(10) : 61-5.