

오적산의 추출 용매 차이에 따른 염증 및 염증 관련 질환에 대한 효능 비교

유새롬, 정수진, 김예지, 임혜선, 진성은, 전우영, 신인식, 신나라
김성실, 김정훈, 하혜경, 이미영, 김은순, 서창섭, 신현규
한국한의약연구원 한약기초연구그룹

Effects of water and ethanol extracts from *Ojeok-san* on inflammation and its related diseases

Sae-rom Yoo, Soo-jin Jeong, Ye-ji Kim, Hye-sun Lim, Seong-eun Jin, Woo-young Jeon, In-sik Shin, Na-ra Shin
Seong-sil Kim, Jung-hoon Kim, Hye-kyung Ha, Mee-young Lee, Ohn-soon Kim, Chang-seob Seo, Hyeun-kyoo Shin
Basic Herbal Medicine Research Group, Herbal Medicine Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine

ABSTRACT

Objectives : *Ojeok-san*, a traditional herbal formula, has been used for the treatment of cold illness and its related symptoms such as headache, nausea and indigestion. This study was performed to compare effects of water (OJSW) and 70% ethanol extracts (OJSE) of *Ojeok-san* on inflammation and its related diseases atopy, asthma and obesity *in vitro*.

Methods : We performed HPLC to investigate contents of index components of OJSW and OJSE. We investigated the effects of OJSW and OJSE with an *in vitro* model, using 5 cell lines, specifically RAW 264.7, HaCaT, MC/9, BEAS-2B and 3T3-L1.

Results : HPLC analysis displayed that the contents of index components were higher in OJSE than OJSW. In lipopolysaccharide (LPS)-treated RAW 264.7 macrophages, OJSE significantly inhibited productions of interleukin (IL)-6, nitrite and prostaglandin E₂ (PEG₂). In TNF- α /IFN- γ -treated HaCaT keratinocytes, OJSE significantly lowered levels of macrophage-derived chemokine (MDC) as well as regulated and normal T cell expressed and secreted (RANTES). OJSE also had a protective effect on inflammatory response by decreasing RANTES secretion in TNF- α -stimulated BEAS-2B cells.

Conclusions : We conclude that OJSE could be more appropriate to enhance the biological activities against inflammation and its related diseases, and could be applied as a bioactive material for developing the potent anti-inflammatory agents.

Key words : *Ojeok-san* (*Wuji-san*), water extract, 70% ethanol extract, anti-inflammation, anti-allergic disease

1. 서론

염증 반응은 상처나 세균 감염 등의 물리적, 화학적 자극이 일어날 때 손상 부위를 복구시키는

신체 방어 기전 중 하나이며, 이 중 만성염증은 체내의 과도한 방어 반응으로 염증이 지속되는 상태를 말한다. 현대 사회의 급격한 산업발달로 인한 환경변화 그리고 이에 따른 스트레스의 증가 등을 포함한 다양한 요인으로 인하여 아토피, 천식, 비만 등의 만성 염증질환이 증가하고 있으며¹, 최근 한약 처방을 이용한 염증 및 관련 질환에 대한 효능들이 연구되고 있다.

· 교신저자: 신현규 대전 유성구 유성대로 1672
한국한의약연구원 한약기초연구그룹
TEL: +82-42-868-9464 FAX: +82-42-864-2120
E-mail: hkshin@kiom.re.kr

오적산은 냉증으로 인해 생기는 身熱無汗(신열무한), 頭痛身痛(두통신통), 項背拘急(항배구급), 心腹疼痛(심복동통) 등에 주로 사용되는 한약처방이다². 오적산은 건강 보험 급여 56개 처방약 중에 포함된 한약 처방으로, 2004 년에 총 투약일수가 7,249,103 일에서 162009 년 2,753,573 일로 크게 줄었지만³ 여전히 가장 많이 투약되는 처방이다. 최근 문헌과 임상 경험을 통해 발달해 온 한방 처방을 근거로 한 과학적 연구가 점차 진행되면서, 오적산의 효능 규명이 다양한 방면에서 이루어졌다⁴⁻⁷. 오적산은 자궁근종 세포의 사멸을 촉진하는 등 항암효능을 나타내었으며⁴, 고지혈증 동물 모델에서 항고지혈증 효능을 나타냈었다⁵. 또한, 면역 기능과 관련하여 관절염 동물모델에서 항염증 효과를 나타내었으며⁶, 면역기능과 면역기능 관련인자를 조절함으로써 면역 기능 활성화 효과가 있음이 보고되었다⁷.

이들 연구에 사용된 오적산 추출물은 모두 증류수를 이용해 추출된 것을 사용하였고, 다른 추출방법이나 용매를 이용해 추출된 오적산을 사용한 연구는 보고된 바 없다. 최근 연구들에 따르면, 한약제제 등을 포함한 천연물들의 추출방법 또는 추출용매의 차이로 인하여, 그 효능이 증감될 수 있다는 결과들이 보고되었다⁸. 한약처방의 경우 추출방법이나 용매를 달리하여 처방의 효능을 비교한 연구가 전무하므로 한약처방의 효능 연구에서도 이와 같이 시도 되어야 할 필요가 있다. 이에 본 연구에서는 오적산을 열수 추출과 에탄올 추출 두 가지 방식으로 추출하고, 이 추출물의 염증 및 관련 질환에 대한 효능을 대식 세포, 각질 형성 세포, 지방 전구 세포 등의 다양한 세포주를 이용하여 각각의 질환에 대한 중요 바이오마커에 대한 변화의 차이를 비교하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용된 오적산의 구성 한약재는 광명당 제약(Ulsan, Korea)에서 각각 구입하였다. 구입한 한약재는 동국대학교와 대전대학교 한의과대학의 2 인 교수로부터 감별 받은 후 사용하였으며, 각각의 구성 한약재들의 표본(2012-KE 04-1~2012-KE 04-17)은 한국한의학연구원 한약기초연구그룹에 보관하였다.

2. 표준액 및 검액의 제조

11 종의 표준품 albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, ferulic acid, nodakenin, naringin, hesperidin, neohesperidin, cinnamaldehyde, glycyrrhizin 및 6-gingerol에 대한 표준용액은 메탄올을 이용하여 1.0 mg/ml의 농도로 조제한 후 4 °C에 보관하면서 사용 전에 희석하여 사용하였다. 배합 후, 물과 70% 에탄올을 시료의 10 배(각각 560 ml)로 각각 첨가하고 2 시간 전탕 한 후 동결건조 하여 물 추출물(OJSW)과 70% 에탄올 추출물(OJSE) 모두 11.3 g(수득률 20.1%)의 동일한 추출물을 얻었다. HPLC 분석을 위하여 OJSW와 OJSE에 대하여 각각 200 mg을 정확히 측정하고 물을 첨가하여 20 ml로 맞춘 후 0.2 μm membrane 여과(Woongki Science, Seoul, Korea) 후 검액으로 하였다.

3. HPLC 분석

오적산 내 주요성분의 함량은 Shimadzu사의 LC-20A 시스템(Shimadzu Co., Kyoto, Japan)을 사용하여 분석하였다. 검출파장은 230 nm(albiflorin과 paeoniflorin), 254 nm(glycyrrhizin), 280 nm(liquiritin, naringin, hesperidin, Neohesperidin, cinnamaldehyde 및 6-gingerol), 320 nm(ferulic acid) 및 330 nm(nodakenin)에서 오적산 내 주요 성분을 각각 검출하였다. 분석 결과는 LC solution software (Version 1.24)를 이용하여 처리하였다.

4. 세포 배양

마우스 유래 RAW 264.7, MC/9, 3T3-L1과 사람

에서 유래된 BEAS-2B 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)에서, HaCaT 세포주는 세종대학교 이나경 교수님 (Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 사용하였다. 세포주 배양은 ATCC에서 권장하는 배지조성에 따라 하였다.

5. 지방세포 분화

마우스 유래 3T3-L1 지방전구세포주의 지방세포로의 분화를 유도하였다. 지방전구세포가 100% 짝 차게 되면 이로부터 2 일 후 분화 유도물질인 5 µg/mL insulin, 1 µM dexamethasone, 0.5 mM, 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx)가 포함된 3T3-L1 differentiation medium을 이틀간 처리하였다. 분화 유도 2 일째부터는 10% FBS와 1 µg/ml insulin을 포함한 DMEM으로 이틀간 배양하였고, 분화 유도 4 일째부터는 10% FBS가 포함된 DMEM으로 교환하여 총 8 일간 분화를 유도하였다.

6. 세포 독성 평가

세포 독성 측정은 CCK-8 solution(Dojindo, Kumamoto, Japan)을 이용하여 450 nm에서 흡광도(microplate reader Benchmark Plus, Bio-Rad, MN, USA)를 측정하였다. 측정값은 대조군과 비교를 통해 상대적인 세포생존율(% of control)을 계산하였다.

7. TNF-α, IL-6, nitrite 및 PGE₂ 생성 측정

TNFα와 IL-6는 각각 ELISA kit(Invitrogen, Carlsbad, CA) 제품을 이용해 제조사의 프로토콜에 따라 측정하였다. NO 및 PEG₂ 측정은 각각 Griess reagent(Promega, Madison, USA)와 PGE₂ ELISA kit(Cayman chemical, MI, USA)를 이용하여 정량하였다. NO와 PEG₂의 양성대조군으로 NG-methyl-L-arginine(L-NMMA, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA)를 indomethacin(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 각각 사용하였다.

9. Histamine 분비량 측정

Histamine EIA Kit(Oxford Biomedical Research Inc., Oxford, MI, USA)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 배양 상층액 내에 존재하는 histamine의 분비량을 측정하였다.

10. Macrophage-derived chemokine(MDC) 분비량 측정

Human-MDC/CCL22 ELISA kit(R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 세포 상층액 내에 존재하는 MDC 분비량을 측정하였다.

11. Regulated and normal T cell expressed and secreted(RANTES) 분비량 측정

Human-RANTES/CCL5 ELISA Kit(R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 각각의 세포 상층액 내에 존재하는 RANTES의 분비량을 측정하였다.

12. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH) 활성도 측정

Glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH) activity assay kit(TAKARA, Tokyo, Japan)을 사용하여 GPDH 활성도를 측정하였다. 측정된 GPDH 활성도 단위는 1 분당 산화된 1 nmol NADH의 값을 unit/ml로 나타내었다.

13. Leptin 분비량 측정

Mouse leptin immunoassay kit(R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 지방 세포에서 분비되는 leptin양을 측정하였다.

14. 통계 처리

정상 대조군과 유발물질을 처리한 군 간의 수치 비교를 위해 t-test를 실시하였으며, 오적산 추출물을 처리한 다 군간의 차이는 Dunnet's multiple

range test에 의해 $p < 0.05$ 수준에서 사후검정을 실시하였다. 본 시험의 모든 결과는 GraphpadInStat ver.3.10(Graphpad software, Inc. San Diego, CA, USA)을 이용하여 산출되었으며, $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$ 으로 표시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 분석 조건의 확립

Naringin, hesperidin, neohesperidin, nodakenin,

6-gingerol, albiflorin, paeoniflorin, ferulic acid, cinnamaldehyde, liquiritin과 glycyrrhizin을 분석 대상으로 1.0% acetic acid가 각각 함유된 물과 acetonitrile을 기용기 용매 조건으로 하여 35 분 이내에 분리하였다. PDA 검출 파장은 230, 254, 280, 320 및 330 nm에서 각각 검출하였으며, 검액에서의 peak는 주요 성분 peak의 retention time과 UV 흡수 파장을 비교하여 확인하였다. 6종의 성분은 9.2, 10.5, 13.9, 14.9, 16.4, 18.6, 19.8, 21.5, 33.5, 41.4 및 42.55분에 각각 검출되었다(Fig. 1).

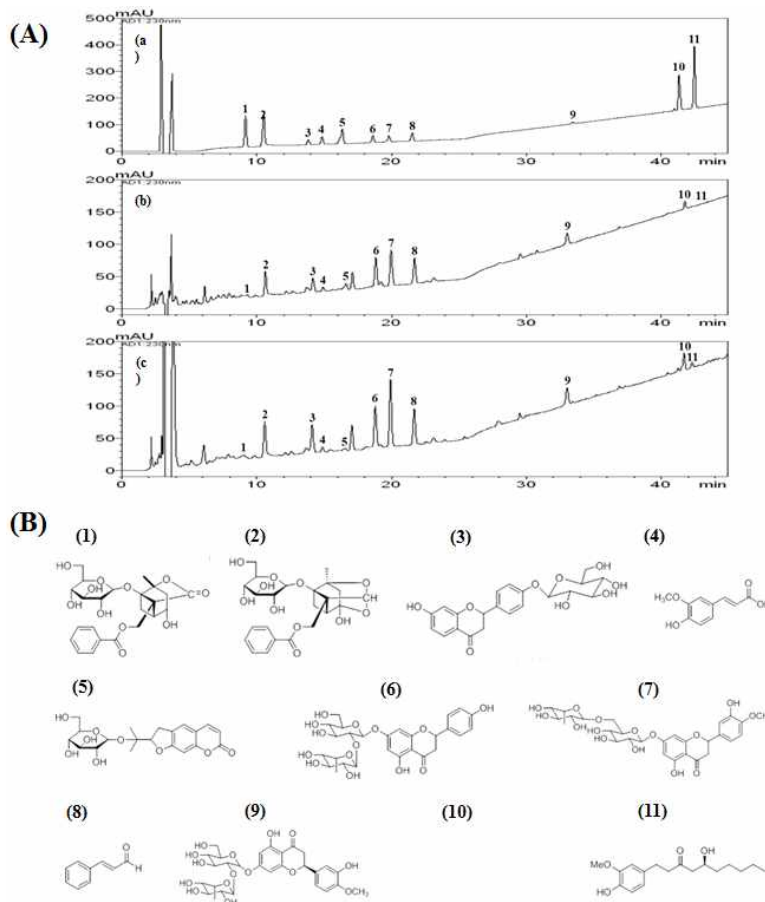


Fig. 1. HPLC analysis of *Ojeok-san*.

(A) HPLC histogram of standard mixture. (a) a standard mixture, (b) water extract and (c) 70% ethanol extract. (B) Chemical structures of index components. (1) Albiflorin, (2) Paeoniflorin, (3) Liquiritin, (4) Ferulic acid, (5) Nodakenin, (6) Naringin, (7) Hesperidin, (8) Neohesperidin, (9) Cinnamaldehyde, (10) Glycyrrhizin and (11) 6-Gingerol.

2. 오적산 추출물의 함량 분석

오적산 추출물의 함량 분석 결과 11종 성분의 상관계수가 0.9997 이상으로 1에 가까운 양호한 직선성을 나타내었다. 11종 성분의 검출한계와 정량한계는 신호 대 잡음비의 값으로 3과 10으로 각각 계산하였으며, 그 범위는 0.04-0.87 mg/ml과 0.13-2.63 g/ml로 각각 나타났다. 이상과 같이 확립된 OJSW

와 OJSE를 HPLC-PDA를 이용하여 11종의 함량을 동시 분석하였다. 함량 분석 결과는 Table 1과 같으며 11종의 성분이 OJSW와 OJSE에서 각각 0.02-1.15 mg/g과 0.07-2.11 mg/g으로 나타났다. OJSE에서 nodakenin을 제외한 10종의 성분에서 OJSW에 비해 현저히 높은 함량을 나타내었다.

Table 1. Analytical results (mg/g) of the 11 compounds in *Ojeok-san*.

Sample	Component											
	Albiflorin			Paeoniflorin			Liquiritin			Ferulic acid		
	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)
Water Extract	0.02	0.00	0.83	0.73	0.00	0.43	0.31	0.00	0.17	0.05	0.00	0.47
70% EtOH Extract	0.07	0.00	1.53	1.19	0.01	0.42	0.67	0.00	0.21	0.09	0.00	0.74
Sample	Component											
	Nodakenin			Naringin			Hesperidin			Neohesperidin		
	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)
Water Extract	0.18	0.00	0.69	0.83	0.00	0.12	1.15	0.00	0.05	0.64	0.00	0.04
70% EtOH Extract	0.08	0.00	3.60	1.24	0.00	0.14	2.11	0.00	0.16	0.91	0.00	0.09
Sample	Component											
	Cinnamaldehyde			Glycyrrhizin			6-Gingerol					
	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)
Water Extract	0.29	0.00	0.12	0.41	0.00	0.35	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	2.27
70% EtOH Extract	0.45	0.00	0.46	1.03	0.00	0.24	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.46

3. 오적산 추출물의 세포 독성 평가

RAW 264.7, MC/9, BEAS-2B 세포 및 3T3-L1 세포는 독성이 나타나지 않은 최고 농도 1000 µg/ml를 기준으로 실험을 진행하였다. HaCaT 세포는 OJSE의 250~1000 µg/ml 농도에서 세포생존율이 40% 이상 감소됨이 관찰되어, 실험적 오류를 고려하여 세포 독성이 나타나지 않는 최고 농도인 100 µg/ml를 기준으로 다음 실험을 진행하였다.

4. 오적산 추출물의 항염증 효능 평가

독소로 잘 알려진 LPS는 TNF-α와 IL-6 등의 염증유도 사이토카인의 발현을 촉진하고, 그 결과 발현된 inducible nitric oxide(iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 같은 염증매개 조절인자에 의해 NO와 PEG₂가 생성되어 염증이 유발된다⁹. 대식세포에서 유래된 NO는 자유라디칼로 NO의 과다생성은 점막 손상을 통해 암 등 질환을 유도하며¹⁰, PEG₂는 손상된 부위나 조직에서 통증과 발열 전달에 주로 관여하는 주요한 염증 인자이다. 오적산 추출물의 항염증 효능을 연구하기 위하여, RAW 264.7 대식

세포에 LPS를 처리하여 염증을 유발시키고 OJSW과 OJSE를 각각 처리한 후, 염증성 사이토카인들의 분비량을 측정하였다. LPS로 자극하여 생산된 TNF- α 는 OJSW(125-1000 mg/ml)에 의하여 유의적으로 감소되었고, OJSE 처리 시에는 고농도 1000 mg/ml에서만 유의적인 효과가 확인되었다(Fig. 2A). 반면에 IL-6 생성량은 OJSE의 250 μ g/ml 이상에서 농도 의존적으로 억제되었지만 OJSW의 IL-6 억제효능은 관찰 되지 않았다(Fig. 2B). 오직 산 추출물의 염증매개 조절인자에 대한 효과를 연구한 결과, OJSE 처리는 NO 생성량을 유의적으로

감소시켰으며, 특히 250 μ g/ml 이상의 농도에서 농도 의존적 감소효과가 있었다(Fig. 2C). NO synthase (NOS) 저해제인 L-NMMA를 양성 대조군으로 사용하였으며 이는 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하였다. 이와 일치하게 PEG₂ 생성량 또한 OJSE의 처리 시에만 억제 효능이 관찰되었다. OJSE의 모든 농도범위에서 PEG₂ 생성량이 유의적으로 감소하였고 농도의존적인 양상을 보였다. OJSW과 OJSE를 비교하였을 때, TNF- α 를 제외하고는 OJSE가 IL-6, NO 및 PEG₂ 생성을 효과적으로 저해하여, OJSE의 항염증 효과가 높은 것으로 확인되었다.

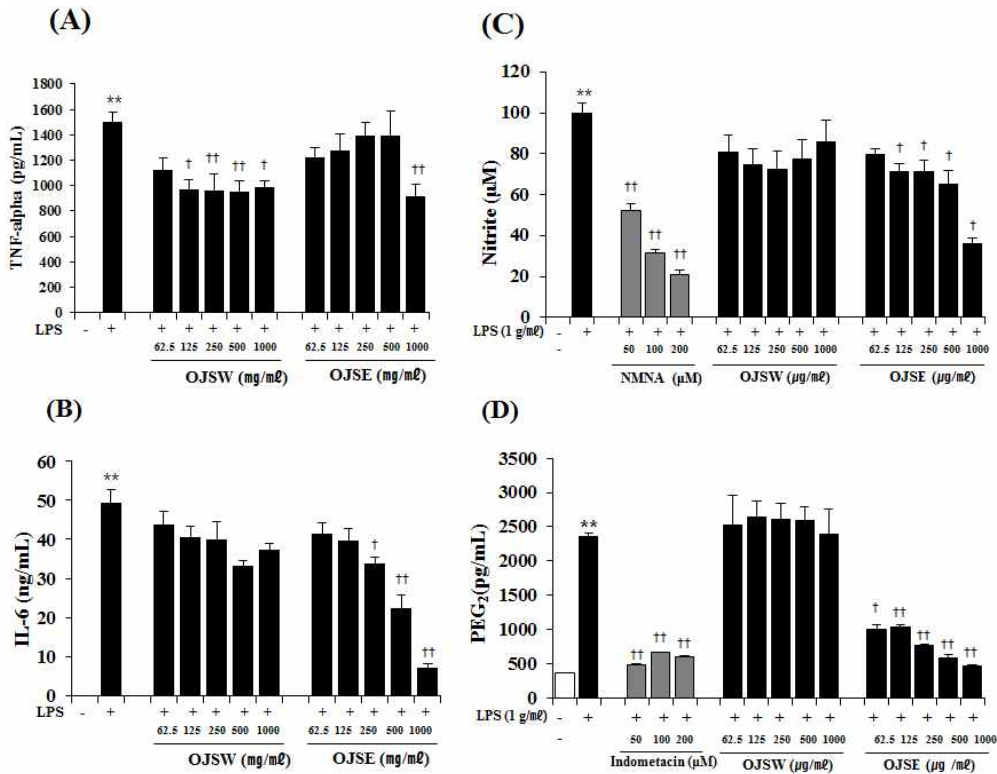


Fig. 2. Anti-inflammatory effects of *Ojeok-san* extracts in RAW 264.7 macrophages.

Cells were co-treated with LPS and indicated concentrations of OJSW or OJSE for 24 h. (A) TNF- α and (B) IL-6 productions were analyzed by ELISA. (C) NO production was measured by using Griess reagents. (D) Secreted level of PGE₂ was analyzed by ELISA. Data represent the mean \pm SEM. ** p <0.01 compared to untreated control. †† p <0.01 compared to LPS-treated group. LPS : lipopolysaccharide, PEG₂ prostaglandin E₂, OJSW : *Ojeok-san* water extract, and OJSE : *Ojeok-san* 70% ethanol extract.

5. 오적산 추출물의 항알러지 효능 평가

대식세포의 염증반응과 달리 알레르기성 염증반응은 알레르기 항원인 알레르겐을 감작해 immunoglobulin E (IgE) 항체의 생산을 통한 면역기전으로, 조절되지 않는 알레르기성 염증반응은 아토피, 천식 등을 유발시킨다. 비만세포(mast cells, 肥満細胞)에 부착된 IgE에 알레르겐이 결합하면 비만세포의 histamine 이 방출된다¹¹. 본 연구는 MC/9 세포에 PMA/A23187 로 histamine 자극을 유도한 후, OJSW와 OJSE를 각각 처리하고 histamine 생성량을 측정하였다. 그 결과, 두 가지 추출물 모두 histamine 생성량에 대한 유의적인 효과는 없었다(data not shown).

알레르겐이 대식세포의 표면에 부착하면 대식세포가 활성화 되어 TNF- α 와 IL-6 등의 염증성 사이토카인의 분비를 증가시키고, 이는 다양한 케모카인의 발현을 유도한다¹². CC-chemokine 그룹에 속한 MDC는 Th2 세포에서 발현되는 CC chemokine receptor-4(CCR-4) 수용체를 통해 선택적으로 발현된다. MDC와 CCR4는 Th2 세포를 염증 부위로 이동시키는 데 중요한 역할을 하며, Th2와 관련된 알러지 질환인 아토피나 천식에 직접적 관여하는 인자이다¹³. 호산구에 대한 강력한 화학주성인자인 RANTES는 Th1 type의 chemokine으로 활성화된 T 세포, 혈소판, 기도 상피 세포 등에서 발현되며 세포 침윤을 유도한다¹⁴.

본 연구에서는 알레르기 질환으로 대표되는 아토피염과 천식을 대상으로 오적산 추출물의 항알러지 효능을 평가하기 위하여, HaCaT 세포와 BEAS-2B 세포에서 MDC와 RANTES 생성량을 측정하였다. 사람의 각질 형성세포주인 HaCaT 세포에 TNF- α 와 IFN- γ 를 동시 처리 시, MDC 분비량¹⁵과 RANTES 생성량이 증가한다는 것이 보고되었다¹⁶. 본 연구결과에서도 아무것도 처리하지 않은 세포에 비해 TNF- α 와 IFN- γ 를 동시 처리한 세포에서 MDC와 RANTES 분비량이 증가하였다. 반면에 오적산 추출물을 처리한 세포에서 TNF- α 와 IFN- γ 를 동시 처리한 세포에 비해 OJSE는 MDC 생성량을 유의적으로 감소시킨 반면, OJSW 처리 시에는 변화가 없었다(Fig. 3A). RANTES 생성량은 OJSW의 125~500 $\mu\text{g/ml}$ 농도와 OJSE의 50~100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 세포에서 모두 유의적인 감소 효과를 보였으며, OJSE를 처리한 세포에서 저해효과가 더 크게 나타났다(Fig. 3B). 기도상피세포인 BEAS-2B 세포에 TNF- α 처리 후 RANTES 생성량을 측정 한 결과, OJSW는 고농도에서만 RANTES 생성량을 감소시켰으나, OJSE의 모든 처리 농도(31.25~500 $\mu\text{g/ml}$)에서 RANTES 생성량이 유의적으로 감소되었다(Fig. 4). 이와 같은 결과를 종합해 보았을 때, OJSE는 OJSW에 비하여 항알러지에 대한 효능이 뛰어난 것을 확인하였다.

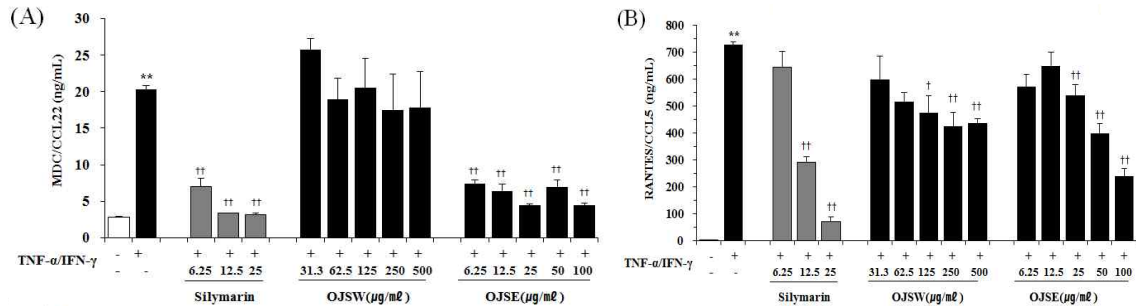


Fig. 3. Anti-atopic activities of *Ojeok-san* extracts in HaCaT keratinocytes.

Cells were co-treated with TNF- α /IFN- γ and indicated concentrations of OJSW or OJSE for 24 h. The MDC/CCL22 (A) and RANTES/CCL5 (B) productions were measured by ELISA at 450nm. Data represent the mean \pm SEM. ** p <0.01 compared to untreated control. †† p <0.01 compared to TNF- α -treated group. MDC : macrophage-derived chemokine, RANTES regulated and normal T cell expressed and secreted, OJSW : *Ojeok-san* water extract, and OJSE *Ojeok-san* 70% ethanol extract.

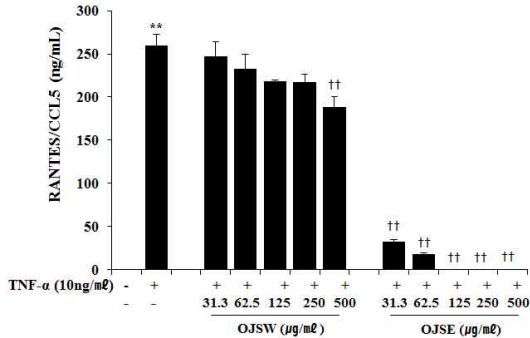


Fig. 4. Anti-asthma effects of *Ojeok-san* extracts in BEAS-2B bronchial epithelial cells.

Cells were co-treated with TNF- α and indicated concentrations of OJSW or OJSE for 24h. RANTES/CCL5 production was evaluated by ELISA at 450nm. Data represent the mean \pm EM. ** p <0.01 compared to untreated control. †† p <0.01 compared to TNF- α -treated group. RANTES : regulated and normal T cell expressed and secreted. OJSW : *Ojeok-san* water extract, and OJSE *Ojeok-san* 70% ethanol extract.

6. 오적산 추출물의 비만 억제 효능 평가

에너지 대사 불균형으로 발생되는 비만은 낮은 수준의 염증상태(a low-grade systemic and chronic inflammatory state)로 정의 된다¹⁷. 증가된 지방조직은 대식세포의 축적을 야기하고 이는 염증 유발 인자들의 발현을 촉진해 동맥경화를 비롯해 천식, 아토피 등 면역계 질환을 유발한다. 본 연구에서는 3T3-L1 지방전구세포를 분화시키면서 OJSW 또는 OJSE 함께 처리하여, 그에 따른 GPDH 활성도 및 leptin 분비량을 측정함으로써 오적산 추출물의 비만 억제 효능을 검증하였다. 분화한 지방세포 OJSW 및 OJSE 모두 GPDH 활성도 변화에 영향을 주지 않았다(data not shown). 그러나 OJSW의 250-1000 μ g/ml 농도와 OJSE의 62.5-1000 μ g/ml 농도에서 leptin 분비량을 유의적으로 감소시켰다(Fig. 5). OJSW에 비해 OJSE는 저농도에서도 leptin 분비량을 감소시켰으며, OJSE의 최고 농도인 1000 μ g/ml에서는 무처치군에 비해 leptin 분비량을 79.97% 까지 감소시켰고 이는 GPDH 활성에 대한 결과와 일치하지

않았다.

비만의 유도는 비만세포 내의 중성지방의 양 또는 비만세포 수의 증가에 의한다. 지방세포의 분화 조절에서 C/EBP α , PPAR γ 는 핵심 전사인자로 작용한다. C/EBP α 는 PPAR γ 의 발현을 유도하는데¹⁸, 이들은 leptin, resistin 등의 adipokines과 fatty acid synthase, lipoprotein lipase 등의 유전자들의 발현을 조절하게 된다. 그 중 GPDH는 탄수화물 및 지질대사에 중요한 연결고리며 지방 세포의 분화에서 글리세롤을 중성지방으로 변환하는 중요 효소로 작용한다. 지방세포 분화 과정은 비만의 진행 단계에 따라 단독 또는 복합적으로 일어나게 된다. 따라서 본 연구에서 GPDH와 leptin에 대한 분석만으로 오적산의 비만 억제 효능을 명확히 설명할 수 없었으나, 효소활성도 및 호르몬 이외의 분화에 기인하는 다른 인자들에 대한 분석을 이용해 다각도로 연구할 필요가 있다.

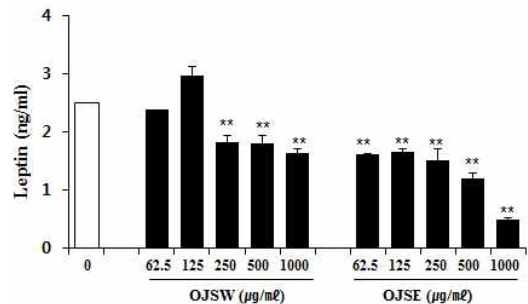


Fig. 5. Anti-obesity effects of *Ojeok-san* extracts in 3T3-L1 adipocytes.

Adipocyte differentiation was induced for 8 days as described in Materials and method and simultaneously treated with indicated concentrations of OJSW or OJSE. (A) GPDH activity was assessed by determination as decrease in NADH at 340 nm. (B) Leptin production was measured by ELISA at 540 nm subtracted from 450 nm. Data represent the mean \pm SEM. ** p <0.01 compared to the differentiated control. GPDH : glycerol-3-phosphate dehydrogenase. OJSW : *Ojeok-san* water extract, and OJSE : *Ojeok-san* 70% ethanol extract.

이상의 연구 결과로부터 서로 다른 추출 용매로 추출한 두 가지 오적산 추출물은 OJSW와 비교하여 OJSE는 nodakenin을 제외한 모든 성분의 함량이 높았으며, 이로 인한 OJSE 포함된 구성성분의 강한 활성이 항염증 및 그와 관련된 질환에 대한 높은 효능을 유도하는 것으로 생각할 수 있다. OJSW와 OJSE에서 공통적으로 naringin hesperidin 및 paeoniflorin의 함량이 가장 많았는데, 이 세 가지 지표성분들의 항산화 효능에 대한 연구는 많이 보고되었다. Naringin과 hesperidin은 진피 또는 지각에서 유래된 성분으로 naringin은 *in vitro*에서 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성을 억제하였으며¹⁹, HaCaT 세포에서 TNF- α /IFN- γ 로 유도된 RANTES 분비량을 감소시켰다²⁰. Hesperidin은 천식 알러지 동물 모델에서 Th2 사이토카인 길항제로 작용해 항염증 효과를 보였으며²¹, Petrova²² 등은 UAB로 피부 손상을 준 SKH-1 마우스 모델에서 hesperidin의 피부 보호효과를 보고하였다. 오적산 추출물에서 세 번째로 고함량인 paeoniflorin은 작약에서 유래된 성분으로 망막 색소 상피에서 산화적 스트레스 보호효과를 보였다²³. 세 가지 고함량 성분 이외에 OJSW에 비해 OJSE에서 triterphenoid saponin glycoside인 glycyrrhizin 함량이 높게 나타났는데, 이 또한 편도원충 감염, 간세포 괴사 등에서 항염증 효과를 나타내었다^{24,25}. 9종의 유효 성분 모두 OJSE에서 높게 검출되었으나, nodakenin은 OJSE에 비해 OJSW에서 그 함량이 더 높았다. 당귀의 뿌리에 함유된 콤마린 유도체인 nodakenin은 식물성 여성 호르몬의 일종으로 LPS로 유도된 마우스 대식세포에서 TNF- α 수용체 관련 인자를 저해하였으며²⁶, 이는 본 연구의 실험 결과와 일부 일치한다. 이와 같은 연구들과 본 연구의 결과를 종합해 보면, 17 종의 약재에서 추출된 다양한 성분들은 물리·화학적으로 서로 상호작용을 통해 항염증 및 항알러지 효과를 유도했을 것이라 사료된다. 또한 본 연구의 결과에 따라 열수 추출법 보다는 많은 유효성분을 추출할 수 있는 에탄올 추출법

등을 통하여 염증 및 관련 질환에 대한 오적산의 효능을 극대화 할 수 있을 것으로 생각한다.

본 연구와 유사한 연구로서 천연물의 추출 방법에 따른 효능 비교에 대한 논문들이 발표되었다. 조⁸ 등은 복분자 추출물이 열수 추출물의 경우 DPPH 항산화 활성, 지질과산화 억제 활성 등에, 감압 추출물의 경우 α -glucosidase 활성 억제 효과가 좋았다고 하였다. Xu²⁷와 Akowuah²⁸ 등은 각각 콩류(legumes) 추출물 및 묘수초(*Orthosiphon stamineus*)를 이용한 연구에서 아세톤 추출물이 에탄올 추출물보다 페놀 성분의 함량이 높고 항산화 효능이 뛰어났다고 보고하였다. 반면에, 김²⁹과 윤³⁰ 등의 연구와 같이 LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포의 염증반응을 억제하는 데 있어 열수 추출물과 에탄올 추출간의 유의적인 차이가 없었던 결과도 있었다. 실제 오적산의 경우, 대부분 당제 위주의 처방을 통해 복용되고 있지만, 본 연구의 결과 열수 추출법에 비하여 에탄올 추출법에서 염증, 천식, 아토피에서 높은 효능을 나타냄을 확인 되었다. 향후 본 연구의 결과를 바탕으로 오적산 뿐만 아니라 다른 한약처방들도 그들의 특성을 고려한 최적의 추출 방법을 통해 약효를 극대화시켜, 이를 기반으로 한 당제 이외의 복용법을 응용하여 개발할 필요가 있다고 사료된다. 아울러 본 연구 결과들을 기본으로 하여 향후 동물실험 모델에 적용하여, 각기 다른 용매로 추출된 오적산 추출물의 항염증 및 관련 질환에 대한 활성을 검증하고, 그 작용 기전에 대한 심도 있는 연구 또한 진행되어야 할 것이다.

IV. 결론

본 연구에서는 오적산을 열수 추출과 에탄올 추출 두 가지 방식으로 추출하여, 이들의 항염증 및 염증 관련 질환인 아토피, 천식 및 비만에 대한 효능을 비교하였다. OJSW와 비교하여 OJSE가 구성성분의 함량이 높았으며, 항염증 및 그와 관련된 질환에 대한 효능 또한 높음이 확인되었다. 본 연

구 결과를 바탕으로 보험 급여 1 위 처방인 오적산이 더욱 효과적으로 염증 및 관련 질환에 적용될 수 있도록 최적의 추출방법을 개발하여 국민 건강에 이바지하였으면 한다.

감사의 글

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

참고문헌

- Sung YY, Kim SD, Yang WK, Nho KJ, Seo HS, Kim YS, et al. Inhibitory effects of *Drynaria fortunei* extract on house dust mite antigen-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *J Ethnopharmacol* 2012 [in press].
- 한의학대학 방제학교수 공편저. 방제학-개정증보-. 서울: 영림사; 2003, p. 268
- 보건복지부. 한방의료 이용 및 한약소비실태조사. 보건복지부 한국보건사회연구원; 2011, p. 38-9.
- 전미혜, 백승희, 신상우, 이영선. 오적산이 자궁근종세 세포의 사멸과 cell apoptosis 에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지 2003;16(2):45-55.
- 김재형, 소경순, 정찬길, 김광호. 오적산이 흰쥐의 고지혈증에 미치는 영향에 대한 실험적 연구. 대한예방의학회지 2004;8(2):185-202.
- 박종기, 채우석. 오적산 엑기스 과립의 경구투여와 수침이 동통에 미치는 영향. 대한침구학회지 1992;9(10):73-91.
- 정다영, 하혜경, 이호영, 이진아, 이준경, 황대선, 등. 대표적인 風寒熱에 의한 통증 치료 처방의 면역 활성화 비교 연구. 동의생리병리학회지 2012;24(4):616-23.
- 조영제, 천성숙, 권효정, 김정환, 윤소정, 이경환. 복분자 (*Rubus coreanum* F.) 열수 및 에탄올추출물의 생리활성비교. 식품영양과학회지 2005;34(6):790-6.
- Posadas I, Terencio MC, Guillén I, Ferrándiz ML, Coloma J, Payá M, et al. Co-regulation between cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000;361:98-106.
- Balkwill F, Mantonavi A. Inflammation and cancer: back to Virchow?. *Lancet* 2001;357:537-45.
- Lane SJ, Lee TH. Mast cell effector mechanisms. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:S67-72.
- Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax* 1999;54:825-57.
- Imai T, Chantry D, Raport CJ, Wood CL, Nishimura M, Godiska R, et al. Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor. *J Biol Chem* 1998; 16:273(3):1764-8.
- Frank S, Kmpfer H, Wetzler C, Stallmeyer B, Pfeilschifter J. Large induction of the chemotactic cytokine RANTES during cutaneous wound repair: a regulatory role for nitric oxide in keratinocyte-derived RANTES expression. *Biochem J* 2000;347(1):265-73.
- Xiao T, Kagami S, Saeki H, Sugaya M, Kakinuma T, Fujita H, et al. Both IL-4 and IL-13 inhibit the TNF- α and IFN- γ enhanced MDC production in a human keratinocyte cell line, HaCaT cells. *J Dermatol Sci* 2003;31(2):111-7.
- Zhang M, Zhu L, Feng Y, Yang Y, Liu L, Ran Y. Effects of acitretin on proliferative inhibition and RANTES production of HaCaT cells. *Arch Dermatol Res* 2008;300(10):575-81.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α :

- direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993;259:87-91.
18. Cao Z, Umek RM, McKnight SL. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 1991;5:1538-52.
 19. Kanno S, Shouji A, Tomizawa A, Hiura T, Osanai Y, Ujibe M, et al. Inhibitory effect of naringin on lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxin shock in mice and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci* 2006;78(7):673-81.
 20. Si-Si W, Liao L, Ling Z, Yun-Xia Y. Inhibition of TNF α /IFN- γ induced RANTES expression in HaCaT cell by naringin. *Pharm Biol* 2011; 49(8):810-4.
 21. Kim SH, Kim BK, Lee YC. Antiasthmatic effects of hesperidin, a potential Th2 cytokine antagonist, in a mouse model of allergic asthma. *Mediators Inflamm* 2011: 485-02.
 22. Petrova A, Davids LM, Rautenbach F, Marnewick JL. Photoprotection by honeybush extracts, hesperidin and mangiferin against UVB-induced skin damage in SKH-1 mice. *J Photochem Photobiol B* 2011;103(2):126-39.
 23. Wankun X, Wenzhen Y, Min Z, Weiyan Z, Huan C, Wei D, et al. Protective effect of paeoniflorin against oxidative stress in human retinal pigment epithelium in vitro. *Mol Vis* 2011;17:3512-22.
 24. Bhattacharjee S, Bhattacharjee A, Majumder S, Majumdar SB, Majumdar S. Glycyrrhizic acid suppresses Cox-2-mediated anti-inflammatory responses during Leishmania donovani infection. *J Antimicrob Chemother* 2012;67(8):1905-14.
 25. Gwak GY, Moon TG, Lee DH, Yoo BC. Glycyrrhizin attenuates HMGB1-induced hepatocyte apoptosis by inhibiting the p38-dependent mitochondrial pathway. *World J Gastroenterol* 2012;21:18(7):679-84.
 26. Rim HK, Cho W, Sung SH, Lee KT. Nodakenin Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses in Macrophage cells by Inhibiting Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6 and Nuclear Factor- κ B Pathways and Protects Mice from Lethal Endotoxin Shock. *World J Gastroenterol* 2012;18(7):679-84.
 27. Xu BJ, Chang SK. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J Food Sci* 2007;72(2):159-66.
 28. Akowuah GA, Ismail Z, Norhayati I, Sadikun A. The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of Orthosiphon stamineus and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food Chem* 2005;93:313-7.
 29. 김형석, 노정두. 육계약침액이 LPS로 유도된 대식세포의 염증반응에 미치는 영향. 대한침구학회지 2012;29(1):15-24.
 30. 윤경진, 이은용, 금은화 추출액이 Raw 264.7 macrophage에서의 NO와 PGE2 생성에 미치는 영향. 대한침구학회지 2012;29(1):67-74.