

삼출건비탕의 추출용매에 따른 성분 함량 및 효능 비교 연구

진성은 · 서창섭 · 하혜경 · 임혜선 · 김예지 · 전우영 · 유새롬 · 김정훈 · 신인식 · 김성실
신나라 · 이미영 · 정수진 · 김온순 · 신현규*
한국한의학연구원 한약기초연구그룹

Comparative Study on Biological Activities and Ingredient Contents of Different Solvent Extracts of *Samchulkunbi-tang*

Seong Eun Jin, Chang-Seob Seo, Hyeakyung Ha, Hye-Sun Lim, Yeji Kim, Woo-Young Jeon, Sae-Rom Yoo, Jung-Hoon Kim, In-Sik Shin, Seong-Sil Kim, Na Ra Shin, Mee-Young Lee, Soo-Jin Jeong, Ohn Soon Kim, and Hyeun-Kyoo Shin*

Basic Herbal Medicine Research Group, Herbal Medicine Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, Yuseongdae-ro 1672, Yuseong-gu, Daejeon, 305-811, Korea

Abstract – In order to investigate anti-inflammatory, anti-allergic and anti-obesity activities of *Samchulkunbi-tang* (SCT; *Shen zhu jian pi-tang*) water and 70% ethanol (EtOH) extracts, *in vitro* inhibitory activities against nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells, and macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22) and regulated on activation of normal T-cell-expressed and -secreted (RANTES/CCL5) production in TNF- α /interferon- γ -stimulated HaCaT and BEAS-2B cells as well as glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity and leptin production in 3T3-L1 cells were determined. A HPLC was used for quantification of the seven marker components (albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, naringin, hesperidin, poncirin and glycyrrhizin) of SCT water and 70% EtOH extracts. SCT showed inhibitory effects against MDC and RANTES production in HaCaT cells, as well as RANTES production in BEAS-2B cells. In addition, SCT reduced not only NO, PGE₂, IL-6 and TNF- α production in RAW 264.7 cells, but also GPDH activity and leptin production in 3T3-L1 cells. Furthermore, the biological activities and the contents of six compounds (except paeoniflorin) were higher in 70% EtOH extract than water extract. These results suggest that SCT has anti-inflammatory, anti-allergic and anti-obesity activities. These efficacies of 70% EtOH extract are relatively higher than that of water extract.

Key words – *Samchulkunbi-tang*, Different solvent extract, Anti-inflammation, Anti-allergy, Anti-obesity

삼출건비탕은 인삼, 백출, 백복령, 후박, 진피, 산사육, 지실, 백작약, 축사, 신곡, 맥아, 감초, 생강 및 대조의 14가지 한약으로 구성되었으며, 만성 위염, 위궤양, 위하수, 소화불량, 설사, 구토 등을 치료하기 위해 사용된다.¹⁾

한약재 및 한약 처방의 경우 임상적으로는 주로 물에 끓여서 추출하는 전탕액의 형태로 복용하는데 반해 천연물 신약 개발의 용도로는 메탄올 (MeOH), 에탄올 (EtOH) 등의 저급 알코올 또는 이의 수용액 추출물을 이용하여 연구가 진행되는 것이 대부분이다. 특히 세포막을 파괴하여 세포

안의 성분을 추출하기 위해서는 70% EtOH가 가장 유용하다.²⁾ 건강(乾薑)의 추출용매별 수율 비교 결과 추출 수율은 물 추출물이 높다고 발표하였으나 표준 물질인 6-gingerol의 함량 비교는 없었고,³⁾ 석창포의 용매별 추출물의 성분 함량 비교 결과 물 추출물과 비교하여 50% MeOH 추출물의 α - 및 β -asarone 함량이 높다고 보고된 바 있다.⁴⁾ 한약 처방으로는 전도산(顛倒散)의 추출용매별 효능 비교 결과 항염증 효능은 물 추출물, 항산화 작용은 에탄올 추출물이 우수하다고 발표하였으나 이들의 성분 함량 비교는 없었다.⁵⁾ 이처럼 한약재 또는 한약처방에 대해 추출 용매에 따른 성분 함량과 효능의 동시 비교 연구는 거의 없는 실정이다.

이에 본 연구에서는 다양한 성분을 함유한 삼출건비탕의

*교신저자 (E-mail): hkshin@kiom.re.kr
(Tel): +82-42-868-9464

추출 용매에 따른 이화학적 성분 및 약리학적 효능을 비교 평가하기 위하여 삼출건비탕을 물 또는 70% EtOH로 추출한 추출물을 대상으로 high performance liquid chromatography (HPLC)법을 이용한 주요성분 동시분석과 염증, 알러지, 비만에 대한 *in vitro* 약리활성 평가를 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용된 삼출건비탕의 구성 한약재 (Table I)는 광명당제약(Ulsan, Korea)에서 각각 구입하였다. 구입한 한약재는 이재현 교수(Dongguk University, Gyeongju, Korea)와 서영배 교수(Daejeon University, Daejeon, Korea) 2인의 전문가 감별 후 사용하였으며, 각각의 구성 한약재들의 표본 (2012-KE06-1~2012-KE06-14)은 한국한의학연구원 한약기초연구그룹에 보관하였다.

시약 - 표준물질인 paeoniflorin, liquiritin, naringin, glycyrrhizin 및 hesperidin은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan), albiflorin과 poncirin은 ChromaDex (Irvine, CA, USA)로부터 구입하였다. 각 표준물질의 순도는 hesperidin (92.0%)을 제외한 6종 모두 98.0% 이상이었다. 시료전처리 및 HPLC 분석을 위한 methanol, acetonitrile, ethanol 및 water는 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였으며, acetic acid는 Merck KGaA (Darmstadt, Germany) 제품을 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), new born calf serum (NCS), penicillin-streptomycin 및 phosphate-

buffered saline (PBS)은 Gibco BRL. (NY, USA), β -mercaptoethanol, lipopolysaccharide (LPS) 및 indomethacin은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. T-STIMTM with ConA culture supplement (rat)와 Cell Counting Kit-8 (CCK-8)는 각각 BD Bioscience (NJ, USA)와 Dojindo (Kumamoto, Japan) 제품을 사용하였다. Tumor necrosis factor (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , human macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22), human regulated on activation of normal T-cell-expressed and -secreted (RANTES/CCL5) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit 및 mouse leptin immunoassay kit는 R&D systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하여 사용하였다. Griess reagent와 prostaglandin E₂ (PGE₂) ELISA kit는 각각 Promega Corporation (Madison, WI, USA)과 Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA)로부터 구입하였다. Interleukin (IL)-6 및 TNF- α ELISA kit는 Invitrogen Co. (Camarillo, CA, USA)로부터 구입하였으며, 3T3-L1 (mouse embryonic fibroblast) differentiation medium과 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity assay kit는 각각 Zen-Bio Inc. (durham, NC, USA)와 Takara (Tokyo, Japan) 제품을 사용하였다.

기기 - 함량분석을 위한 HPLC는 LC-20A 시스템(Shimadzu Co., Kyoto, Japan)을 사용하였고, 시스템은 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.

표준액의 조제 및 검량선 작성 - 7종의 표준품인 albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, naringin, hesperidin, poncirin 및 glycyrrhizin 등에 대한 표준용액은 모두 MeOH로 녹여 1.0 mg/mL의 농도로 조제한 후 4°C에 보관하면서 사용 전에 희석하여 사용하였다. 검량선은 albiflorin과 glycyrrhizin 0.78-50.00 μ g/mL, paeoniflorin, naringin, hesperidin 및 poncirin 0.78-100.00 μ g/mL 및 liquiritin 0.39-50.00 μ g/mL의 농도범위에서 표준용액을 이용하여 검량선을 작성하였다.

삼출건비탕 추출물 및 검액의 조제 - 삼출건비탕의 구성 한약재를 Table I과 같이 무게 비율로 배합하여 물과 70% EtOH를 시료의 10배(각각 435 mL)로 각각 첨가하여 2시간 전탕 한 후 Whatman No. 2 (Maidstone, Kent, UK) 여과지를 이용하여 여과한 후 감압 농축하였다. 감압 농축된 물 추출물의 잔여 용매를 완전히 제거하기 위하여 동결건조 하여 물 추출물 11.2 g (수율 25.75%)을 얻었다. 또한 감압 농축된 70% EtOH 추출물에 물 100 mL을 첨가한 후 동결건조 하여 70% EtOH 추출물 9.8 g (수율 22.53%)을 얻었다. HPLC 분석을 위하여 물 추출물과 70% EtOH 추출물에 대하여 각각 200 mg을 정확히 측정 후 물을 넣어 20 mL로

Table I. Composition of *Samchulkunbi-tang*

| Latin name | Amount (g) | Source |
|---------------------------|------------|-------------------|
| Ginseng Radix | 3.75 | Geumsan, Korea |
| Atractylodis Rhizoma | 3.75 | China |
| Hoelen | 3.75 | Yeongcheon, Korea |
| Magnoliae Cortex | 3.75 | China |
| Citri Pericarpium | 3.75 | Jeju, Korea |
| Crataegi Fructus | 3.75 | Inje, Korea |
| Ponciri Fructus | 3.00 | China |
| Paeoniae Radix | 3.00 | Hwasun, Korea |
| Amomi Semen | 1.875 | China |
| Massa Medicata Fermentata | 1.875 | Muju, Korea |
| Hordei Fructus Germinatus | 1.875 | Muju, Korea |
| Glycyrrhizae Radix | 1.875 | China |
| Zingiberis Rhizoma | 3.75 | Yeongcheon, Korea |
| Zizyphi Fructus | 3.75 | Yeongcheon, Korea |
| Total | 43.5 | |

맞추고 0.2 μm membrane (Woongki Science, Seoul, Korea) 으로 여과 후 검액으로 하였다.

HPLC 분석조건 - 삼출건비탕 내 주요성분인 albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, naringin, hesperidin, poncirin 및 glycyrrhizin의 함량을 분석하기 위하여 Shimadzu사의 LC-20A 시스템을 사용하여 측정하였다. 분석에 사용된 칼럼은 Gminin C₁₈ (5 μm , 4.6 \times 150 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) 칼럼을 사용하였고, 칼럼온도는 40°C로 유지하였다. 유속은 1.0 mL/min으로 흘러주었으며 주입량은 10 μL 였다. 이동상은 1.0% acetic acid가 함유된 water (A)와 1.0% acetic acid가 함유된 acetonitrile (B)을 사용하여 기울기 용매조건(0-40분, 5-70% B, 40-45분, 70-100% B, 45-50분, 100% B)으로 흘러주었으며, 검출과장은 230 nm, 254 nm 및 280 nm에서 검출하였다.

세포 배양 - Human keratinocyte cell line인 HaCaT 세포는 세종대학교 이나경 교수(Seoul, Korea)로부터 분양 받아 사용하였으며 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에 penicillin (100 U/mL)과 streptomycin (100 $\mu\text{g/mL}$)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. Human bronchial epithelial cell line인 BEAS-2B, mouse macrophage cell line인 RAW 264.7 및 mouse preadipocyte cell line인 3T3-L1 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)으로부터 분양 받아 사용하였다. BEAS-2B 및 RAW 264.7 세포는 각각 10% 및 5.5% FBS와 penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 $\mu\text{g/mL}$)이 포함된 DMEM을 사용하고, 3T3-L1 preadipocytes는 10% NCS가 포함된 DMEM을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

지방세포의 분화 - 3T3-L1 preadipocytes는 3T3-L1 differentiation medium에 분화 유도물질인 5 $\mu\text{g/mL}$ insulin, 1 μM dexamethasone 및 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)을 2일 동안 처리하여 지방세포로 분화를 유도하였다. 이어서 2일 동안 10% FBS와 1 $\mu\text{g/mL}$ insulin을 포함한 DMEM을 사용하고, 분화 유도 4 일째부터 10% FBS가 포함된 DMEM을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

세포독성 평가 - 삼출건비탕 물 추출물 및 70% EtOH 추출물의 각 세포 독성을 알아보기 위해 HaCaT, BEAS-2B 및 RAW 264.7 세포를 96 well plate에 각각 1 \times 10³, 6 \times 10³ 및 3 \times 10³ cells/well씩 분주하여 18 시간 배양한 후, 삼출건비탕 물 추출물 및 70% EtOH 추출물을 농도별로 처리하여 24 시간 동안 배양하였다. 물 추출물과 70% EtOH 추출물의 수율이 다르므로 모든 실험은 추출 전 건조 약제의 양으로 맞추어 진행하였다. 3T3-L1 preadipocytes는 96 well plate에 5 \times 10⁴ cells씩 분주한 후, 삼출건비탕 물 추출물과 70% EtOH 추출물을 농도별로 처리하여 상기 방법으로 8 일간 분화를 유도하였다. 이후 CCK-8 용액을 10 μL 씩 첨가하여 4시간 동안 배양하고 microplate reader (Benchmark Plus,

Bio-Rad, MN, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 대조군과 비교하여 상대적인 세포생존율(% of control)을 계산하였으며, 이후의 실험은 세포 독성이 나타나지 않는 최고 농도를 기준으로 진행하였다.

RAW 264.7 세포에서의 Nitric oxide (NO) 및 PGE₂, IL-6, TNF- α 분비량 측정 - RAW 264.7 세포를 48 well plate에 2.5 \times 10⁵ cells/well씩 분주하여 18 시간 배양한 후 삼출건비탕 물 추출물 및 70% EtOH 추출물을 농도별로 처리하고 동시에 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. Griess reagent를 이용하여 제조사의 방법에 따라 배양 상등액 내에 존재하는 nitrite의 분비량을 측정하였으며, 양성 대조군으로 nitric oxide synthase (NOS) inhibitor인 N^G-methyl-L-arginine (L-NMMA)을 사용하였다. 상등액 내의 PGE₂, IL-6 및 TNF- α 분비량을 측정하기 위해 ELISA kit를 사용하여 각 제조사의 방법에 따라 측정하였으며, PGE₂ 억제에 대한 양성 대조군으로 indomethacin을 사용하였다.

HaCaT 세포에서의 MDC 및 RANTES 분비량 측정 - HaCaT 세포를 6 well plate에 1 \times 10⁶ cells/well씩 분주한 후, 10% FBS가 포함된 DMEM에서 배양하였다. 18시간 배양 후 serum-free DMEM으로 배지를 교체하고, 삼출건비탕 물 추출물 및 70% EtOH 추출물과 TNF- α 및 IFN- γ (각각 10 ng/mL)를 동시에 처리하여 24시간 동안 배양하고 상등액을 수집하였다. Human-MDC/CCL22 및 human-RANTES/CCL5 ELISA kit를 이용하여 제조사의 방법에 따라 상등액 내에 존재하는 MDC 및 RANTES의 분비량을 측정하였다.

BEAS-2B 세포에서의 RANTES 분비량 측정 - BEAS-2B 세포를 48 well plate에 3 \times 10⁴ cells/well씩 분주한 후, 10% FBS가 포함된 DMEM에서 배양하였다. 18시간 배양 후 serum-free DMEM으로 교체하고, 삼출건비탕 물 추출물 및 70% EtOH 추출물과 TNF- α (10 ng/mL)를 동시에 처리하여 24시간 동안 배양하고 상등액을 수집하였다. Human-RANTES/CCL5 ELISA kit를 이용하여 제조사의 방법에 따라 상등액 내에 존재하는 RANTES의 분비량을 측정하였다.

3T3-L1 세포에서의 Leptin 분비량 및 GPDH 활성 측정 - 3T3-L1 preadipocytes를 48 well plate에 1 \times 10⁵ cells/well씩 분주한 후, 삼출건비탕 물 추출물 및 70% EtOH 추출물을 농도별로 처리하고 상기 방법으로 8일간 분화를 유도하였다. ELISA kit를 이용하여 제조사의 방법에 따라 배양 상등액 내에 존재하는 leptin의 분비량을 측정하였으며, GPDH 활성을 측정하기 위해 세포를 수집하여 PBS로 세척한 후 enzyme extract buffer를 첨가하여 원심분리 하였다. 상등액을 수거하여 β -mercaptoethanol이 포함된 dilution buffer로 희석하고 30°C에서 기질과 반응시키는 20분 동안 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

통계처리 - 모든 실험값은 mean \pm SEM으로 나타내었다. 실험결과에 대한 통계학적 유의성 검정은 ANOVA검정을

적용하였으며, Dunnet's multiple comparison test를 이용하여 *p*-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

분석조건외 확립 - 삼출건비탕의 구성 약재 중 작약의 주요성분인 albiflorin과 paeoniflorin, 진피의 주요성분인 hesperidin, 지실의 주요성분인 naringin과 poncirin 및 감초

의 주요성분인 liquiritin과 glycyrrhizin을 분석 대상으로 1.0% acetic acid가 함유된 water와 1.0% acetic acid가 함유된 acetonitrile을 기용기 용매 조건으로 하여 35분 이내에 분리하였다. PDA 검출 파장은 230 nm에서 albiflorin과 paeoniflorin, 254 nm에서 glycyrrhizin 및 280 nm에서 naringin, hesperidin, poncirin 및 liquiritin을 각각 검출하였다. 검액에서의 peak는 주요 성분 peak의 retention time과 UV 흡수 파장을 비교하여 확인하였으며, 7종의 성분은 8.774, 9.657,

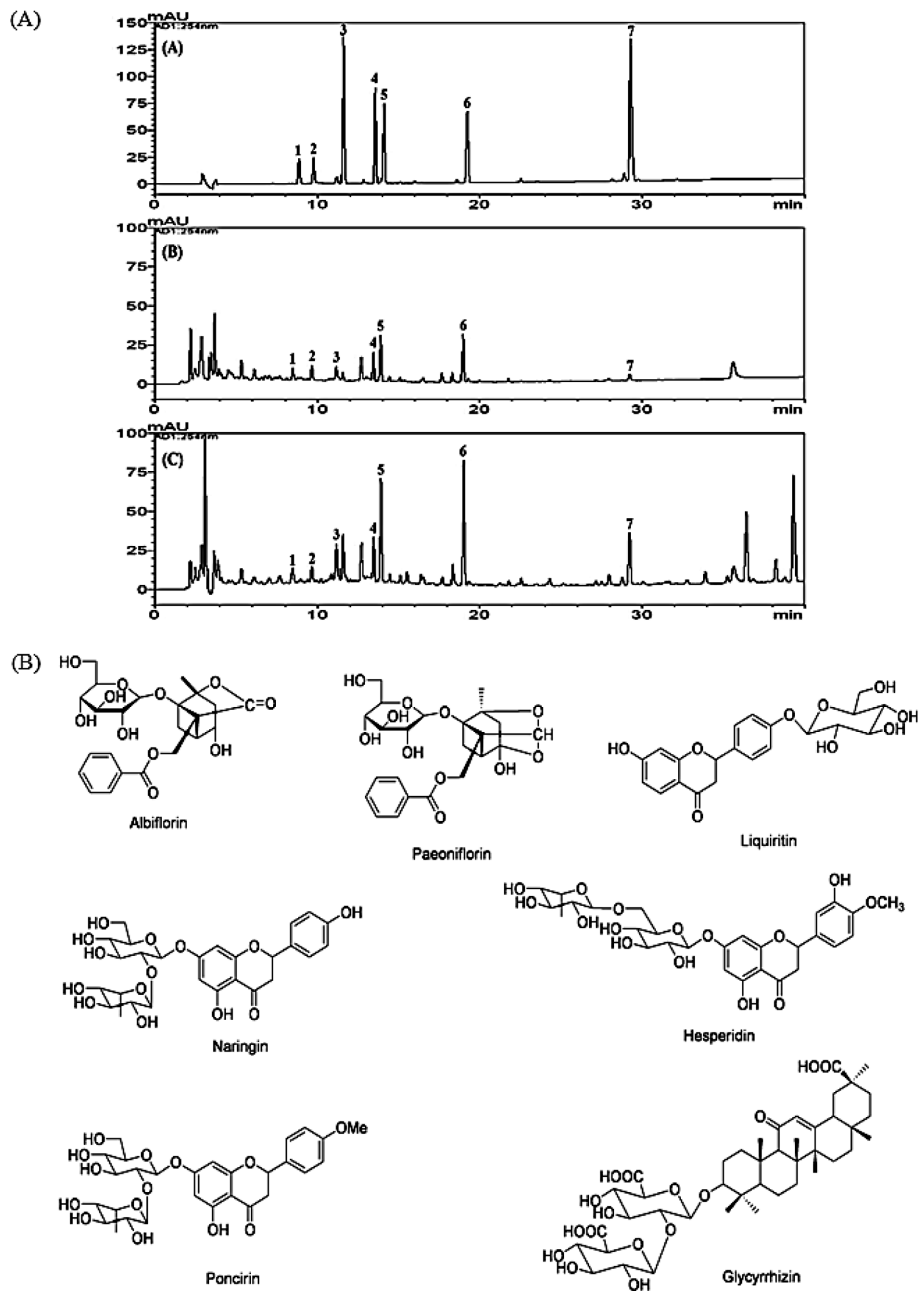


Fig. 1. (A) Chemical structures of seven constituents in *Samchulkunbi-tang* and (B) HPLC chromatogram of a standard mixture (a), water extract (b), and 70% EtOH extract (c). Albiflorin (1), paeoniflorin (2), liquiritin (3), naringin (4), hesperidin (5), poncirin (6), and glycyrrhizin (7).

11.495, 13.465, 13.977, 19.127 및 30.295분에 각각 검출되었다(Fig. 1).

함량분석 - 삼출건비탕의 함량분석을 위한 표준용액의 검량선은 Table II와 같으며 상관계수 값이 0.9999이상으로 1에 가까운 아주 양호한 직선성을 나타내었다. 또한 7종 성분의 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 0.05-0.20 µg/mL과 0.15-0.65 µg/mL로 각각 나타났(Table II). 7종 성분의 피크 면적과 머무름 시간에 대한 재현성은 모두 상대표준편차가 1.5%와 0.1% 이내로 양호한 재현성을 나타내었다. 이상과 같이 확립된 삼출건비탕의 물 추출물과 70% EtOH 추출물을 HPLC-PDA를 이용하여 동시분석을 실시하고 albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, naringin, hesperidin, poncirin 및 glycyrrhizin 등 7종 성분에 대한 함량을 분석하였다. 함량 분석 결과 paeoniflorin을 제외한 6종 성분 모두 물 추출물보다 70% EtOH 추출물에서 높은 함량을 나타냈으며 특히 glycyrrhizin은 7.6배 이상 높은 함량을 나타냈다(Table III).

RAW 264.7 세포에서의 항염증 효능 - 삼출건비탕 물 추출물 및 70% EtOH 추출물의 항염증 효능을 비교 평가하기 위하여 각 추출물과 LPS (1 µg/mL)를 동시 처리한 RAW 264.7 세포에서 NO, PGE₂, IL-6 및 TNF-α 생성억제 효과를 검색하였다. 대조군과 비교하여 LPS 처리군은 NO 생성이 유의적으로 증가되었고(P<0.01) 양성 대조군으로 사용한 L-NMMA 처리시 농도의존적으로 LPS에 의한 NO 생

성을 억제하는 것으로 나타났다(P<0.01). 삼출건비탕 물 추출물은 NO 생성을 억제하는 것으로 나타났으나 농도의존적인 효과는 없었으며, 70% EtOH 추출물은 농도가 증가함에 따라 NO 생성을 유의적으로 억제하는 것으로 나타났다(P<0.01). 또한, 70% EtOH 추출물이 물 추출물에 비해 상대적으로 높은 NO 억제 활성을 나타내었다(Fig. 2A). PGE₂ 생성 역시 LPS 처리로 인해 유의적으로 증가하였으며(P<0.01), 양성 대조군으로 사용한 indomethacin은 LPS 처리군과 비교하여 PGE₂ 생성을 유의적으로 억제하였다(P<0.01, Fig. 2B). 삼출건비탕 물 추출물은 PGE₂ 생성을 억제하는 것으로 나타났으나 농도의존적인 효과는 없는 반면, 70% EtOH 추출물은 62.5 µg/mL 이상에서 PGE₂ 생성을 현저히 억제(78.46%, P<0.01)하여 물 추출물에 비해 높은 PGE₂ 억제 활성을 나타내었다. Fig. 2C-D에 나타낸 것과 같이 LPS 처리군은 대조군과 비교하여 IL-6 및 TNF-α 생성이 유의적으로 증가되었다(P<0.01). 증가된 IL-6 생성은 물 추출물에 의해 억제되었으나(P<0.01) 농도의존적이지 않은 것에 반해 70% EtOH 추출물은 농도가 증가함에 따라 IL-6의 생성을 유의적으로 억제하는 것으로 나타났다(P<0.01). TNF-α 생성에 대해서는 물 추출물이 농도의존적이지는 않지만 유의적인 억제 활성을 나타내었으며(P<0.01), 70% EtOH 추출물은 500 µg/mL까지는 유의적인 차이를 보이지 않았으나 1000 µg/mL에서 현저히 억제(53.02%, P<0.01)하는 것으로 나타났다.

Table II. Calibration graphs, linear ranges, LOD and LOQ

| Compound | Linear range (µg/mL) | Slope | Intercept | Correlation coefficient (R ²) | LOD (µg/mL) | LOQ (µg/mL) |
|--------------|----------------------|---------|-----------|---|-------------|-------------|
| Albiflorin | 0.78-50.00 | 11938.0 | 45.6 | 1.0000 | 0.13 | 0.45 |
| Paeoniflorin | 0.78-100.00 | 12182.0 | 3175.6 | 0.9999 | 0.16 | 0.52 |
| Liquiritin | 0.39-50.00 | 17784.0 | 118.0 | 1.0000 | 0.07 | 0.24 |
| Naringin | 0.78-100.00 | 17210.0 | 470.6 | 1.0000 | 0.06 | 0.18 |
| Hesperidin | 0.78-100.00 | 18422.0 | 534.2 | 1.0000 | 0.06 | 0.19 |
| Poncirin | 0.78-100.00 | 28646.0 | 751.8 | 1.0000 | 0.05 | 0.15 |
| Glycyrrhizin | 0.78-50.00 | 8246.9 | 345.0 | 1.0000 | 0.20 | 0.65 |

Table III. Analytical results (mg/g herb) of the 7 compounds in *Samchulkunbi-tang*

| Ingredient | Water extract | | | 70% EtOH Extract | | |
|--------------|---------------|------|---------|------------------|------|---------|
| | Mean (mg/g) | SD | RSD (%) | Mean (mg/g) | SD | RSD (%) |
| Albiflorin | 0.08 | 0.00 | 0.95 | 0.30 | 0.00 | 0.14 |
| Paeoniflorin | 1.06 | 0.00 | 0.20 | 1.00 | 0.00 | 0.42 |
| Liquiritin | 0.19 | 0.00 | 2.36 | 0.84 | 0.01 | 0.60 |
| Naringin | 0.77 | 0.00 | 0.45 | 1.17 | 0.00 | 0.27 |
| Hesperidin | 1.27 | 0.01 | 0.52 | 2.63 | 0.00 | 0.10 |
| Poncirin | 0.83 | 0.00 | 0.16 | 1.78 | 0.00 | 0.11 |
| Glycyrrhizin | 0.11 | 0.00 | 0.19 | 0.84 | 0.00 | 0.24 |

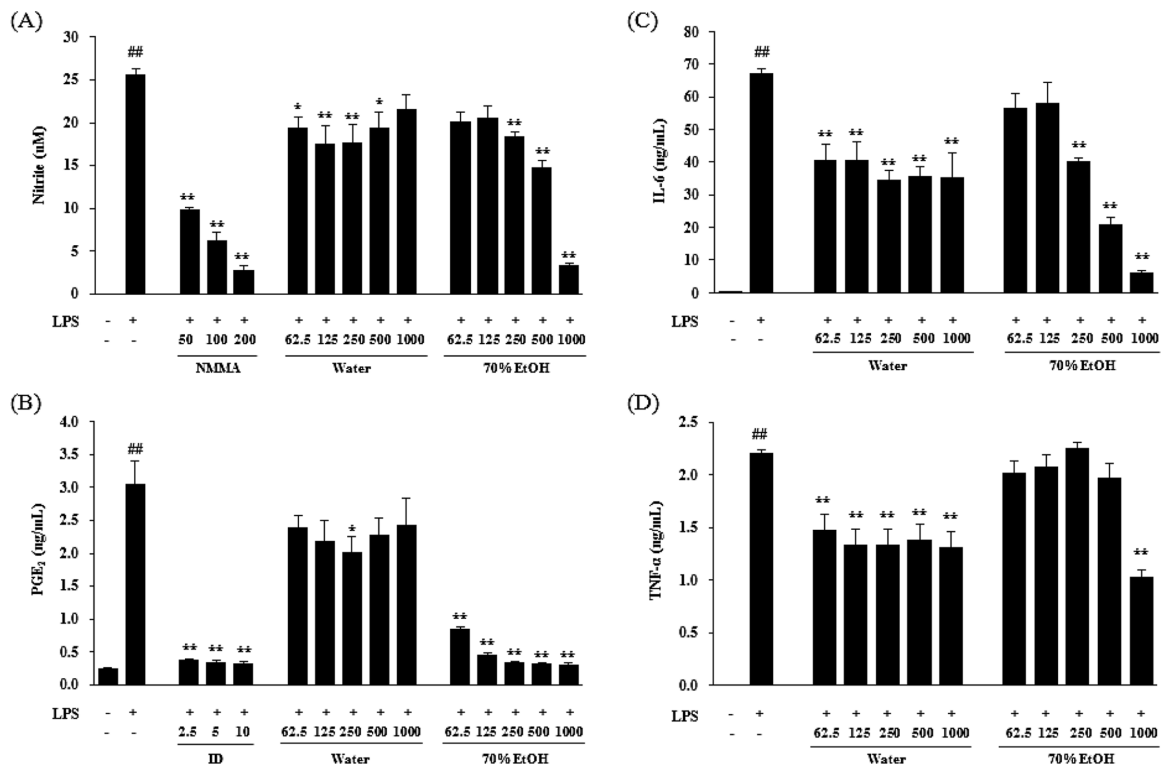


Fig. 2. The anti-inflammatory effects of SKT water and 70% EtOH extracts in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were treated with SKT water or 70% EtOH extracts (each 62.5-1000 μg/mL) and then costimulated with LPS (1 μg/mL) for 24 h. NO production was measured in the culture medium with the Griess reaction (A). The levels of PGE₂ (B), IL-6 (C) and TNF-α (D) released into the culture medium were assessed using commercially available ELISA kits. The data are mean values of three experiments ± SEM. Each bar represents the mean of three independent experiments. ##P<0.01 versus vehicle-treated control group; *P<0.05 and **P<0.01 versus LPS-treated cells.

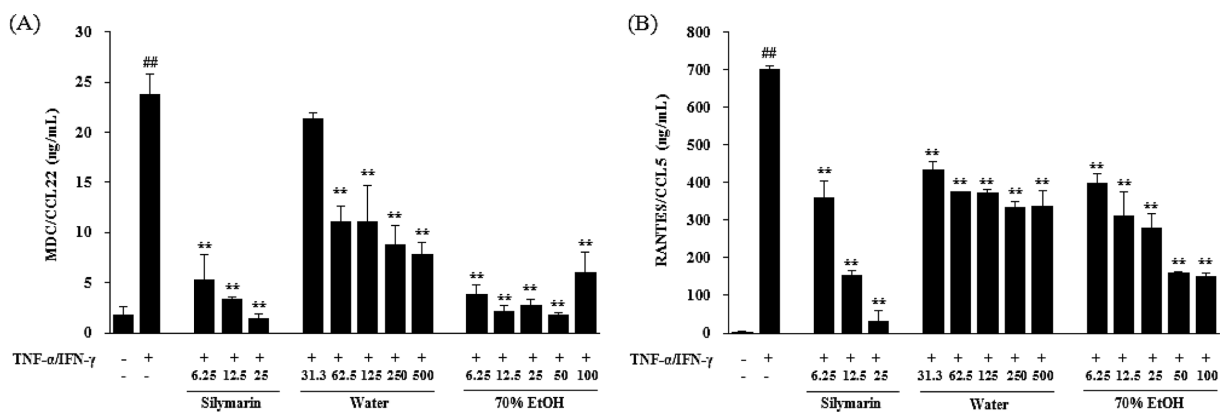


Fig. 3. Effects of SKT water and 70% EtOH extracts on chemokine production in HaCaT cells. Cells were treated with SKT water (31.3-500 μg/mL) or 70% EtOH (6.25-100 μg/mL) extracts and then costimulated with TNF-α and IFN-γ (each 10 ng/mL) for 24 h. As the positive control, cells were treated with silymarin (6.25-25 μg/mL). The levels of RANTES (A) and MDC (B) released into the culture medium were assessed using commercially available ELISA kits. The data are mean values of three experiments ± SEM. Each bar represents the mean of three independent experiments. ##P<0.01 versus vehicle-treated control group; *P<0.05 and **P<0.01 versus TNF-α/IFN-γ-treated cells.

HaCaT 세포에서의 항아토피 효능 - 삼출건비탕 물 추출물 및 70% EtOH 추출물의 항아토피 효능을 비교 평가하기 위하여 각 추출물과 TNF-α/IFN-γ (각 10 ng/mL, TI)를

동시 처리한 HaCaT 세포에서 아토피성 피부염과 관련된 chemokine인 MDC 및 RANTES 분비억제효과를 검색하였다. 대조군과 비교하여 TI 처리군은 MDC 및 RANTES 분

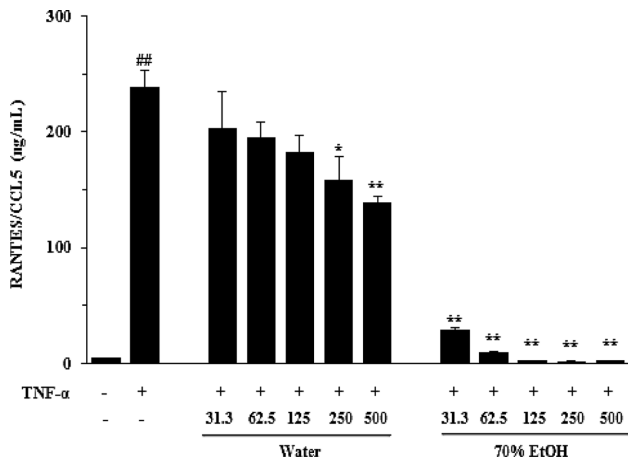


Fig. 4. Effects of SKT water and 70% EtOH extracts on TNF- α induced RANTES production in BEAS-2B cells. Cells were treated with SKT water or 70% EtOH extracts (each 31.3-500 μ g/mL) and then costimulated with TNF- α (10 ng/mL) for 24 h. The levels of RANTES released into the culture medium were assessed using commercially available ELISA kits. The data are mean values of three experiments \pm SEM. Each bar represents the mean of three independent experiments. ^{##} P < 0.01 versus vehicle-treated control group; ^{*} P <0.05 and ^{**} P <0.01 versus TNF- α -treated cells.

비가 유의적으로 증가한 반면(P <0.01), 양성 대조군으로 사용한 silymarin은 TI 처리군과 비교하여 MDC 및 RANTES 분비를 농도의존적으로 억제하였다(P <0.01, Fig. 3). 삼출건비탕 물 추출물 및 70% EtOH 추출물은 각 세포독성이 나타나지 않는 최고농도인 500 및 100 μ g/mL에서 MDC 분비를 67.13 및 74.78%, RANTES 분비를 51.99 및 78.56% 억제하는 것으로 나타났다(P <0.01, Fig. 3). 70% EtOH 추출물은 MDC 분비를 농도의존적으로 억제하지는 않지만, 물 추출물에 비해 MDC 및 RANTES 분비에 대한 억제 효과가 높은 것으로 나타났다.

BEAS-2B 세포에서의 항천식 효능 - 삼출건비탕 물 추출물 및 70% EtOH 추출물의 항천식 효능을 비교 평가하기 위하여 각 추출물과 TNF- α (10 ng/mL)를 동시 처리한 BEAS-2B 세포에서 RANTES 분비억제효과를 검색한 결과 TNF- α 처리군은 대조군과 비교하여 RANTES 분비가 유의적으로 증가하였다(P <0.01, Fig. 4). 이에 반해 물 추출물 및 70% EtOH 추출물은 농도의존적으로 RANTES 분비를 억제하는 것으로 나타났다 (P <0.05). 특히 70% EtOH 추출물은 31.3 μ g/mL 이상에서 RANTES 분비를 현저히 억제 (87.79%, P <0.01)하는 것으로 나타났다.

3T3-L1 세포에서의 항비만 효능 - 3T3-L1 preadipocytes의 분화 억제에 대한 삼출건비탕 물 추출물 및 70% EtOH 추출물의 효과를 검색한 결과, adipocytes로의 분화 시 증가된 GPDH 활성은 삼출건비탕 추출물에 의해 유의적으로 억

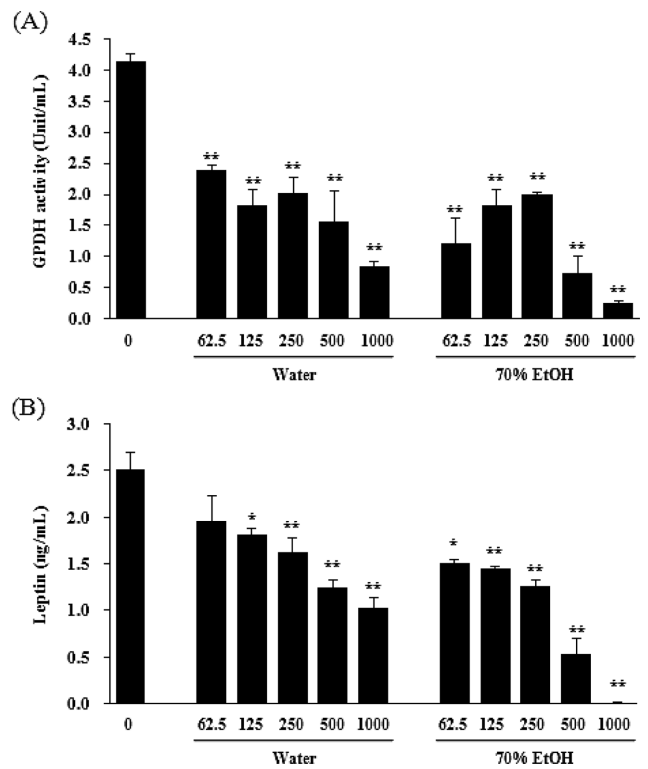


Fig. 5. Effects of SKT water and 70% EtOH extracts on GPDH activity and leptin production in 3T3-L1 adipocytes. On day 8 after inducing differentiation of the 3T1-L1 cells, GPDH activity (A) and leptin (B) were assessed using commercially available ELISA kits. The data are mean values of three experiments \pm SEM. Each bar represents the mean of three independent experiments. ^{*} P <0.05 and ^{**} P <0.01 versus untreated cells.

제되었으며(P <0.01), 특히 70% EtOH 추출물은 1000 μ g/mL에서 GPDH 활성을 매우 강하게 억제(93.45%, P <0.01)하는 것으로 나타났다(Fig. 5A). 삼출건비탕이 배양액 내 leptin 함량에 미치는 영향을 관찰한 결과, 대조군에 비해 물 추출물 및 70% EtOH 추출물은 농도의존적으로 leptin 분비를 억제하는 것으로 나타났다(P <0.05). 특히 70% EtOH 추출물은 1000 μ g/mL에서 99.65% leptin 분비를 억제하는 것으로 나타났다(P <0.01, Fig. 5B).

고 찰

삼출건비탕은 14종의 한약재로 구성되어 있는 한약 처방으로 동물 모델에서 항염증⁶⁾ 및 진통 효과가 있으며, 마취제의 수면 시간을 연장시키고, 위장관 운동성과 쾌양 발생을 억제시키는 등의 약리활성이 보고되어 있다.^{1,7)} 구성약재 중 약역의 주요 성분인 albiflorin과 paeoniflorin은 항고고,⁸⁾ 신경근 차단,⁹⁾ 면역조절¹⁰⁾ 및 항고혈당¹¹⁾ 효과를 가지며, 진피의 hesperidin은 항산화,¹²⁾ 항염증¹³⁾ 및 면역조절¹⁴⁾ 작용

을 하는 것으로 알려져 있다. 또한, 지실에 함유된 naringin과 poncirin은 항 *Helicobacter pylori*,¹⁵⁾ 항염증¹⁶⁾ 작용 및 항아테롬성 효과¹⁷⁾를 나타내며, 감초의 주요 성분인 liquiritin과 glycyrrhizin은 항염증,¹⁸⁾ 면역조절,¹⁹⁾ 항우울²⁰⁾ 및 신경보호²¹⁾ 효과를 가진다고 보고되어 있다. 이와 같이 삼출건비탕과 이를 구성하는 약재들의 주요 성분에 대한 생리활성은 알려져 있지만, 삼출건비탕 처방의 추출 용매에 따른 성분 및 활성 차이 등에 대한 연구 결과는 발표된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 삼출건비탕을 물과 70% EtOH를 이용하여 추출한 추출물을 대상으로 구성약재의 주요 성분인 albiflorin, paeoniflorin, hesperidin, naringin, poncirin, liquiritin 및 glycyrrhizin에 대하여 동시분석을 실시하였다.

또한 모든 질병에서 기본적으로 발생하는 염증반응에 대한 삼출건비탕 물 추출물 및 70% EtOH 추출물의 효능을 비교하기 위해서 *in vitro* assay를 통해 항염증, 항알러지 및 항비만 효능을 평가하였다. 분석결과 물 추출물보다 70% EtOH 추출물에서 paeoniflorin을 제외한 모든 성분들의 함량이 높게 추출되어 나오는 것을 확인하였으며, 생리활성 역시 유기용매 추출물에서 더 높게 나타나는 것을 확인하였다. 염증은 생체 조직의 외부 자극에 대한 방어반응의 하나로서 염증반응이 일어나면 proinflammatory cytokine과 NO 및 PGE₂와 같은 염증인자들이 생성되며, 이들의 과도한 분비는 염증 반응을 촉진시켜 발적, 발열, 통증, 기능장애 등의 염증성 질환을 야기한다.²²⁾ 본 연구에서 삼출건비탕의 항염증 효능을 확인하기 위하여 RAW 264.7 대식세포에서 LPS로 유도된 NO, PGE₂, IL-6 및 TNF- α 생성에 대한 억제 활성을 평가한 결과, 물 추출물은 NO, IL-6 및 TNF- α 생성을 억제하는 것으로 나타났으나 농도의존적인 효과는 없었으며 PGE₂ 생성은 미미한 수준으로 억제하는 것으로 나타났다. 반면, 70% EtOH 추출물은 NO, PGE₂, IL-6 및 TNF- α 모두 유의적으로 억제하며 물 추출물에 비해 억제율이 높은 것으로 나타났다. 이는 삼출건비탕 구성 약재 성분 중에서 hesperidin, naringin, poncirin, liquiritin, glycyrrhizin 등 항염증 활성이 뛰어난 성분들이 물에 비해 유기용매에서 다량 추출됨으로써 70% EtOH 추출물이 상대적으로 높은 활성을 나타내는 것으로 판단되었다.

Chemokine은 백혈구의 이동과 활성화를 조절하는 cytokine의 한 그룹으로서 조직으로 염증세포의 침윤을 조절한다.²³⁾ T helper (Th) 2 세포는 CC chemokine 수용체-4 (CCR4)를 발현하며, CCR4는 thymus and activation-regulated chemokine (TARC)/CCL17과 MDC/CCL22의 수용체이다.²³⁾ Th2-type chemokine에 속하는 MDC/CCL22와 Th1-type chemokine인 RANTES/CCL5는 아토피 피부염과 같은 염증성 알러지 질환에 관여하며, HaCaT 세포에서 TNF- α 와 IFN- γ 로 자극했을 때 분비량이 증가한다.²⁴⁻²⁷⁾ 이에 본 연구에서는 HaCaT 세포를 이용하여 MDC와 RANTES의 생성에 대한 삼출건

비탕의 억제효과를 조사함으로써 항아토피 효능을 평가하였다. TNF- α /IFN- γ 처리로 인해 증가한 MDC 및 RANTES 분비가 물 추출물에 의해 유의적으로 억제되었지만, 70% EtOH 추출물이 물 추출물보다 더 낮은 농도에서 높은 억제율을 나타내었다. 따라서 삼출건비탕을 물보다 70% EtOH로 추출할 경우 아토피 피부염의 예방 및 치료에 더 효과적인 성분이 다량 추출되는 것으로 사료된다. 한편, 여러 연구에 의하면 호흡기 상피세포는 바이러스 감염, TNF- α , IFN- γ 등과 같은 여러 자극에 의하여 IL-6, IL-8, RANTES 등의 cytokine 및 chemokine을 분비해 기도 염증반응에 관여하는 것으로 알려져 있다. 특히 RANTES는 기관지 천식의 병리에서 중요한 호산구에 대하여 강력한 화학 주성을 가지고 호산구를 활성화하여 eosinophil cationic protein 등을 분비함으로써 알러지 염증반응에 의한 기도 손상에서 중요한 역할을 한다.²⁸⁾ 따라서 본 연구에서 TNF- α 로 자극시킨 BEAS-2B 세포에서 RANTES 분비에 대한 삼출건비탕의 억제 활성을 측정하여 항천식 효능을 평가하였다. 그 결과 물 추출물과 70% EtOH 추출물 모두 RANTES 분비를 농도의존적으로 억제하는 것으로 나타났지만, 70% EtOH 추출물이 물 추출물에 비해 상대적으로 높은 활성을 가짐으로써 기관지 천식 완화에 효과적인 성분이 유기용매에 의해 다량 추출된 것으로 판단되었다.

염증에서 leptin의 역할에 대한 관심이 증가하면서 비만 역시 염증과 관련이 있다고 보고되었다.²⁹⁻³⁰⁾ Leptin은 지방 세포에서 분비되는 유사 cytokine hormone으로 중추신경계를 통해 식욕과 체중조절을 유도하는 것으로 알려져 있으며,³¹⁾ adipogenesis는 GPDH에 의해 glycerol에서 triacylglycerol로의 전환을 통해 유도된다.³²⁾ 이에 본 연구에서 3T3-L1 preadipocytes에서 adipocytes로 분화되는 과정에서 그 발현량이 증가하는 GPDH 및 leptin에 대한 삼출건비탕의 억제 활성을 측정하여, 물 추출물에 비해 70% EtOH 추출물의 활성이 더 높은 것으로 나타났다. 따라서 70% EtOH 추출물에 항비만 활성을 지닌 성분이 다량 추출되었음을 유추할 수 있다.

결 론

삼출건비탕을 물과 70% EtOH를 이용하여 추출한 추출물을 대상으로 albiflorin, paeoniflorin, hesperidin, naringin, poncirin, liquiritin 및 glycyrrhizin에 대하여 동시분석을 실시한 결과 물 추출물보다 70% EtOH 추출물에서 paeoniflorin을 제외한 모든 성분들의 함량이 높게 추출되어 나오는 것을 알 수 있다. 또한 삼출건비탕 물 추출물에 비해 70% EtOH 추출물의 항염증, 항알러지 및 항비만 효능이 상대적으로 높은 것은 유기용매에 의해 다량 추출된 성분들에서 기인한 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 한국한의학연구원에서 지원하는 ‘표준한방치방 EBM 구축사업 (K12031)’에 의해 수행되었으며 이에 감사 드린다.

인용문헌

- Kim, S. W. and Lee, T. H. (1988) Effect of samchulkunbitang on the gastric secretion and intestinal transport in the rat. *Korean J. Oriental Med. Pathol.* **3**: 84-90.
- Kim, T. J., Seo, E. Y., Jang, Y. S., Kim, S. H., Kim, D. H., Chu, V. M., Kim, D. H. and Kang, J. S. (2012) Influential characteristics of decoction waters on extraction of components in corydalis tuber analyzed by multiple factor analysis. *Kor. J. Pharmacogn.* **43**: 16-21.
- Leem, K. H., Kim, H. C. and Ahn, D. K. (1996) A study for standardization of Zingiberis rhizome-A study on quantitative analysis of 6-gingerol in *Zingiberis officinale* ROSCOE by HPLC and extracting rate with different eluants. *Kor. J. Herbology* **11**: 85-91.
- Pang, T. S., Lee, K., Ham, I., Bu, Y., Kim H., Rhee J. S. and Choi H. Y. (2008) A study on the content changes of β -asarone and α -asarone in *Acorus gramineus* according to its parts, extraction solvent, and fermentation. *Kor. J. Herbology* **23**: 149-157.
- Seo, H. S. (2010) The comparative study of anti-inflammation and anti-oxidation in accordance with extraction solvents of *Jeondo-san*. *J. Korean Orient. Med. Ophthal. Otolaryn. Dermatol.* **23**: 69-80.
- Lee, J. A., Ha, H. K., Jung, D. Y., Lee, H. Y., Lee, N. H., Lee, J. K., Huang, D. S. and Shin, H. K. (2010) Anti-inflammatory Effects of Sam-chul-kun-bi-tang. *Korean J. Orient. Med.* **31**: 47-54.
- Kim, T. G., Ko, S. G. and Baik, T. H. (1997) An experimental study on the effect of Samchulgunbitang affecting gastrointestinal and central nervous system. *Korean J. Orient. Med.* **18**: 1-14.
- Ishida, H., Takamatsu, M., Tsuji, K. and Kosuge, T. (1987) Studies on active substances in herbs used for Oketsu (“stagnant blood”) in Chinese medicine. VI On the anticoagulative principles in *Paeoniae Radix*. *Chem. Pharm. Bull.* **35**: 849-852.
- Kimura, M., Kimura, I. and Nojima, H. (1985) Depolarizing neuromuscular blocking action induced by electropharmacological coupling in the combined effect of paeoniflorin and glycyrrhizin. *Jpn. J. Pharmacol.* **37**: 395-399.
- Liang, J., Zhou, A., Chen, M. and Xu, S. (1990) Negatively regulatory effects of paeoniflorin on immune cells. *Eur. J. Pharmacol.* **183**: 901-902.
- Hsu, F. L., Lai, C. W. and Cheng, J. T. (1997) Antihyperglycemic effects of paeoniflorin and 8-debenzoylpaeoniflorin, glucosides from the root of *Paeonia lactiflora*. *Planta Med.* **63**: 323-325.
- Wilmsen, P. K., Spada, D. S. and Salvador, M. (2005) Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 4757-4761.
- Galati, E. M., Monforte, M. T., Kirjavainen, S., Forestieri, A. M., Trovato, A. and Tripodo, M. M. (1994) Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): antiinflammatory and analgesic activity. *Farmaco.* **40**: 709-712.
- Yeh, C. C., Kao, S. J., Lin, C. C., Wang, S. D., Liu, C. J. and Kao, S. T. (2007) The immunomodulation of endotoxin-induced acute lung injury by hesperidin *in vivo* and *in vitro*. *Life Sci.* **80**: 1821-1831.
- Kim, D. H., Bae, E. A. and Han, M. J. (1999) Anti-Helicobacter pylori activity of the metabolites of poncirin from *Poncirus trifoliata* by human intestinal bacteria. *Biol. Pharm. Bull.* **22**: 422-424.
- Kim, J. B., Han, A. R., Park, E. Y., Kim, J. Y., Cho, W., Lee, J., Seo, E. K. and Lee, K. T. (2007) Inhibition of LPS-induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by poncirin through the NF-kappaB inactivation in RAW 264.7 macrophage cells. *Biol. Pharm. Bull.* **30**: 2345-2351.
- Lee, C. H., Jeong, T. S., Choi, Y. K., Hyun, B. H., Oh, G. T., Kim, E. H., Kim, J. R., Han, J. I. and Bok, S. H. (2001) Anti-atherogenic effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, associated with hepatic ACAT and aortic VCAM-1 and MCP-1 in high cholesterol-fed rabbits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**: 681-688.
- Schröfelbauer, B., Raffetseder, J., Hauner, M., Wolkerstorfer, A., Ernst, W. and Szolar, O. H. (2009) Glycyrrhizin, the main active compound in liquorice, attenuates pro-inflammatory responses by interfering with membrane-dependent receptor signaling. *Biochem. J.* **421**: 473-482.
- Yoshikawa, M., Matsui, Y., Kawamoto, H., Umamoto, N., Oku, K., Koizumi, M., Yamao, J., Kuriyama, S., Nakano, H., Hozumi, N., Ishizaka, S. and Fukui, H. (1997) Effects of glycyrrhizin on immune-mediated cytotoxicity. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **12**: 243-248.
- Wang, W., Hu, X., Zhao, Z., Liu, P., Hu, Y., Zhou, J., Zhou, D., Wang, Z., Guo, D. and Guo, H. (2008) Antidepressant-like effects of liquiritin and isoliquiritin from *Glycyrrhiza uralensis*. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **32**: 1179-1184.
- Yang, Y., Bian, G. X. and Lu, Q. J. (2008) Neuroprotection and neurotrophism effects of liquiritin on primary cultured hippocampal cells. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **33**: 931-935.
- Posadas, I., Terencio, M. C., Guillén, I., Ferrándiz, M. L., Coloma, J., Payá, M. and Alcaraz, M. J. (2000) Co-regulation between cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **361**: 98-106.

23. Yoshie, O., Imai, T. and Nomiyama, H. (2001) Chemokines in immunity. *Adv. Immunol.* **78**: 57-110.
24. Rha, Y. H. (2005) Role of chemokines in the pathogenesis of atopic. *Pediatr. Allergy. Respir. Dis.* **15**: 238-241.
25. Zhang, M., Zhu, L., Feng, Y., Yang, Y., Liu, L. and Ran, Y. (2008) Effects of acitretin on proliferative inhibition and RANTES production of HaCaT cells. *Arch. Dermatol. Res.* **300**: 575-581.
26. Yu, B., Koga, T., Urabe, K., Moroi, Y., Maeda, S., Yanagihara, Y. and Furue, M. (2002) Differential regulation of thymus- and activation-regulated chemokine induced by IL-4, IL-13, TNF-alpha and IFN-gamma in human keratinocyte and fibroblast. *J. Dermatol. Sci.* **30**: 29-36.
27. Xiao, T., Kagami, S., Saeki, H., Sugaya, M., Kakinuma, T., Fujita, H., Yano, S., Mitsui, H., Torii, H., Komine, M., Asahina, A., Nakamura, K. and Tamaki, K. (2003) Both IL-4 and IL-13 inhibit the TNF-alpha and IFN-gamma enhanced MDC production in a human keratinocyte cell line, HaCaT cells. *J. Dermatol. Sci.* **31**: 111-117.
28. Zhang, L., Redington, A. E. and Holgate, S. T. (1994) RANTES: A novel mediator of allergic inflammation? *Clin. Exp. Allergy* **24**: 899-904.
29. La Cava, A. and Matarese, G. (2004) The weight of leptin in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **4**: 371-379.
30. Fantuzzi, G. (2005) Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **115**: 911-919.
31. Isaia, G. C., D'Amelio, P., Di Bella, S. and Tamone, C. (2005) Is leptin the link between fat and bone mass? *J. Endocrinol. Invest.* **28**: 61-65.
32. Trayhurn, P. and Wood, I. S. (2004) Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br. J. Nutr.* **92**: 347-355.
- (2012. 9. 24 접수; 2012. 11. 1 심사; 2012. 11. 19 게재확정)