

## 한국산과 중국산 박하의 항염증 효과에 관한 비교연구

임혜선 · 김정훈 · 하혜경 · 서창섭 · 신현규\*

한국한의약연구원 한약기초연구그룹

### Comparative Study of the Anti-inflammatory Effects of Menthae Herba from Korea and China

Hye-Sun Lim, Jung-Hoon Kim, Hyekyung Ha, Chang-Seob Seo and Hyeun Kyoo Shin\*

Basic Herbal Medicine Research Group, Korea Institute of Oriental Medicine, 483 Expo-ro, Yuseong-gu,  
Daejeon 305-811, Republic of Korea

**Abstract** – Menthae herba (MH) extracts exhibit anti-inflammatory effects. The purpose of this study was to determine whether the anti-inflammatory effects of MH extracts vary according to the cultivation regions. We performed a comparative analysis of MH extracts by evaluating the production of inflammatory mediators in RAW 264.7 murine macrophage cells and HaCaT human keratinocyte cells. MH extracts obtained from different cultivation regions in Korea and China significantly reduced the production of nitric oxide (NO), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in RAW 264.7 cells stimulated with lipopolysaccharide (LPS). No differences in these inhibitory activities were observed between MH extracts. In HaCaT cells stimulated with TNF- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), MH extracts did not inhibit the production of macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22), but most extracts reduced the production of the regulated on activation normal T-cell expression and secreted (RANTES/CCL5). We used clustering tree analysis of the MH extracts according to the chromatographic pattern and anti-inflammatory potency of MH extracts. We observed differences in the chromatographic pattern of MH extracts but no difference in anti-inflammatory potency. Our findings suggest that MH extracts from different regions do not show any differences in their pharmacological potency in that MH extracts are used as therapeutic agents to treat inflammatory disorders.

**Key words** – Menthae herba, Comparative study, Cultivation region, Anti-inflammatory effect

박하(Menthae Herba)는 꿀풀과(Lamiaceae)에 속하는 다년 생 식물로 한국, 중국, 시베리아 습지에 자생한다.<sup>1)</sup> 박하의 기원에 대해 한국에서는 *Mentha arvensis* L. var. *piperascens* Malinvaud로 규정하고 있고, 중국에서는 *M. haplocalyx* Briq.로 규정하고 있어서 한국과 중국 간의 기원종 차이가 존재한다.<sup>2,3)</sup> 전통적으로 박하는 거풍, 진해, 해독에 관련하여 사용되어져 왔으며 풍열, 두통, 인후종통, 복부고창, 치통, 피부소양에 대하여 치료효과가 있는 것으로 알려져 있다.<sup>4)</sup> 이러한 특징을 바탕으로 많은 연구자들에 의해 박하의 약리학 적 효능에 관련된 많은 연구가 실시되었다. 이전 보고에 따르면 박하는 항 HSV-1, 항균성, 항산화 효과, 그리고 항암 및 방사선보호 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.<sup>5-8)</sup> 또한 박하는 복강비만세포에서 histamine 분비를 억제하여

항알러지 효과를 나타내었으며,<sup>9)</sup> 박하의 구성물질 역시 histamine 분비를 억제한다고 보고되었다.<sup>10)</sup> 이처럼 박하의 약리학 적 특징에 관련된 보고는 다양하게 보고되었으나, 박하의 효능과 관련하여 각 산지별 특징에 대해서는 아직 보고된 바가 없다. 현재 한국과 중국에서 규정된 박하의 기원 종이 서로 다른 상황에서 시중에 유통되고 있는 한국산, 중국산 박하의 효능상에 차이가 존재하는지에 대한 연구가 필요한 실정이다.

알러지성 질환은 수세기에 걸쳐 유병률이 증가해오고 있으며, 특히 유년기에 있어 유병률이 높아 현대사회의 중요한 질병 중 하나로 알려져 있다.<sup>11)</sup> 많은 연구자들이 다양한 표적물질을 대상으로 한 항알러지성 물질들을 개발하고 있으며 regulated on activation normal T-cell expression and secreted (RANTES/CCL5), thymus and activation regulated chemokine (TARC/CCL17), macrophage-derived chemokine

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

(MDC/CCL22)은 알러지성 질환의 발현과 진행에 있어 중요한 표적물질로 사용되어 왔다.<sup>12)</sup> RANTES/CCL5는 피부 섬유질과 아토피 환자에서 많이 나타나는 케모카인으로 *kruppel-like factor 13* (KLF13)에 의해 T 세포를 조절한다고 보고되었으며,<sup>13)</sup> TARC/CCL17는 CC 케모카인의 일종으로 흉선에서 분비되며 *monocyte-derived dendritic cell*, *endothelial cell* 및 *각질형성세포*에 의해 생성된다고 보고되었다.<sup>14)</sup> 또한, MDC/CCL22는 TARC와 밀접한 관련이 있는 CC 케모카인으로 *dendritic cell*, B 세포, *macrophage*, *keratinocyte* 및 *epithelial cell*에서 분비된다고 알려져 있다.<sup>15)</sup> 이러한 알러지성 질환은 염증반응을 동반하기 때문에 염증과 관련된 표적물질에 있어서도 관심이 높아지고 있다. 염증반응이 일어나면 여러 가지 염증인자들이 만들어지는데, *inducible nitric oxide synthase* (iNOS)에 의해서 생성되는 *nitric oxide* (NO)와 *cyclooxygenase-2* (COX-2)에 의해서 생성되는 *prostaglandin E<sub>2</sub>* (PGE<sub>2</sub>) 등이 있다. 또한 염증인자로 염증 cytokines인 *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ), *interleukin-6* (IL-6) 등이 포함된다.<sup>16)</sup> 따라서 본 연구에서는 한국과 중국의 산지별 박하에 대해 각질형성세포주를 이용하여 RANTES/CCL5 및 MDC/CCL22 등의 알러지성 지표물질과 대식세포주를 이용하여 NO, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  등과 같은 염증성 지표물질에 대한 생성량을 확인하여 한국산과 중국산 박하의 항염증성 효과에 대해 비교 분석을 실시하였다.

## 재료 및 방법

**실험재료** – Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin, phosphate-buffered saline (PBS)은 Gibco BRL. (USA), cell counting kit-8 (CCK-8)은 Dojindo (Japan), lipopolysaccharide (LPS), *N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine* (L-NMMA), *indomethacin*은 Sigma Chemical Co. (USA), *Prostaglandin E<sub>2</sub>* (PGE<sub>2</sub>) ELISA kit는 Cayman Chemical (USA), *tumor necrosis factor* (TNF)- $\alpha$ , *interferon* (IFN)- $\gamma$ , *mouse-TNF- $\alpha$*  ELISA Kit, *human-RANTES/CCL5* ELISA Kit 및 *human-MDC/CCL22* ELISA kit는 R&D systems (USA) 제품을 구입하여 사용하였다.

**시료추출** – 건조된 산지별 박하 1g을 분쇄기(RT-08, KyungSeo Machine Co., Incheon, Korea)를 이용하여 분말로 만들고 여기에 100% 메탄올 100 mL을 가한 뒤 1시간 동안 초음파 추출하였다. 추출액을 여과지(150 mm, Advantec, Tokyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)로 여과한 후 여액을 감압 농축하여 시료로 사용하였다(Table I).

**Gas Chromatography 분석** – 분석에는 불꽃 이온화 검출기(Flame ionization detector, FID)가 장착된 Shimadzu GC-17A (Japan)가 사용되었고, HP-Innowax (30 m  $\times$  0.23 mm,

**Table I.** Cultivation areas of Korea and China used in experiment and contents (%) of reference compound in mentha herba samples

Sample	Area	Yield (%)	(-)-Menthone (%)	(-)-Menthol (%)
K-1	경북고령	5.45	0.62	0.48
K-2	전북남원	5.75	1.43	0.47
K-3	전남구례	8.50	0.74	0.32
K-4	한국	4.74	2.11	0.58
K-5	한국	4.32	1.67	0.33
K-6	한국	5.17	0.55	0.32
K-7	한국	4.75	0.51	0.13
C-1	중국	6.12	3.30	1.31
C-2	중국	5.80	1.68	1.27
C-3	중국	7.69	1.51	1.05
C-4	중국	7.57	4.11	2.06
C-5	중국	7.24	2.66	2.67
C-6	중국	5.55	1.56	2.15

0.50  $\mu$ m, Agilent, MA, USA) 컬럼을 이용하여 분리를 진행하였다. 분석 조건은 Kim 등의 논문과 같다.<sup>17)</sup>

**세포 배양** – RAW 264.7 세포주(mouse macrophage cell line)는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 분양 받았고, HaCaT 세포주(human keratinocyte cell line)는 세종대학교 이나경 교수님(Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 사용하였다. RAW 264.7, HaCaT 세포는 각각 5.5% FBS 및 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

**세포독성 평가** – RAW 264.7 ( $3 \times 10^3$  cells/well), HaCaT ( $1 \times 10^3$  cells/well) 세포를 96 well plate에서 18시간 배양한 후, 산지별 박하의 추출물과 지표성분인 (-)-Menthone, (-)-Menthol을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이어서 CCK-8 용액 10  $\mu$ L를 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.

**NO 생성량 측정** – RAW 264.7 ( $2.5 \times 10^5$  cells/well) 세포를 48 well plate에 분주하고, 산지별 박하의 추출물과 LPS (1  $\mu$ g/mL)를 동시에 처리하여 18시간 동안 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub>의 형태를 통해 측정하였다. 세포배양 상등액 50  $\mu$ L와 Griess 시약 [1% (w/v) sulfanilamid, 0.1% (w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (w/v) phosphoric acid]

100  $\mu$ L를 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 ( $\text{NaNO}_2$ )를 연속 희석하여 얻었다(1-100  $\mu$ M).

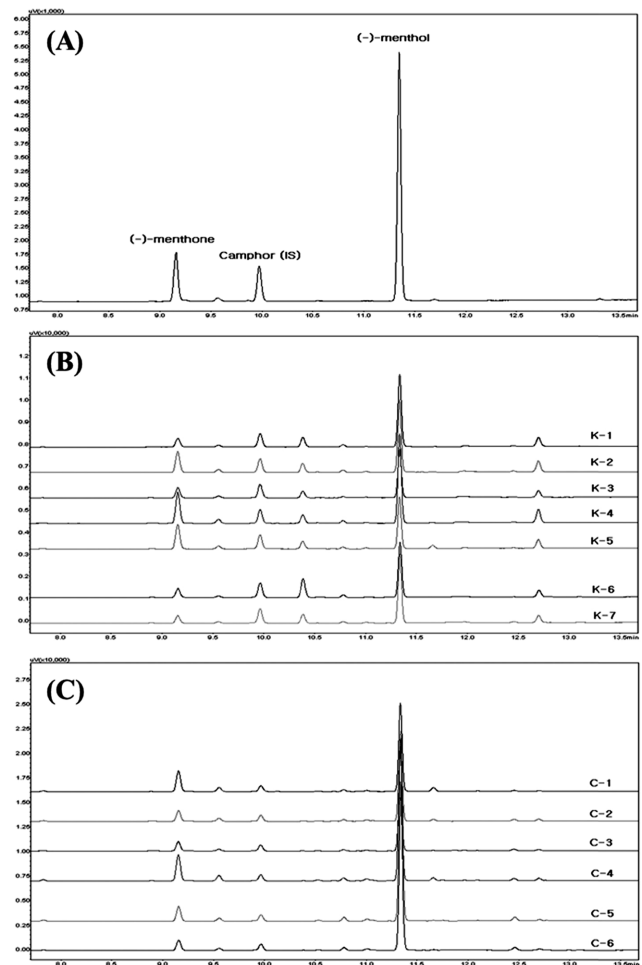
**PGE<sub>2</sub> 및 TNF- $\alpha$  생성량 측정** - 세포 배양액 내의 PGE<sub>2</sub> 및 TNF- $\alpha$ 의 양을 측정하기 위해 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 이용하여 실험을 수행하였다. NO 생성량 측정에 사용했던 동일한 세포배양 상등액을 PGE<sub>2</sub> 및 TNF- $\alpha$  측정에 사용하였다. PGE<sub>2</sub>의 양을 측정하기 위해 상등액을 goat anti-mouse IgG로 coating된 96 well plate에 각각 50  $\mu$ L씩 loading하고, 여기에 primary antibody solution 50  $\mu$ L와 PGE<sub>2</sub> conjugate 50  $\mu$ L씩 첨가하여 4°C에서 overnight시켰다. Washing buffer로 4회 세척하고 substrate solution을 200  $\mu$ L씩 처리하여 90분간 반응시킨 후, 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 COX-2 생성 억제제인 indomethacin을 사용하였다. TNF- $\alpha$ 의 양을 측정하기 위해 배양액을 적절한 농도로 희석한 후, anti-mouse TNF- $\alpha$ 로 coating된 96 well plate에 50  $\mu$ L씩 첨가하여 4°C에서 overnight시켰다. Washing buffer로 3회 세척한 다음, 100  $\mu$ L의 streptavidine-HRP solution을 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 다시 washing buffer로 3회 세척하였다. 여기에 di-(2-ethylhexyl)-2,4,5-trimethoxybenzalmalonate (TMB) substrate를 100  $\mu$ L씩 처리하여 30분간 반응시킨 후 100  $\mu$ L의 stop solution을 처리한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**MDC 및 RANTES 분비량 측정** - HaCaT ( $1 \times 10^6$  cells/well) 세포를 6 well plate에 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에 18시간 배양한 후 serum-free DMEM 배지로 교체하고, 산지별 박하의 추출물과 TNF- $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$  (각각 10 ng/mL)를 동시에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. ELISA kit를 이용하여 제조사의 방법에 따라 세포 상등액 내에 존재하는 MDC 및 RANTES의 분비량을 측정하였다.

**통계처리** - 본 연구의 모든 측정결과는 mean  $\pm$  SD로 나타내었다. 대조군과 추출물 처리군 간의 차이는 Student's t-test (Excel 2010 program)를 사용하여 통계학적 분석을 수행하였으며 P값이 0.05 미만일 경우 ( $P < 0.05$ ) 통계적인 유의성이 있다고 판정하였다. 또한 군집 방법(clustering tree)은 SYSTAT 10.0 프로그램(SYSTAT Inc., Evanston, IL, USA)을 사용하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

**Chromatography를 이용한 산지별 박하 분석** - 한국산 박하와 중국산 박하에서 모두 지표물질인 (-)-menthone과 (-)-menthol이 검출되었지만, 지표물질 peak의 크기를 비롯한



**Fig. 1.** Chromatograms of standard mixture (A), Menthae herba extracts from Korea (B) and China (C).

전체적인 패턴에서 차이점을 보였다. Kim 등의 연구에 의하면 지표물질 함량이 한국산보다 중국산에서 더 높은 것으로 확인되었는데 (Table I),<sup>17)</sup> 이를 크로마토그램으로 살펴보면 한국산 박하의 경우 지표물질 모두 중국산 박하보다 작게 나타났고, retention time 10.3 min, 12.7 min peak가 두드러지게 나타나 중국산 박하와의 차이를 확인할 수 있었다. 이에 반해 중국산 박하는 12.4 min peak가 두드러지게 나타나 한국산 박하와 차이가 있었다 (Fig. 1). 전체적으로 한국산 박하와 중국산 박하는 chromatogram상에서 서로 다른 패턴을 보여 서로 구분할 수 있는 기준이 되었다.

**산지별 박하 추출물에 대한 세포독성** - RAW 264.7 세포 및 HaCaT 세포에 추출물(7.8~500  $\mu$ g/mL)을 연속 희석하여 처리한 후, 24시간 동안 배양하여 CCK-8 방법을 이용하여 세포독성을 관찰하였다. 세포독성은 무처리군의 세포생존율 (cell viability; 100%)을 기준으로 RAW 264.7 세포는 250  $\mu$ g/mL, HaCaT 세포는 62.5  $\mu$ g/mL 범위 내에서 세포독성이 없는 것으로 나타났다 (data not shown). 따라서 이후 실험은

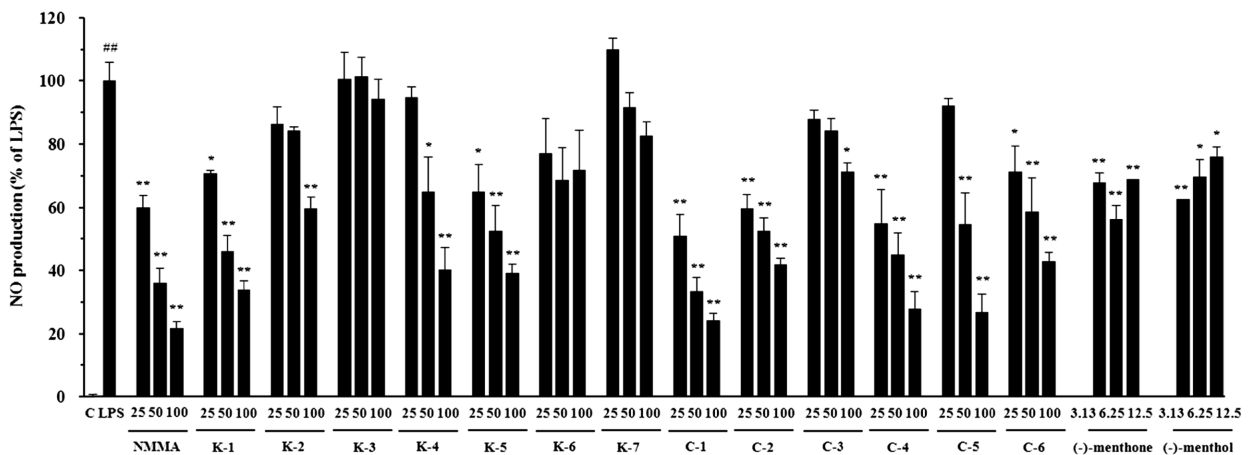
독성이 없는 농도 범위에서 수행하였으며, 산지별 박하 추출물을 RAW 264.7 세포에 25, 50, 100 µg/mL, HaCaT 세포에 12.5, 25, 50 µg/mL의 농도로 처리하였다.

**산지별 박하 추출물의 NO 생성억제 효과** - 활성산소 중 하나이며, 염증유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO 생성에 대한 산지별 박하 추출물의 효과를 알아보았다. 생성된 NO 양을 Griess 시약을 이용하여 세포배양 중에 존재하는 NO<sub>2</sub>의 형태로 측정된 결과, 지표물질인 (-)-menthone과 (-)-menthol에서는 억제효과는 있지만 농도 의존적으로 나타나지 않았다. 산지별 박하 추출물은 한국산 추출물 K-1, K-2, K-4, K-5와 중국산 추출물 C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6이 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하였으며, LPS 처리군 보다 산지별 박하 추출물의 최고 농도 100 µg/mL에서 각각 K-1 (83.5%), K-2 (51.0%), K-4 (75.5%), K-5 (76.9%), C-1 (96.1%), C-2 (73.6%), C-3 (36.4%), C-4 (91.5%), C-5 (92.8%), C-6 (72.2%)이 유의성 있게 NO 생성을 억제하였다(Fig. 2).

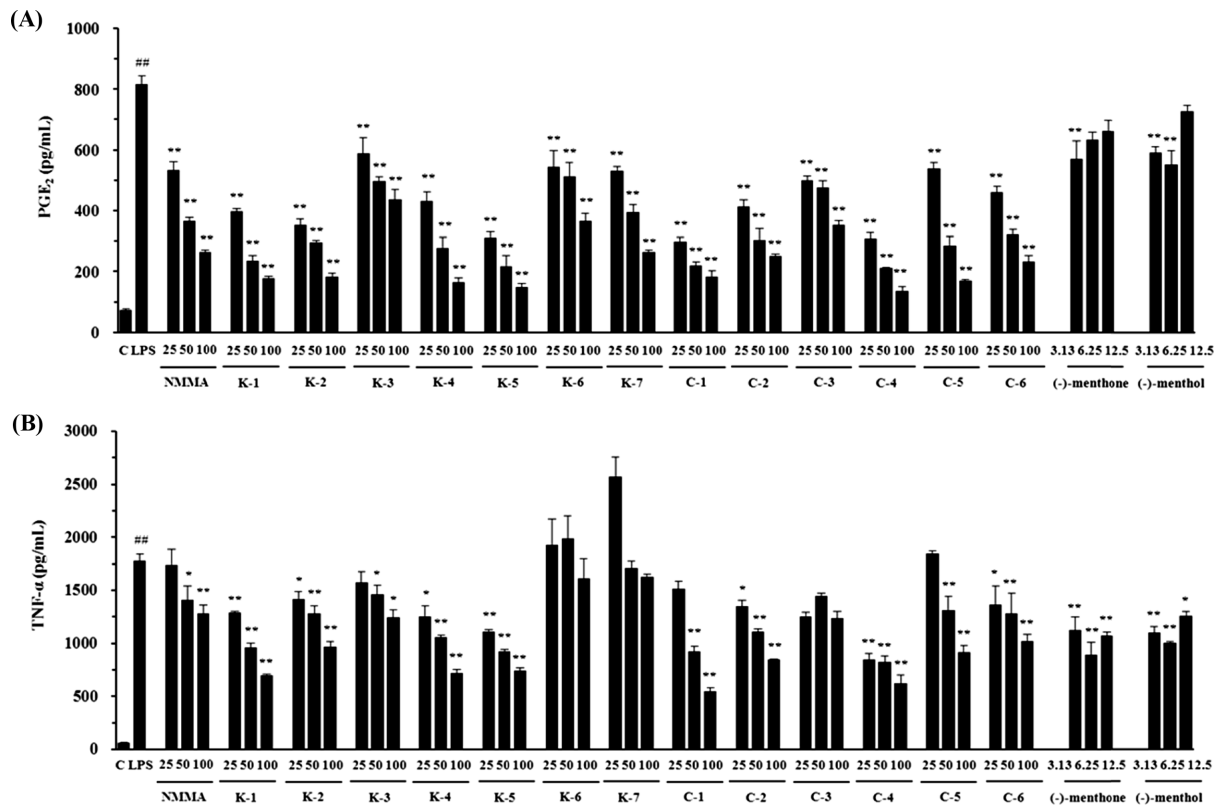
**산지별 박하 추출물의 PGE<sub>2</sub> 및 TNF-α의 생성억제 효과** - 염증은 외부 자극에 대한 생체조직의 방어반응의 하나로, 임상적으로는 발적, 발열, 종창, 동통, 기능장애 등의 증상이 나타나며, cytokines, PGE<sub>2</sub>, lysosomal enzyme, free radical 등 다양한 매개물질이 관여하고 있다.<sup>18)</sup> 이 중 PGE<sub>2</sub>는 염증반응, 면역반응, 그리고 angiogenesis를 촉진하는 등 암 발생에도 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있으며,<sup>19,20)</sup> TNF-α는 macrophage와 mast cell 등에서 분비되며, LPS 반응의 주요 매개체로서 내재면역에 있어서 중요한 역할을 하며 만성 염증성 반응과도 관련되어 있다.<sup>21)</sup> RAW 264.7 세포에 1 µg/mL의 LPS를 처리했을 때, PGE<sub>2</sub>의 생성량은 무처

리군(72.41±5.14 pg/mL)과 비교하여 11배(817.08±27.80 pg/mL) 이상 증가되었다. 산지별 박하 추출물을 처리시 LPS 처리군과 비교하여 한국산과 중국산 모두 PGE<sub>2</sub> 생성을 농도 의존적이고 유의적으로 억제하였다(Fig. 3A). 또한 TNF-α는 LPS 처리시 무처리군(57.65±2.00 pg/mL)과 비교하여 30배(1775.59±68.48 pg/mL) 이상 증가되었으며, 산지별 박하 추출물의 최고 농도 100 µg/mL에서 LPS 처리군 보다 한국산 추출물인 K-1 (37.3%), K-2 (53.3%), K-3 (68.9%), K-4 (38.7%), K-5 (39.6%)와 중국산 추출물인 C-1 (28.2%), C-2 (45.7%), C-3 (68.5%), C-4 (32.6%), C-5 (49.6%), C-6 (56.2%)이 농도 의존적으로 TNF-α의 생성을 유의적으로 억제하였다(Fig. 3B). 지표물질인 (-)-menthone과 (-)-menthol은 TNF-α의 생성에 대해서 억제 효과는 있으나 농도 의존적으로 나타나지 않았다.

**산지별 박하 추출물의 MDC 및 RANTES의 생성억제 효과** - 각질형성세포는 다양한 사이토카인과 세포 유착분자를 통해서 T 림프구와 상호 작용을 통하여 여러 가지 피부 질환의 면역 반응에 관여하게 된다.<sup>22)</sup> 이러한 반응은 T 림프구에서 분비하는 염증성 사이토카인인 TNF-α와 IFN-γ 등에 의해서 활성화된다고 알려져 있으며, 이러한 염증성 사이토카인들은 각질형성세포에서 면역활성 인자로 알려진 MDC 및 RANTES 등 케모카인의 생성을 증가시킨다고 보고되었다.<sup>23)</sup> HaCaT 세포에 TNF-α와 IFN-γ 처리시 MDC는 무처리군(28.02±1.28 ng/mL)과 비교하여 17배(499.19±20.69 ng/mL) 이상 증가되었고, 산지별 박하 추출물을 처리한 결과 최고 농도 50 µg/mL에서 TNF-α와 IFN-γ 처리군과 비교하여 한국산 추출물인 K-5 (30.7%), K-6 (45.6%)와 중국산 추출물인 C-6 (23.1%)이 유의적으로 MDC 생성을 억



**Fig. 2.** Effect of Menthae herba extracts on LPS- stimulated NO production in RAW 264.7 cells. The production of NO was assayed from culture medium of cells treated with Menthae herba extracts (25, 50, 100 µg/mL), reference compound (3.13, 6.25, 12.5 µg/mL) and then co-stimulated LPS (1 µg/mL) for 18 h. L-NMMA (25, 50, 100 µM) is used as positive control drug. Each bar represents the mean of three independent experiments. <sup>##</sup>*P*<0.01 vs. vehicle control group; \*,\*\**P*<0.05 and *P*<0.01 vs. LPS treated cells, respectively.

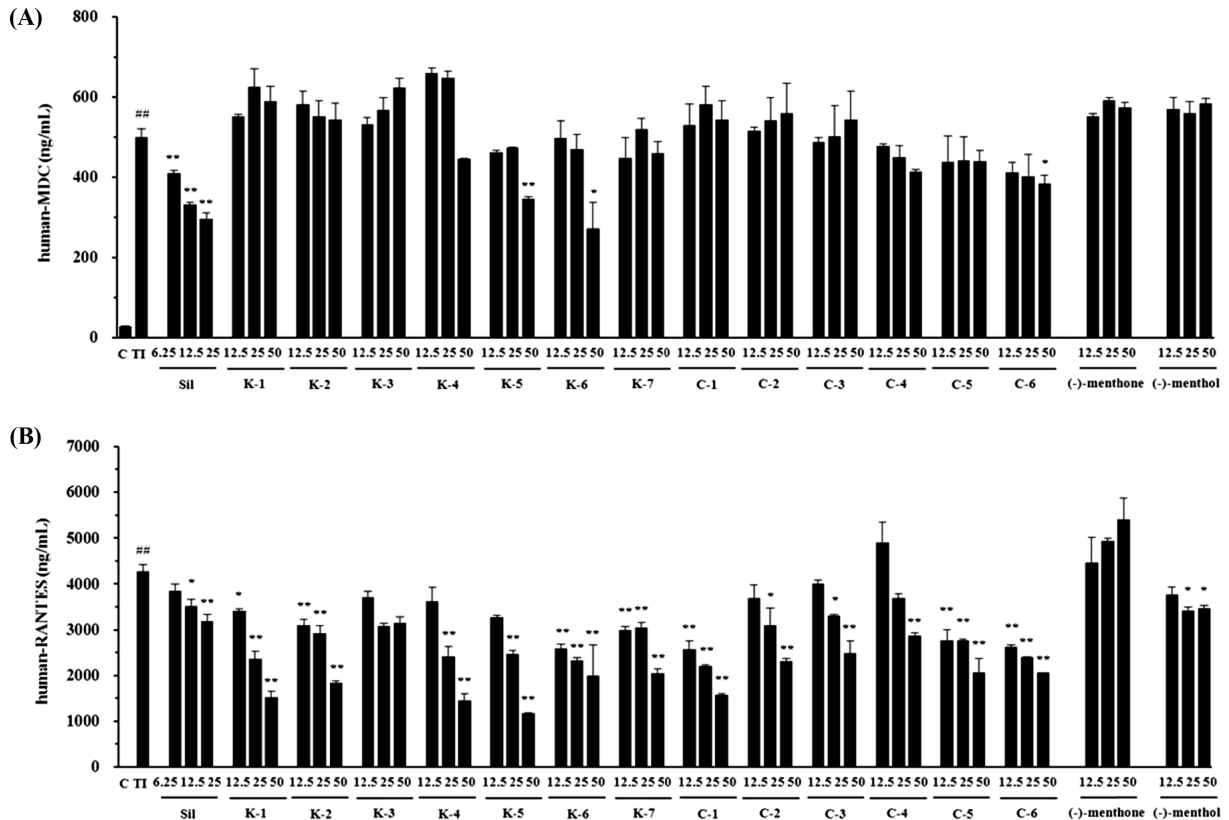


**Fig. 3.** Effect of Menthae herba extracts on LPS- stimulated PGE<sub>2</sub> and TNF-α production in RAW 264.7 cells. The production of PGE<sub>2</sub> (A) and TNF-α (B) was assayed from culture medium of cells treated with Menthae herba extracts (25, 50, 100 μg/mL), reference compound (3.13, 6.25, 12.5 μg/mL) and then co-stimulated LPS (1 μg/mL) for 18 h. Indomethacin (1.25, 2.5, 5 ng/mL) and L-NMMA (25, 50, 100 μM) is used as positive control drug. Each bar represents the mean of three independent experiments. <sup>##</sup>*P* < 0.01 vs. vehicle control group; <sup>\*</sup>, <sup>\*\*</sup>*P* < 0.05 and *P* < 0.01 vs. LPS treated cells, respectively.

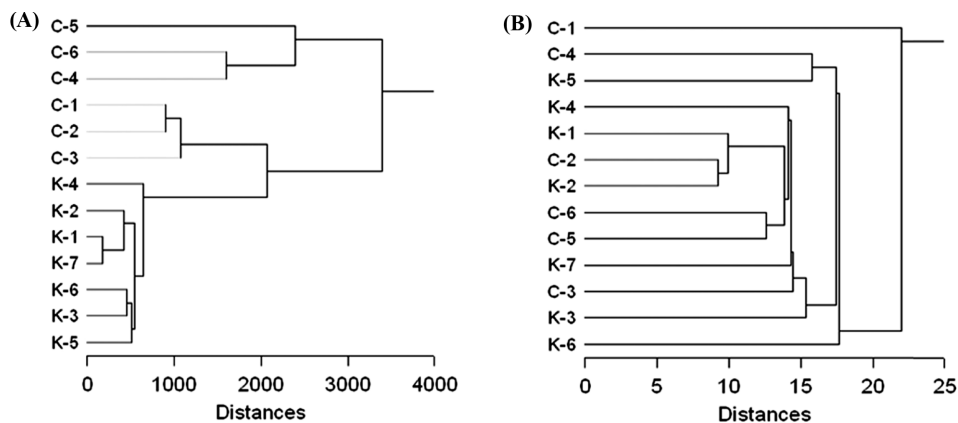
제하였지만, 한국산과 중국산의 다른 추출물들은 MDC 생성 억제효과가 나타나지 않았다(Fig. 4A). 또한 RANTES는 산지별 박하 추출물을 처리한 결과 최고 농도 50 μg/mL에서 TNF-α와 IFN-γ 처리군과 비교하여 한국산 추출물인 K-1 (64.3%), K-2 (56.9%), K-3 (26.0%), K-4 (65.7%), K-5 (72.3%), K-6 (53.3%), K-7 (52.1%)과 중국산 추출물인 C-1 (63.1%), C-2 (45.8%), C-3 (41.6%), C-4 (32.4%), C-5 (51.6%), C-6 (51.6%) 모두 농도 의존적으로 RANTES 생성을 현저히 억제시켰다(Fig. 4B). 지표물질인 (-)-menthone과 (-)-menthol은 MDC의 생성에 대해서 억제 효과는 없었으며, (-)-menthol의 최고 농도 50 μg/mL에서 TNF-α와 IFN-γ 처리군과 비교하여 RANTES 생성 억제 효과를 보였다.

**산지별 박하 추출물에 대한 성분과 효능의 계층적 군집 분석** - 계층적 군집방법은 처음에 *n*개의 군집으로부터 시작하여 점차 군집의 개수를 줄여나가는 방법으로 유사성을 가진 그룹들을 같은 군집으로 군집화 하고, 거리가 가까운 두 집단을 연결하는 방법이다. 산지별 박하 추출물에 대한 성분을 군집 분석한 결과, K-1과 K-7이 가장 가까운 관계를 형성하였고 이는 다시 K-2와 연결되었다. 그리고 K-3은 K-

6과 가장 가까운 관계를 형성하였고 이는 다시 K-5와 연결되었다. 이 둘의 관계가 다시 K-4와 연결되어 한국산 박하는 좁은 distance 내에서 서로 밀접한 관계를 형성하는 것으로 나타났다. 중국산 박하의 경우 C-1과 C-2가 관계를 형성하며 이것이 다시 C-3과 연결되었고, C-4와 C-6이 관계를 형성하고 이것이 다시 C-5에 연결되어 한국산 박하보다는 밀접한 관계를 형성하지는 않았다. 하지만 K-1~K-7과 C-1~C-6이 서로 연계성을 보이는 것으로 나타나 Kim 등의 연구에서 보여진 주성분분석(principle component analysis, PCA) 결과와 마찬가지로 한국산(K-1~K-7)과 중국산 박하(C-1~C-6)는 산지별로 뚜렷하게 군집이 형성되는 것으로 확인되었다(Fig. 5A). 그러나 본 연구에서 실시한 항염증 효능 결과를 바탕으로 한 군집분석에서는 한국산 박하와 중국산 박하가 서로 섞인 상태로 관계를 형성하여 산지별로 뚜렷한 군집이 형성되는 것을 확인할 수 없었다(Fig. 5B). 이러한 결과를 바탕으로 살펴볼 때, 한국산 박하와 중국산 박하는 성분 분석을 통해서도 명확히 구분되어 중간 차이가 있음을 추정해 볼 수 있었지만, 항염증 활성에서는 서로 간에 큰 차이를 보이지 않는 것으로 볼 수 있었다.



**Fig. 4.** Effects of *Menthae herba* extracts on TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ -stimulated chemokine productions in HaCaT cell. The productions of MDC (A) and RANTES (B) were assayed from culture medium of cells treated with *Menthae herba* extracts (12.5, 25, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), reference compound (12.5, 25, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and then co-stimulated TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  (each 10 ng/mL, TI) for 24 h. Silymarin (6.25, 12.5, 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) is used as positive control drug. Each bar represents the mean of three independent experiments.  $^{##}P < 0.01$  vs. vehicle control group; \*,\*\* $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  vs. TI treated cells, respectively.



**Fig. 5.** One-way clustering Hierarchical clustering analysis of chromatographic pattern (A) and anti-inflammatory potency (B) of *Menthae herba* extracts. Clustering analysis was performed with *Menthae herba* extracts from Korea and China.

**결론**

산지별 박하의 효능 차이에 대한 기초자료를 확보하고자 국내에서 수집된 한국산 박하(*Mentha arvensis* L. var. *piper-*

*ascens* Malinvaud) 7종과 중국산 박하(*M. haplocalys* Briq.) 6종의 항염증에 대한 효과를 비교하였다. RAW 264.7 세포에 LPS로 자극을 주고 산지별 박하 추출물을 처리하여 확인해 본 결과, NO, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ 생성에 억제효과가 있음

확인하였으며, HaCaT 세포에 TNF- $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$ 로 자극을 주고 산지별 박하 추출물을 처리한 결과 한국산 박하 K-5, K-6 추출물과 중국산 박하 C-6 추출물에서 MDC 생성을 억제하였지만 한국산과 중국산 박하의 다른 추출물들은 MDC 생성에 억제 효과가 없었다. 또한, 한국산과 중국산 박하 추출물 모두에서 RANTES 생성을 억제하는 것을 확인하였다. 산지별 박하 추출물의 성분과 효능에 대해 평가하고 군집 분석을 통해 비교해 본 결과 성분 분석에서는 한국산과 중국산의 뚜렷한 차이가 나타났다. 이러한 성분 분석의 결과는 산지별 효능비교에 있어 한국산과 중국산의 현저한 차이를 나타낼 것으로 예상되었으나, 본 연구에서 확인한 염증매개인자의 발현에 있어서는 큰 차이를 확인하기 어려웠다. 하지만 본 연구는 제한적인 염증매개인자 발현을 확인하였기 때문에, 산지별 효능의 차이의 결론을 내리기에는 다소 제한적이다. 따라서 이러한 산지별 효능을 정확하게 비교하기 위해서 좀더 심도 있는 추가 실험을 통하여 명확한 차이점을 밝힐 필요가 있을 것으로 사료된다.

## 사 사

본 연구는 한국한의학연구원 '표준한방처방 EBM 구축사업 (K12031)'의 연구비 지원으로 수행된 결과이며 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

- Kim, H., Back, Y. S. and Kim, Y. A. (2003) Inhibitory Effect of Anaphylaxis by Mentha Herba Water Extract. *J. Kor. Soc. Cosm.* **9**: 3-10.
- National Pharmacopoeia Commission of the People's Republic of China (2010) Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 354. China Medical Science Press, Beijing.
- South Korea college of pharmacy conference (2007) Pharmacopoeia person and society, Korean Pharmacopoeia, 1123. Shinilbooks, Seoul.
- Bae, K. H. (2000) Medicinal plants of Korea, 439. Koy-Hak Publishing Co. Ltd., Seoul.
- Schuhmacher, A., Reichling, J. and Schnitzler, P. (2003) Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses *Herpes simplex virus type 1* and *type 2* in vitro. *Phytomedicine* **10**: 504-510.
- Tassou, C., Koutsoumanis, K. and Nychas, G. J. E. (2000) Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International*. **23**: 273-280.
- Lee, S. E., Han, H. S., Jang, I. B., Kim, G. S. and Seong, N. S. (2005) *In vivo* physiological activity of *Mentha viridis* L. and *Mentha piperita* L.. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **13**: 261-267.
- Kumar, A., Samarth, R. M., Yasmeen, S., Shatma, A., Sugahara, T., Terado, T. and Kimura, H. (2004) Anticancer and radioprotective potentials of *Mentha piperita*. *Biofactors* **22**: 87-91.
- Shin, T. Y. and Kim, D. K. (1998) Antiallergic Activity of Menthae Herba. *Kor. J. Pharmacogn.* **29**: 248-253.
- Inone, T., Sugimoto, Y., Masuda, H. and Kamei, C. (2002) Antiallergic effect of flavonoid glycosides obtained from *Mentha piperita* L.. *Biol. Pharm. Bull.* **25**: 256-259.
- Kay, A. B. (2000) Overview of 'allergy and allergic diseases: with a view to the future'. *Br. Med. Bull.* **56**: 843-864.
- Jang, S. Y., Han, E. H., Jeong, H. G. and Kim, D. H. (2007) 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.* **21**: 1099-1107.
- Taha, R. A., Minshall, E. M., Leung, D. Y., Boguniewicz, M., Luster, A., Muro, S., Toda, M. and Hamid, Q. A. (2000) Evidence for increased expression of eotaxin and monocyte chemoattractant protein-4 in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**: 1002-1007.
- Qi, X. F., Kim, D. H., Yoon, Y., Li, J. H., Song, S. B., Jin, D., Huang, X. Z., Teng, Y. C. and Lee, K. J. (2009) The adenylyl cyclase -cAMP system suppresses TARC/CCL17 and MDC/CCL12 production through p38 MAPK and NF- $\kappa$ B in HaCaT keratinocytes. *Mol. Immunol.* **46**: 1925-1934.
- Rossi, D. and Zlotnik, A. (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **18**: 217-242.
- Yun, H. J., Heo, S. K., Yi, H. S., Kim, C. H., Kim, B. W. and Park, S. D. (2008) Anti-inflammatory effect of injinho-tang in RAW264.7 cells. *Korean J. Herbology* **23**: 169-178.
- Kim, J. H., Seo, C. S. and Shin, H. K. (2010) Simultaneous determination of (-)-menthone and (-)-menthol in Menthae Herba by gas chromatography and principal component analysis. *Nat. Prod. Sci.* **16**: 180-184.
- Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H. and Moilane, E. (2005) Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr. Drug Targets-Inflamm. Allergy* **4**: 471-479.
- Higuchi, M., Hisgahi, N., Taki, H. and Osawa, T. (1990) Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J. Immunol.* **144**: 1425-1431.
- Kim, J. Y., Jung, K. S. and Jeong, H. G. (2004) Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS Lett.* **569**: 321-326.
- Lee, A. K., Sung, S. H., Kim, Y. C. and Kim, S. G. (2003) Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- $\alpha$  and COX-2 expression by sauchinone effects on I- $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *British J. Pharmacol.* **139**: 11-20.

22. Kim, S. D., Lee, J. Y., Lee, W. J. and Koo, D. W. (2001) Comparative study on the expression of ICAM-1 of pre-immune state keratinocyte induced by trichophyton antigen. *Korean J. Dermatol.* **39**: 39-42.
23. Vestergaard, C., Bang, K., Gesser, B., Yoneyama, H., Matsushima, K. and Larsen, C. G. (2000) A TH2 chemokine, TARC, produced by keratinocytes may recruit CLA+CCR4+ lymphocytes into lesional atopic dermatitis skin. *J. Invest. Dermatol.* **115**: 640-646.
- (2012. 2. 17 접수; 2012. 4. 18 심사; 2012. 8. 3 게재확정)