



Original Article / 원저

7종 한약재 추출물의 항산화 및 항염증 효과와 이를 이용한 방제 구성에 대한 고찰

박정후 · 박주연 · 박선동*

동국대학교 한의과대학

Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effect of 7 Herbal Extracts and Methods of Herbal Formula Compositioning

JeongHoo Park · JooYeon Park · Sundong Park*

College of Korean Medicine, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : Herbal formulas are complicated to analyze and difficult to compose because of its mixed, complex features. So we discussed about how to compose herbal formulas effective and efficient by analyzing various effectiveness of each herbal extracts.

Methods : To evaluate the effectiveness of herbal formula, anti-oxidative and anti-inflammatory effectiveness were mathematically analyzed.

DPPH, superoxide anions, Nitric Oxide scavenging activity was measured to evaluate the effectiveness of 7 herbal extracts. And next, cytotoxic activity of extracts on RAW 264.7 cells were measured using MTS assay. To asses anti-inflammatory effect, nitric oxide and PGE₂ production were measured.

Based on these anti-oxidative and anti-inflammatory experiment result, mathematical analyzation were carried out with constOptm function, and determined efficacy-maximizing ratio.

Results : This mathematical analysis based formula showed significantly outstanding effectiveness than other formulae. And estimated tendency of anti-inflammatory effectiveness was matched with real effectiveness.

Conclusions : So, mathematical analysis can be available to evaluate and estimate the effectiveness of herbal formulae.

Keyword : Herbal formula, Mathematical analysis, Anti-inflammatory, Anti-oxidative stress

I. 서 론

산화적 스트레스는 생체 내의 라디칼 생산 및 소거의 균형이 무너진 상태로, 약제나 방사선, 허혈 등 여러 가지 요인이 원인이 된다. 이러한 산화적 스트레스로 인해 DNA의 돌연변이, 세포사(apoptosis)의 유도, 염증 반응 및 지질 과산화를 포함한 세포의 상해 등 다양한 결과가 나타나는데, 이는 노화뿐만 아니라 다양한 급·만성 질환을 야기한다.¹⁾

이러한 산화적 스트레스를 제한하고 활성 라디칼을 소거하는 효능이 있는 한약재가 다양하게 보고된 바 있는데, 그 활성 성분 및 한약재 추출물에 대해서 많은 연구가 이루어지고 있다. 본 연구에서 사용된 감초(*Glycyrrhiza uralensis Fischer.*), 박하(*Mentha arvensis L.*), 계지(*Cinnamomum cassia Blume.*), 황련(*Coptis Chinensis*), 홍삼(Red ginseng : *Panax ginseng C. A. Meyer*), 녹차잎(*Thea sinensis*), 유백피(*Ulmus macrocarpa Hance*) 역시 항산화 효과에 대한 다양한 연구가 수행되어 왔다.²⁾³⁾

그러나 실제 한의학 임상에서 한약재 單味만 사용되는 경우는 드물고, 다양한 한약재를 일정한 비율로 배합하여 한약 처방으로 사용되는 경우가 대부분이다. 이러한 한약 처방은 인체 내에서 한 가지 효능만을 목표로 하는 것이 아니라, 여러 가지 효능을 가능한 한 높은 효율로 나타내기 위해서 사용되는 경우가 많다. 하지만 한약 처방은 그 성분이 하나로 정해지지도 않으며, 각 성분 간의 상호작용도 존재하는 반면, 그 효능에 대한 정량

적인 분석은 어렵기 때문에, 처방 내에서 개별 한약재가 어떤 효능을 얼마만큼이나 발휘하는지는 사실상 연구하기 어려운 부분이다. 개별 한약재의 효능을 파악하여 이를 산술적으로 계산하게 된다면, 기존 처방의 효능에 대한 예측뿐만 아니라 나아가서는 새로운 처방을 구성할 수 있는 획기적인 방안이 되리라 생각되지만 이에 대한 연구는 이루어진 적이 없고, 다만 한약재와 방제에 대한 문헌에서의 통계적 분석을 통한 귀납적인 효능을 분석한 연구 정도만이 있었다⁴⁾⁵⁾. 따라서 본 연구에서는 개별 한약재의 효능에 대한 정량적인 분석 및 다양한 배합 비율을 통하여 그 효과를 극대화 시킬 수 있는 조합법에 대하여 연구해 보고자 하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 추출물의 제조

본 연구의 실험에 사용된 한약재들은 (주) 휴먼허브(경산, 경북)에서 구입하였고, 구입한 약재는 동국대학교 한의과대학 방제학교실에서 정선하여 사용하였다. 7종의 한약재 추출물의 제조 방법은 아래와 같다.

1) 환류냉각관을 장착한 플라스크에 각 한약재를 넣고 8배수(w/w)의 증류수를 가하여 4시간동안 100°C에서 추출한다.

2) 추출액을 wattman paper로 여과 후 rotary evaporator를 이용하여 용매를 증발시킨 다음, -85°C에서 1시간 동안 냉동한다.

* Corresponding author : Sundong Park, PhD, Professor, Department of Herbal Prescription, College of Korean Medicine, Dongguk-ro, Ilsandong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do, 410-820, South Korea.

· Tel : 82-31-961-5825

· E-mail : sundong@dongguk.ac.kr

• Received : November 17, 2014 / Revised : December 02, 2014 / Accepted : December 10, 2014

3) 동결건조기를 이용하여 충분히 동결건조 한 후 75%의 에탄올을 가하여 24시간동안 실온에서 추출한다.

4) 추출액을 위와 같은 방법으로 여과, 동결건조 후 역시 같은 방법으로 85%, 95% 에탄올을 가하여 24시간 동안 실온에서 추출 한 다음, 마지막으로 여과 및 동결건조하여 시료로 사용한다.

5) 분말화된 추출물은 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해한 후 0.20 μm syringe filter로 여과하여 사용한다.

2. 시약

실험에 사용된 시약 중 DMSO는 Amresco사 (Solon, USA) 에서, ethanol은 Samchun Chemicals 사(Pyungtack, Republic of Korea)에서 구입하였다. 1,1-diphenyl-2-picrylhy-drazyl(DPPH), 4,5-diaminofluorece-in(DAF-2), lipopolysaccharide(LPS), sodium nitro-prusside(SNP), sodium phosphate, sodium chloride, potassium chloride, hypoxanthine, nitroblue tetrazolium(NBT), xanthine oxidase, ethylenediaminetetraac-etic acid(EDTA)는 sigma 사(St.Louis, USA)에서 구입하였다. Prostaglandin E2(PGE₂) 측정용 위한 commercial competitive enzyme immunoassay kit는 R&D systems (Minneapolis, USA)에서 구입하였고, 세포 배양액인 dulbecco's modified eagle medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin 등의 세포배양용 시약들은 Gibco BRL사(Grand Island, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

3. 실험 방법

1) DPPH radical 소거활성 측정

대표적인 cation radical인 DPPH radical에 대한 소거활성은 Gyamfi 등의 방법으로 측정하였다⁶⁾. 먼저 시료 50 μL 에 0.1 mM DPPH 용액 1 mL와 50 mM Tris-Hcl buffer (pH 7.4) 450 μL 를 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨다. 이후 microplate reader(VersaMax, Molecular Devices, USA)를 사용하여 517 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

DPPH radical의 소거활성은 회귀분석을 통하여 50%의 소거능을 나타내는 농도 (IC₅₀)로 표시하였다.

2) Superoxide anions 소거활성 측정

대표적인 ROS의 하나인 superoxide anion의 소거 활성은 Gotoh와 Niki의 방법⁷⁾을 변형하여 측정하였다. 시료 30 μL 에 30 mM EDTA(pH 7.4) 100 μL , 30 mM hypoxanthine 10 μL , 1.42 mM NBT 200 μL 를 가한 다음 실온에서 3분간 반응시킨 후, 0.5 U/mL xanthine oxidase 100 μL 를 첨가하고 50 mM phosphate buffer(pH 7.4)로 총 용량을 3 mL로 맞추었다. 반응용액을 실온에서 20분간 배양시킨 후, 560 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. Superoxide anion의 소거활성은 회귀 분석을 통하여 50%의 소거능을 나타내는 농도(IC₅₀)로 표시하였다.

3) Nitric oxide 소거활성 측정

Nitric oxide(NO)의 소거활성은 Sutherland 등의 방법⁸⁾으로 측정하였다. DAF-2와 NO의 반응에 의해 생성되는 triazolofluorescein의 형광 강도를 측정하는 방법으로, 먼저 DAF-2를 1.81 mg/mL의 농도로 DMSO에 용해시킨 다음, 이를 다시 50 mM phosphate buffer에 400배로 희석하여 DAF-2 용액을 제조하였다. 시료 10 μL 를 130 μL 의 50 mM phosphate buffer(pH 7.4)에 혼합한 다음, 40 mM의 SNP 10 μL 와, 앞서 제조한 DAF-2 용액 50 μL 를 첨가하였다. 혼합액을 실온에 10분간 둔 후에 fluorescence microplate reader(SPECTRA MAX GEMINI EM, Molecular Devices Corp., USA)를 사용하여, excitation 파장 495 nm 및 emission 파장 515 nm에서 측정하였다.

4) 세포 배양

RAW 264.7 마우스 대식세포주는 한국 세포주은행(KCLB, 서울)에서 분양 받았으며, 1% penicillin-streptomycin과 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂의 환경에서 배양하였다.

5) Cell viability 측정

세포생존을 측정은 5-(3-carboxymeth-oxyphenyl) 2H-tetrazolium inner salt(MTS) assay를 사용하여 측정하였다⁹⁾. 96 well plate에 1×10^4 cells/well의 RAW 264.7 세포를 분주하고, 시료를 농도별 (0, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 18시간 동안 처리하였다. 이후 well당 20 μL 의 MTS solution을 첨가하여 37°C, 5% CO_2 배양기에서 4시간 동안 반응시킨 후, microplate reader(DYNEX, Opsys MR, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 시료를 처리하지 않은 well에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다.

6) NO 억제효과 측정

LPS로 염증을 유도한 RAW 264.7 세포의 세포 배양액 내 nitrite 농도를 Griess Reagent를 이용하여 측정하여, 시료가 NO를 얼마나 억제하는지 정량하였다. RAW264.7 세포에 cell viability를 손상시키지 않는 농도 이내에서 시료를 농도별로 전처리하고, 1시간 후 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPS를 처리하여 18시간 동안 배양하였다. 세포 배양액 50 μL 와 동량의 Griess Reagent를 혼합하여 상온에서 10분간 반응시킨 다음 microplate reader(VersaMax, Molecular Devices, USA)를 사용하여 540 nm 파장에서의 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite를 농도별로 분주하여 표준곡선을 얻고, 시료의 흡광도와 대비하여 배양액 내의 NO 농도를 계산하였다.

7) PGE₂ 생성량 측정

세포 배양액 내의 PGE₂를 측정하여 시료가 어느 정도의 cytokine 억제 효과를 보이는지 보았다. commercial competitive enzyme immunoassay kit를 R&D systems(Minneapolis, USA)에서 구입하여 실험하였다. RAW264.7 세포에 시료를 cell viability를 손상시키지 않는 농도 이내에서 농도별로 전처리하고, 1시간 후 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPS를 처리하여 18시간 동안 배양하였다. 여기서 얻은 세포 배양액을 goat anti-mouse antibody로 coating된 96 well plate에 100 μL loading한 다음, primary antibody solution과 PGE₂ conjugate를 각각 50 μL

씩 첨가하여 4°C에서 overnight 시켰다. Washing buffer를 사용하여 4회 세척하고 substrate solution을 200 μL 씩 처리하여 5분간 반응시킨 후, 50 μL 의 stop solution을 처리한 다음, 450 nm 파장에서의 흡광도를 측정하였다. 생성된 PGE₂의 양은 시료를 처리하지 않은 well에 대하여 fold 값으로 나타내었다.

4. 처방 비율의 결정

1) Cell viability

항염증, 항산화 효능 시험의 경우 세포를 대상으로 시행되는 실험이기 때문에, cell viability는 중요한 사항이다. 해당 한약재의 효능이 뛰어나다 하더라도 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는 농도 이내에서 실험을 진행해야 하기 때문에, MTS assay를 통해 RAW 264.7 cell line에 대한 세포 생존율을 확인한 후, 각 한약재의 최대 농도로 혼합한 처방 비율로 실험을 진행하여 그 처방의 효능을 알아보려고 하였다. Cell viability를 기준으로 한 처방 샘플은 이하 'Via' 샘플로 칭하였다.

2) 한의학적 이론을 바탕으로 한 배합비율의 탐색
홍삼과 감초는 한의학적으로 補氣藥에 속한다. 補氣藥은 精氣를 보익하고 허약을 보충하여 신체 허약으로 인한 쇠약 증후를 해소시키는 약물이다. 그 효능은 일반적으로 인체의 생리기능과 체력을 현저하게 증강시킨다.

황련과 녹차잎은 淸熱藥에 속하는데, 淸熱藥은 한의학적으로 인체의 熱을 제거하는 효능이 있는 약이다. 이는 인체의 발열 증상을 제거시키는 약물로 항염증 효과와 관련이 깊다.

박하와 계지는 解表藥에 속한다. 解表藥은 表邪를 發散하여 表證을 없애는 작용을 하는 약물로, 땀을 내는 작용이 있다.

유백피는 利水藥으로 水道를 通利시켜 水濕을 제거시키는 약의 일종으로 水濕이 체내에 정체되어 일어난 병증에 사용한다. 이뇨작용이 있어서 水腫이나 黃疸 등에 사용되며 과도한 염분 및 수분을 제거하는 작용이 있다.

이렇게 7종의 한약재를 각각의 효능에 따라 4

Table 1. Mixture ratio of BG(補氣), CY(清熱), HP(解表), LS(利水) sample

| | 홍삼, 감초 | 황련, 녹차잎 | 박하, 계지 | 유백피 |
|---------------|--------|---------|--------|-----|
| BG(補氣) sample | 2 | 1 | 1 | 1 |
| CY(清熱) sample | 1 | 2 | 1 | 1 |
| HP(解表) sample | 1 | 1 | 2 | 1 |
| LS(利水) sample | 1 | 1 | 1 | 2 |

가지 그룹으로 나눈 후, 각각의 그룹을 2배량으로 하는 4가지 배합비를 나누어 실험한 후, 어떤 한약재군이 좋은 효과를 나타내는지 알아본다. 이는 君臣佐使 배합의 君藥 개념에 해당한다고 볼 수 있다.

3) 수학적 분석

Google의 statistical language R을 사용하여 분석하였고, constOptim fuction을 사용하여 최적의 효과를 나타낼 수 있는 혼합비를 찾고자 하였다. Language R 은 통계 소프트웨어 개발과 자료 분석에 널리 사용되고 있으며, 패키지 개발이 용이하여 통계학자들 사이에서 통계 소프트웨어 개발에 많이 쓰이고 있는 프로그래밍 언어이다. 빅 데이터 분석 및 데이터간의 연관성 분석에 많이 사용되고 있으며, 아직 국내에서는 널리 사용되고 있지 않은 편이다.

각 실험에서 radical 및 NO와 PGE2의 억제효과를 퍼센트로 나타낸 후, 억제 효과를 회귀분석하여 그 효과를 시료마다, 실험마다 각각의 관계식으로 나타내었다. 이후, 각 시료의 효과는 혼합시에 변하지 않는다는 가정 하에, 관계식의 합이 시료의 최고농도 이내의 범위에서 최대화 시키는 방법으로 부등식을 만들었다. 각 시료의 농도 및 최고농도를 변수로 설정하였으며, 각 변수는 서로

독립적이라 가정하였다.

$$\min \sum_{i=1}^m \prod_{j=1}^n f(a_{ij}),$$

$$\text{subject to } \sum_{j=1}^n x_j \leq M, x_j \geq 0 (j=1,2,3,\dots,n)$$

Formula 1. Relation between Max concentration M and effectiveness relation a_{ij} .

5. 통계처리

실험 결과는 means±SD으로 나타냈으며, 통계 분석은 GraphPad Prism 5.0를 사용하였다. one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range tests를 실시하였고, P값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 판정하였다.

III. 실험 결과

1. 개별 한약재 추출물의 Free radical 소거 활성 측정

개별 한약재 추출물의 항산화 능력 측정을 위하여, DPPH radical과 superoxide anion, nitric oxide의 소거능을 측정하였다. 실험 결과는 Table 2. 와 같다.

Table 2. Free radical scavenging activities. Data are represented as mean±SD.

| | IC ₅₀ (µg/mL) | | |
|-----|--------------------------|------------------|--------------|
| | DPPH | Superoxide anion | Nitric oxide |
| 감초 | 229.87±4.12 | 154.78±17.71 | 5.80±0.25 |
| 박하 | 45.66±3.97 | 69.60±7.79 | 0.78±0.04 |
| 계지 | 317.12±11.76 | 325.13±40.35 | 2.21±0.44 |
| 황련 | 101.39±6.23 | 42.54±2.18 | 2.55±0.36 |
| 홍삼 | 98.82±3.35 | 25.03±8.31 | 0.96±0.11 |
| 녹차잎 | 55.21±5.12 | 88.69±3.18 | 10.79±0.09 |
| 유백피 | 288.39±10.20 | 24.29±0.11 | 59.62±0.35 |

2. 개별 한약재 추출물의 Cell viability 측정

각 한약재 추출물의 Cell viability를 MTS assay를 이용하여 측정하였고, 그 결과는 아래와 같다 (Figure 1). 그 결과, 박하와 계지, 녹차잎은 500 µg/mL 이상의 농도에서 Cell viability가 80% 이하로 감소하였고, 감초와 홍삼, 유백피는 250 µg/mL

이상의 농도에서, 황련은 100 µg/mL 이상의 농도에서 세포 생존율이 80% 이하를 나타내었다. 이 결과를 근거로 이후의 RAW 264.7 세포를 대상으로 한 실험에서는 위에 밝힌 농도를 최고 농도로 설정하여 실험을 진행하였다.

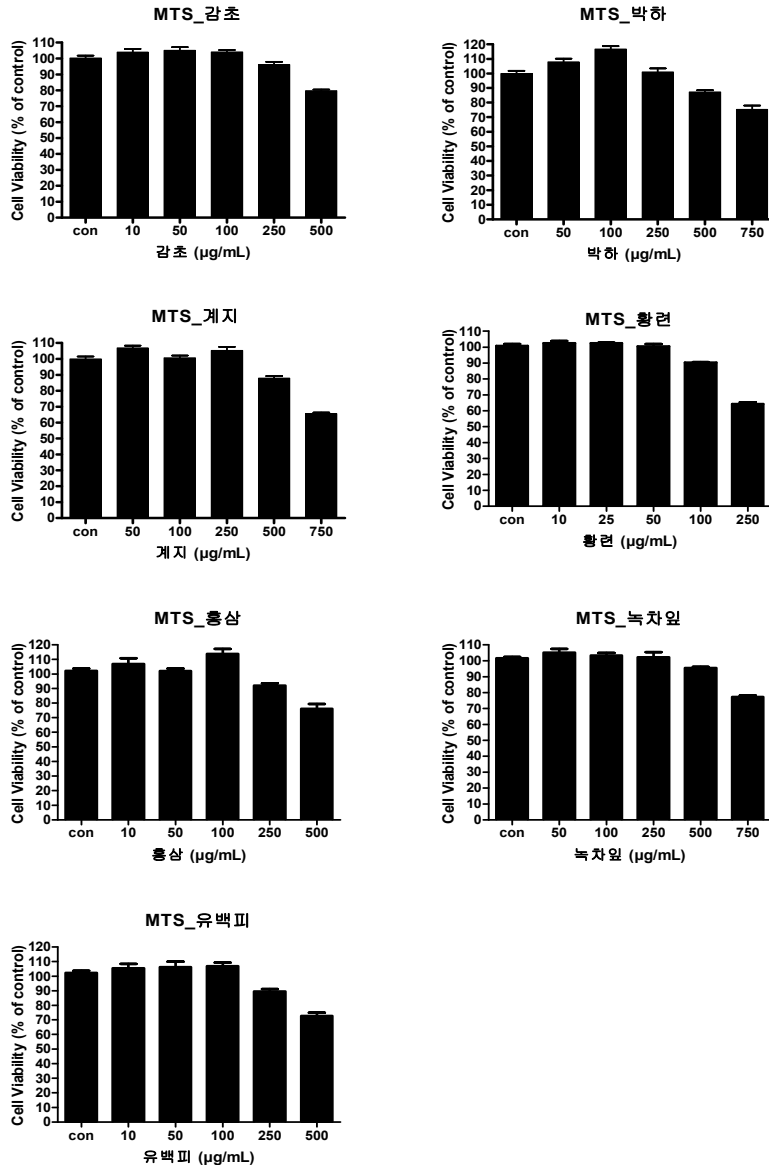


Figure 1. Effect of 7 herb extracts on the cell viabilities of RAW 264.7 cells.

Extracts were treated on RAW 264.7 cells for 18 hrs. Cell viability was measured with MTS assay. Data were chosen from three independent triplicate experiments.

3. 개별 한약재 추출물의 NO와 PGE₂ 생성량에 미치는 영향 측정

각 한약재 추출물의 *in vivo* 효과를 조사하기 위하여 LPS로 염증을 유도한 후 Griess reagent를 사용하여 nitric oxide의 생성량을 측정하였다 (Figure 2). 거의 모든 추출물에서 nitrite 억제 효

과가 농도 의존적으로 나타났고, 특히 홍삼의 효과가 가장 뛰어난 것으로 보인다.

또한 LPS에 의해 생성되는 PGE₂의 생성량을 측정한 결과, Figure 3의 결과와 같이 나타났다. 홍삼과 황련의 효과가 우수하게 나타났고 감초와 계지 역시 농도 의존적으로 생성량을 감소시키는

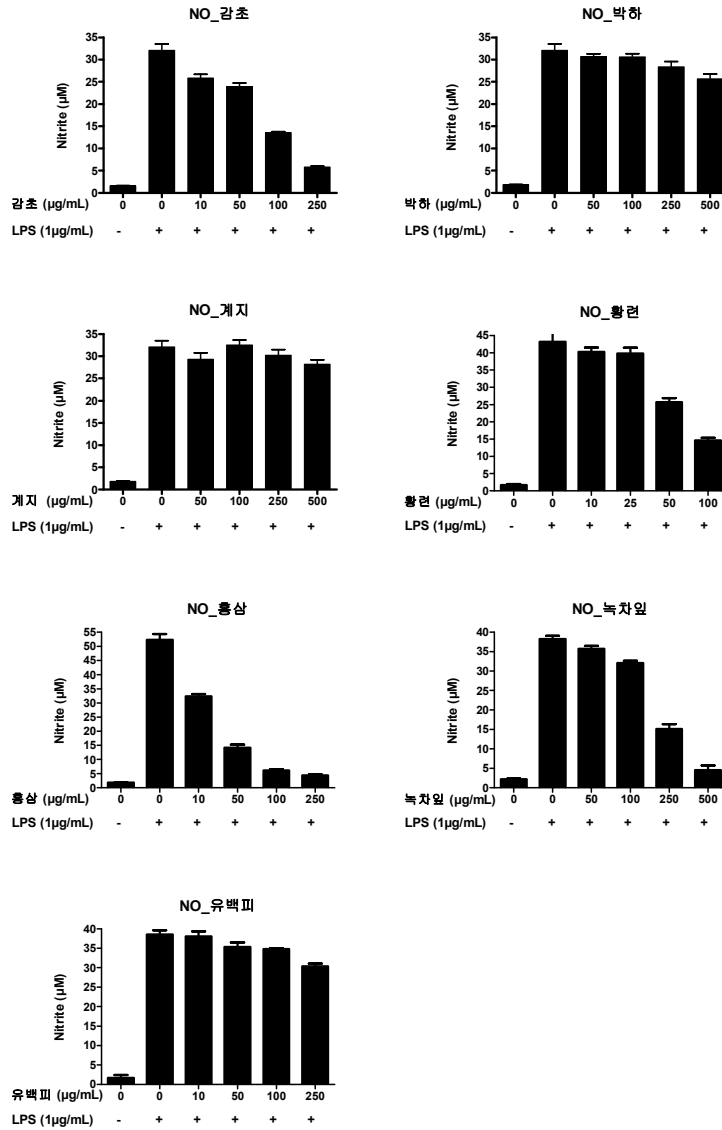


Figure 2. Effect of 7 herb extracts on LPS-induced Nitric Oxide production in RAW 264.7 cells. Extracts were pre-treated on RAW 264.7 cells for 1 hr. Then we treated 1 µg/mL of LPS for 18 hrs. Nitric Oxide production was measured with Griess Reagent. Data were chosen from three independent triplicate experiments.

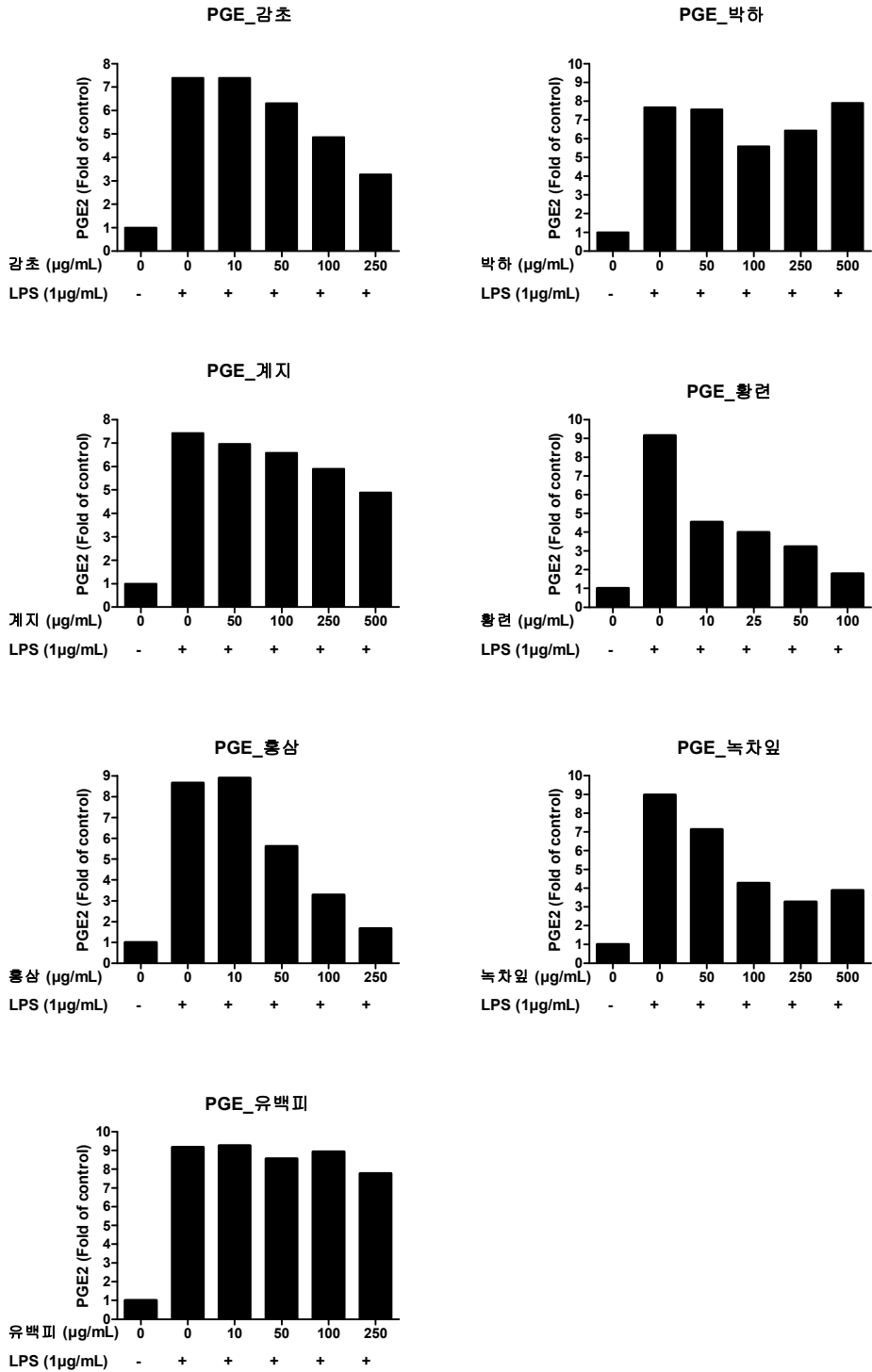


Figure 3. Effect of 7 herb extracts on LPS-induced PGE₂ production in RAW 264.7 cells. Extracts were pre-treated on RAW 264.7 cells for 1 hr. Then we treated 1 µg/mL of LPS for 18 hrs. PGE₂ production was measured with ELISA kit.

결과를 보여주었으나, 박하나 유백피의 경우 유의할 만한 효과가 관찰되지 않았다.

4. 처방 비율의 결정

1) Cell viability를 기준으로 한 처방 비율 결정 앞서 MTS assay를 통해, 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 농도를 기준으로 하여 'Via' 샘플의 비율을 정하였다. 박하, 계지, 녹차잎은 500 µg/mL, 감초, 홍삼, 유백피는 250 µg/mL, 황련은 100 µg/mL 농도를 최고 농도를 잡았기 때문에 이와 같은 비율로 처방을 정하였다. Via sample의 구성 비율은 Table 3과 같다.

Table 3. Mixture ratio of Via sample

| Component | Proportion |
|-------------|------------|
| 박하, 계지, 녹차잎 | 10 |
| 감초, 홍삼, 유백피 | 5 |
| 황련 | 2 |

2) 수학적 분석을 통한 처방 비율 결정 및 Language R source
 실험 방법 부분에서 언급한 Formula 1.을 만족

하는 조건 하에서 약물 처리 최대 농도인 M값을 상수로 놓고 계산하여 농도를 구하였다. M값은 모든 한약재를 1대1로 혼합하여 만든 처방의 MTS 결과를 참고하여 500 µg/mL로 설정하였다. Formula 1에서의 세부 관계식은 Free radical 소거능력 및 RAW 264.7 cell에서의 Nitric Oxide, PGE₂ 억제능의 실험 데이터를 회귀분석하여 구하였다. 회귀분석 결과 결정계수(R²) 값이 0.95 이상인 경우의 관계식을 채택하여 사용하였고 필요에 따라 독립변수의 구간을 통제하여 사용하였다.

위의 조건을 만족시키는 constOptim fuction 활용을 위하여 Language R로 분석하였다. 그 source는 Formula 2.와 같다.

위 방법을 통하여 모든 실험값을 최대화 시킬 수 있는 처방의 배합 비율을 정한 결과, 배합비는 Table 4.와 같으며, 그 때의 기대 효과는 Table 5.와 같다. 기대 효과는 각 radical 및 nitrite와 PGE₂의 %소거능으로 표기하였다. 그리고 이 샘플을 'Mat' sample로 칭하기로 한다.

```
library(stats)
IC50_matrix = c()
# 감초/박하/계지/황련/홍삼/녹차잎/유백피
IC50_matrix = rbind(
    c(229.87, 45.66, 317.12, 101.39, 98.82, 55.21, 288.39),
    #DPPH radical
    c(5.80, 0.78, 2.21, 2.55, 0.96, 10.79, 59.62), #DAF-2
    c(154.78, 69.60, 325.13, 42.54, 25.03, 88.69, 24.29)
    #Superoxide anion)

Amat = (1/2)^(1/IC50_matrix)
# a_ij

Amat = rbind(Amat,
    c(0.9933366,0.9995676,0.9997883,0.9887631,0.9908901,0.9953846,0.9990802), #Nitrite
    c(0.9966432,1,0.9991911,0.9932149,0.9863952,0.9984726,0.9993568) #PGE2)
M = 500
n = ncol(Amat) # number of reagents
theta = rep(M/(n+1), n)
f = function(x){sum(apply(t(t(Amat)^x), 1, prod)) / nrow(Amat)}
grad = function(x){t(log(Amat)) %*% apply(t(t(Amat)^x), 1, prod)}
ui = rbind(rep(-1, n), diag(n))
ci = rbind(-M, matrix(rep(0, n), ncol=1))
constOptim(theta=theta, f=f, grad=grad, ui=ui, ci=ci)
```

Formula 2. Language R source for using f. constOptim

Table 4. Estimated inhibition rate(eIR) of Mat sample.

| Object | DPPH | Nitric Oxide | Superoxide anion | Nitric Oxide (RAW 264.7 cell) | PGE ₂ |
|--------|------|--------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| eIR(%) | 97.7 | 99.9 | 99.9 | 98.0 | 97.5 |

Table 5. Estimated inhibition rate(eIR) of Mat sample.

| Object | DPPH | Nitric Oxide | Superoxide anion | Nitric Oxide (RAW 264.7 cell) | PGE ₂ |
|--------|------|--------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| eIR(%) | 97.7 | 99.9 | 99.9 | 98.0 | 97.5 |

Table 6. Comparison between free radical IC₅₀ and eIC₅₀ of 6 herbal formulas. There's difference between IC₅₀ and eIC₅₀ within 11.5 or less, but tendencies are similar.

| | | BG | CY | HP | LS | Via | Mat |
|--------------|-------------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|
| DPPH | IC ₅₀ | 71.18±2.22 | 63.13±2.91 | 69.33±8.75 | 95.52±3.40 | 108.33±4.96 | 54.64±3.53 |
| | eIC ₅₀ | 75.5 | 63.6 | 67.4 | 89.0 | 104.9 | 57.2 |
| | Difference | 4.3 | -1.9 | 1.9 | -6.5 | -3.4 | 2.6 |
| Superoxide | IC ₅₀ | 50.51±2.43 | 59.89±3.70 | 45.18±5.95 | 53.15±3.84 | 55.21±4.58 | 41.18±1.11 |
| | eIC ₅₀ | 59.6 | 67.3 | 53.1 | 63.1 | 66.7 | 49.0 |
| | Difference | 9.1 | 7.4 | 7.9 | 9.9 | 11.5 | 7.8 |
| Nitric oxide | IC ₅₀ | 0.68±0.13 | 0.78±0.19 | 0.63±0.12 | 1.08±0.05 | 0.95±0.10 | 0.54±0.02 |
| | eIC ₅₀ | 0.6 | 0.7 | 0.6 | 0.8 | 0.8 | 0.5 |
| | | - | - | - | - | - | - |

5. 6가지 처방 (BG, HP, CY, LS, Via, Mat)의 실제 효과 및 추정치와의 차이

1) Free radical 소거능

Formula 2의 source에서 최대 농도인 M은 500 µg/mL로, 독립변수 a₁는 처방의 비율에 맞게 설정한다. 이후 종속변수 a₃의 효과를 계산하여 eIC₅₀(estimated IC₅₀) 값을 구하였다. 그리고 구한 eIC₅₀값을 실제 실험 결과와 비교하였고, 그 차이가 어느 정도인지 살펴보았다.

DPPH Radical 소거능의 경우 IC₅₀, eIC₅₀ 모두 Mat 샘플이 가장 낮게 나와 가장 좋은 효능을 보였고, Via 샘플이 가장 낮은 효과를 보였다. Mat, CY, HP, BG, LS, Via 순서로 효과가 뛰어난 것을 알 수 있었다.

Superoxide anion 역시 Mat 샘플이 가장 좋은 효과를 보여주었고, 큰 차이 없이 Mat, HP, BG, LS, Via, CY 순서로 효과가 나타났다.

Nitric oxide의 경우, 박하와 홍삼의 효과가 매

우 뛰어났기 때문에 모든 처방 샘플에서 eIC₅₀ 값이 1 이하로 나타났다. 또한 Language R 소스상 eIC₅₀값을 소수점 두 번째 자리에서 반올림하게 되는데, 이 경우 IC₅₀과 eIC₅₀의 유효숫자 차이가 발생할 뿐만 아니라 소수점 둘째자리 수준의 비교를 해야 하는 상황이 생기기 때문에, IC₅₀과 eIC₅₀의 비교는 생략하였다(Table 6).

2) Cell viability 측정

RAW 264.7 세포에 대한 각 처방 추출물의 nitric oxide와 PGE₂ 억제 효과를 측정하기 위하여 먼저 Cell viability를 MTS assay를 이용하여 측정하였고, 그 결과는 아래와 같다(Figure 4).

CY 샘플의 경우에는 500 µg/mL, 나머지 다른 샘플은 모두 750 µg/mL 농도에서 세포 생존율이 80% 이하로 내려갔다. 따라서 CY 샘플은 250 µg/mL, 나머지 샘플은 500 µg/mL 농도를 최고 농도로 하여 이후 실험을 진행하였다.

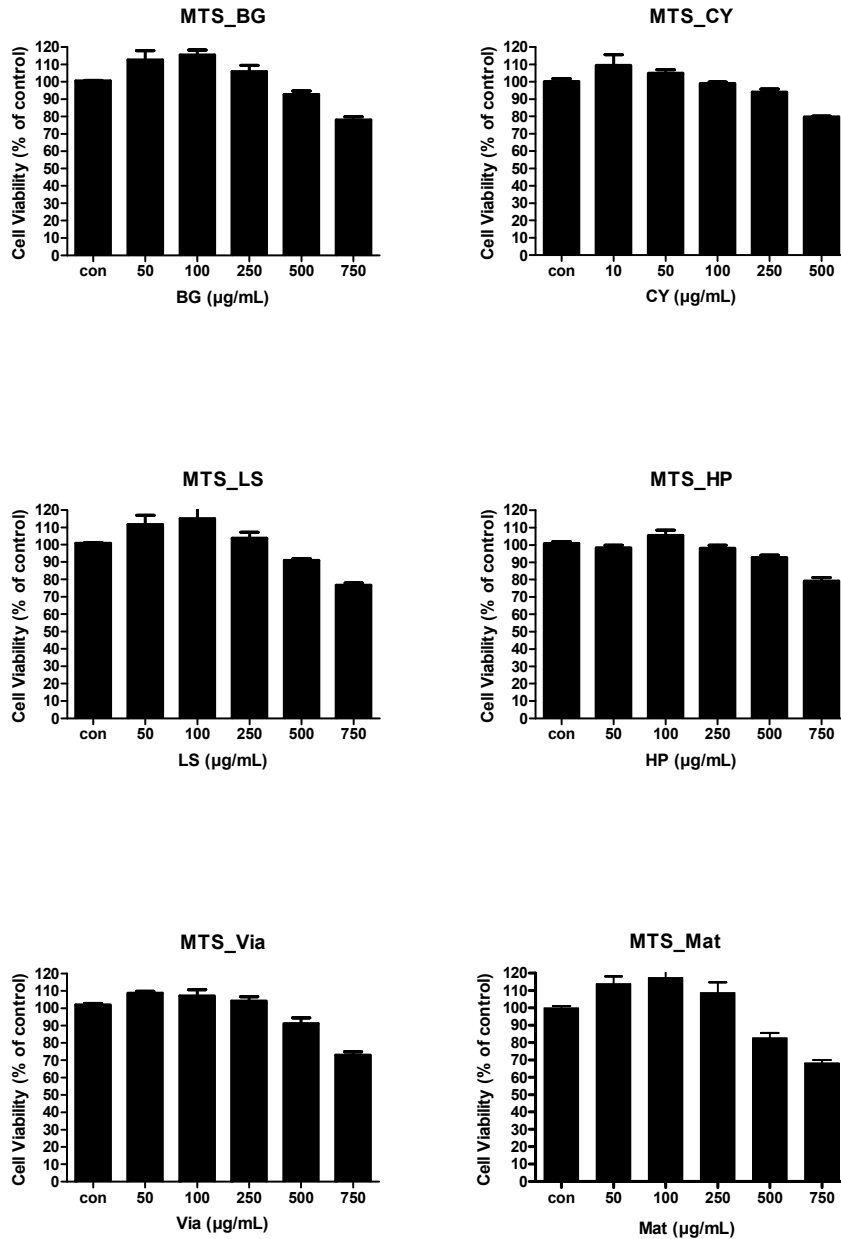


Figure 4. Effect of 6 herbal formulas on the cell viabilities of RAW 264.7 cells. Extracts were treated on RAW 264.7 cells for 18 hrs. Cell viability was measured with MTS assay. Data were chosen from three independent triplicate experiments.

3) NO와 PGE₂ 생성량에 미치는 영향 측정

각 처방 추출물의 nitrite 억제 효과를 조사하기 위하여 LPS로 염증을 유도한 후 Griess reagent를 사용하여 nitric oxide의 생성량을 측정하였다

(Figure 5). 거의 모든 샘플들에서 농도 의존적으로 nitric oxide의 억제 효과가 나타났다. Nitric oxide 억제 효과는 Mat, BG, Via, HP, CY, LS 순서로 나타났다.

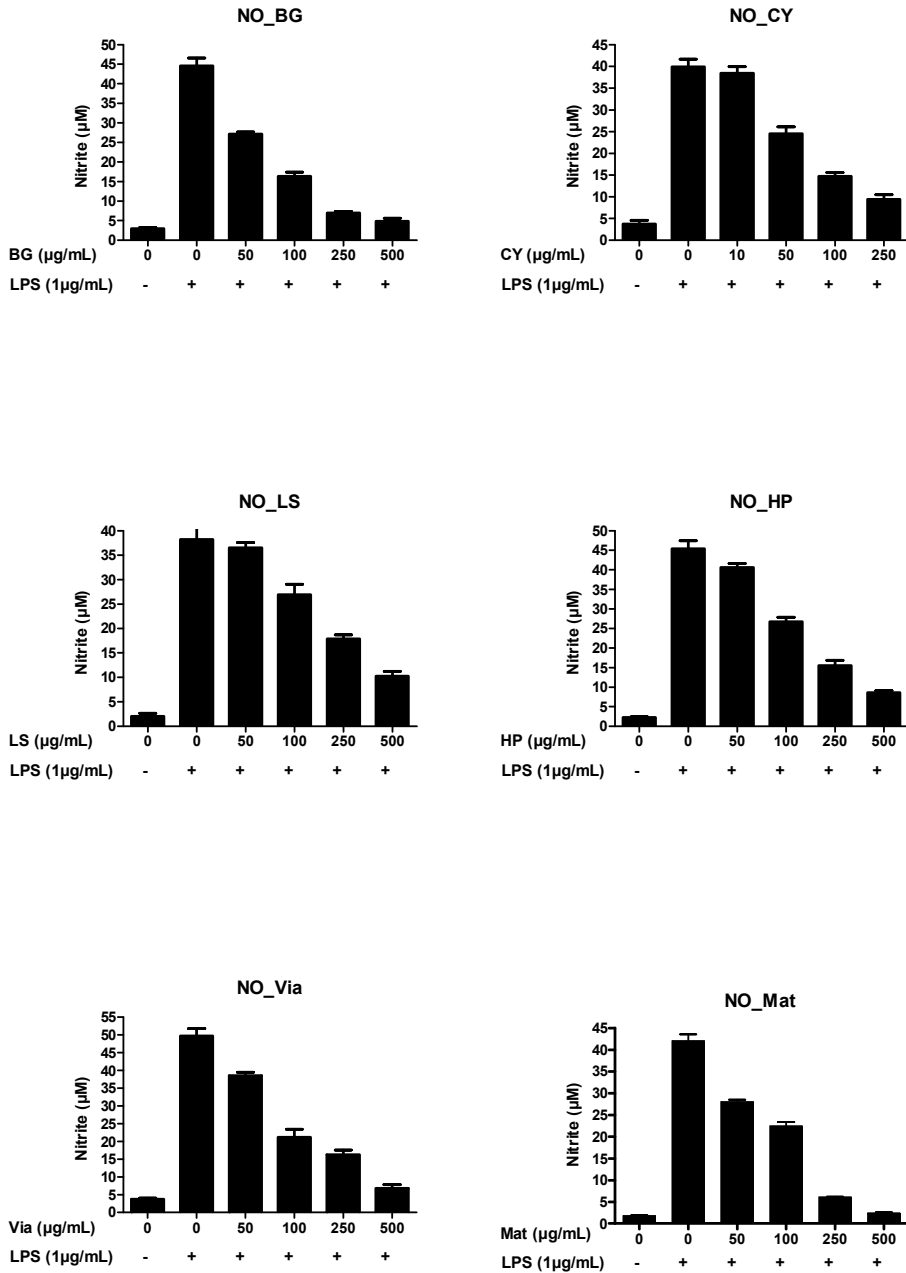


Figure 5. Effect of 6 herbal formulas on LPS-induced Nitric Oxide production in RAW 264.7 cells. Extracts were pre-treated on RAW 264.7 cells for 1 hr. Then we treated 1 µg/mL of LPS for 18 hrs. Nitric Oxide production was measured with Griess Reagent. Data were chosen from three independent triplicate experiments.

또한 LPS에 의해 생성되는 PGE₂의 생성량을 측정하는 결과, Figure 6의 결과와 같이 나타났다. 역시 농도 의존적으로 PGE₂의 생성량을 감소시키

는 결과가 나타났으며 그 효과는 BG, Mat, Via, LS, HP, CY의 순서로 나타났다.

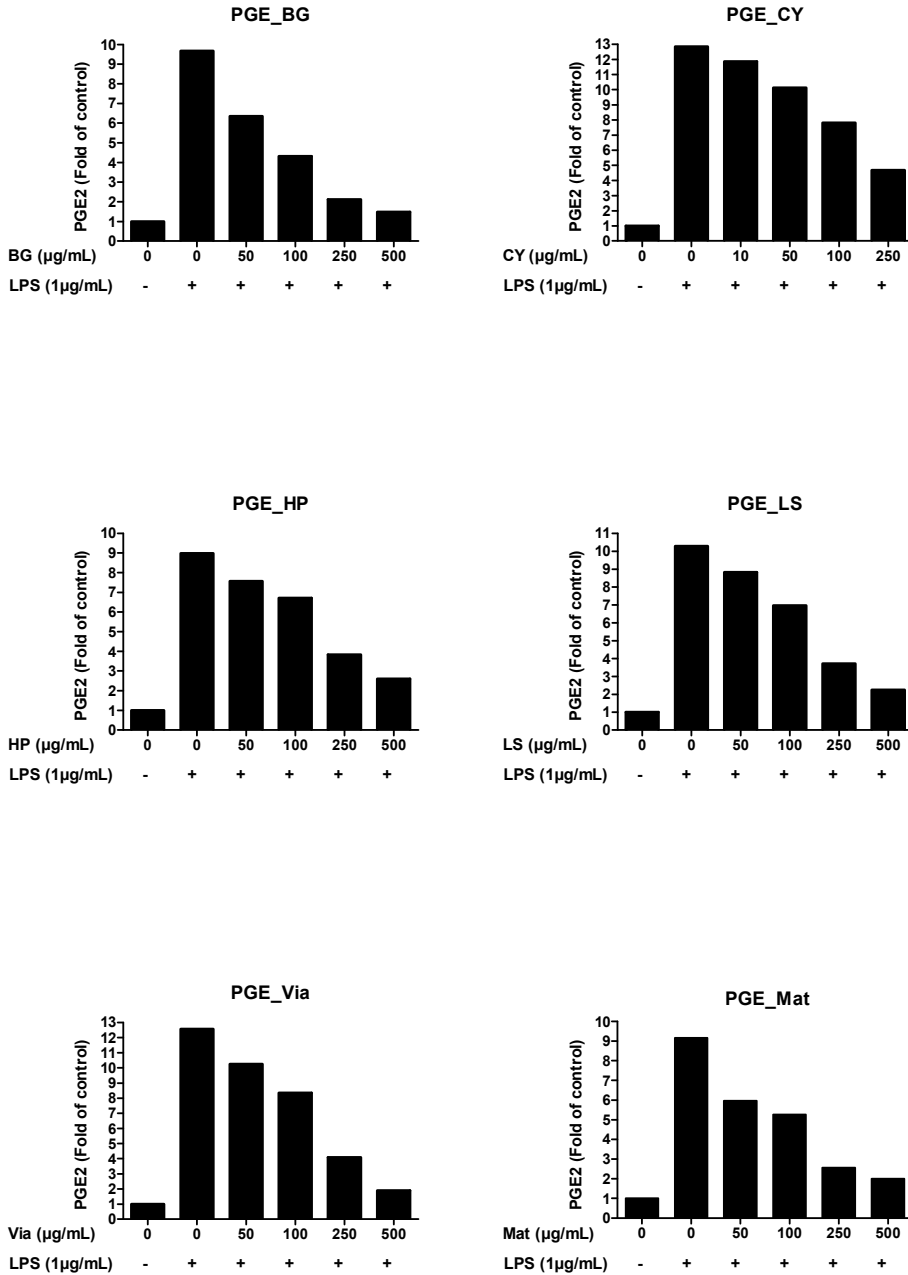


Figure 6. Effect of 6 herbal formulas on LPS-induced PGE₂ production in RAW 264.7 cells. Extracts were pre-treated on RAW 264.7 cells for 1 hr. Then we treated 1 µg/mL of LPS for 18 hrs. PGE₂ production was measured with ELISA kit.

4) 6가지 처방 (BG, HP, CY, LS, Via, Mat) 의 실제 효과 및 추정치와의 차이 앞서 Free radical의 eIC₅₀ 값을 계산할 때와 동

일한 방법으로 6종 처방에 대한 샘플의 농도별 nitric oxide 소거능을 계산한 후, 실제 효능과 비교하여 그래프로 나타내 보았다(Figure 7).

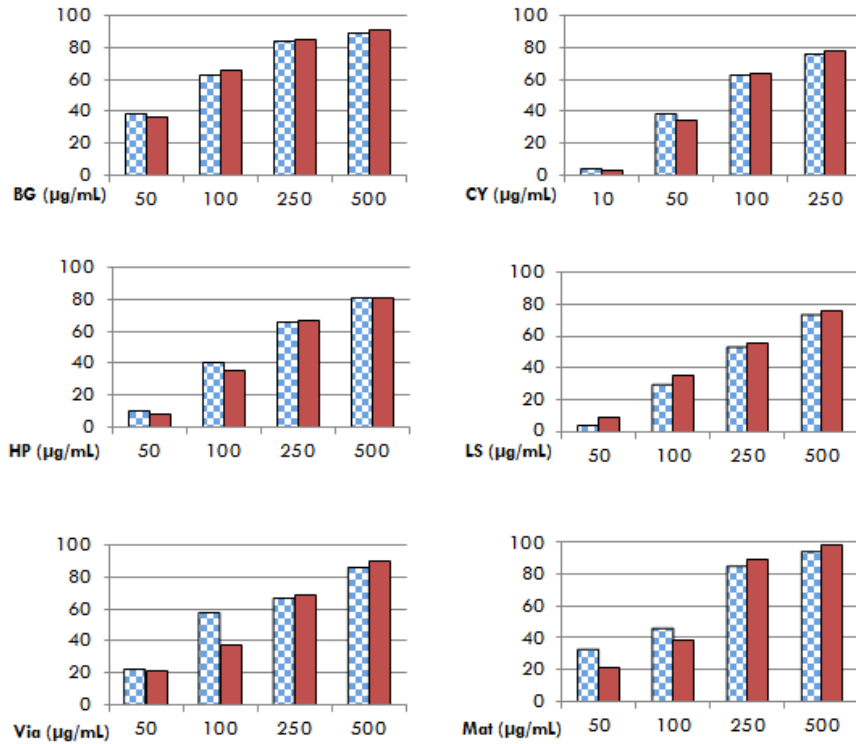


Figure 7. Comparison between real effect and estimated effect of 6 herbal formulas on LPS-induced NO production. rIR is better than eIR in Low concentration.

■ : rIR (real Inhibition Rate)
■ : eIR (estimated Inhibition Rate)

PGE₂의 경우 단일 한약재의 효과에서 불 배 농도 의존적으로 감소하지 않게 나오는 한약재가 많아서 농도 구간별로 나누어 회귀분석을 해야 했는데, 그 경우 결정계수(R²) 값이 0.95 이상으로 나오는 경우가 없었기 때문에 eIR을 계산할 수 없었다.

IV. 결 론

1. 수학적 분석에 기반한 Mat 처방의 효능이 타 처방에 비해 뛰어난 항산화, 항염증 효능을 보였다.

2. 수학적 예측값과 실제 값과는 약간의 차이는 있으나, 비슷한 경향성을 보인다.

3. 위 분석 내용을 바탕으로 할 때, constOptm 함수를 이용한 수학적 분석 방법은 처방의 구성 및 효능 예측에 일정 부분 유의하다고 보여진다.

V. 고 찰

본 연구에서는 한약재의 간단한 항산화-항염증 효과를 실험하고, 그 효능을 바탕으로 새로운 처방을 만드는 과정에 대하여 다양한 관점에서 모색해 보았다. Cell viability, 한약재의 효능과 관련된 한의학적 이론, 수학적 분석 크게 이 세 가지 관점에서 처방의 비율을 구성해 보고, 그 효능을 비교 분석하며 나아가서는 개별 한약재 효능의 정량적 분석을 바탕으로 새로운 처방이 어느 정

도의 효능을 가질 것인지에 대한 계산을 수행하였으며 또한 실제 실험에서 나타나는 효능과의 비교를 시행하였다.

먼저 Free radical 소거능을 살펴보면, DPPH radical과 superoxide anion, nitric oxide에서 모두 수학적 분석에 기반한 Mat 처방이 가장 우수한 효능을 보여주었다. Mat 처방 외에는 해표약을 군약으로 사용한 HP 처방과 청열약을 군약으로 사용한 CY 처방이 좋은 효능을 보여주었다. 반면에 cell viability에 기반한 Via 처방과 보기약을 군약으로 한 BG 처방은 상대적으로 낮은 효과를 보여주었다.

하지만 RAW 264.7 cell을 대상으로 하여 실험한 nitric oxide와 PGE₂ 생성량 측정치를 살펴보면, 역시 nitric oxide에서는 Mat 처방이 가장 우수한 효능을 보였지만 그 후순위로 BG, Via 처방이 그 뒤를 이었다. 마찬가지로 PGE₂ 생성량을 살펴보아도 BG 처방이 가장 우수한 효능을 보였으며 그 다음으로 Mat, Via 순서였다. 이는 수학적 정량화에 기반한 Mat 처방의 효과가 우수함을 보여주는 반면에, 세포 단위 실험에서는 보기약의 효과가 뛰어나며, cell viability에 기반한 Via 처방 역시 세포 실험에서는 뛰어난 효과를 나타낸다고 보여진다. 상대적으로 세포 독성이 강한 CY 처방은 두 실험 모두에서 낮은 순위를 보였다.

또, 수학적 분석을 살펴보자면 Mat 처방이 아주 우수한 효능을 보였을 뿐만 아니라 free radical 소거능에 있어서 실제 실험과 예측값의 차이가 크지 않은 것으로 나타났다. 약 5~10% 내외의 오차를 보여주었으며, IC₅₀ 값의 경향성은 일치하는 결과를 보여주었다.

또한 Mat 처방은 세포를 대상으로 한 실험에서 역시 좋은 효능을 보여주었으나, PGE₂ 생성 억제 효과에서는 BG 처방보다는 낮은 효과를 보였다. 보기약이 상대적으로 많이 쓰인 BG 처방이 세포 실험에서 좋은 효과를 보인 것에는 보기약이 cell viability를 크게 해치지 않는 점과 보기약이 인체를 보익하는 약물로 면역계에 긍정적인 영향을 미친다는 점이 원인으로 생각된다. RAW 264.7 세포는 면역세포로서 면역계를 활성화시키

는 보기약의 영향이 좀 더 강하게 작용하리라 추측되기 때문이다.

또, RAW 264.7 세포에서의 nitric oxide 억제 효능을 보았을 때, 특이할 만한 점으로는 비교적 저농도 (최대 농도 500 µg/mL 기준, 100 µg/mL 이하) 에서는 rIR이 eIR보다 높은 경향성을 나타내지만, 그 이상의 농도에서는 eIR이 rIR보다 높게 계산되었다. 이는, nitric oxide 생성 억제 효과 실험에서 본 실험에 사용된 처방들이 저농도에서 좀 더 효과가 뛰어나다고 볼 수 있겠다. 그리고 이러한 rIR-eIR 값이 양의 상관관계를 보일 경우, 개별 한약재 효능의 합 보다 처방의 효과가 좋은 것으로, 방제학적인 시너지 효과를 보인 것으로 얘기할 수 있다고 생각된다.

다만 이러한 수리적인 효능 분석의 경우 아주 정확한 수리적인 이론을 바탕으로 하여 좀 더 다듬어야 할 필요가 있고, 비슷한 경향성을 나타낸 것이지 오차가 존재하며, 회귀분석을 통한 관계식을 얻어낼 수 없는 경향성을 보이는 경우에는 실제로 적용하기 어렵다는 단점이 있다.

또한 본 실험에서 사용된 한약재의 숫자가 7종류로 한정되어 있기 때문에 일반화된 결론을 내리기가 힘들다. 따라서 샘플의 종류를 늘리고, 실험의 종류도 좀 더 다양화 한 연구가 필요하다고 생각된다. 부족한 연구 결과에도 한 가지 확실하게 결론내릴 수 있는 점은, 본 연구에서 예측한 처방의 효능이 실제 효능과 어느 정도 경향성이 일치한다는 점이다. 나아가서는 새로운 처방을 구성하거나, 처방의 효능 분석 및 예측에 있어서도 본 연구에서 사용된 방법들이 유효할 수 있다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Oh YT, Kim SC, Lee BW. Estimation Study of the herbal formula's effects by the compositional herbal effects (Guideline of the herbal effects intensity). J. Korean Medical

- Classics. 2008;21(2):49-57
2. Park BS, Kim EH, Lee SA, Lee BW. The Comparative Study between the Effect of Herbal Formula in Schoolbook and the Effect deduced from Compositional Herbal Effects. J. Korean Medical Classics. 2008;21(1):79-92
 3. Kim YJ, Lee MJ, Park JW, Kim JK, Choi DY, Kim CH. Antioxidant Activity of Water-Extract from *Coptis chinensis* Franch. Journal of Life Science. 2000;40:241-6
 4. Gyamfi MA, Yonamine M, Aniya Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana. Gen Pharmacol. 1999;32:661-7
 5. Gotoh N, Niki E. Rates of interactions of superoxide with vitamin E, vitamin C and related compounds as measured by chemiluminescence. Biochim Biophys Acta. 1992;1115:201-7
 6. Sutherland H, Khundkar R, Zolle O, McArdle A, Simpson AW, Jarvis JC, Salmons S. A fluorescence-based method for measuring nitric oxide in extracts of skeletal muscle. Nitric Oxide. 2001;5:475-81.
 7. Desai A, Vyas T, Amiji M. Cytotoxicity and apoptosis enhancement in brain tumor cells upon coadministration of paclitaxel and ceramide in nanoemulsion formulations. J Pharm Sci. 2008;97(7):2745-56.
 8. Kolodziejczyk-Czepas J, Bijak M, Saluk J, Ponczek MB, Zbikowska HM, Wachowicz B, Nowak P, Tsirigotis-Maniecka M, Pawlaczyk I. Radical scavenging and antioxidant effects of *Matricaria chamomilla* polyphenolic-polysaccharide conjugates. Int J Biol Macromol. 2014;14:634-5
 9. Bak MJ, Hong SG, Lee JW, Jeong WS. Red ginseng marc oil inhibits iNOS and COX-2 via NF κ B and p38 pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Molecules. 2012;17(12):13769-86
 10. Hwang ES, Thi ND. Antioxidant Contents and Antioxidant Activities of Hot-Water Extracts of *Aronia* (*Aronia melanocarpa*) with Different Drying Methods. Korean J Food Sci Technol. 2014;46(3):303-8
 11. Han SY, Lee EY. Effect of *Paeoniae Radix Rubra* Extract on the Production of NO and Prostaglandin E2 in LPS-stimulated RAW264.7 Macrophages. The Acupuncture. 2011;28(1):77-85.
 12. Wadley AJ, Veldhuijzen van Zanten JJ, Aldred S. The interactions of oxidative stress and inflammation with vascular dysfunction in ageing: the vascular health trail. Age (Dordr). 2013 Mar 28. [Epub ahead of print]
 13. Qui M, Paromov VM, Yang H, Smith M, Stone WL. Inhibition of inducible Nitric Oxide Synthase by a mustard gas analog in murine macrophages. BMC Cell Biol. 2006;7:39.
 14. Park KH, Park M, Choi SE, Jeong MS, Kwon JH, Oh MH, Choi HK, Seo SJ, Lee MW. The anti-oxidative and anti-inflammatory effects of caffeoyl derivatives from the roots of *Aconitum koreanum* R. RAYMOND. Biol Pharm Bull. 2009;32(12):2029-33.
 15. Saw CL, Wu Q, Su ZY, Wang H, Yang Y, Xu X, Huang Y, Khor TO, Kong AN. Effects of natural phytochemicals in *Angelica sinensis* (Danggui) on Nrf2-mediated gene expression of phase II drug metabolizing enzymes and anti-inflammation. Biopharm Drug Dispos. 2013;34(6):303-11.
 16. Jung HA, Jin SE, Ahn BR, Lee CM, Choi JS. Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Eisenia bicyclis* and its constituents fucosterol and phlorotannins in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. Food Chem Toxicol. 2013;59:199-206.
 17. Jeon HJ, Choi HS, Lee OH, Jeon YJ, Lee BY. Inhibition of Reactive Oxygen Species (ROS) and Nitric Oxide (NO) by *Gelidium elegans* Using Alternative Drying and Extraction

- Conditions in 3T3-L1 and RAW 264.7 Cells. *Prev Nutr Food Sci.* 2012;17(2):122-8.
18. Surh J, Yun JM. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Butanol Extract of *Melaleuca leucadendron* L. *Prev Nutr Food Sci.* 2012;17(1):22-8.
19. Wu TY, Khor TO, Saw CL, Loh SC, Chen AI, Lim SS, Park JH, Cai L, Kong AN. Anti-inflammatory/Anti-oxidative stress activities and differential regulation of Nrf2-mediated genes by non-polar fractions of tea *Chrysanthemum zawadskii* and licorice *Glycyrrhiza uralensis*. *AAPS J.* 2011 Mar;13(1):1-13.