

## 호흡기 증상에 대한 복합제 HAE의 완화 효과

장보윤<sup>1</sup> · 김다은<sup>1</sup> · 한지혜<sup>1</sup> · 이주석<sup>1</sup> · 김대성<sup>2</sup> · 조형권<sup>2</sup> · 김성연<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>원광대학교 약학대학, 약품 연구소, <sup>2</sup>한풍제약

## Relief Effect of Medicinal Herb Mixture HAE Series on Respiratory Symptoms

Bo Yoon Chang<sup>1</sup>, Da Eun Kim<sup>1</sup>, Ji Hye Han<sup>1</sup>, Joo Seok Lee<sup>1</sup>, Dae Sung Kim<sup>2</sup>,  
Hyoung Kwon Cho<sup>2</sup>, and Sung Yeon Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Pharmaceutical Research and Development, College of Pharmacy, Wonkwang University,  
Iksan, Jeonbuk 570-749, Korea

<sup>2</sup>HanpoongPharm. CO., Ltd, 333-241st Palbok-dong, Deokjin-gu, Jeonju-si, Jeonbuk 561-841, Korea

**Abstract** – HAE series (HAE 01 - 06), are the mixtures of medicinal plants; Lonicerae Folium et Caulis (*Lonicera japonica*), Scutellariae Radix (*Scutellaria baicalensis*), Adenophorae Radix (*Adenophora triphylla* var. *japonica*), Polygonati Oddorati Rhizoma (*Polygonatum odoratum* var. *pluriflorum*), Platycodi Radix (*Platycodon grandiflorum*), Liriopsis seu Ophiopogonis Tuber (*Liriope platyphylla*). HAE 06 showed the significant antitussive effect in HAE series. HAE 04, 05, and 06 increased the effect of expectorant measured by secretion of phenol red in rats. All tested HAE series were observed to have the antioxidant activity determined by the scavenging activity. HAE 01, 03 and 06 were significantly reduced the production of nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) increased by LPS. HAE 06 was selected based on the results and done further experiments. HAE 06 inhibited the number of coughing induced by citric acid in dose dependent manner. HAE 06 effectively increased the effect of expectorant. HAE 06 exhibited anti-inflammatory effects by inhibiting the production of NO and TNF- $\alpha$ . In addition, HAE 06 significantly suppressed inducible Cyclooxygenase-2 (COX-2). Especially HAE 06 has the highest effect in alleviating the respiratory symptoms. Moreover, the enhancement antioxidant activity and reduction inflammation partly were attributed to it. HAE 06 may become the promising candidate for the treatment of respiratory symptom in the future.

**Key words** – Herb mixtures, Antitussive, Expectorant, Anti-inflammation, Antioxidant

국내 호흡기 질환은 대부분의 경우 만성폐쇄성폐질환 (COPD, chronic obstructive pulmonary disease)과 천식 (asthma)이 주를 이루고 있다. 이러한 질환의 호흡기 증상은 다양한 자극에 대한 방어 작용으로써 기침, 가래, 콧물, 호흡곤란, 천명음(쌩쌩거리는 소리) 및 흉부 압박감등이 나타난다.<sup>1,2)</sup> 증상 완화 및 치료를 위해 기관지 확장제, 점액 개선제, 스테로이드제, 항콜린제, 흡입용 교감 신경 자극제 등의 약물요법이 주를 이루고 있고, 그 외에 감기, 급만성 기관지염, 기타 호흡기 감염 등 질환과 관련하여 다양한 진해 거담제 및 기관지 확장제가 사용되고 있다.<sup>3,4)</sup> 대표적인 진해제(鎮咳劑)로는 의존성 마약류 및 항정신성 의약품인 디하이드로코데인, 메틸에페드린 등으로 주로 중추신경에 작

용하는 성분이 사용되며, 이러한 성분들은 종종 심혈관계 혈전반응이나 심근경색, 호흡억제, 위 또는 장관출혈과 같은 부작용이 유발되는 경우가 있다. 거담(祛痰) 작용으로는 아세틸시스테인, 엘도스테인 등과 같은 치올계와 암브록솔과 같은 비치올계 거담제 등이 사용되고 있으나, 위 복부 팽만감, 두드러기, 구내 마비감, 화농성 비염등의 부작용을 유발하는 경우가 있다.

최근, 합성의약품에 의해 유발되는 부작용 및 합병증은 이유로, 각종 천연 소재로부터 생리활성 물질을 탐색하여 질병의 예방 및 효과를 갖는 제품을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>4,5)</sup> 특히, 우리나라를 비롯한 동양권에서는 예로부터 다양한 종류의 질병 치료를 위해 천연물 처방을 사용하여 왔다. 이러한 천연물 제제들은 오랜 기간의 경험을 근거로 생리활성 효능이 검증 되어 있고, 낮은 부작

\*교신저자(E-mail): sungykim@wonkwang.ac.kr  
(Tel): +82-63-850-6806

용으로 사용 빈도가 높다.<sup>6)</sup> 천연물 복합제는 단일물질이 아니라 여러 가지 천연물로 구성되기 때문에 다양한 성분의 복합적인 효과로 광범위한 효능을 나타낼 수 있으며, 배합비와 추출 방법에 따라 효능이 달라질 수 있다.<sup>7,8)</sup> 천연물중에는 호흡기 증상 및 질환을 치료 할 수 있는 진해 거담 효과가 있다고 알려진 성분이 많고 이들을 단독 혹은 혼합투여했을 때 임상적인 효과가 있음이 보고된 바 있다.<sup>9)</sup>

본 연구에서는 현재 민간 및 한방에서 진해 거담제로 널리 사용되는 인동(忍冬, *Lonicerae Folium et Caulis*), 황금(黃芩, *Scutellariae Radix*), 사삼(沙參, *Adenophorae Radix*), 옥죽(玉竹, *Polygonati Oddorati Rhizoma*), 길경(桔梗, *Platycodi Radix*) 및 맥문동(麥門冬, *Liriopsis seu Ophiopogonis Tuber*) 등의 천연물을 주성분으로 복합제 HAE가 호흡기 증상에 미치는 효과를 확인하여, 천연물 복합제 기반의 호흡기 증상 완화제 개발에 필요한 기초자료를 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

**시약** - 세포 배양액인 Dulbecco's modifide eagle medium, fetal bovine serum, streptomycin penicillin 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco(San Francisco, CA, USA)사에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical, citric acid, theobromine은 sigma사에서 구입하였다. Nitric oxide 측정 키트는 인트론사에서 구입, Tumor necrosis factors-alpha는 R&D system사에서 구입하여 사용하였다.

**세포주 및 배양** - 혼합 추출물의 세포 독성을 측정하기 위하여 쥐의 대식세포인 Raw 264.7세포를 ATCC에서 구입하여 사용하였다. Raw 264.7 세포는 DMEM배지에 10% FBS, 1% 페니실린 스트렙토마이신 1% L-글루타민 및 20 µg/ml을 첨가한 배양액을 사용하여 배양하였고, 37°C 습윤한 CO<sub>2</sub> 배양기(5% CO<sub>2</sub>/95% air)에서 배양하였다.

**동물의 사육** - 본 연구에서는 오리엔트 바이오(주)로부터 입수한 6주령의 자성 ICR 마우스 및 SD rat를 사용하였다. 1 주간의 적응기를 둔 후 체중범위에 따른 무작위법에 의하여 균 분리를 실시한 후 사용하였다. 실험에 사용된 동물들은 인수 및 순화기간 동안 이상증상이 관찰되지 않았다. 순화 및 실험 기간 동안 사육 환경은 온도 23±2°C, 상대습도 55±5%, 조명시간 12시간 및 조도 150~300 Lux로 설정하고, 오리엔트 바이오(주)에서 공급된 살균 처리된 실험동물용 고형사료와 물은 자유섭취 조건으로 하였다. 실험동물은 꼬리에 개별인식 처리 후 각각의 동물을 관찰하는데 방해가 되지 않는 범위에서 폴리카보네이트 케이지에 사육하였다.

**시료의 추출** - 본 실험에 사용한 인동, 황금, 사삼, 옥죽, 길경 및 맥문동은 동경종합상사에서 2014년 4월에 구입하였다. 본 실험에 사용한 6종의 천연물은 한풍제약, 김대성

박사가 검증한 후 실험에 사용하였으며, 한풍제약 표본실에 보관하고 있다(HP-14-054). 천연물은 30% 주정 및 30% 주정에 식초가 3% 되도록(베타추출) 혼합한 용매로 추출하였다. 추출은 시료 중량의 10배 양을 가하여 95°C에서 3시간 추출을 2회 반복 하였다. 복합제는 원심 분리 및 여과 농축하여 건조하였고 냉장실에 보관하였다. 본 실험에 사용된 복합제는 총 6가지로 HAE 01과 02는 인동, 황금, 길경을 3:1:1의 비율로 혼합후 각각 30% 주정 및 베타추출, HAE 03과 04는 인동, 황금, 맥문동을 3:1:1의 비율로 혼합 후 각각 30% 주정 및 베타추출, HAE 05과 06은 인동, 황금, 사삼, 옥죽을 8.8:1:1:1의 비율로 혼합 후 각각 30% 주정 및 베타추출 하였다. 각각의 추출 수율은 28.8, 26.8, 31.4, 31.6, 22.1, 25.3%였다.

**진해능 평가** - 진해능을 측정하기 위해 Tanaka등의 방법<sup>10)</sup>에 따라 실험을 수행하였다. 복합제 HAE을 ICR 마우스에 경구로 단회 투여하고, 30분 뒤 기침 유발제(0.4 M citric acid)를 OMRON사의 neublizer를 활용하여 분무하여 기침을 유발시켰다. 분무 후, 마우스를 플레티시스코 그래프 챔버(Buxco, U.S.A)에 넣은 후 발생하는 기침수를 15분간 5초 간격으로 측정하였다. HAE series는 단일 용량인 200 mg/kg으로 스크리닝하고, HAE 용량별 실험은 100, 200 및 400 mg/kg(인체 적용 용량, Human Equivalent Dose (HED): 487, 972, 1945 mg/60kg/day)을 kg당 10 ml로 투약하였다. 양성대조군으로는 테오브로민 50 mg/kg을 사용하였다.

**거담능 평가** - 거담능을 확인하기 위해 Engler와 Szelenyi의 방법<sup>11)</sup>에 따라 실험을 수행하였다. 복합제 HAE를 SD rat에 경구로 단회 투여하고 60분 후 phenol red(20 mg/kg)를 복강주사 하였다. 30분 후 디에틸에테르를 이용해 마취시키고 복부 대동맥을 절단하여 방혈시킨 후, 기관(trachea) 전체를 절제하였다. 분리된 기관을 1.5 cm를 1 ml의 생리 식염수에 넣어 30 분 동안 세척하였고, 10,000 rpm으로 5분간 상온에서 원심분리하여 얻은 상등액에 1 N 가성소다(NaOH)를 첨가 후 546 nm에서의 흡광도를 측정하여 페놀레드의 농도로서 거담활성을 평가하였다. HAE series는 단일 용량인 200 mg/kg으로 스크리닝하고, HAE 용량별 실험은 50, 100 및 200 mg/kg(HED: 487, 972, 1945 mg/60 kg/day)을 kg당 10 ml로 투약하였다. 양성 대조군으로는 암브록솔 50 mg/kg을 사용하였다.

**염증관련 사이토카인 정량** - Raw 264.7cell은 DMEM 배지를 이용하여 5×10<sup>4</sup> cells/ml로 조절한 후 96 well plate에 접종하고, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 전 배양하였다. 세포에 10 µg/ml의 LPS를 처리하고 1 시간 뒤에 HAE를 다양한 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. Nitric oxide의 측정에는 상등액과 같은 양의 Griess reagent(5% 인산에 용해된 0.1% N-1-naphthylethylenediamine과 1% sulfanilamide

을 1:1로 혼합)을 처리해 실온에서 10분 방치 후 microplate reader(TECAN, CA, USA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

TNF- $\alpha$  측정 역시, 배양이 끝난 상층액으로 TNF- $\alpha$  ELISA Kit 을 활용하여 정량하고 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**COX-2 단백질 변화량 측정** - 배양이 끝난 Raw 264.7 세포를 수집하여 lysis buffer(50 mM Tris·Cl, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100 and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)로 단백질을 추출하여 정량을 하였다. 정량한 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel에 20  $\mu$ g을 주입하여 2시간 동안 100v에서 전기영동을 하였다. 분리된 단백질을 80v로 2시간 동안 방치하여 니트로셀룰로오스 멤브레인에 이동시킨 후, 5% non-fat milk로 비특이적 단백질 결합을 방지하였다. 일차항체인 COX-2 polyclonal antibody를 1:5,000으로 희석하여 24시간 동안 반응시킨 후, 이차항체인 goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase conjugate(Bio-rad Laboratories, Hercules, CA)를 1:1,000으로 희석하여 2시간 동안 반응시켰다. 세 번 세척 후 enhanced chemiluminescence(Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ) 시약으로 필름에 감광시켜 COX-2 단백을 확인하였다.

**DPPH Radical 소거 활성 측정** - HAE series의 항산화 효과를 확인하기 위하여, 진한 보라색을 띄는 Diphenylpicrylhydrazyl이 항산화제에 의해 Diphenylpicrylhydrazine으로 환원되어 옅은 노란색에 가까워지는 DPPH(Diphenylpicrylhydrazine) assay를 수행하였다. 시료와 0.1 mM DPPH용액을 1:1로 혼합하고 1시간뒤, 520 nm의 파장에서 흡광계를 이용하여 항산화능을 측정하였다. 흡광도를 다음의 식으로 %환산 하였다.

$$\text{항산화능} = 1 - (\text{시료 처리군} / \text{미처리군}) \times 100$$

**통계분석** - 시험에 얻어진 결과는 평균 $\pm$ 표준편차로 표기

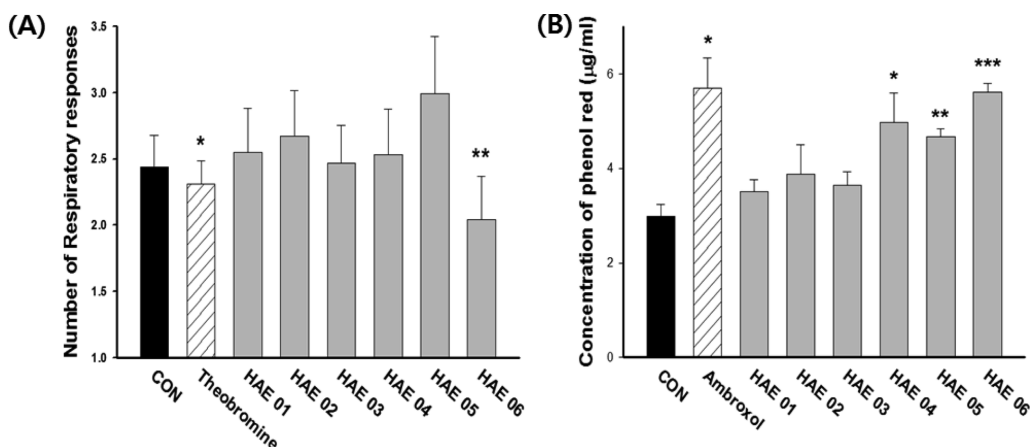
하였으며, Graphpad Prism v5.0 프로그램을 활용하여 student *t*-test를 수행하여 유의성을 검증하였다. 실험군이 3개 이상인 경우 일원분산분석(one-way ANOVA)를 수행한 후 Tukey's multiple comparison test로 검증하였다. 통계적인 유의성은 *p* 값이 0.05 이하인 경우를 기준으로 판정하였다.

## 결 과

**실험동물에서 측정된 HAE Series의 진해능 평가** - 진해능 평가는 citric acid로 기침 유발 후 빈도의 변화를 측정하였다. 복합제 HAE series와 양성대조약물로 사용된 테오브로민의 진해능을 Fig. 1A에 나타내었다. 테오브로민 투여는 유의적인 기침수 감소 효과를 나타내었으나, HAE series 중 01-05는 기침수에 영향을 주지 않았다. HAE 06은 테오브로민과 유사한 기침수 억제 효과를 보였다.

**실험동물에서 측정된 HAE series의 거담능 평가** - 거담능 평가는 점액분비의 마커로 기관내 phenol red 분비량을 측정하였다. 복합제 HAE series와 양성대조약물로 사용된 암브록솔의 거담능 측정 결과, phenol red 분비량은 HAE 04, 05과 06을 투여 시, control 대비 유의적인 거담능의 증가가 관찰되었으며, 각각 1.7배, 1.3배, 2.0배 증가를 나타내었다.

**HAE Series의 항염 활성 측정** - 대식세포가 염증 반응시 생산하는 NO로부터 산화된 형태인 NO<sub>2</sub> 농도를 측정 한 결과, LPS를 단독으로 처리하였을 때 NO의 농도가 45.3  $\mu$ M까지 증가 하였다. 복합제 HAE 01, 02, 03, 04, 06의 100  $\mu$ g/ml 처리군에서는 LPS에 의해 증가된 NO의 농도를 각각 31.1, 35.1, 24.5, 22.5, 41.9% 감소하는 것으로 나타났다. 대식세포가 생산하는 대표적인 염증 사이토카인인 TNF- $\alpha$ 의 농도는 LPS를 단독으로 처리하였을 때의 농도는



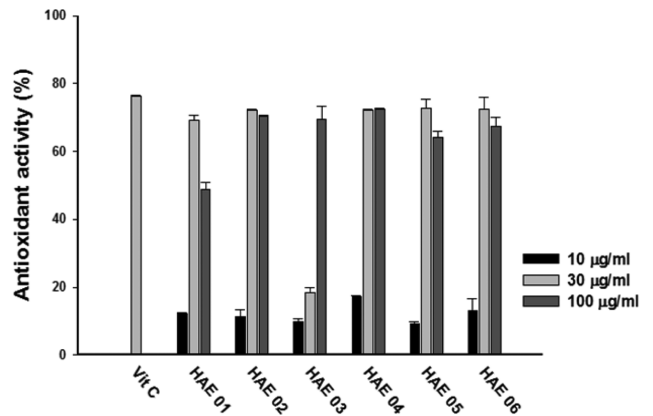
**Fig. 1.** Effect of HAE series on (A) cough inhibition and (B) phenol red secretion *in vivo*. The value were presented as mean $\pm$ S.D. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001, significantly different from the control group.

**Table I.** Anti-inflammatory effects of HAE series in LPS-stimulated macrophages

	Conc (µg/ml)	NO (µM)	TNF-α (ng/ml)
NOR	-	3.20±0.32	0.20±0.03
LPS	10	45.3±4.30	3.2±0.04
HAE 01	10	40.2±2.32	2.83±0.13
	30	38.3±1.35	2.53±0.15*
	100	31.2±1.35*	2.65±0.14*
HAE 02	10	38.2±5.35	3.52±0.43
	30	35.2±2.32	3.01±0.25
	100	29.4±4.35*	2.91±0.45
HAE 03	10	40.2±3.35	3.12±0.65
	30	36.2±4.30*	2.74±0.14
	100	34.2±5.13*	2.84±0.10
HAE 04	10	32.1±3.46*	2.88±0.42
	30	35.3±3.35*	3.12±0.32
	100	35.1±1.35*	2.20±0.14*
HAE 05	10	40.2±3.56	3.35±0.31
	30	38.2±10.3	2.94±0.21
	100	36.1±2.35	2.84±0.24
HAE 06	10	38.2±3.43	2.84±0.35
	30	24.3±2.35*	2.67±0.25*
	100	26.3±3.14*	2.24±0.38*

The value were presented as means±S.D. \**p*<0.05, significantly different from the LPS group.

3.2 ng/ml까지 증가하지만, 복합제 HAE 01, 04, 06 함께 처리하였을 때 TNF-α는 고농도 처리군에서 각각 17.1, 31.2, 30% 감소하였다. HAE 06는 10 µg/ml 처리시 11.3%, 30 µg/



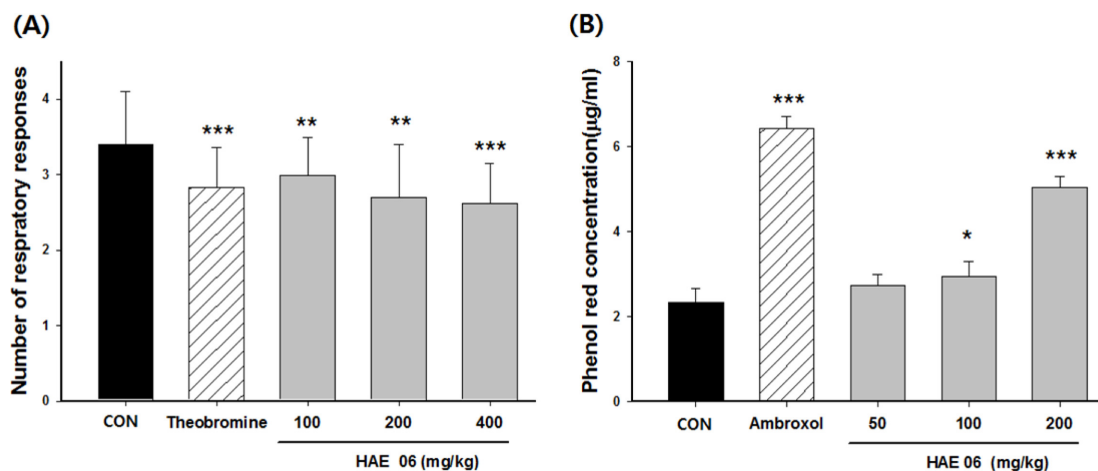
**Fig. 2.** Antioxidant activity of HAE series. The value were presented as means±S.D.

ml 처리시 16.6%, 100 µg/ml 처리시 30%로 농도 의존적인 감소를 나타내었다(Table I).

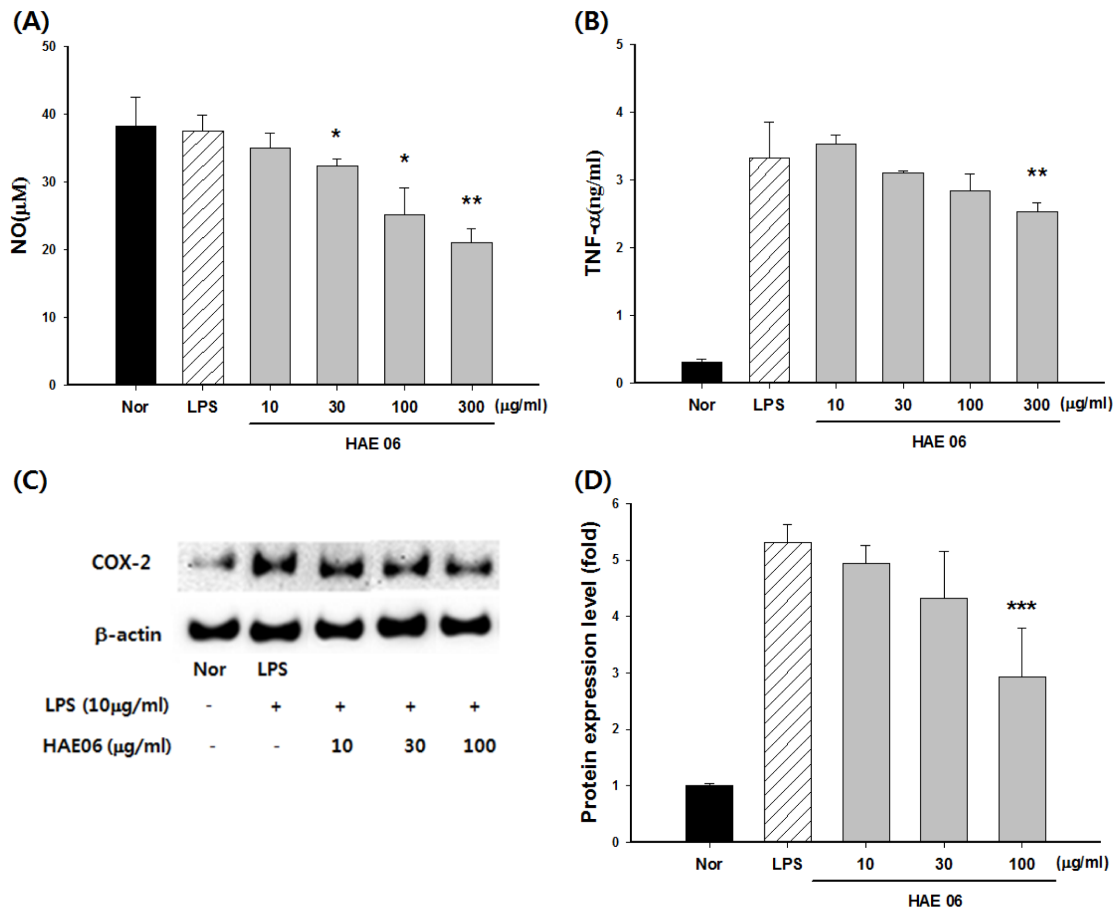
**HAE Series의 항산화 효과** - 6종의 복합제와 양성대조 약물로 사용된 *L*-ascorbic acid의 항산화능을 비교한 결과, HAE 03은 처리농도 100 µg/ml에서만 69.4%의 항산화능을 나타내었으며, 그 외 그룹에서는 10 µg/ml의 농도를 제외한 30, 100 µg/ml에서 50% 이상의 항산화능을 나타내었다. HAE 02, 04, 05, 06 고농도에서는 실험에 사용된 *L*-ascorbic acid와 유사한 항산화 효과를 나타내었다(Fig. 2).

**실험동물에서 측정된 HAE 06의 진해 및 거담능 평가** - 6종류의 HAE 복합제중의 진해 및 거담 활성 검색 결과, 가장 효과가 뛰어난 HAE 06에 대한 농도별 시험을 진행하였다. 복합제 HAE 06의 경우 농도 의존적으로 14.7, 23.5, 26.8%의 기침 억제 효과를 나타내었으며, 기존 진해제인 테오브로민과 유사한 진해 효능을 보였다.

거담능 평가를 위해 양성대조약물로 사용된 암브록솔은



**Fig. 3.** Effect of HAE 06 (A) cough inhibition and (B) phenol red secretion according to dose. The value were presented as means±S.D. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001, significantly different from the control group.



**Fig. 4.** Inhibition of (A) NO and (B) TNF- $\alpha$  production, and (C, D) COX-2 expression by HAE 06 in LPS-stimulated macrophage. The value were presented as means $\pm$ S.D. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001, significantly different from the LPS group.

대조군 대비 3.0배 phenol red 분비 증가를 나타내었다(Fig. 3B). HAE 06의 처리시 대조군 대비 각각 1.2, 1.4, 2.3배 농도 의존적인 증가를 나타내었다.

**HAE 06의 COX-2의 단백질 발현 저해 효과** - 10  $\mu$ g/ml부터 세포 독성이 나타나지 않은 고농도인 300  $\mu$ g/ml까지 HAE 06을 처리하였을 때 LPS로 유발된 NO와 TNF- $\alpha$  생성을 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인하였다(Fig. 4A, B). 또한 항염기전을 확인하기 위해 western blot을 이용하여 COX-2의 발현을 측정하였다. 그 결과 LPS에 의해 증가된 COX-2의 단백질 발현양이 농도 의존성 있게 감소하였으며,  $\beta$ -actin의 band density 비율에 따라 COX-2의 단백질 발현을 고농도에서는 44.8% 저해함을 확인하였다(Fig. 4C, D).

### 고찰

전통적으로 천연물은 질병의 치유에 사용함에 있어, 그들의 효능을 증진시키고 독성이나 부작용을 줄이기 위하여 복합처방의 형태로 대부분 사용되어 왔다. 이와 같이 천연물

복합제가 상호작용을 통해 더욱 유효한 효과를 발휘하고 있다는 점에서, 천연물을 배합하여 상승효과를 나타내는 복합제에 대한 관심이 증대되고 있다.<sup>8,9)</sup>

인동(*Lonicera japonica*)은 溫病發熱, 熱毒血痢, 風濕熱痹 등의 병증에 사용되었다<sup>12)</sup>. 특히 인동 추출물이 기관지 수축, 비만세포의 histamine 유리 및 폐기관지 내의 총백혈구 및 호산구의 증가를 억제 등을 통한 항천식 효과에 대한 보고가 있다<sup>13)</sup>.

황금(*Scutellaria baicalensis*)의 효능은 清熱燥濕, 사화해독, 지혈, 안태의 효능이 있으며 습온으로 인한 황달 열림, 기분실열, 등의 병증에 사용된다<sup>12)</sup>. 특히 baicalin은 뇌 손상에 대한 항염증 효과와 파킨슨병 유발 흰쥐에서 cytokine IL-1과 tumor necrosis factor의 함량을 감소시키는 효과가 있으며<sup>14)</sup>, baicalin과 baicalein 성분은 비만세포의 과민성 물질의 방출을 억제하여 항염과 항알러지 작용을 나타낸다고 보고되었다<sup>15)</sup>. 또한 황금의 진통효능과 항염효능에 대한 보고된바 있다<sup>16)</sup>. 이러한 효능이 있는 인동과 황금에 상기도 감염 및 수반되는 증상에 사용되어온 길경<sup>17)</sup>, 맥문동<sup>18)</sup>, 사삼<sup>19)</sup>, 옥죽<sup>20)</sup>을 혼합하여 처방 설정하고 본 실험을 통해서

호흡기 증상 완화에 도움을 주는 최적의 혼합비율 및 추출법을 결정하고자 하였다.

천연물의 혼합비율은 인동의 향천식 효능에 관한 보고를<sup>13)</sup> 근거로 처방 비율을 높이고 황금, 길경, 맥문동, 사삼, 옥죽을 같은 비율로 설정하였다. 혼합비율은 크게 3가지로 인동:황금:길경을 3:1:1, 인동:황금:맥문동을 3:1:1, 인동:황금:사삼:옥죽을 8.8:1:1:1의 비율로 혼합하였다. 추출법은 천연물 추출에 많이 사용되는 30% 에탄올과 베타 추출법으로 분류하여 수행하여 총 6종의 복합제를 제조하였다. 베타 추출에 사용된 식초 추출법은 천연물의 항산화능, 폴리페놀 함량을 높이고,<sup>21-24)</sup> 인삼의 경우 ginsenoside Rg2, Rg3, Rh1, F4의 농도를 높이는 등<sup>25)</sup> 이러한 과정을 통해 활성 성분 및 종류와 양의 차이를 나타낸다는 보고가 있다. 따라서 30% 에탄올과 베타 추출에 따른 호흡기 증상 완화에 대한 효과를 비교 하였다.

세포를 활용한 항염증 효과를 측정하기 전에 복합제가 세포에 독성을 나타내는지를 MTT assay를 이용하여 측정하였다.<sup>26)</sup> 모든 복합제에서 90% 이상의 세포 생존율을 보여 세포독성은 나타나지 않는 것을 확인하였다(data not shown).

항염증 지표인 NO는 정상적인 생리 상태에서 혈관의 항상성, apoptosis 유도 작용 등 중요한 생리적인 기능을 매개하지만, 다량의 NO는 정상세포를 죽이고 염증을 유도하여 급성 또는 만성 염증질환의 원인이 되는 물질로 작용하게 된다. 염증 관련 cytokine 중, TNF- $\alpha$ 는 염증반응 및 LPS의 중요한 매개체로서 내재 면역에 있어서도 중요한 역할을 하며 만성 염증 반응과도 관련되어 있다.<sup>27)</sup> 따라서, 효과적인 NO, TNF- $\alpha$  분비조절은 급성 또는 만성 염증질환의 치료방법으로 알려져 있으며 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 복합제중 HAE 01, 04, 06에서 LPS에 의해 유도된 NO와 TNF- $\alpha$ 의 증가를 유의적으로 감소시키는 것을 확인하였다(Table I).

항산화 물질의 가장 특징적인 기작은 유리기와 반응하는 것으로 라디칼 소거 작용은 활성라디칼에 전자를 공여하여 항산화 효과나 인체에서 노화를 억제하는 척도로 이용되고 있다.<sup>28)</sup> 복합제의 항산화능 평가를 위해 DPPH를 이용한 라디칼 소거 활성을 측정 하였다. 3가지 천연물을 에탄올 추출만 수행한 HAE 01과 HAE 03 보다는 베타 추출을 수행한 HAE 02와 04에서 유의적 증가를 나타내었다. 하지만 4가지 천연물을 혼합한 HAE 05와 HAE 06의 경우 베타 추출에 따른 항산화 능의 차이는 나타나지 않았다. HAE 02, 04, 05, 06 고농도에서는 50  $\mu$ M ascorbic acid와 유사한 항산화 효과를 나타내었다.

기침과 가래는 이물에 대한 기도의 방어기전이거나 특정한 질병에 수반되는 증상이다. 세균, 진균에 의하여 기관지가 감염되었거나 가스와 먼지와 같은 것을 흡입하거나 호흡기가 냉 자극을 받음으로서 기관지 점막 또는 폐에 염증

이 유발 되었을 때 기침과 가래가 발생하게 된다.<sup>2,6)</sup>

기침의 빈도 및 강도를 완화하기 위해 기침 억제 치료를 시행하는데 기침반사를 억제하거나 점액 용해 효과가 있는 약제를 흔히 사용한다. 기침 반사 억제능을 확인하기 위해 마우스에 복합제 HAE series를 전 처리하고 Citric acid로 기침을 유발하여 기침 빈도를 측정하였다.<sup>10,29)</sup> 그 결과 HAE 06의 농도 의존적인 기침 억제 효능을 확인할 수 있었다.

생체의 거담작용은 매우 다양한 기전에 의해 이루어지는데 수분을 비롯한 점액의 분비를 촉진시킴으로서 그 양을 증가, 직접적인 작용으로 점액 혹은 담의 점성을 낮추는 것, 섬모운동의 촉진으로 인해 배설을 용이하게 하는 것 등이 있다. 수분 및 점액의 분비작용을 확인할 수 있는 phenol red의 배설 작용을 볼 때 HAE 06은 거담에 탁월한 효과를 나타내었다.<sup>11,30)</sup> 이러한 결과는 HAE 06은 농도 의존적으로 점액의 분비를 촉진 시킬 뿐만 아니라 담의 점성을 감소시키는 효과가 있음을 시사한다.

농도 의존적인 항염능을 나타내는 HAE 06의 항염 기전을 이해 하고자 western blot을 수행하여 COX-2 발현을 측정하였다. 다수의 항염증 약물은 COX-2의 생성 및 효소 활성저해에 의해 prostaglandin 합성을 억제한다. COX는 COX-1과 COX-2로 구분되는데, 다양한 세포 에서 각각 다른 발현 경향을 나타낸다. COX-1은 위 및 신장기능의 유지, 혈소관의 형성에 필요한 prostaglandin을 합성한다. 상대적으로 COX-2는 동물이나 인간의 염증반응부위에서 발현 된다.<sup>31)</sup> 따라서 COX-2에 의한 prostaglandin의 합성은 염증 반응을 매개하는 것으로 여겨지고 있다. HAE 06의 항염활성은 LPS에 의해 형성되는 PGE2를 유의성 있게 감소시키며 이는 COX-2 단백질 발현 저해에 의한 것임을 확인할 수 있었다.

## 결 론

천연 복합제의 호흡기 증상완화제로서의 이용 가능성을 조사하고자 각기 다른 비율과 추출방법으로 복합제를 HAE 6종을 제조하고 항산화 활성, 항염 활성 및 실험동물을 이용한 진해 거담능을 평가 하였다. 실험 결과 인동:황금:사삼:옥죽을 8.8:1:1:1의 비율로 혼합하고 베타 추출한 HAE 06에서 다른 HAE series와 비교 시 높은 항산화능 및 항염증 효과를 나타내었으며 실험 동물에서 농도 의존적인 기침 억제 및 거담능을 나타내었다. 천연물 복합제인 HAE 06은 높은 항산화, 항염, 진해 거담능을 나타내며 호흡기 증상 개선을 위한 소재로서 이용가치가 높은 것으로 사료된다.

## 사 사

본 연구는 농림축산식품부 생명산업기술개발사업(312057-

3)에 의해 이루어진 것임.

### 인용문헌

- Postma, D. S. and Rabe, K. F. (2015) The asthma-COPD overlap syndrome. *N. Engl. J. Med.* **373**: 1241-1249.
- Von, Nussbaum. F. and Li, V. M. (2015) Neutrophil elastase inhibitors for the treatment of (cardio) pulmonary diseases: Into clinical testing with pre-adaptive pharmacophores. *Bio-org. Med. Chem. Lett.* **25**: 4370-4381.
- Kim, D. S., Bae G, Kim, S. K., LEE, H. S., Kim, Y. J. and Lee, S. H. (2012) Retrospective drug utilization review of antibiotics for respiratory tract infection(RTI) in ambulatory outpatient care. *Kor. J. Clin. Pharm.*, **22**: 291-303.
- Kim, S. H. (2010) Antitussives, mucolytic agents and expectorants in clinical practice. *Korean J. Med.* **78**: 682-686.
- Akopov, A. L., Aleksandrova, E. B., Il'kovich, M. M., Petrov, D. V. and Trofimov, V. I. (2015) Rengalin, a new efficacious and safe antitussive agent. results of a randomized, comparative, multicenter clinical trial in patients with acute respiratory tract infections. *Antibiot. Khimioter.* **60**: 19-26.
- Stamatiou, K. and Pierris, N. (2013) *Serenoa repens* extract additionally to quinolones in the treatment of chronic bacterial prostatitis. The preliminary results of a long term observational study. *Arch. Ital. Urol. Androl.* **84**: 190-196.
- Bansky, D. and Barolet, R. (1990) Chinese herbal medicine formulas and strategies. Eastland Press, Seattle, WA, USA. pp. 7-8.
- Lee, S. G., Jeong, H. J., Lee E. J., Kim, J. B. and Choi, S.W. (2011) Anti-inflammatory activities of ethanol extracts from medicinal herb mixtures. *Korean J. Food SCI. Technol.* **43**: 200-205.
- Song, K. J., Shin, Y. J., Lee, K. R., Lee, E. J., Suh, Y. S. and Kim, K. S. (2015) Expectorant and antitussive effect of *hedera helix* and *rhizoma coptidis* extracts mixture. *Yonsei Med J.* **56**: 819-824.
- Tanaka, M. and Maruyama, K. (2003) Cough reflex induced by microinjection of citric acid into the larynx of guinea pigs: new coughing model. *J Pharmacol Sci.* **93**: 465-470.
- Engler, H. and Szelenyi, I. (1984) Tracheal phenol red secretion, a new method for screening mucosecretolytic compounds. *J. Pharmacol. Moth.* **11**: 151-157.
- 전국한약과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 서울: 영림사. pp. 158-160, 209-210, 245-246.
- Ryu, K. H., Han, C. K., Rhee, H. I., Kim, T. S., Jung, I. H., Lee, S. J., Im, G. J., Lee, K. J., Jung, K. W., Kim, D. K., Kim K. H. and Cho, Y. B (1999) Anti-asthmatic activities of the extract of *Lonicera japonica*. *Kor J. Pharmacogn.* **30**: 377-383.
- Kim, E. H., Shim, B. S., Kang, S. H., Jeong, G. J., Lee, J. S., Yue, Y. B and Chun, M. S. (2009) Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* extract via suppression of immune modulators and MAP kinase signaling molecules. *J. Ethnopharmacol.* **126**: 320-331.
- Jung, M. A., Jang, S. E., Hong, S. W., Han, M.J. and Kim, D.H. (2012). The role of intestinal microflora in anti-inflammatory effect of baicalin in mice. *Biomolecules and Therapeutics.* **20**: 36-42.
- Lee, J. K., Son,g Y. K. and Lim, H. H. (2007). Analgesic and Anti-Inflammatory Effect of *Scutellaria Baicalensis*. *J. Korean Med. Sci.* **28**: 124-135
- Kim, S. Y., Lee, E. B. and Jeong, E.J. (2009) Anti-Inflammatory action of the fractions of *platycodi radix*. *Korean J. Food & Nutr.* **22**: 618-624.
- Park, G. I. and Oh, J. M. (2011) Effects of *liriopis tuber* water extract on RANKL-induced osteoclast differentiation. *Korean J. Phys. Anthropol.* **24**: 237-244.
- An, S. M., Kim, H. G. and Choi, E. J. (2014) Screening for anti-inflammatory activities in extracts from korean herb medicines. *J. Soc. Cosmet.* **40**: 95-108.
- Park, S. D., Lee, G. H. and Lee, Y. S. (2007) Comparison of Immunomodulatory Effects of Water-extracted *Adenophorae Radix*, *Liriopis Tuber*, *Dendrobii Herba*, *Polygonati Odorati Rhizoma* and *Polygonati Rhizoma*. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* **21**: 414-424.
- Lim, S. Y., Leem, J. Y. and Lee, C. S. (2007) Antioxidant and Cell proliferation effects of *acanthopanax senticosus* extract in human osteoblast-like MG-63 cell line. *Korean J. food Sci. Technol.* **39**: 694-70.
- Kang, S. H., Kim S.M. and Kim, J. H. (2005) Method fo using acid hydrolysis to increase the efficacy of decreasing alcohol concentration from *Hovenia dulcis* extract. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **20**:129-132.
- Kim, M. Y., Lee S. H., Jang, G. Y., Kim, H. Y., Woo, K. S., Hwang, I. G., Lee J. S. and Jeong, H. S. (2013) Effects of heat treatment on antioxidant activity of hydrolyzed mung beans. *Korean J. food sci. technol.* **45**:34-39.
- Kim, Y. M., Do, J. R., Kim D. S. and Park, J. H. (2006) Cytotoxicities of hydrolyzed crude laminaran from *eisenia bicyclis* on the SNU-1, hela anc SW cells. *J. food sci. technol.* **38**:793-798.
- Kim, S. J., Kim, J. D. and Ko, S. K. (2013) The change of ginsenoside composition in ginseng leaf and stem extract by the microwave and vinegar process. *Kor. J. Pharmacogn.* **44**:149-153.
- Tournebize, J., Sapin-Minet, A., Bartosz, G., Leroy, P. and Boudier, A. (2014) Pitfalls of assays devoted to evaluation of oxidative stress induced by inorganic nanoparticles. *Talanta.* **116**: 753-763.
- Kim, C. J., Romero, R., Chaemsaithong, P. and Kim, J.S. (2015) Chronic inflammation of the placenta: definition, classification, pathogenesis, and clinical significance. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **213**: 53-69.
- Liang, X. L., Wang, X. L., Li, Z., Hao, Q. H., Wang, S. Y.

- (2010) Improved in vitro assays of superoxide anion and 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity of isoflavones and isoflavone metabolites. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 11548-11552.
29. Cinelli, E., Bongianni, F., Pantaleo, T. and Mutolo, D. (2015) The cough reflex is upregulated by lisinopril microinjected into the caudal nucleus tractus solitarii of the rabbit. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **30**: 9-17.
30. Lin, B. Q., Li, P. B., Wang, Y. G., Peng, W., Wu, Z., Su, W. W. and Jo H. (2008) The expectorant activity of naringenin. *Pulm Pharmacol. Ther.* **1**: 259-263.
31. Urquhart, P., Nicolaou, A. and Woodward, D. F. (2014) Endocannabinoids and their oxygenation by cyclo-oxygenases, lipoxygenases and other oxygenases. *Biochim. Biophys. Acta.* **29**: 35-40.
- (2015. 10. 19 접수; 2015. 10. 30 심사; 2015. 11. 10 게재확정)