

가미소요산의 새로운 제형에 대한 항산화 활성 및 항염증 효능평가

최혜민[#], 김세진, 김인수, 이지범, 김종범, 문성옥, 이화동^{*}

한약진흥재단, 한약제제팀

Evaluation on Anti-oxidant Activity and Anti-inflammatory Effects for the New Formulation of Gamisoyosan

Hye-Min Choi[#], Se-Jin Kim, In-Su Kim, Ji-Beom Lee, Jong-Beom Kim,
Sung-Ok Moon, Hwa-Dong Lee^{*}

Korean Medicine Preparation Team,
National Development Institute of Korean Medicine (NIKOM), Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : Gamisoyosan (GMS) is a useful prescription for treating insomnia, dysmenorrhea and infertility induced by a stress. Also, GMS has been used traditionally to improve systemic circulation and biological energy production. The purpose of this study was to assess the anti-oxidant activity and anti-inflammatory effects of Gamisoyosan Formulation (Soft extract, GMS-SE).

Methods : The biological activities such as anti-oxidant and anti-inflammatory effects were measured through cell line-based in vitro assay. We investigated the anti-oxidant properties of GMS-SE on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, contents of total flavonoid and polyphenol. GMS-SE compared to butyl hydroxy anizole (BHA). Furthermore, based on this result the anti-inflammatory effects of GMS-SE have verified by mechanism from LPS- treated Raw264.7 macrophages.

Results : The anti-oxidant activities of GMS-SE increased markedly, in a dose-dependent manner. The GMS-SE showed significant scavenging activity (GMS-SE 500 $\mu\text{g/ml}$: $32.77 \pm 1.65\%$, GMS-SE 1000 $\mu\text{g/ml}$: $45.06 \pm 1.04\%$ and BHA 100 $\mu\text{g/ml}$: $39.25 \pm 2.41\%$ for DPPH assay). and, The total phenolic compound and flavonoids contents of GMS-SE were $73.93 \pm 6.87 \mu\text{g/mg}$ and $698.75 \pm 6.78 \mu\text{g/mg}$. GMS-SE which is LPS has diminished in the LPS-induced release of inflammatory mediators (NO, iNOS, COX2 and PGE2) and pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6 and IL-1 β) from the RAW264.7 macrophages. Moreover, GMS-SE inhibited the activation of phosphorylation of p38 and ERK MAPKs by induced LPS.

Conclusion : The present results indicate that GMS-SE has an anti-oxidant and anti-inflammatory properties, therefore may be beneficial in diseases which related to oxidative stress-mediated inflammatory disorders.

Key words : Gamisoyosan, New formulation, Anti-oxidant, Anti-inflammation

I. 서 론

우리 인체는 생체조직에 유해물질이나 화학적 자극 등 외부 자극이 침투하면 이에 대한 방어반응의 하나로서 염증이

발생 한다¹⁾. 하지만, 염증의 과도한 반응은 다량의 염증 매개 물질을 분비하여 임상적으로 발열, 통증, 기능장애 등의 증상을 유발하는 원인이 된다. 염증반응들은 대식세포에 작용하여 세포를 활성화시키며 세포나 조직이 특정한 생리적 기능을 수

*Corresponding author : Hwa-Dong Lee, Korean Medicine Preparation Team, NIKOM, Korea.
· Tel : +82-53-810-0332 · E-mail : herb@nikom.or.kr

#First author : Hye-Min Choi, Korean Medicine Preparation Team, NIKOM, Korea.
· Tel : +82-53-810-0358 · E-mail : hyemin@nikom.or.kr

· Received : 11 October 2016 · Revised : 2 November 2016 · Accepted : 16 November 2016

행하기 위한 분자적 신호로 작용을 하며, 그 자체로 여러 가지 기능을 가진다. 염증 신호의 대표적 염증매개물질인 nitric oxide (NO) 는 다양한 생리적, 병리적 과정에 포함되는 중요한 세포신호전달분자이며, 급/만성 염증 반응의 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에서 과량 생성되며 염증반응을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 또한 cyclooxygenase2 (COX2)는 염증매개물질인 prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성을 촉매하는 효소로서 iNOS와 마찬가지로 염증반응에 중요한 역할을 하며, 발열을 포함한 염증반응에 관여한다. interLeukin-6 (IL-6)나 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β)는 cytokine이라고 하여, 세포가 다른 세포에게 신호를 주기 위해 방출하는 생리활성 단백질이다. IL-6는 T림프구나 대식세포 (macrophage)에서 분비되는 활성인자로, B림프구를 자극하여 활성화시키는 역할도 하고, 여러 염증반응 또한 촉진한다. TNF- α 는 '중양괴사인자'로, 종양세포에 신호를 주어 자살하도록 만들거나, 그 밖에 대식세포를 자극하기도 하며, 염증반응을 촉진하는 등, 내재면역반응 (innate immune response)에 폭넓게 관여하는 신호분자이다. 이들은 모두 대식세포에 작용하여 대식세포를 활성화시키며 염증반응을 유도한다²⁻⁷⁾. 이와 같이 염증인자는 대식세포 표면의 TLR4를 자극하여 하부 세포신호전달경로인 mitogen activated protein kinase (MAPK)의 활성화도 유도되는데⁸⁾, MAPK는 세포 성장과 분화의 조절, cyto- kine과 stress에 대한 세포 반응의 조절에 중요한 역할을 한다⁹⁾. 또한, 과량의 활성산소는 산화적 스트레스로 인해 생체 내에서 DNA나 세포막 등에 작용하여 산화적 손상을 일으킴으로써 퇴행성 질환이나 암, 동맥경화, 관절염 등의 만성 염증성 질병을 일으키게 된다¹⁰⁾.

이와 같은 과량의 염증반응과 활성 산소로 인한 산화적 스트레스성 질환이 한약을 비롯한 천연물로부터 개발하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다¹¹⁾.

한약제제 (韓藥製劑)란 동물·식물 또는 광물에서 채취된 것으로서 주로 원형대로 건조·절단 또는 정제된 생약 (生藥)을 한방원리에 따라 배합하여 제조한 의약품을 의미한다 (약사법 제2조 제 5, 6항)^{12,13)}. 한약제제는 제조 방법에 따라 크게 두 가지 종류로 나뉘어 지는데, 일반적인 탕제처럼 약재를 혼합하여 추출한 탕제를 엑스제로 만든 복합제제와 한가지 약재만으로 추출한 엑스제 (단미엑스제)를 처방 비율에 따라 섞어 제조한 혼합단미엑스제가 있다. 현재 우리나라에서 한방건강보험 급여적용 한약제제는 혼합단미엑스제로 단미엑스산 69종 및 혼합단미엑스제 56처방으로 일부 처방 및 산제 제형의 건강보험용 한약제제로 국한되어 있다^{14,15)}. 이에 본 연구는 복용이 편리한 제형 개발 및 보험급여 등재로 한약제제의 활성화 및 보장성 확대를 위하여 가장 대표적인 가미소요산 (加味逍遙散) 처방에 대하여 혼합단미연조엑스제 (GMS-SE)를 개발함으로써, 이에 대한 유효성을 확인하였다.

본 연구에 사용된 가미소요산 (加味逍遙散)은 송대 진사문의 태평惠民화제국방 (太平惠民和劑局方)¹⁶⁾에 최초로 수록된 처방약 소요산 (逍遙散)에서 목단피와 치자를 가미한 처방으로, 소요산 (逍遙散)의 소간해울 (疏肝解鬱) 작용보다 청열양혈 (淸熱涼血), 활혈거어 (活血祛瘀) 작용을 강조한 처방이라고 하였으며, 간울혈허 (肝鬱血虛)를 화열생혈 (化熱生血)하는

소요산의 주치 (主治)에 화울 (火鬱)이 겸한 경우에 사용된다¹⁷⁾.

건강보험용 가미소요산 (加味逍遙散) 한약제제의 적응증은 갱년기 장애에 관한 질병에 처방하도록 제시 되어있다¹⁸⁾.

이와 같이 가미소요산 (加味逍遙散)에 대한 최근 연구는 주로 증례 연구와 항스트레스 효과^{119,20)}, 갱년기에 관한 연구^{21,22)}가 대부분이었으며, 가미소요산 (加味逍遙散)의 항산화 및 항염증 효능과 관련된 실험적 연구는 아직 미흡한 실정이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 한약재 및 첨가제

본 연구에 사용된 가미소요산 처방 구성 약재들 중 당귀, 작약, 복령, 백출, 시호, 치자, 목단피, 감초는 (주)휴먼허브 (경북 경산, 한국)에서 구입하였고, 박하는 (주)유니허브 (대구, 한국)에서 각각 구입하였다. 연조엑스제 제조에 필요한 첨가제는 모두 화성화공약품상사(주)에서 구입하였다.

2) 세포실험 분석 시약

세포 배양액인 fetal bovine serum (FBS), dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), penicillin-streptomycin, phosphate buffered saline (PBS) 등의 세포배양용 시약들은 hyClone (USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 lipopolysaccharide (LPS), griess reagent은 sigma (USA), aqueous one solution cell proliferation Assay (MTS) kit 및 agarose는 promega (USA), TNF- α , IL-6, IL-1 β , PGE2 enzyme linked immunosorbent (ELISA) assay kit를 R&D system (USA)에서 구입하여 사용하였다. 단백질 분석 실험에 사용한 1차 항체인 iNOS monoclonal antibody (mAb)는 BD bioscience (USA)에서, COX2, P-ERK, P-P38 mAb는 cell signaling technology (USA)에서 구입하였다. β -actin 1,2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

2. 방법

1) 추출방법 및 제형개발

본 연구에 사용한 GMS-SE는 공정서 (대한민국 한약(생약) 규격집, KHP)에 표기된 가미소요산 (GMS)의 개별 한약재 1 kg을 정선하여 대한약전 제제총칙 엑스제의 제법에 따라 절도 및 분말도에 따라 조절로 하고, 약탕기 (대용약탕기, 서울, 한국)로 정제수 10 배량을 가해 100℃에서 3시간 침출한 다음 Whatman filter paper (No. 4)로 여과하고, 생약의 침출액을 농축 (85℃이하, 감압농축)한 연조엑스를 얻은 것으로 KHP에 따른 수율과 고형물 함량에 대비하여 혼합 용량을 설정하였다(표 1). 또한, 가미소요산 혼합단미연조엑스제 (GMS-SE) 제형개발에 필요한 부형제는 식품공전 및 의약품 첨가제 평가 가이드라인의 공정서에서 제시하는 품목으로 벤조산나

트림은 보존제로, γ -사이클로덱스트린은 포접제, 자일리톨, 스테비아는 감미제, 구연산은 산도제, 대추향은 착향제, CMC-Na는 점증제로서 각각의 역할로 기준치를 넘지 않는 구성 비율로 혼합한 후 제조하였다 (표 1).

Table 1. The content and dosage of Gami soyo-san Soft extract (GMS-SE).

	Herbal Name	Pharmacopoeia (g)	Yield (%)	Soft extract (g)	Dry matter content (%)
	Gamisoyosan Soft extract	Angelicae Gigantis Radix	1.25	23.0	0.48
Paoniae Radix		1.25	17.0	0.33	65.0
Hoelen		1.25	1.0	0.03	40.0
Atractylodis Rhizoma Alba		1.25	23.0	0.41	70.0
Bupleuri Radix		1.25	10.3	0.20	65.0
Gardeniae Fructus		1.25	21.6	0.68	40.0
Moutan Cortex Radicis		1.25	22.5	0.51	55.0
Glycyrrhizae Radix et Rhizoma		1.25	16.9	0.33	65.0
Menthae Herba		0.63	12.4	0.10	75.0
Total			10.63		3.07

	Name	Content (g)	Ratio (%)
	Excipient	Gamisoyosan Soft extract	3.07
D.W		5.82	58.2
Sodium benzoate		0.006	0.06
γ -Cyclodextrin		0.50	5.00
Xylitol		0.50	5.00
Stevia		0.02	0.20
Citric acid		0.03	0.30
Jujube aroma		0.04	0.40
CMC-Na		0.03	0.30
총량			10.00



2) 세포배양

마우스의 대식세포주인 RAW264.7 세포는 한국세포주은행 (KCLB)에서 분양 받았으며, 세포 배양을 위해 항생제 및 항균제인 1% penicillin-streptomycin, 10% FBS를 첨가한 DMEM 배지를 배양액으로 하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

3) 세포독성평가

GMS-SE의 RAW264.7 세포에 대한 독성 농도를 알아보기 위하여 MTS assay를 수행하였다. 먼저 1X10⁴ cells/well의 RAW 264.7 세포를 분주하고 GMS-SE를 농도 별 (0, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000 μ g/ml)로 처리하여 24 시간 배양하였다. 그 후, MTS solution을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2 시간 동안 반응시켜 microplate reader (Tecan)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성 정도는 시료를 처리하지 않은 대조군 (CON)과 약물 처리군의 비율로 계산하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = 100 \times \frac{\text{treated sample}}{\text{Non-treated sample (CON)}}$$

4) Nitric oxide (NO) 생성량 측정

GMS-SE의 염증억제효과를 확인하기 위해 세포배양액 내 Nitric oxide (NO)량을 측정하였다. AW264.7 세포 (1X10⁵ cells/well)에 GMS-SE를 각각 50, 100, 200 μ g/ml 농도로 전처리하고 2 시간 후, LPS (0.1 μ g/ml)를 처리하여 18 시간 배양하였다. NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent System을 이용하여 측정하였다. 즉, 세포배양액 100 μ l에 동량의 Griess reagent를 넣고 교반기에서 10 분간 반응시킨 후 microplate reader (tecan Infinite M200)를 이용, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. sodium nitrite의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액 내의 NO 농도를 결정하였다.

5) 효소 결합면역측정법 (ELISA)에 따른 cytokine 측정

RAW264.7 세포 (1X10⁵ cells/well)에 GMS-SE를 각각 50, 100, 200 μ g/ml 농도로 2 시간 전처리를 한 후, LPS (0.1 μ g/ml)를 처리하여 18 시간 배양한 후 세포배양액을 수거하여 cytokine 측정에 이용하였다. 배양액은 각 cytokine 측정에 적절한 농도로 희석한 후, TNF- α , IL-6, IL-1 β , PGE₂의 농도를 ELISA kit (R&D System, USA)를 이용하여 측정하였다. 각 cytokine의 농도는 standard curve와 비교해 계산하였다.

6) 종합효소 연쇄반응법 (RT-PCR)에 따른 염증

Cytokine 측정

GMS-SE를 각각 50, 100, 200 μ g/ml 농도로 2 시간 전처리를 한 후, LPS (0.1 μ g/ml)를 5 시간 배양한 RAW264.7 세포를 수거한 후 RNAiso (Takara, Japan)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 total RNA는 1 μ g로 정량하여 oligo-dT, DEPC와 함께 70°C에서 5 분간 반응시킨 후 바로 ice에서 반응을 중지시킨다. 여기에 dNTP's, RT buffer와 reverse transcriptase를 첨가한 완충 반응액 (Promega, USA)을 넣어 45°C에서 약 60 분간 반응시킨 후 72°C에서 10 분간 처리하여 cDNA를 합성하였다. 이 template DNA와 Taq polymerase 등이 포함된 반응 혼합액 (itron, USA)과 각각의 Primer sequence인 GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C (forward), ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG G (reverse); TNF- α , CCG GAG AGG AGA CTT CAC AG (forward), GGA AAT TGG GGT AGG AAG GA (reverse); IL-6, CCA AAC CTC TTC GAG GCA CA (forward), AAC ACG CAG GAC AGG TAC AG (reverse); IL-1 β , AAA GCC ACG AGG CTC TGA CA (forward), GTG AGA GGC AAA GGA GGA GA (reverse); iNOS로 PCR 증폭 후, 1.5% Agarose gel 전기영동으로 분석하였다.

7) Western Blotting에 따른 MAPK 활성화에 미치는 영향

RAW264.7 세포 (2×10^5 cells/well)에 GMS-SE를 각각 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 2 시간 전처리를 한 후, LPS (0.1 $\mu\text{g/ml}$)를 처리하여 MAPK 활성을 측정하기 위하여 각 cytokine의 시간조건 별로 반응하였다. 1X PBS로 세척 후, protease&phosphatase inhibitor cocktail을 포함하는 RIPA buffer (PIERCE, USA)로 균질화 하였다. Protein content를 BCA법으로 정량하여 50 μg 의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리하고, PVDF membrane으로 단백질을 전이시켰다. 그 후, 5% Skin milk를 처리하여 비 특이적인 단백질에 대한 blocking을 하였고, 각각의 1차 항체 iNOS, COX2, P-ERK, P-P38, β -actin primary antibody (1:1000 dilution)로 4°C에서 overnight 반응한 후, TBS-T로 3회 세척하고, HRP-conjugated secondary anti-body (1:1000 dilution)로 1 시간동안 실온에서 반응시켰다. 3회 세척 후, immuno-positive bands는 enhanced chemi-luminescent (ECL, Thermo Scientific, USA)에 의해 감광시켜 chemiluminescent detection system을 이용하여 현상하였다.

8) 1, 1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능 측정

Shahidi DPPH 방법²³⁾을 변형하여 GMS-SE를 100, 200, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 100 μl 를 96 well plate에 분주 하였다. 실험 직전에 제조한 0.01 mM DPPH 용액을 가하여 25°C에서 30 분간 반응시킨 후, 516 nm에서 흡광도를 측정하여 소거능을 다음 공식에 의하여 산출하였다. 대조군은 시료를 첨가하지 않은 물로 하였다. 각 시료에 대한 DPPH 라디칼 소거능 억제강도는 양성대조군으로 butylated hydroxy-anisole (BHA) 100, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 를 사용하여 비교하였다.

$$\text{Activity}(\%) = 100 \times \frac{\text{treated sample}}{\text{Non-treated sample (CON)}}$$

9) 총 폴리페놀 함량 측정

GMS-SE를 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu reagent가 추출물의 폴리 페놀성 화합물에 의해 환원된 결과 몰리브덴 청색으로 발색하는 것을 원리로 하였다²⁴⁾. 총 폴리페놀 함량은 표준물질로 gallic acid (Sigma, USA)를 이용하여 검량선을 작성하여 나타내었다.

10) 총 플라보노이드 함량 측정

GMS-SE를 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에 함유된 총 플라보노이드 함량은 Singleton VL 등²⁵⁾의 방법을 일부 변경하여 측정하였다. 표준물질로 quercetin (Sigma, USA)를 이용하여 총 플라보노이드 함량 검량선을 작성하였다.

3. 통계분석

실험결과와 통계 처리는 SPSS package를 이용하였으며, 모든 측정값은 mean \pm SEM (n=3)로 표시하였고 분석에 대한

유의성은 one-way-ANOVA를 실시, 분석결과에 대한 p < 0.05의 수준에서 LSD 다중검정법으로 사후검정을 실시하여 각 처리구간의 평균치에 대한 유의성을 분석하였다.

III. 결 과

1. RAW264.7세포에 대한 GMS-SE의 세포독성

GMS-SE 처리에 의한 세포독성 검사를 위해서 RAW264.7 대식세포에 GMS-SE 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후 MTS assay를 수행하였다(Fig. 1). RAW264.7 세포에 대한 GMS-SE의 세포독성은 GMS-SE를 처리하지 않고 배양한 대조군의 세포생존율 100%를 기준으로 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지는 95% 정도 및 그 이상의 생존율을 보여 세포독성이 거의 없는 것으로 판단되지만, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 80% 이하로 감소되었다. 이후 본 연구는 안전한 200 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도 범위에서 수행하였다.

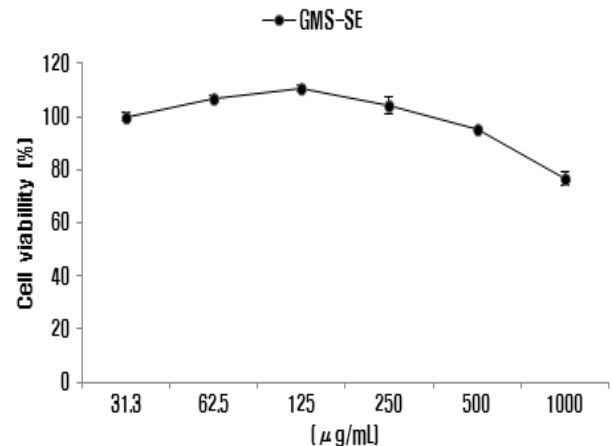


Figure 1. Effect of GMS-SE on the viability in of RAW264.7 cells. Cells were treated with indicated concentrations of GMS-SE for 24 h. The values of independent experiments are expressed as means \pm SEM (n=3).

2. GMS-SE의 NO, iNOS 생성 억제에 대한 효과

NO는 활성산소 중 하나이며, 최근 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 NO 생성에 대한 GMS-SE의 효과를 알아보기 위해 Griess assay 방법을 이용하여 측정하였다. GMS-SE는 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 처리농도에서 각각 29.86%, 46.15%로 농도 의존적이고, 양성대조군인 Dexamethasone (DEX)의 32.58%에 유의적으로 NO 생성이 억제되는 것으로 나타났다 (Fig. 2A). NO는 iNOS에 의해 생성되어 염증 상태에서 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 NO를 생성하게 하는 iNOS의 mRNA와 단백질 발현을 측정하였다. 그 결과, LPS 처리에 의해 형성되는 iNOS mRNA 발현은 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 47.30%, 단백질 발현 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 24.84%, 57.62%로 현저한 억제 양상을 나타내었다(Fig. 2B, C).

A

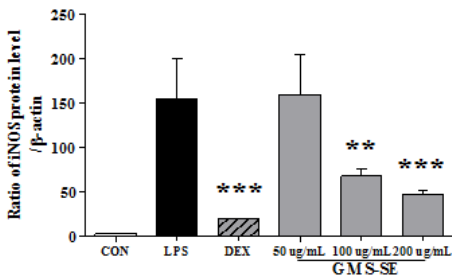
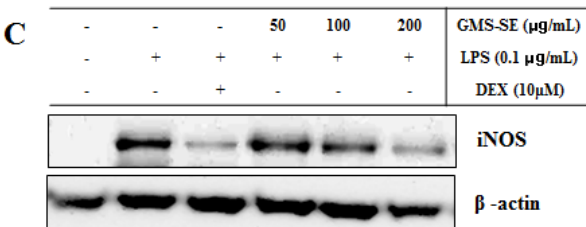
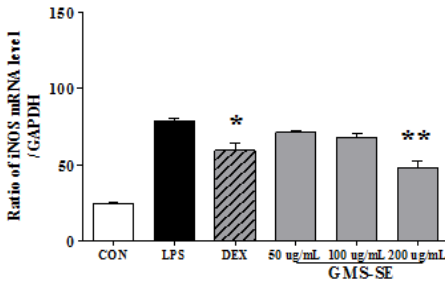
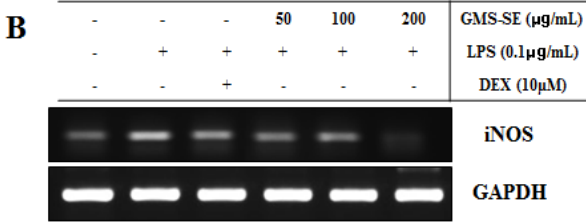
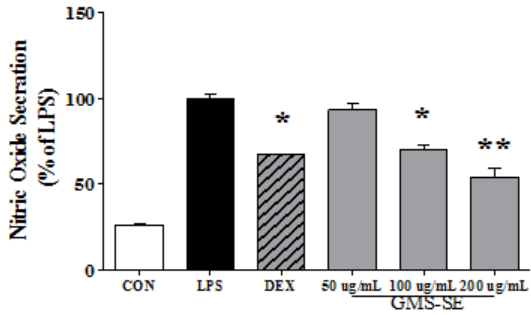
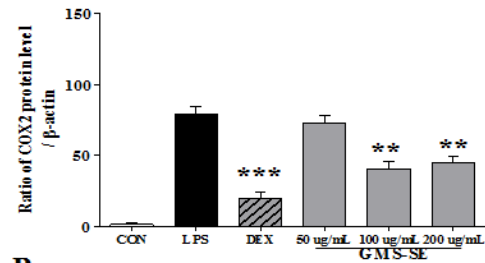
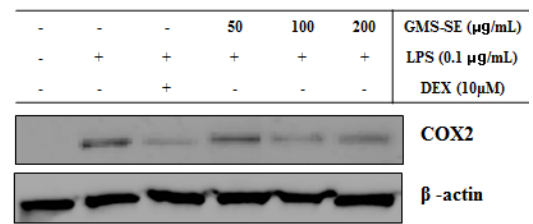


Figure 2. Effects of GMS-SE on lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) production and inducible NO synthase (iNOS) expression in RAW264.7 cells. Cells were pre-treated with GMS-SE (50, 100 or 200 μg/ml) for 2 hr and then stimulated with LPS (0.1 μg/ml) 24h. The culture medium was to quantify the production of NO (nitrite) levels (A) and the cells were lysed for mRNA extraction and the expression level of iNOS was analyzed by RT-PCR (B). The cell lysates were obtained, and the iNOS protein levels were analyzed by western blot analysis. β-actin expression was used as an internal control for western blot analysis (C). The values of independent experiments are expressed as means ± SEM (n=3). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. LPS. DEX (Dexamethasone) : Positive control.

3. GMS-SE의 PGE₂, COX2 생성 억제에 대한 효과

NO와 함께 강력한 염증 매개물질로 작용하는 것으로 보고 되어 진 PGE₂와 COX2 생성에 대한 GMS-SE의 효과를 알아보기 위해 약리학적인 효능 평가를 실시하였다. 그 결과, LPS 처리에 의해 증가된 COX2 발현은 100 μg/ml 농도 이상에서 양성대조군 DEX에 유의적으로 현저하게 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 3A). 이와 같이 GMS-SE는 100, 200 μg/ml의 처리 농도에서 각각 70.93%, 91.34%로 농도 의존적으로 PGE₂ 생성이 양성대조군 DEX 87.11%에 비교하여 유의 있게 억제되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3B).

A



B

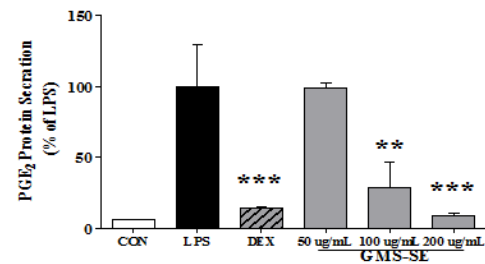


Figure 3. Effects of GMS-SE on lipopolysaccharide (LPS)-induced protein production of pro-inflammatory cytokines COX2 (A) and PGE₂ (B) in RAW264.7 cells. Cells were pre-treated with GMS-SE (50, 100 or 200 μg/ml) for 2 hr, and then stimulated with LPS (0.1 μg/ml) for 24 hr. The cell lysates were obtained, and the COX2 protein levels were analyzed by western blot analysis. β-actin expression was used as an internal control for western blot analysis (A), and the culture medium was collected to quantify the production of PGE₂ proteins by ELISA (B). The values of independent experiments are expressed as means ± SEM (n=3). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. LPS. DEX (dexamethasone) : positive control.

4. GMS-SE의 TNF-α, IL-6, IL-1β 생성 억제에 대한 효과

TNF-α, IL-6, IL-1β는 염증단계에서 중추적 역할을 한다고 알려져 있다. 따라서 TNF-α, IL-6, IL-1β에 대한 GMS-SE의 효과를 알아보기 위해 이들의 mRNA 발현에 대

한 효과를 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였고, ELISA를 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 단백질량을 측정하였다. 그 결과, mRNA발현에서는 LPS 자극원을 처리하였을 때 TNF- α , IL-6, IL-1 β 생성이 현저히 증가하였고, GMS-SE를 처리하였을 때 TNF- α , IL-6, IL-1 β 모두 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 유의성 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 4A). 또한, LPS 자극원에 의해 세포 배양액으로 분비되는 단백질량은 TNF- α 는 25.64%, 48.98%, 84.19%, IL-6는 89.33%, 99.45%, 99.40%로 저농도인 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서부터 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하였고, IL-1 β 는 최종농도인 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 47.09%로 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 4B).

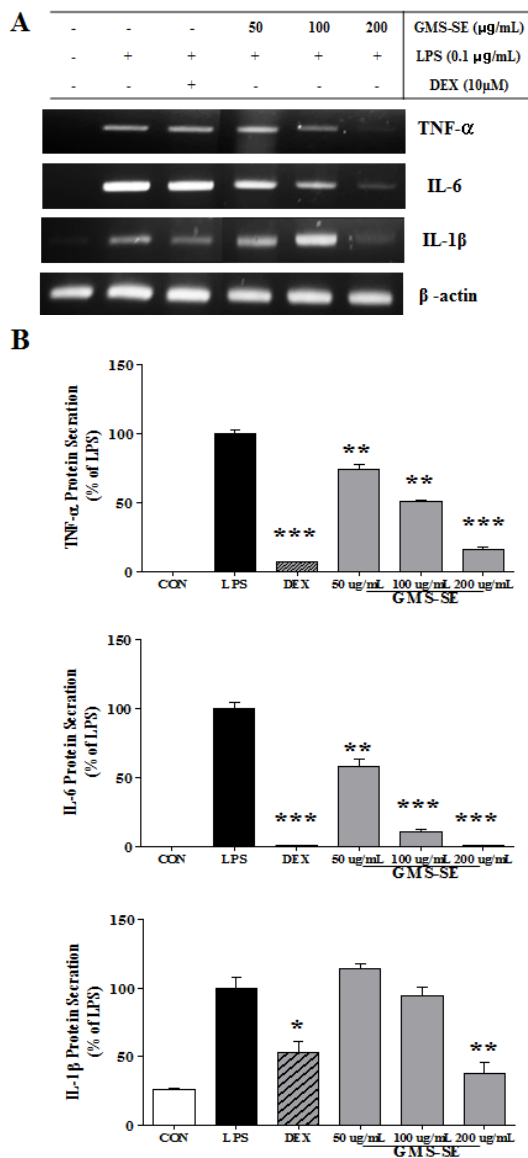


Figure 4. Effects of GMS-SE on LPS-induced TNF- α (A), IL-6 (B) and IL-1 β (C) in RAW264.7 cells. Cells were pre-treated with GMS-SE (50, 100 or 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 2 hr, and then stimulated with LPS (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 5 h (for mRNA) or 18 h (for ELISA). Following treatment, the cells were lysed for mRNA extraction, and the gene expression level was analyzed by RT-PCR (A) and the culture medium was collected to quantify the production of corresponding cytokine by ELISA (B). The values of independent experiments are expressed as means \pm SEM (n=3). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. LPS. DEX (dexamethasone) : positive control.

5. GMS-SE의 MAPKs의 인산화 억제에 대한 효과

MAPKs는 세포의 성장과 분화 및 cytokine과 stress 제어에 중요한 역할을 한다. 따라서 GMS-SE의 염증 억제가 분자기전적으로 MAPKs를 경유하는지 알아보기 위해 ERK와 P38의 인산화를 Western blot을 통해 확인하였다. 그 결과, LPS에 의해 활성화된 RAW264.7 대식세포에 GMS-SE를 처리한 경우 ERK와 P38 인산화를 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서부터 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 5A, B).

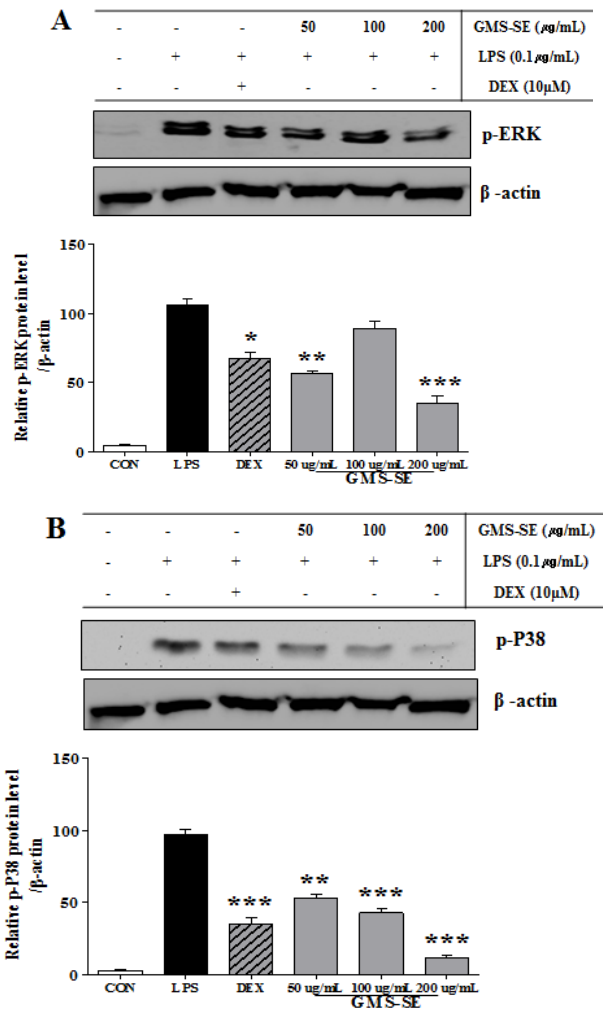


Figure 5. Effects of GMS-SE on lipopolysaccharide (LPS)-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinase (MAPK)-associated molecules in RAW264.7 cells. Cells were pre-treated with GMS-SE (50, 100 or 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 2 hr, and then stimulated with LPS (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 30min. The cell lysates were obtained, and the p-ERK protein levels (A), the p-P38 protein levels (B) were analyzed by western blot analysis. β -actin expression was used as an internal control for western blot analysis. The values of independent experiments are expressed as means \pm SEM (n=3). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. LPS. DEX (dexamethasone) : positive control.

6. GMS-SE의 항산화 활성에 대한 효과

GMS-SE의 항산화 활성을 측정하기 위하여 우선적으로 항산화 활성 물질로 잘 알려진 페놀 및 플라보노이드의 함량을

측정하였다. 그 결과, 총 폴리페놀 함량을 gallic acid를 표준 물질로 하여 측정한 결과 $73.93 \pm 6.87 \mu\text{g/ml}$, 총 플라보노이드 함량은 표준물질 quercetin으로 정량 측정하여 $698.75 \pm 6.78 \mu\text{g/ml}$ 로서 높은 항산화 물질 함량을 나타내었고 (Fig 6A), DPPH 라디칼 소거능을 알아보기 위해 합성 항산화제로 잘 알려진 BHA와 비교한 결과, Fig 6B와 같이 GMS-SE의 DPPH 라디칼 소거능은 농도에 의존적으로 증가했으며, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 이상에서 BHA 100 $\mu\text{g/ml}$ 와 유사한 효과를 나타내었다 (Fig 6B).

A

Decoction	Total polyphenols (ug/mg)	Total flavonoids (ug/mg)
Gamisoyo-san Soft Extract (GMS-SE)	73.93±6.87	698.75±6.78

B

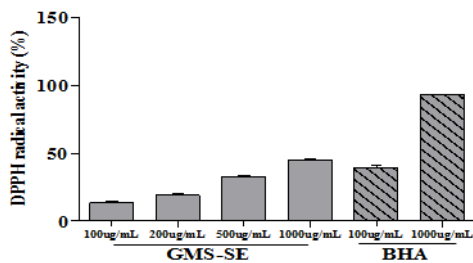


Figure 6. Correlation coefficient between the contents of anti-oxidant and anti-oxidant effects by DPPH radical scavenging activity of GMS-SE. Total polyphenol equivalent to gallic acid of GMS-SE (A), Total flavonoid equivalent to quercetin of GMS-SE (A), DPPH radical scavenging activity of GMS-SE and the positive controls BHA (B). The values of independent experiments are expressed as means \pm SEM (n=3).

IV. 고찰

예로부터 한약제제는 아시아지역에서 치료 및 補氣, 補陽의 목적으로 오랜 임상 경험을 통해 안전성과 유효성이 입증되어 왔다. 하지만, 대부분 한약은 여러 약재를 혼합해 물에 끓인 후 제조하는 방법으로, 약재가 가지는 고유의 쓴맛과 액체 상태로 안정성과 유효성, 복약 순응도가 떨어지는 단점을 가지고 있다. 이러한 복용이 불편한 기존 한약탕제의 제형에서 탈피하고 당제와 약효가 동등한 현대적 제형의 한약제제 개발의 여러 가지 발전방안과 연구가 진행됨으로써, 한약제제 산업 활성화를 위하여 노력하고 있다²⁶⁾. 현재 한약제제 개발의 결과물로는 산제, 정제, 과립제 등의 한약제제들이 시중에 공급되고 있다. 하지만, 한방건강보험의 경우 총 69종의 단미엑스 산제를 혼합한 56개 처방에서만 건강보험급여로 인정되는 제한된 한약시장과 한약제제에 대해서는 안전성, 유효성 자료도 면제되는 정책에 의해 한약제제에 대한 연구가 소홀하여 국민들의 신뢰도도 떨어지는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 한약탕제의 고유한 쓴맛을 없애 먹기 편한 시럽 형태의 한방건강보험용 가미소요산 혼합단미연조엑스제 (GMS-SE)의 새로

운 제형으로 개발함으로써, 이에 대한 항산화, 항염증 효능도 확인하여 유효성을 검증하였다.

개발된 가미소요산은 이미 여러 연구를 통해 항스트레스 효과^{8,9)}, 갱년기에 관한 연구^{10,11)}의 보고가 이루어진바 있으며, 특히, 항산화 활성과 RAW264.7 세포에서의 지질 과산화 생성을 억제한다는 보고가 된 바 있다^{27,28)}. 이러한 가미소요산의 효능을 바탕으로 본 연구는 가미소요산 혼합단미연조엑스제 (GMS-SE)의 항염증 및 항산화 효과를 대식세포내 염증조절기전에 대한 규명으로 효과적인 항산화, 항염증 치료제로도 개발할 수 있는 근거가 됨을 밝혔다.

대식세포는 초기 염증반응에 관여하는 대표적인 면역세포로서 동물체 내 모든 조직에 존재하며 외부 이물질을 탐지하고 포식하여 죽은 세포를 제거하는 포식작용과 TNF- α , IL-6, IL-1 β 와 같은 전염증성 cytokine (pro-inflammatory cytokine)을 비롯하여 NO, PGE2 등의 다양한 염증 매개물질들을 분비하는 면역세포이다²⁹⁾. 최근, LPS에 의한 대식세포의 활성화는 toll like receptor (TLR) 4의 발현을 조절한다는 알려져 있다³⁰⁾. LPS와 TLR4가 결합하여 활성화 되면 염증매개물질들인 NO, Prosta-glandins (PGs) 그리고 pro-inflammatory cytokines 등을 조절한다³¹⁾. 이러한 사실에 기초하여 가미소요산 혼합단미연조엑스제 (GMS-SE)가 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 NO의 생성을 저해함을 확인하였고, RT-PCR과 Western blot으로 iNOS의 mRNA와 단백질 발현 억제를 분석한 결과 NO 형성 억제와 유사한 경향을 나타냄으로써 가미소요산 혼합단미연조엑스제 (GMS-SE)이 LPS에 의해 유도된 iNOS의 전사와 번역 모두를 저해한다고 추정된다(Fig 2). 그리고 다수의 항염증 약물들의 작용기전은 prostaglandin 합성을 억제하며 이는 COX2의 생성 및 효소 활성저해에 의한 것이다. 따라서 COX2에 의한 prostaglandin의 합성은 염증반응을 매개하는 것으로 여겨지고 있다고 보고 가미소요산 혼합단미연조엑스제 (GMS-SE)가 LPS에 의해 형성되는 PGE2를 유의성 있게 감소시키며 이는 COX2 발현저해에 의한 것임을 확인 할 수 있었다 (Fig 3). 염증매개물질인 TNF- α , IL-6, IL-1 β 는 in vivo 및 in vitro 모두에서 중추적으로 염증반응을 조절하는 것으로 알려져 있다. 이러한 cytokine들은 서로 상호작용이 있는 것으로 알려져 있으며 LPS등의 염증 자극 물질에 의해 생성이 유도된다고 보고되었다³²⁾. 본 연구에서는 LPS에 의해 유도된 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 생성에 대한 가미소요산 혼합단미연조엑스제 (GMS-SE)의 억제 효과를 cytokine 분비량을 ELISA법으로, mRNA 발현을 RT-PCR로 분석한 결과 TNF- α , IL-6, IL-1 β 단백질 분비와 mRNA 발현 모두에서 매우 유사한 경향을 나타냄을 확인 하였다 (Fig 4). 또한, 가미소요산 혼합단미연조엑스제 (GMS-SE)가 어떠한 신호전달을 통해 억제하는지 알아보기 위해 전사인자인 MAPKs의 인산화를 억제하는지 알아보았다. 현재까지 비교적 잘 알려진 염증반응의 분자신호 전달기전 MAPK superfamily에 속하는 세 가지 효소들로 extracellularregulated protein kinase (ERK), c-Jun NH2-protein kinase (JNK)/stress-activated protein kinase (SAPK), serine/threonine protein kinase

인 p38 MAPK 등을 들 수 있다. 본 연구에서는 ERK 1/2와 p38 MAPK의 인산화의 염증 전구물질의 형성을 억제함을 확인하였다 (Fig 5).

또한, 가미소요산 혼합단미연조엑스제 (GMS-SE)의 항산화 활성은 농도 의존적인 활성을 나타내었고, 특히 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 항산화제로 잘 알려진 대조군 BHA의 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 유사하게 나타남을 확인할 수 있었다 (Fig 6). 이러한 결과들을 통하여 한의학에서 스트레스성 장애와 같은 부인과 질환에 사용되어온 가미소요산의 항염증 기전을 밝힘으로써 그 과학적 근거를 제시하고, 가미소요산 혼합단미연조엑스제 (GMS-SE)의 우수한 품질 한약제제 제공에 기여할 것으로 사료되어진다.

V. 결 론

본 연구에서는 가미소요산의 새로운 제형으로써 혼합단미연조엑스제 (GMS-SE) 개발에 따른 항산화 및 항염증 효능을 검증하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 본 연구에서는 최초로 건강보험용 가미소요산 혼합단미연조엑스제의 새로운 제형을 개발하여 품목허가를 받았다.

1. GMS-SE는 RAW264.7 대식세포에서 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서만 80% 이하의 세포독성이 나타났다.
2. GMS-SE는 RAW264.7 대식세포에서 농도 의존적으로 염증 매개 물질인 NO, iNOS, COX-2, PGE2의 분비와 발현을 유의적으로 억제시켰다.
3. GMS-SE는 RAW264.7 대식세포에서 농도 의존적으로 전염증성 Cytokine인 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 유전자와 단백질 생성을 억제시켰다.
4. GMS-SE는 RAW264.7 대식세포에서 농도 의존적으로 ERK 1/2와 p38의 인산화를 억제시켰다.
5. GMS-SE는 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량 수치는 낮았지만, DPPH 라디칼 소거능은 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 대조군 BHA와 함께 유의적인 항산화 활성을 나타내었다.

따라서 가미소요산 혼합단미연조엑스제는 항염증 및 항산화 활성이 있으며, 향후 복용이 편리한 건강보험용 한약제제 제 품으로 개발함으로써 우수성 및 품질향상을 확보할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 지정 2016년 한의약산업육성을 위

한 기반구축 사업의 '한약제제 현대화 사업 (제형개선)'의 재정 지원을 받아 수행된 연구입니다.

참고문헌

1. Cho W, Nam JW, Kang HJ, Windono T, Seo EK, Lee KT. Zedoarondiol isolated from the rhizoma of *Curcuma heyneana* is involved in the inhibition of iNOS, COX2 and pro-inflammatory cytokines via the downregulation of NF- κ B pathway in LPS-stimulated murine macrophages. *Int Immunopharmacol*. 2009;9(9):1049-57.
2. Kim HH, Park GH, Park KS, Lee JY, An BJ. Antioxidant and Antiinflammation Activity of Fractions from *Asterglehni* Fr. *Schm. Korean J Microbiol Biotechnol*. 2010;38(4):434-41.
3. Yoshizawa S, Horiuchi T, Yoshida T, Okuda T. Antitumor promoting activity of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of Tannin in green tea. *Phytother Res*. 1987;1(1):44-7.
4. Blois MS. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*. 1958;181(4617):1199-200.
5. Kim SI, Sim KH, Ju SY, Han YS. A Study of Antioxidative and Hypoglycemic Activities of Omija (*Schizandra chinensis* Baillon) Extract under Variable Extract Conditions. *Korean J Food & Nutr*. 2009;22(1):41-7.
6. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999;26(9-10):1231-7.
7. Posadas I, Terencio MC, Guillén I, Ferrándiz ML, Coloma J, Payá M, Alcaraz MJ. Co-regulation between cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time course of murine inflammation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2000; 361(1):98-106.
8. Akira, S., Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol*. 2004 ;4:499-511.
9. Johnson, G.L., Lapadat, R. Mitogen activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*. 2002;298:1911-12.
10. Aniya Y, Naito A. Oxidative stress-induced activation of microsomal glutathione S-transferase in isolated rat liver. *Biochem Pharmacol*. 1993;45(1): 37-42.
11. Shahidi, F. Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung* 2000;44(3): 158-163.
12. The Korean Food and Drug Administration Notification 2007-89. The Korean Pharmacopoeia

- Ninth Edition.
13. Korea Ministry of Government Legislation. Available from: URL: <http://www.law.go.kr/main.html>
 14. Kim YK. The Standardization of Herbal Medicine Preparations in Korea. KFDA Herbal Medicine Policy Division. 2012.
 15. Hyeon BH. Development of Botanical New Drug. Biotech Policy Research Center. 2012.
 16. Jin SM. Taepyunghyeminhwajekuk-bang. China : Inminweeseng Publication. 1985 : 308.
 17. Kim JH, Yoo DY. A philological study on Danchisoyo-san. J Daejon University Orient Med. 1999 ; 7 : 531-51.
 18. http://www.ksid.or.kr/rang_board/inc/download.php?code=notice3&num=851
 19. Ko ES, Kang BC, Sung KH, Song IH, Kim UC, Kwon DI, Park KH, Jung SM, Park JH. The Clinical Review on Three Cases of UL-syndrome (鬱證) induced by Chronic Stress. Korean J. Oriental Int. Med. 2004;25(3):615-24.
 20. Park HS, Seo WH, Moon IR, Kim JK, Bae KY, Heo YK. A case of patient who have depressive episode mixed with organic depressive. J Oriental Neuropsychiatry. 2003;14(2):199-206.
 21. Lee SN, Leem KH, Ju YS, Son1 JB, Kim HJ. The Literatual Study of Kami- soyosan on Menopausal Disorder. J. Orient. OBSTETRICALS & GYNECOLOGY. 2009;22(4):46-64.
 22. Washio M. Kami-shoyo-san is usually used for women. Psychiatry Clin Neurosci. 2003;57(3):345.
 23. Liyana-Pathirana CM, Shahidi F. Antioxidant activity of commercial soft and hard wheat (*Triticum aestivium* L) as affected by gastric pH conditions. J Agric Food Chem. 2005;53(7):2433-40.
 24. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic. 1965;16(3):144-158.
 25. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem. 1999;64(4):555-9.
 26. Han K, Kwon DY, Lee SG, Park SK, Kim C, Kim YK. The present state of korean herbal preparation production and possible improvement plan. Korean J. Oriental Med. Prescrip. 2006;14:30- 30.
 27. Hwang GS. Effects of Gamisoyosan (GS) on LDL oxidation in RAW 264.7 cell. Korean J Orient Prev Med Soc. 2001;5:134-43.
 28. Lee SH, Lee JM, Cho JH, Lee CH, Jang JB, Lee KS. Antioxidant and Neuroprotective Effects of gamisoyosan. J Orient Obstet Gynecol. 2010;23:1-13.
 29. Wei W, Li XY, Zhang HQ, Wu SG. Antiinflammatory and immuno pharmacology. 1sted. Beijing : Renmin weisheng chubanshe. 2004;10-17.
 30. Iontcheva I, Amar S, Zawawi KH, Kantarci A, Van Dyke TE. Role for moesin in lipopolysaccharide stimulated signal transduction. Infect Immun. 2004, 72, 2312~2320.
 31. Gomez PF, Pillinger MH, Attur M, Marjanovic N, Dave M, Park J, Bingham CO, Al-Mussawir H, Abramson SB. Resolution of inflammation: prostaglandin E2 dissociates nuclear trafficking of individual NFkappaB subunits (p65, p50) in stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. J. Immunol. 2005;175:6924-30.
 32. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. Annu. Rev. Immunol. 1996;14: 397-440.