

靑蛾地黃湯의 RAW264.7 Cell에서 항산화 및 항염증 효능 연구

윤정원 · 김순중 · 박동수
세명대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Effects of Cheongajihwang-Tang Extract on RAW264.7 Cells

Jeong-won Yoon, K.M.D., Soon-Joong Kim, K.M.D., Dong-Su Park, K.M.D.
Department of Korean Rehabilitation Medicine, College of Korean Medicine, Se-Myung University

RECEIVED June 23, 2016
ACCEPTED July 6, 2016

CORRESPONDING TO
Soon-Joong Kim, College of Korean
Medicine, Se-Myung University, 65
Semyung-ro, Jecheon 27136, Korea

TEL (043) 649-1920
FAX (043) 649-1872
E-mail kimsj@semyung.ac.kr

Copyright © 2016 The Society of
Korean Medicine Rehabilitation

Objectives This study was designed to investigate whether the Cheongajihwang-Tang (CT) has an inhibitory effect association with oxidation or inflammation in RAW264.7 cells.

Methods Cytotoxic activity of CT extract on RAW264.7 cells was evaluated by using 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solution. Nitric oxide production was measured using Griess reagent system. The total phenolic contents and 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity was measured to evaluate the anti-oxidative effects of CT. Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) has been used as a substrate for measuring intracellular oxidant production.

Results Cheongajihwang-Tang does not impair the cell viability in tested concentration. CT showed anti-oxidative effects *in vitro* by decreasing electron donating ability, and also showed anti-inflammatory effects suppressing NO and ROS expression in LPS induced RAW264.7 activation. CT inhibited the generation of intracellular ROS production as dose dependant manner.

Conclusions CT has anti-oxidative effects and anti-inflammatory activities. These results indicate that CT extract has an anti-inflammatory activities via anti-oxidative effects. (J Korean Med Rehabil 2016;26(3):51-58)

Key words Cheongajihwang-Tang, Anti-oxidation, Anti-inflammatory, RAW264.7

서론»»»»

염증은 병원균 침입이나 조직 손상에 의해 일어나는 선천적 면역 반응으로 다양한 면역 세포에 의해 진행되는 복합적인 과정이다¹⁾. 염증성 반응은 크게 급성 반응과 만성 반응으로 나눌 수 있는데, 장기간 지속되는 만성 염증의 경우 노화로 인한 파킨슨질환, 노인성 치매, 류마티스 관절염, 동맥경화와 같은 다양한 질환들의 원인이 된다²⁾.

노화는 시간이 경과함에 따라 생체내 여러 가지 생리

적 기능이 저하되는 현상을 말하며 아울러 외부로부터 오는 stress를 감당하지 못하게 되는 상태를 의미한다³⁾. 노화의 기전과 관련하여 많은 이론들이 대두되고 있는데 이중 free radical과 관련된 학설이 최근 많은 지지를 받고 있다⁴⁾. 인체 내에는 안정한 상태의 산소가 환경적 및 생화학적 요인 등에 의하여 반응성이 큰 활성산소로 전환된다. 이들 활성산소는 강한 산화력으로 세포막 지방질을 과산화 시키고 세포막 투과성의 변화를 초래하고 이것이 축적된 결과가 노화와 만성 퇴행성 질병의 근본적인 원인

이 된다⁵⁾. 또한 산화적 스트레스는 세포 구조를 빠른 속도로 붕괴시킴으로써 염증 반응에 관여하게 된다⁶⁾.

또한 노화 과정에서 염증반응이 지속적으로 일어나므로써 활성 산소의 생성 증가와 iNOS 유도에 따른 NO의 대량 생성이 세포 및 조직 손상을 가져와 노화과정을 촉진한다고 정⁷⁾ 등이 말하였다.

이렇게 산화적 스트레스와 염증은 상호 관계를 통하여 노화를 진행시킨다. 그러므로 각종 만성 퇴행성 질환을 치료 또는 개선하기 위해서 생체의 항산화 기능 및 항염 기능을 증가시킬 수 있는 물질의 공급이 필요하다고 사료된다.

최근 천연물, 한약재를 포함한 다양한 약용식물들에서 생리활성 물질들을 찾는 연구가 활발하게 진행되고 있으며 특히 전 세계적으로 식물자원에서 항암, 항산화 및 항염 등에 효과가 있는 기능성 물질을 다량 함유하는 자원을 선별하는 연구가 다양한 각도에서 진행되고 있다⁸⁾.

靑蛾地黃湯은 『晴崗醫鑑』⁹⁾에 수록되어 있는 처방으로 靑蛾丸¹⁰⁾에 六味地黃湯¹¹⁾을 合方加味한 것으로 腎虛腰痛에 쓰이는 처방이다. 靑蛾丸은 胡桃, 補骨脂, 杜冲, 六味地黃湯은 熟地黃, 山藥, 山茱萸, 澤瀉, 牡丹皮, 白茯苓의 약물로 구성되어 있으며 모두 腎虛에 사용되는 처방이다. 腎虛는 동양의학에서 노화의 중요 원인으로 보고 있다¹²⁾.

靑蛾丸과 六味地黃湯의 항산화 작용과 항염 작용에 대한 관련 연구로는 문¹³⁾, 정¹⁴⁾, 서¹⁵⁾, 이¹⁶⁾ 등의 연구가 있으며, 이들을 합방한 靑蛾地黃湯에 대한 연구로는 골다공증에 미치는 영향¹⁷⁾ 외에는 없었다.

이에 저자는 靑蛾地黃湯도 靑蛾丸과 六味地黃湯 같이 항산화 및 항염 효과가 있을 것이라고 기대하여 이를 밝히고자 LPS로 염증이 유도된 RAW264.7 mouse macrophage cell line을 이용하여 靑蛾地黃湯 추출물이 나타내는 염증 억제반응을 관찰하였으며, 유효한 결과가 있었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법»»»»

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 靑蛾地黃湯(이하 CT라 한다)은 에이

치맥스(제천, 대한민국)으로부터 구입하여 사용하였다. 처방의 구성과 용량은 다음과 같다(Table 1).

실험에 사용하기 위해 靑蛾地黃湯 5첩 분량(약 430 g)을 10배 중량의 증류수를 넣고 80°C에서 3시간동안 추출한 후 감압농축기(EYELA, Japan) 및 동결건조기(Labcono, USA)를 이용하여 추출물(74.64 g, 회수율 19.07%)을 만들었으며, 이를 냉동실에 보관하였다가 실험 직전에 필요한 농도로 만들어 사용하였다. 세포실험을 수행하는 경우에는 물 추출물 중 부유물 및 잔사 제거를 위해 추출물을 70% 에탄올에 녹인 후 용해된 부분만 다시 감압농축 및 동결건조를 수행한 후 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 실험에 필요한 농도로 용해한 후 이를 증류수로 희석하여 세포실험을 진행하였다.

2) 시약

실험에 사용한 시약은 다음과 같다.

DMSO (Junsei chemical Co., Japan)와 30% hydrogen peroxide (Junsei chemical Co., Japan), 추출에 사용한 Methanol (SK chemicals Co., Korea), 세포 배양액인 Dulbecco's Modifide Eagle Medium (Welgene, Korea), Fetal bovine serum (Gibco BRL, USA)과 Penicillin-streptomycin (Gibco BRL, USA), Folin & Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich Co., USA)와 Sodium carbonate (Sigma-Aldrich Co., USA), Diethylene glycol (Sigma-Aldrich Co., USA), 2,2-Diphenyl-1-pikryl-hydrazyl (Sigma-Aldrich Co., USA) 등을 사용하였다.

Table 1. The Compositions of Cheongajihwang-Tang Extracts

Herb name	Pharmacognostic name	Amount (g)
熟地黃	Rehmanniae Radix Preparata	16
山藥	Discoreae Rhizoma	8
山茱萸	Corni Fructus	8
杜冲	Eucommiae Cortex	6
補骨脂	Psoraleae Fructus	6
白茯苓	Poria	6
牡丹皮	Moutan Cortex	6
澤瀉	Alismatis Rhizoma	6
五味子	Schizandrae Fructus	2 (7粒)
胡桃肉	Juglandis Semen	22 (5枚)
Total		86

3) 세포

실험에 사용된 세포는 mouse macrophage RAW 264.7 cell line으로 한국 세포주 은행(KLCB, Korea)에서 구입하였다.

2. 방법

1) 총 폴리페놀 함량

총 polyphenol 함량은 Folin-Denis의 방법¹⁸⁾을 참고하여 사용하였으며, Folin-Ciocalteu 시약을 이용하는 방법으로 측정하였다. 추출 시료용액 1 ml에 50% Folin-Ciocalteu's phenol reagent 0.5 ml를 가하여 실온에서 3분간 반응시켰다. 반응용액에 Na₂CO₃ 포화용액 1 ml와 7.5 ml 증류수를 차례로 혼합하여 30분간 정치시킨 뒤 12000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취해 ELISA reader (BioTek, USA)로 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 polyphenol 함량은 gallic acid를 표준물질로 이용하여 작성한 검량선에 따라 함량을 구하였으며 측정단위로는 GAE (Gallic acid equivalent)/g을 사용하였다.

2) 항산화 효과

각 농도별 추출물을 0.2 ml, 1.5×10⁻⁴ M 2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) 용액 1.8 ml을 혼합하여 암실에서 30분간 반응 시켜 ELISA reader를 이용해 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 위 실험은 Blois의 방법¹⁹⁾을 응용하였다. 전자공여능은 시료 첨가한 샘플과 첨가하지 않은 샘플 차이를 백분율로 구하였다. 양성대조군으로서 아스코르브산(ascorbic acid)을 이용하였다.

3) 세포배양

마우스 유래 대식세포주인 RAW264.7 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

4) RAW264.7 세포 독성 시험

추출물에 대한 세포 생존율을 측정하기 위해 세포 개수를 세어 well 당 2×10⁵ cells가 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 18시간 배양하였다. 이후 부착

된 각 세포들에 추출물을 농도별로 처리하고, 1시간 뒤 5 μg/ml의 농도인 LPS를 처리하여 24시간 처리 하였고 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay 방법으로 분석하였다. 이는 Carmichael 등의 방법²⁰⁾을 응용하였다. 세포가 부착되어 있는 plate에 MTT solution (1 mg/ml)을 동량반응 시켜 2시간 동안 incubator에서 반응시키고 상층액을 제거 한 후 남아 있는 formazan을 용해시켜 fluorescence reader를 이용해 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 데이터들은 다음과 같이 계산하였다.

Percent values (%)

$$=[1-(\text{Control Abs}-\text{Sample Abs})/\text{Control Abs}]\times 100$$

5) NO 생성 억제효과 측정

약물 처리 후 NO를 측정하기 위해 각 농도별 추출물을 다른 plate에 옮겨 Griess reagent [1% (w/v) sulfanilamide, 1% (w/v) naphthylethylenediamine in 30% acetic acid]와 동량 반응 시켜 ELISA reader를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) DCFH-DA에 의한 intracellular ROS 측정

각 추출물에 대한 산화적 손상을 보호하는 효과를 확인하기 위해 세포를 2×10⁵ cells가 되도록 각 well에 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 18시간 배양하였다. 이 후 부착된 각 세포들에 추출물을 농도별로 처리하고, 1시간 뒤 5 μg/ml의 농도인 LPS를 처리하여 24시간 처리하였다. 약물 처리 후 배지를 제거한 다음, Phosphate Buffer Saline (PBS)로 희석된 10 μM 2' 7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)를 가하고, 30분간 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후에 ELISA reader를 이용해 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 형광강도를 측정하였다. DCF 형광강도의 증가율은 대조군과 비교하여 퍼센트(%)로 계산하였다.

7) 통계 분석

모든 실험은 3번 반복하고, 실험 결과는 평균±표준편차(mean±S.D.)로 표현하였다. 대조군 및 실험군 간의 통계적 유의성은 일원 분산 분석(one-way ANOVA with

Dunnett's post hoc test)을 통해 확인하였다. 모든 그래프에서 p 값은 0.05이하일 때 통계적으로 유의한 것으로 간주 하였다.

결과»»»»

1. 총 폴리페놀 함량

CT 추출물에 존재하는 총 polyphenol 함량을 gallic acid를 표준물질로 하여 측정한 결과, polyphenol 함량이 39.76 ± 1.63 mg/g으로 나타났다(Table II).

2. DPPH free radical 소거능

산화적 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제시키게 하는 방법으로서 항산화효과를 보는 것을 목적으로 하였다. 항산화능은 페놀화합물의 양과 상관관계가 있는

Table II. Total Phenolic Contents of Cheongajihwang-Tang Extract

Sample	Total phenolics (mg*)
CT [†]	39.76 ± 1.63

The values represent mean±S.D. of triplicate independent experiments.

*Total phenolic contents was expressed as milligram of gallic acid equivalent (GAE) per gram of extract. [†]CT: Cheongajihwang-Tang.

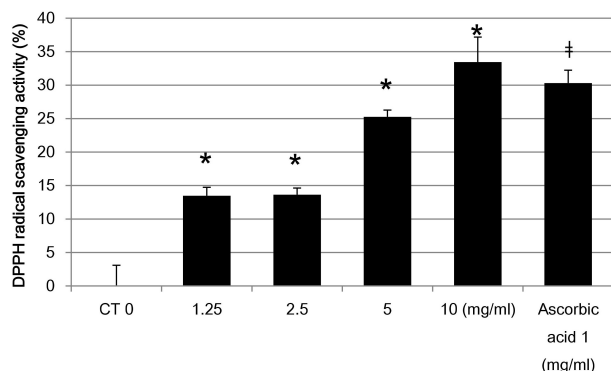


Fig. 1. DPPH free radical scavenging activity of ascorbic acid and Cheongajihwang-Tang (CT) extract. The results are expressed as mean±S.D. of three independent experiments. Significantly different from ascorbic acid (*p<0.05). Significantly different from control group ([†]p<0.05).

것으로 보고되고 있으며²¹⁾, 본 연구에서 CT과 양성대조군의 전자공여능을 농도별로 측정하여 비교한 결과 10 mg/ml 농도에서 $33.4 \pm 3.7\%$ 의 소거능을 보여, 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid $30.3 \pm 1.9\%$ 의 소거능과 비교하여 통계적으로 유의한 높은 효과를 나타냈다(Fig. 1).

3. 세포 독성 측정

CT에 의한 대식세포의 독성을 MTT assay에 의해 확인한 결과 농도별 약물을 주입하였을 때 각 농도에서 대식세포에 대한 독성을 일으키지 않은 것으로 나타났다(Fig. 2).

4. Nitric oxide 측정

RAW264.7 cell의 NO 생성 억제 효능을 측정하기 위해 CT을 농도별로 처리한 결과, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 및 4 mg/ml 투여군에서 각각 $23.3 \pm 0.4 \mu\text{M}$, $19.1 \pm 0.7 \mu\text{M}$, 및 $12.3 \pm 1.0 \mu\text{M}$ 의 농도의존적 경향으로 NO의 생성을 억제하였고, 이는 대조군 CT0군의 $10.8 \pm 0.3 \mu\text{M}$ 의 NO 생성량과 비교하여 통계적으로 유의한 NO 생성 억제 효과를 나타내었다(Fig. 3).

5. Intracellular ROS 생성 저해

RAW264.7 cell의 ROS 생성 억제 효능을 측정하기 위

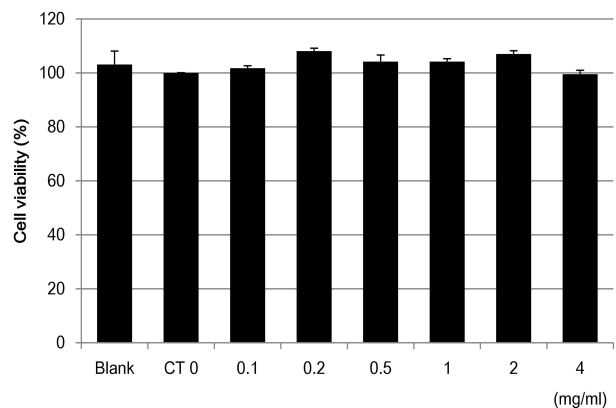


Fig. 2. Effect of Cheongajihwang-Tang (CT) extract on the cell viability of RAW264.7 cells. The values represent mean±S.D. of three independent experiments. Cell viability expressed as a percentage of the control (CT0).

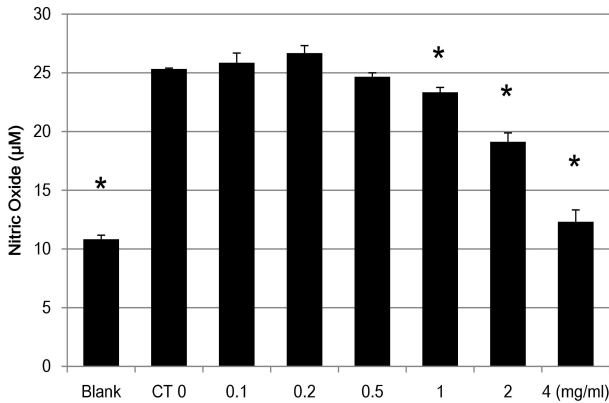


Fig. 3. Effects of Cheongajihwang-Tang (CT) extract on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The values represent mean±S.D. of three independent experiments. Asterisk indicates a significant difference at *p<0.05 level.

해 CT을 농도별로 처리한 결과, 2 mg/ml 및 4 mg/ml 투여군에서 각각 81.9±6.2%, 및 65.3±1.8%로 대조군 (CT0)과 비교하여 통계적으로 유의한 그리고 농도 의존적으로 ROS 생성을 억제하였음을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

고찰»»»»

활성산소는 산소의 화학적 특성으로 인해 생성되는 산소 프리라디칼(oxygen free radical)과 이들로부터 유래되는 산소화합물을 말한다²²⁾. 인체 내에는 산화억제 기구가 활성화되어 있어서 산화촉진물질과 산화억제물질이 균형을 이루고 있지만 여러 가지 요인들에 의하여 이 균형상태가 깨지면 산화적 스트레스가 유발된다²³⁾. 과잉으로 생성된 활성산소는 세포를 구성하는 지질, 단백질, 탄수화물 및 DNA와 반응하여 산화적 손상 및 효소활성을 변화시켜 세포 손상을 가져와²⁴⁾ 세포사를 일으키며, 고혈압, 동맥경화, 심부전, 류마티스 관절염, 알레르기, 암 및 노화 등에 깊이 관련되어 있다²⁵⁾. 또한, 활성산소의 과도한 생성 및 그로 인한 NO의 축적은 대식세포의 지나친 활성을 유도하여 생체내 필수 방어 기전인 염증의 과활성화를 일으켜 염증 관련 질환을 유발하기도 한다²⁶⁾.

노화란 생명체에서 진행되는 일련의 퇴행성변화를 일으키는 과정으로 형태적, 기능적 퇴축, 예비력과 적응력의 저

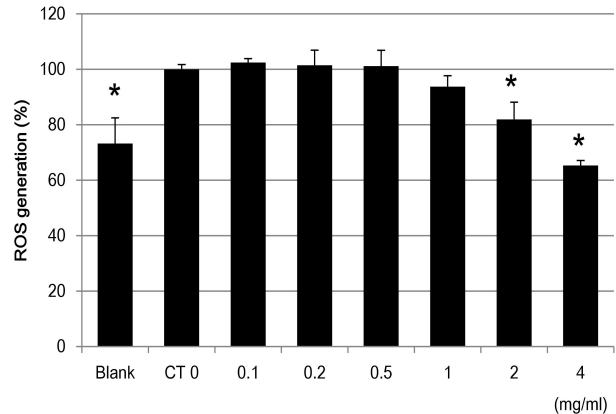


Fig. 4. Effect of Cheongajihwang-Tang (CT) extract on the intracellular reactive oxygen species (ROS) generation of RAW264.7 cells. The values represent mean±S.D. of three independent experiments. ROS generation expressed as a percentage of the control (CT0). Asterisk indicates a significant difference at *p<0.05 level.

하로 사망에 귀착되는 보편적인 생리 현상을 말한다²⁷⁾.

최근 생활수준이 향상되고 인간의 수명이 증가함에 따라 노화와 관련된 각종 퇴행성 질환에 관심이 커지고 있으며, 그 원인이 활성산소에 기인된 것이라는 산소 유해설이 점차 인정받고 있다²⁸⁾. 이러한 관점에서 볼 때 생체내 항산화 방어시스템을 증가시키거나 reactive oxygen species (ROS)를 조절할 수 있는 항산화제 개발연구의 필요성이 강조되고 있고 이에 대한 탐색이 활발히 진행되고 있다²⁹⁾.

활성산소를 조절하는 항산화제는 합성항산화제와 천연 항산화제로 구분되며 합성 항산화제의 경우, 다량 섭취 시 여러 가지 독성을 나타낼 수 있는 것으로 알려져 있어 안전한 천연항산화제 연구에 대한 관심이 높아지고 있다.

식물 속에 함유된 phytochemical을 비롯한 천연 생리 활성 물질들은 체내에 들어오면 항산화작용이나 세포 손상을 억제하는 작용을 통해 항암, 항균, 항 돌연변이 등의 예방 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 왔다³⁰⁾.

본 연구에서 사용한 靑蛾地黃湯은 『晴崗醫鑑』⁹⁾에 수록되어 있는 처방으로 靑蛾丸에 六味地黃湯을 合方加味한 것이다.

靑蛾丸은 『太平惠民和劑局方』¹⁰⁾에 최초로 기재된 처방으로 胡桃, 補骨脂, 杜沖의 약물로 구성되어 있어 溫腎強腰의 효능이 있으며, 腎陽虛의 만성요통에 사용된다³¹⁾.

六味地黃湯은 『小兒藥證直訣』¹¹⁾에 최초로 수록된 처방으로 熟地黃, 山藥, 山茱萸, 澤瀉, 牡丹皮, 白茯苓의 약물로 구성되어 있다. 滋陰補腎, 瀉火의 효능이 있어 肝腎陰虛, 虛火上炎으로 인한 증상에 적용한다³¹⁾.

『素問·上古天真論』³²⁾에 “女子七歲 腎氣盛 …… 八八則齒髮去 腎者主水 受五臟六腑之精 而藏之”, “天壽過度氣脈常通 而腎氣有餘也”라 하여 長壽하는 것은 腎氣의 盛衰 興否에 의하여 결정된다고 하였으니 腎氣虛衰는 노화의 중요 원인이다¹²⁾.

항산화 및 항염 작용과 관련하여 靑蛾丸은 김¹²⁾, 정¹⁴⁾ 등의 연구가 있으며 六味地黃湯은 문¹³⁾, 서¹⁵⁾, 이¹⁶⁾ 등의 연구가 있다. 그러나 이들을 합방한 靑蛾地黃湯에 대한 항산화 및 항염 관련 연구는 아직 없다. 이에 저자는 靑蛾地黃湯 항산화 효과 및 항염증 효과를 밝히고자 하였다.

본 연구에서는 靑蛾地黃湯의 항산화 및 항염증 효능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 총 polyphenol 함량, DPPH free radical 소거능, NO 생성 억제 효과, ROS 생성 억제 효과를 평가하였다.

Lipopolysaccharide (LPS)는 병원균 내독소로서 인지질, 다당류 및 소량의 단백질로 구성되며 RAW264.7 cell과 같은 대식세포에서 tumor necrosis factor-alpha (TNF- α inflammatory cytokine)을 증가시키며 염증을 유발한다³³⁾. 또한 reactive oxygen species (ROS) 생성을 촉진하고 nitric oxide (NO)를 과도하게 활성화 시켜 염증을 유발시켜 조직의 손상을 초래한다³⁴⁾. 따라서 LPS는 염증 반응을 연구하는 실험 모델로 많이 사용되고 있다³⁵⁾.

Polyphenol 화합물은 flavonoids, anthocyanins, tannins, catechins, isoflavones, lignanas, resveratrols 등을 총칭하며, 식물계에 널리 분포되어 있고 과일 및 엽채류에 다량 함유되어 있다³⁶⁾. 페놀성 항산화제들은 연쇄반응에서 alkyl radical이나 alkylperoxy radical에 수소를 공여하여 그 radical을 제거함으로써 산화를 억제하는 작용을 가진 물질로 알려져 있다³⁷⁾.

DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 라디칼 소거능은 항산화제가 안정한 자유라디칼인 DPPH와 반응하면서 DPPH를 DPPHH로 환원시켜, 흡광도를 감소시키는 원리를 이용하여 항산화 활성을 측정하는 방법으로 가장 널리 사용되고 있다³⁸⁾.

Nitric oxide (NO)는 동맥이나 다른 혈관의 이완 및 신경계의 신호전달 물질로 작용하면서 외부에서 침입한 미

생물에 대한 방어 분자로 알려져 있다³⁹⁾. 그러나 과도한 NO의 형성은 혈관투과성 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다⁴⁰⁾.

본 연구에서는 靑蛾地黃湯 추출물에 포함된 폴리페놀 함량을 gallic acid를 표준물질로 하여 측정한 결과, 폴리페놀 함량이 39.76 \pm 1.63 mg/g으로 나타났다.

DPPH radical scavenging activity는 CT과 양성대조군의 전자공여능을 농도별로 측정하여 비교한 결과 10 mg/ml 농도에서 33.4 \pm 3.7%의 소거능을 보여, 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid 30.3 \pm 1.9%의 소거능보다 좋은 활성을 나타내었으며 통계적으로 유의하였다.

NO 생성 억제 효능을 측정한 결과 본 연구에서 LPS 단독으로 처리한 경우 NO 생성이 상승함을 확인하였고 CT을 농도별로 처리한 결과 농도의존적 경향으로 NO 생성을 억제하였다. 또한 대조군 CT0군의 NO 생성량과 비교하였을 때 통계적으로 유의한 NO 생성 억제 효과를 나타내었다.

ROS가 정상적으로 소거되지 않았을 때는 잔존하는 자유라디칼에 의해 산화적 스트레스를 일으키게 된다⁴¹⁾. 세포내 생성된 ROS는 비형광을 나타내는 DCF-DA를 산화시켜 형광물질인 DCF로 전환시키는데 이렇게 전환된 형광물질의 양이 ROS의 양을 나타낸다⁴²⁾. 본 실험에서 역시 LPS에 의해 유도된 ROS 생성 억제 효능을 측정하기 위해 CT을 농도별로 처리한 결과 대조군(CT0)과 비교하여 통계적으로 유의한 그리고 농도 의존적으로 ROS 생성을 억제하였다.

다만, 靑蛾丸과 六味地黃湯을 연구한 논문에서는 쥐의 신장과 뇌조직에서 peroxynitrite (ONOO⁻)의 제거능, superoxide dismutase (SOD) 및 glutathione peroxidase (GSH)와 같은 항산화 효소의 활성 등을 측정하여¹²⁻¹⁶⁾ 본 실험에서의 항산화 및 항염 효과 측정 방법과 달라 靑蛾地黃湯과 비교분석을 할 수 없는 한계점을 보인다. 향후 연구에서 실험 방법을 통일한다면 합방하기 전과 후의 처방 효과를 비교해 볼 수 있는 좋은 연구가 될 것이다.

이상의 연구 결과를 종합하면, 靑蛾地黃湯은 항산화 효과가 있으며 이로 인한 유효한 항염증 효과를 나타내, 염증을 동반하여 나타나는 다양한 만성 퇴행성 질병의 연구에 응용될 수 있으리라 사료된다.

결론»»»»

靑蛾地黃湯 추출물의 항산화 활성이 마우스 대식세포에서의 항염증, 세포 내 활성 산소를 억제하는 연구를 수행하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 靑蛾地黃湯 추출물의 폴리페놀 함량은 39.76 ± 1.63 mg/g이다.
2. 靑蛾地黃湯 추출물의 DPPH radical 소거능은 일부 양성대조군 보다 통계적으로 유의하게 뛰어난 항산화 효과를 관찰할 수 있었다.
3. 靑蛾地黃湯 추출물은 실험농도에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다.
4. 靑蛾地黃湯 추출물의 대식세포 내 NO 생성을 억제하는 것을 확인한 결과, 농도의존적으로 유의하게 NO 생성을 억제하였다.
5. 靑蛾地黃湯 추출물은 대식세포 내 ROS 생성을 농도의존적으로 유의하게 억제하였다.

이상의 실험결과 靑蛾地黃湯은 항산화 과정에 의한 항염증 효능이 있음을 관찰할 수 있었다.

References»»»»

1. Bae GC, Bae DY. The anti-inflammatory effects of ethanol extract of *Allium Hookeri* cultivated in South Korea. *Kor.J.Herbology*. 2012;27(6):55-61.
2. Greig FH, Kennedy S, Spickett CM. Physiological effects of oxidized phospholipids and their cellular signaling mechanisms in inflammation. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(2):266-80.
3. Lee DU. Oxidative stress and age-related changes in microsomal mixed function oxidase activity. *Kor.J.Gerontol*. 1991;1(2):187-201.
4. Volicer L, Crino PB. Involvement of free radicals in dementia of the Alzheimer's type, a hypothesis. *Neurobiol Aging*. 1990;11:567-71.
5. Kim HJ, Jin CB, Lee YS. Anti-oxidative activities of phenolic compound isolated from *Inonotus obliquus*. *Kor.J.Pharmacognogy*. 2007;38:1-16.
6. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature*. 2000;408(6809):239-47.
7. Chung HY, Kim HJ, Kim JW. The inflammation hypothesis of aging : Molecular modulation by calorie restriction. *Ann.N.Y Acad Sc*. 2001;928:327-35.
8. Kim HJ, Ahn MS, Kim GH, Kang MH. Antioxidant and antimicrobial activity of *Pleurotus eryngii* extracts prepared from different aerial part. *Kor.J.Food Sci Technol*. 2006;38:799-804.
9. Kim YH. Cheonggangeuigam, Seoul:Seongbosa, 2001:304.
10. Jin SM. Taepyeonghyeminhwajegukbang. Beijing:Ren min wei sheng Publishing INC. 1985:175.
11. Qian Yi. Soayakjeungjikygeol. Seoul:Yeogang Publishing INC. 2002:11.
12. Kim SH, Jeong JC. Peroxynitrite scavenging activity and its mechanism of Cheonga-hwan. *Kor.J.oriental medicine*. 2002;23(4):55-63.
13. Moon SS, Kim BS, Kang JS. Study on antioxidant action of Yukmijihwang-tang. *Kor.J.oriental physiology&pathology*. 2003;17(2):436-442.
14. Jeong JC. Increased antioxidant enzyme activities and scavenging effects of oxygen free radicals by Cheongahwan. *Journal of Korean Medicine*. 1997;18(2):355-65.
15. Seo YE, Lee EA, Bae HS, Shin MK, Hong MC. Antioxidant effects of the Herbs Composing Yukmijihwang-tang on PC12 cell. *Kor.J.Oriental Physiology&Pathology*. 2003; 17(1):203-8.
16. Lee GH, Yoo DY. Evaluation of Anti-Inflammatory Effects of Yukmijihwangtang and Individual Drug Substances Based on the Extraction Methods. *The Journal of oriental obstetrics&gynecology*. 2012;25(2):89-107.
17. Kim MS, Seo BI, Kwak MA, Jee SY. Effect of Chungajihwangtang on osteoporosis in ovariectomized rats. *Kor.J.Herbology*. 2003;18(2):49-58.
18. Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem*. 1998;46(10):4113-7.
19. Kandaswami CE, Middleton E Jr. Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity of Plant Flavonoids. *Adv Exp Med Biol*. 1994;366:351-76.
20. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res*. 1987;47(4):943-6.
21. Gheldof N, Engeseth NJ. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of *in vitro* lipoprotein oxidation in human serum samples. *J Agric Food Chem*. 2002;50(10):3050-5.
22. Choi BK, Jeong SY, Park GS, Cho JH. Reactive Oxygen Substances and Diseases. Shinil Publishing INC. 2004;1:7-15.
23. Park SN. Skin aging and antioxidants. *Kor.J.Soc Cosmetic Chem*. 1997;23:75-132.
24. Stadtman ER, Berlett BS. Reactive oxygenmediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev*. 1998;30(2):325-43.
25. Virag L, Szabo E, Gergely P and Szabo C. Peroxynitrite induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for

- intervention. *Toxicol Lett.* 2003;140(1):113-124.
26. Omata N, Tsukahara H, Ito S, Ohshima Y, Yasutomi M, Yamada A, Jiang M, Hiraoka M, Nambu M, Deguchi Y, Mayumi M. Increased oxidative stress in childhood atopic dermatitis. *Life Science.* 2001;69:223-8.
 27. Knight JA. The biochemistry of aging. *Adv Clin Chem.* 2000;35:1-62.
 28. Goldberg I. *Functional foods.* New York:Chapman&Hall Press. 1994:3-550.
 29. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160:1-40.
 30. Kim MJ, Chu WM, Park EJ. Antioxidant and antigenotoxic effects of shiitake mushrooms affected by different drying methods. *Kor.J.Soc Food Sci Nutr.* 2012;41:1041-8.
 31. Hwang TY. *Bangyakhappyeon.* Seoul:Namsandang. 1989: 216-7.
 32. Hong WS. *Huangjenaegyeongsomun.* Seoul:Institute of Traditional Culture. 1993:19-20. 46.
 33. Lee ES, Ju HK, Moon TC, Lee E, Jahng Y, Lee SH, Son JK, Baek SH, Chang HW. Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor- α production by propenone compound through blockade of nuclear factor (NF)- κ B activation in cultured murine macrophage. *Biol Pharm Bull.* 2004;27:617-20.
 34. Lin CH, Yeh CH, Lin LJ, Wang SD, Wang JS, Kao ST. Immunomodulatory effect of chinese herbal medicine formula sheng-fei-yu-chuan-tang in lipopolysaccharide-induced acute lung injury mice. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:976342.
 35. Mathiak G, Grass G, Herzmann T, Luebke T, Zetina CC, Boehm SA, Bohlen H, Neville LF, Hoelscher AH. Caspase-1-inhibitor ac-YVAD-cmk reduces LPS lethality in rats without affecting haematology or cytokine responses. *Br J Pharmacol.* 2000;131(3):383-6.
 36. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* 2010;15:7313-52.
 37. Labuza TP. Kinetic of lipid oxidation in foods. *CRS critical Rev. Food Technol.* 1973;335.
 38. Meenakshi S, Umayaparvathi S, Arumugam M, Balasubramanian T. *In vitro* antioxidant properties and FTIR analysis of two seaweeds of Gulf of Mannar. *Asian Pac J Trop Med* 2012;66-70.
 39. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron.* 1992;8:3-11.
 40. Ryu, JH. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS- activated macrophage. *Phytother Res.* 2003;17:485-9.
 41. Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene.* 1999;18(54):7719-30.
 42. Choi WH, Oh YS, Ahn JY, Kim SR, Ha TY. Antioxidative and Protective Effects of *Ulmus davidiana* var. *japonica* Extracts on Glutamate-Induced Cytotoxicity in PC 12 Cells. *Kor.J.Food Sci Technol.* 2005;37(3):479-83.