

## 가미십전대보탕의 RAW 264.7 세포에서 항산화 및 항염증 효과

명정호 · 이명선

대전대학교 뷰티건강관리학과

### Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Kamisipjeondaebotang in RAW 264.7 Cells

Jeong-Ho Myung and Myung-Sun Lee

Department of Health and Beauty, Daejeon University

**ABSTRACT** As Kamisipjeondaebotang (KSD) extract is an herbal ingredient, safety is very important due to possible cell poisoning or heavy metal toxicity to organs when administered to humans or animals. Accordingly, this study examined the antioxidant and anti-inflammatory effects of KSD extract to confirm its medicinal safety by using RAW 264.7 cells after heavy metal screening, functional index test of the liver and kidney, and cell survival rate test. Heavy metals were not found in KSD extracts or were less than standard amounts. Liver function indices such as aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase revealed low values and kidney function indices such as creatinine and blood urea nitrogen were not significantly different from the normal group. This proved the safety to the human. RAW 264.7 cells showed no poisoning compared to the control group in terms of survival rate. Regarding the antioxidant effect of KSD extract, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging activity and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical scavenging activity increased at concentrations over 10 µg/mL. The anti-inflammatory effect of KSD extract significantly decreased based on the amount of nitric oxide at concentrations of 10 and 100 µg/mL compared to the control group. Expression of interleukin (IL)-1β and IL-6 decreased in a concentration-dependent manner. There was no significant difference in tumor necrosis factor-α level. Based on the results, KSD can be regarded as a safe antioxidant with anti-inflammatory effects for fracture treatment.

**Key words:** anti-inflammatory effect, pro-inflammatory cytokines, Kamisipjeondaebotang

## 서 론

십전대보탕은 《태평혜민화제국방(太平惠民和劑局方)》에 최초로 기재된 이래, 몸을 전반적으로 보양하는 대표 처방으로 사용되어 왔으며(1), 골절 치유에 충분한 혈액 공급(2)을 위해 혈허(血虛)된 기혈(氣血)을 보혈(補血)하기 위한 기혈쌍보제(氣血雙補劑)로 사용되며(3), 항산화 및 항당뇨 작용(4), 신장조직 손상에서 보이는 항산화 효과(5), 남성 생식세포에서 보이는 항산화 효과(6), 성장지능 발달 조절 작용(7), 항노화(8) 및 항염증 작용에 효과가 있다(9).

십전대보탕에 골절치료약제로 쓰이는 FeS<sub>2</sub>를 함유하여(10) 신속한 골 접합과 타박상(打撲傷), 경계(驚悸), 영류(癭瘤), 창양(瘡瘍), 화상(火傷)(11)에 쓰이는 자연동(12), 불안증, 신경쇠약, 타박상, 근골절상(13,14)에 쓰이는 합환피, 폐놀 화합 성분과 전분 및 포도당 등이 함유되어 있으며(15), 항고혈압 작용(16) 및 항산화 작용(17), 골 형성 및 골 석회

화 등 골 질병 치료 효과(18)가 증명된 골쇄보(19)를 가미하여 십전대보탕을 통해 항산화 및 항염증 작용과 기혈을 높이는 동시에 골절 치료에 효과적인 약제들을 복합한 탕을 가미십전대보탕이라 한다.

골절이란 뼈의 연속성이 소실되거나 선상의 변형을 일으킨 현상이며 피부, 피하조직, 근막, 근 골막, 혈관 및 신경 등의 손상을 일으키는 것을 말한다(20). 골절의 발생 원인으로서는 재해나 사고로 인한 외상, 골다공증 등 질병에 의한 뼈의 변화 그리고 운동이나 하중 부하로 인한 뼈에 대한 반복적인 스트레스 등이 있으며(21), 근래에는 급격한 노령화로 골다공증에 의한 이차적 골절이 2008년 이후 매년 10% 이상 늘고 있는 실정이다(22).

골절의 유합과정을 살펴보면 골절 발생 후 초기 단계에선 조직 결손부와 혈종이 육아조직으로 바뀌고 거기에 결합조직이 증식한다. 그리고 그 부위에 조골세포(osteoblast)가 증식하여 뼈의 기질을 만들어 골절된 뼈의 양 끝을 일시적으로 결합시킨다. 조골세포가 증식하여 만든 기질로 인한 유골(osteoid)에 칼슘이 침착되면 초기골(woven bone)이 된다(23). 이러한 유합과정은 조골세포에 의한 뼈 생성과 파골세포에 의한 뼈 흡수 과정이 반복되며 뼈의 재형성을 유도한

Received 5 June 2017; Accepted 14 September 2017

Corresponding author: Myung Sun Lee, Department of Health and Beauty, Daejeon University, Daejeon 34520, Korea  
E-mail: leesun@dju.ac.kr, Phone: +82-42-280-2393

다. 그러나 골절 유합과정에 부정적 영향을 주는 인자가 있는데 대표적으로 산화 스트레스와 염증반응이 보고되고 있다(24,25).

이에 본 연구는 십전대보탕의 주 기능인 항산화, 항염증 작용 및 자연동, 합합피, 골쇄보의 골절 유합 성분을 가미하여 생약성분으로 세포독성 및 중금속에 의한 장기의 안전성을 확보하고 항산화 효과 및 RAW 264.7 세포를 이용한 항염증 효과를 입증하여 골절 치료제로의 기초자료를 얻고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 추출물 제조

실험에 사용된 RAW 264.7 실험세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 사용한 가미십전대보탕(이하 KSD로 표기)에 구성된 약재들은 (주)옴니허브(Daegu, Korea)에서 구입 후 대전대학교 TBRC-RIC에서 정선한 다음 사용했으며, 그 내용과 사용량(1첩)은 Table 1과 같으며, KSD 2첩에 DW 1,000 mL를 넣고 3시간 환류 추출한 여과액을 이용, rotary vacuum evaporator(B-480, Büchi Co., Flawil, Switzerland)에서 감압 농축하였다. 농축한 용액은 freeze dryer(FDU-540, EYELA Co., Tokyo, Japan)로 동결 건조하여 분말 4.6 g을 정제하였으며, 정제된 분말은 초저온 냉동고(-80°C)에서 보관하며 실험에 따라 필요 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다. 실험동물인 수컷 11주령의 Sprague Dawley(SD) rat(310~360 g)은 라온바이오(Gyeonggi, Korea)에서 공급받아 실험 당일까지 고형사료((주)퓨리나, Gyeonggi, Korea)와 수분을 충분히 공급하고 온도 22±2°C, 습도 55±15%, 12시간~12시간(light-dark cycle)의 환경에서 2주간 실험 조건에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 본 실험은 대전대학교 동물실험윤리 위원회의 승인(동물사용 윤리위원회 승인번호: DJUARB 2015-022)을 받아 동물윤리준칙에 따라 실험하였다.

**Table 1.** The prescription of Kamisipjeondaebotang (KSD)

Pharmacognostic name	Weight (g)
Ginseng Radix Alba	4
Atractylodis Rhizoma Alba	4
Hoelen	4
Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	4
Rehmanniae Radix Preparata	4
Paeoniae Radix	4
Cnidii Rhizoma	4
Angelicae Gigantis Radix	4
Astragali Radix	4
Cinnamomi Cortex Spissus	4
Pyritum	6
Albiziae Cortex	6
Drynariae Rhizoma	6
Total amount	58

### 세포배양

동결된 RAW 264.7 세포를 50 mL 튜브에 옮겨 fetal bovine serum(FBS, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 9 mL를 넣고 세포를 부유시킨 후 1,200 rpm에서 5분간의 원심분리(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 통해 상층액을 제거하였다. 세포가 들어있는 튜브에 10% FBS와 1% penicillin으로 조성된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco BRL Co., Grand Island, NY, USA) 배지 1 mL를 투여해 부유시켰다. 100 mM dish에 9 mL의 배지를 넣고, 세포를 부유시켜 세포배양기(SANYO Electric Co., Gunma, Japan) 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 계대 배양은 5회 이상 실시하였고, 시료들을 처리하기 전에 24시간 동안 적응시켰다.

### 안전성 측정

납, 비소, 카드뮴 분석은 KSD 추출용액 0.5 g을 극초단파 시료전처리장치 용기에 넣고 질산 10 mL를 넣은 후, 용기를 후드 안에 정치시켜 발생된 가스를 제거했으며 극초단파 시료전처리장치를 사용하여 분해하였다. 분해가 끝난 분해액을 여과지로 여과한 후 용량플라스크에 넣고 물을 희석하여 적절한 표준액의 농도 범위로 변환하여 검사액으로 사용하였다. 따로 질산 10 mL를 극초단파 시료전처리장치 용기에 넣어 검액 조제와 동일한 방법으로 조작하여 공시험액으로 사용하였다. 준비된 검사액, 표준액, 공시험액을 이용해 유도 결합플라즈마 분광계(ICP, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 이용하여 검량선을 작성하고 보정된 공시험액으로 검액을 측정하였다. 수은 분석의 경우 KSD 추출물 50 mg을 정량하게 측정하여 특별한 전처리 과정 없이 수은분석기(Teledyne Leeman Labs, Hudson, NH, USA)를 사용하여 측정하였다. KSD를 8주간 섭취한 흰쥐의 혈청에서 간 기능 지표인 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT) 활성도 검사를 했으며 AST, ALT 활성도는 JSCC UV method의 원리를 이용하여 생화학 자동분석기로 측정하였다. 신기능 지표인 creatinine(Cr), blood urea nitrogen(BUN) 활성도 측정을 위해 간 기능 활성도 측정과 같이 KSD를 8주간 섭취한 흰쥐의 혈액을 채취하였다. 혈액을 30분간 상온에서 보관한 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 분리된 혈청을 대전대학교 임상병리학과(Daejeon, Korea)에 분석 의뢰하였다. Cr의 함량은 creatinine Jaffe method의 원리, BUN의 함량은 Kinetic UV assay for urea/urea nitrogen의 원리를 이용하여 생화학 자동분석기로 정량 측정하였다.

### 세포독성 측정

RAW 264.7 세포는 96-well plate에 1.5×10<sup>5</sup> cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양시켰다. 실험 전 새로운 배양액으로 교체하였고, KSD를 각각 1, 10, 100 µg/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 재배양하였다. 배양 후 10 µL의

KSD 추출물 solution을 가미하여 세포배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 30분간 반응을 관찰하였다. 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도 변화를 측정하여 대조군에 대한 실험군의 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

### 항산화 효능 측정

자유라디칼 소거 활성 시험은 안정된 자유라디칼 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)을 사용하는 방법이다. KSD 추출물은 최종 1, 10, 100, 1,000 µg/mL의 농도로 희석하였으며, 에탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 150 µL와 KSD 추출물을 각 100 µL씩 혼합하여 37°C 온도에서 30분간 각 반응시켰다. 반응 후 517 nm에서 흡광도의 결과를 측정하였다. 시료액의 대조군에는 증류수를 넣었으며, DPPH 용액의 대조군에는 에탄올을 넣어 보정 값을 얻었다. DPPH 자유라디칼 소거능 계산은 아래의 식에 따랐다.

$$\text{소거율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{무처리군의 흡광도}}\right) \times 100$$

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)(ABTS) 방법은 기존 보고 방법을 수정하여 96-well plate에 맞게 실시하였다. KSD 추출물은 최종 농도가 1, 10, 100, 1,000 µg/mL의 농도가 되게 희석시켰으며, ABTS 용액은 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 제조한 다음, 암소에 하루 동안 보관하여 양이온(ABTS<sup>•+</sup>)을 형성시킨 후 734 nm에서 흡광도 측정값이 1.5 이하로 나오도록 희석하고, 희석한 ABTS<sup>•+</sup> 용액 150 µL와 KSD 추출물을 각각 5 µL 혼합하고, 실온상태에서 10분간 반응시킨 다음 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화능은 대조군으로 증류수를 사용하여 대조군에 대한 ABTS 라디칼 소거능을 백분율로 계산하였다.

$$\text{소거율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{무처리군의 흡광도}}\right) \times 100$$

### 항염증 효능 측정

Nitric oxide(NO)의 농도 측정은 RAW 264.7 세포를 96-well plate에 1.5×10<sup>5</sup> cells/well로 100 µL씩 분주하고 37°C, 5%, CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 1, 10, 100 µg/mL 농도의 KSD 추출물에 lipopolysaccharide(LPS, Sigma-Aldrich Co.)를 1 µg/mL 농도로 동시에 처리하여 NO 생성을 24시간 동안 세포배양기에서 유도시켰다. 유도 후 NO 생성 측정을 위해 nitric oxide detection kit(Intron Biotechnology, Gyeonggi, Korea)을 이용하였다. NO 생성을 유도한 96-well plate에 nitric oxide detection kit로 구성된 N1 buffer와 N2 buffer를 10분간격으로 차례로 50 µL씩 넣은 후, ELISA reader 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 생성을 유도하지 않은 RAW 264.7 세포를 정상군(Normal), NO 생성을 유도하고 FU 추출물을 처리하지 않은 RAW 264.7 세포를 대조군(Control)

으로 표기하였으며, 대조군에 대한 백분율 계산을 통해 NO 생성 저해능을 분석하였다.

### RAW 264.7

세포를 12-well plate에 2×10<sup>5</sup> cells/well로 100 mL씩 분주하고 37°C, 5%, CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 1, 10, 100 µg/mL 농도의 FU 추출물에 LPS를 1 µg/mL 농도로 동시에 처리하여 염증성 사이토카인 생성을 24시간 동안 세포배양기에서 유도시켰다. 이후 염증성 사이토카인 생성 측정을 위해 MILLIPLEX<sup>®</sup> MAP Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel-Immunology Multiplex Assay를 이용하였다. 12-well plate에서 염증성 사이토카인 생성을 유도한 배양액을 500 mL 회수하여 1,500 rpm 조건에서 10분 동안 원심분리 한 상청액을 96-well plate에 25 µL씩 분주하고 assay buffer, matrix solution, antibody-immobilized beads를 각각 25 µL씩 가하여 혼합한 후 2시간 동안 실온에서 반응시키고 washing 완충 용액을 이용하여 2회 세척하였다. 이후 25 µL의 detection antibody를 넣은 후 1시간 동안 plate shaker(500 rpm)로 반응시키고 추가로 25 µL의 streptavidin-phycoerythrin을 넣고 다시 plate shaker(500 rpm)로 반응시킨 다음 washing 완충 용액을 이용하여 2회 세척하였다. 세척 후 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS, Welgene, Gyeongbuk, Korea)을 150 µL 넣고 Luminex를 이용하여 tumor necrosis factor(TNF)-α, interleukin(IL)-1β, IL-6를 측정하였다. 염증성 사이토카인 생성을 유도하지 않은 RAW 264.7 세포를 정상군(Normal), 염증성 사이토카인 생성을 유도하고 FU 추출물을 처리하지 않은 RAW 264.7 세포를 대조군(Control)으로 표기하였으며, 대조군에 대한 백분율 계산을 통해 NO 생성 저해능을 분석하였다.

### 통계처리

통계처리는 SPSS(Statistical Package for the Social Science, ver 11.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)의 unpaired Student's *t*-test 및 ANOVA를 이용하여 분산분석 및 Duncan's multiple range test로 통계처리 하였으며, *P*<0.05와 *P*<0.01 수준에서의 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

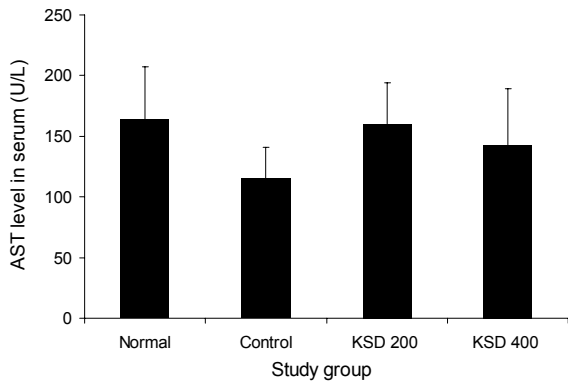
### 안전성

KSD 추출물의 중급속 함량을 측정한 결과는 Table 2와 같이 기준치 이하로 나타났고 간 기능의 지표 성분인 AST, ALT 측정은 Fig. 1, Fig. 2와 같이 정상군과 비교하여 차이를 보이지 않아 간 기능에 영향을 미치지 않아 안전한 것으로 보이며, 신기능 또한 Fig. 3의 Cr 및 Fig. 4의 BUN 함량이 정상군과 비교하여 차이를 보이지 않아 신기능에 영향을 미치지 않았으며, RAW 264.7 세포에 대한 독성 측정은 Fig.

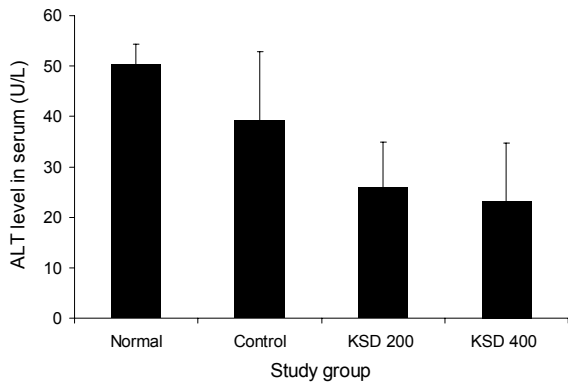
**Table 2.** Content of Pb, As, Cd, and Hg in KSD

	Pb	As	Cd	Hg
Permissive density (mg/kg)	5	3	0.3	0.2
KSD	ND <sup>1)</sup>	ND	0.001	ND

<sup>1)</sup>ND: not detected.



**Fig. 1.** Effect of KSD extract on the AST of serum in skull fracture in rat. Skull fracture model followed by Normal, Control, KSD 200, 400 mg/kg by the administration for 8 weeks. The results were presented by the mean±SD.

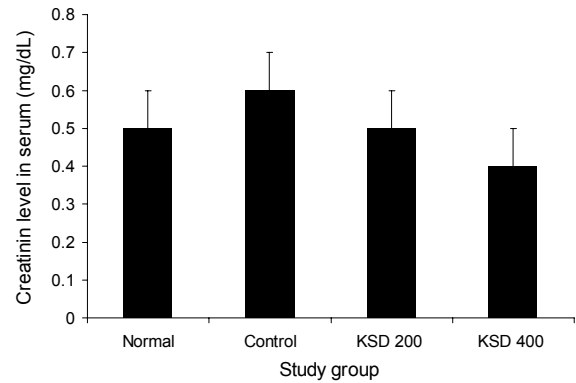


**Fig. 2.** Effect of KSD extract on the ALT of serum in skull fracture in rat. Skull fracture model followed by Normal, Control, KSD 200, 400 mg/kg by the administration for 8 weeks. The results were presented by the mean±SD.

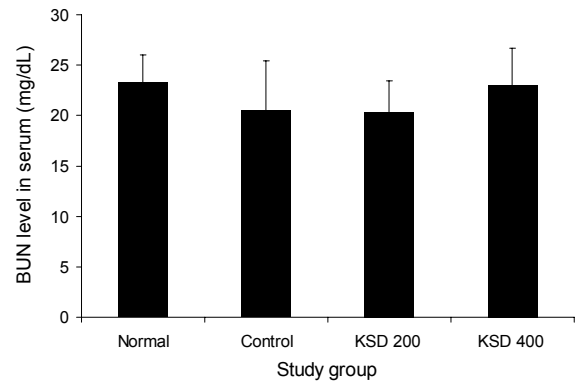
5와 같은 생존율로 안전한 것으로 나타났다.

**DPPH, ABTS 라디칼 소거능**

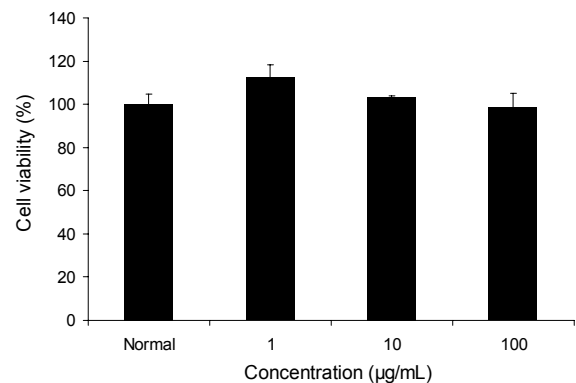
DPPH는 안정한 라디칼로 천연 추출물의 항산화 활성 측정법으로 널리 사용되고 있다. KSD 추출물의 DPPH 소거능을 측정한 결과 Table 3과 같이 1 µg/mL 농도에서 0.30±1.77%, 10 µg/mL 농도에서 1.66±1.26%, 100 µg/mL 농도에서 4.47±0.97%, 1,000 µg/mL 농도에서 41.35±1.77%로 나타나 10 µg/mL 이상의 농도에서 의존적으로 라디칼 소거능이 증가함을 보였으며, Lee와 Oh(26)에 의한 십전대보탕 항산화 연구에서도 동일한 농도에서 7.4~94.3%의 소



**Fig. 3.** Effect of KSD extract on the creatinine of serum in skull fracture in rat. Skull fracture model followed by Normal, Control, KSD 200, 400 mg/kg by the administration for 8 weeks. The results were presented by the mean±SD.



**Fig. 4.** Effect of KSD extract on the BUN of serum in skull fracture in rat. Skull fracture model followed by Normal, Control, KSD 200, 400 mg/kg by the administration for 8 weeks. The results were presented by the mean±SD.



**Fig. 5.** Cell viability of KSD extract in RAW 264.7 cells. Cells were treated with 1, 10, and 100 (µg/mL) of KSD extract for 24 h. Cytotoxicity was measured using an MTT assay. The results were expressed as mean±SD from three independent experiments.

거능으로 비율 차이는 있지만 농도 의존적으로 DPPH 소거능이 증가함을 볼 수 있다. ABTS 측정법은 DPPH 소거 활성법과 차이는 있으나(27) 측정시간이 짧고 결과의 재현성

**Table 3.** DPPH free radical scavenging activity of KSD extract at various concentration

Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Scavenging activity (%)
1	$0.30 \pm 1.77^{a1)2)}$
10	$1.66 \pm 1.26^a$
100	$4.47 \pm 0.97^b$
1,000	$41.35 \pm 1.77^c$

<sup>1)</sup>Values are mean $\pm$ SD.

<sup>2)</sup>Different letters (a-c) within a column indicate significant differences at  $P < 0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

**Table 4.** ABTS cation radical scavenging activity of KSD extract at various concentration

Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Scavenging activity (%)
1	$1.87 \pm 0.85^{a1)2)}$
10	$2.89 \pm 1.06^a$
100	$8.12 \pm 1.19^b$
1,000	$69.11 \pm 2.23^c$

<sup>1)</sup>Values are mean $\pm$ SD.

<sup>2)</sup>Different letters (a-c) within a column indicate significant differences at  $P < 0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

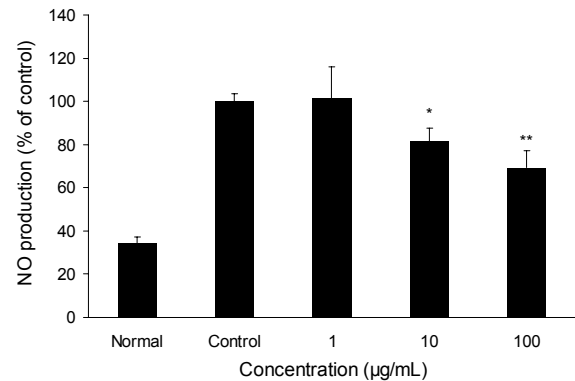
이 높아 DPPH 소거 활성법과 같이 비교하였다. KSD 추출물의 ABTS 소거율을 측정한 결과 Table 4와 같이 1  $\mu\text{g/mL}$  농도에서  $1.87 \pm 0.85\%$ , 10  $\mu\text{g/mL}$  농도에서  $2.89 \pm 1.06\%$ , 100  $\mu\text{g/mL}$  농도에서  $8.12 \pm 1.19\%$ , 1,000  $\mu\text{g/mL}$  농도에서  $69.11 \pm 2.23\%$ 로 나타나 10  $\mu\text{g/mL}$  이상의 농도에서 의존적으로 라디칼 소거능이 증가함을 보였으며, Lee와 Oh(26)의 연구에서도 1.9~86%의 소거능으로 비율의 차이는 있지만 농도 의존적으로 ABTS 소거능이 증가함을 볼 수 있다. 이러한 결과는 KSD 성분이 항산화 물질로써 유의성이 있음을 확인할 수 있으며 이후 소거능을 높일 수 있는 다양한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

### NO의 생성량에 미치는 영향

대식세포에서 생성되는 NO는 세포 내 감염 방어 작용의 신호 전달 물질로 RAW 264.7 세포에서 KSD 추출물의 NO 생성량을 측정 결과 Fig. 6과 같이 대조군을  $100.0 \pm 3.7\%$ 로 나타낼 때 정상군은  $34.4 \pm 2.7\%$ , KSD 추출물은 1  $\mu\text{g/mL}$  농도에서  $101.6 \pm 14.6\%$ , 10  $\mu\text{g/mL}$  농도에서  $81.4 \pm 6.3\%$ , 100  $\mu\text{g/mL}$  농도에서  $69.4 \pm 7.9\%$ 로 나타나 대조군에 비하여 10, 100  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 유의성 있게 감소하여 Lee와 Oh(26)의 연구에서의 독활, 참죽나무잎 추출물을 대식세포에 처리한 결과인 추출물 농도 증가에 비례해 NO 생성량 억제와 비슷한 결과를 나타내었다. 따라서 KSD의 생약 추출물은 NO 생성을 억제시켜 감염 반응에 대한 초기 면역 기능에 활성도가 높을 것이라 생각된다.

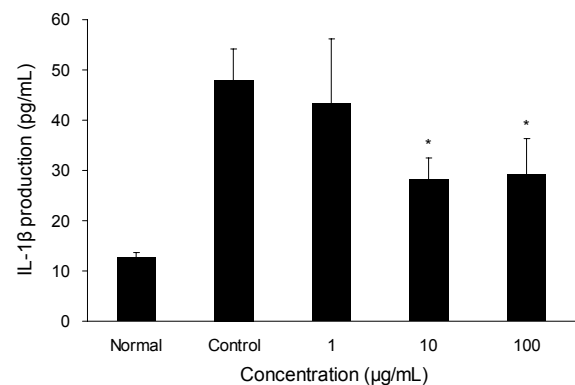
### RAW 264.7 세포 내 사이토카인에 미치는 영향

IL-1 $\beta$ 는 cytokine network에 중요한 역할인 T세포 활

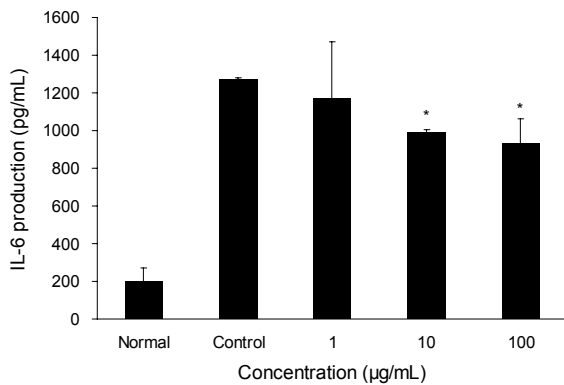


**Fig. 6.** Effect of KSD extract on LPS-induced nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell was treated with 1, 10, and 100  $\mu\text{g/mL}$  of KSD extract and LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) for 24 h. The amount of nitric oxide in supernatant was measured using Griess reagent. The results were expressed as mean $\pm$ SD from three independent experiments. Significance of results, \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ .

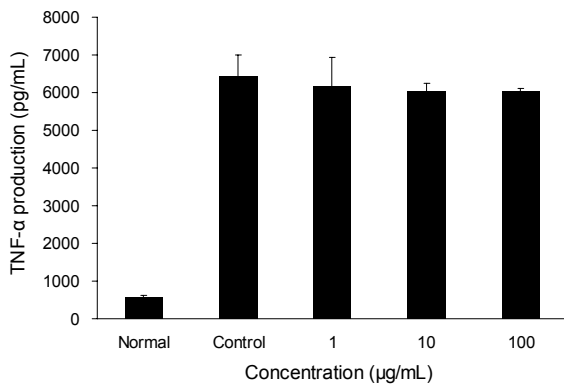
성화와 IL-2 사이토카인 활성을 증진시키는 역할을 한다 (28). 본 연구 결과 Fig. 7와 같이 RAW 264.7 세포에서 KSD 추출물의 IL-1 $\beta$  생성량에서 대조군이  $48.0 \pm 6.2$  pg/mL, 정상군이  $12.6 \pm 1.0$  pg/mL, KSD 추출물은 1  $\mu\text{g/mL}$  농도에서  $43.3 \pm 12.8$  pg/mL, 10  $\mu\text{g/mL}$  농도에서  $28.1 \pm 4.4$  pg/mL, 100  $\mu\text{g/mL}$  농도에서  $29.2 \pm 7.1$  pg/mL로 나타나 대조군에 비하여 10, 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 유의성 있는 ( $P < 0.05$ ) 감소를 보여 중간 및 고농도에서 의존적으로 IL-1 $\beta$  생성 억제에 영향이 있다고 생각된다. IL-6는 면역과 염증 조절에 다양하게 관여하는 사이토카인으로 면역글로블린 합성 증진과 plasma cell 분화 유도를 한다(29). 본 연구는 Fig. 8과 같이 RAW 264.7 세포에서 KSD 추출물의 IL-6 생성량을 측정한 결과 대조군이  $1,269.3 \pm 8.9$  pg/mL, 정상군이  $200.6 \pm 71.3$  pg/mL, KSD 추출물은 1  $\mu\text{g/mL}$  농도에서  $1,169.0 \pm 300.3$  pg/mL, 10  $\mu\text{g/mL}$  농도에서  $991.0 \pm 12.6$  pg/mL, 100  $\mu\text{g/mL}$  농도에서  $935.3 \pm 127.2$  pg/mL로 나타



**Fig. 7.** Effect of KSD extract on LPS-induced IL-1 $\beta$  production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 1, 10, and 100  $\mu\text{g/mL}$  of KSD extract in the presence of LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) for 24 h. The results were expressed as mean $\pm$ SD from three independent experiments. Significance of results, \* $P < 0.05$ .



**Fig. 8.** Effect of KSD extract on LPS-induced IL-6 production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 1, 10, and 100 µg/mL of KSD extract in the presence of LPS (1 µg/mL) for 24 h. The results were expressed as mean±SD from three independent experiments. Significance of results, \* $P < 0.05$ .



**Fig. 9.** Effect of KSD extract on LPS-induced TNF-α production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 1, 10, and 100 µg/mL of KSD extract in the presence of LPS (1 µg/mL) for 24 h. The results were expressed as mean±SD from three independent experiments.

나, 대조군에 비하여 10, 100 µg/mL의 농도에서 유의성 있게 감소하여 항염증 활성을 유도하는 것이라 생각된다. TNF-α는 대식세포가 LPS 자극에 의한 염증성 사이토카인을 분비하며, 이는 염증반응의 촉진인자로 알려져 있다(30). 본 연구는 Fig. 9와 같이 RAW 264.7 세포에서 KSD 추출물의 TNF-α 생성량을 측정된 결과 대조군이 6,451.3±557.6 pg/mL, 정상군이 573.0±52.3 pg/mL, KSD 추출물은 1 µg/mL 농도에서 6,151.8±779.6 pg/mL, 10 µg/mL 농도에서 6,053.8±187.0 pg/mL, 100 µg/mL 농도에서 6,041.8±72.5 pg/mL로 보였다. Kim과 Kang(31)의 복합 생약물과 Kounsar 등(32)의 마디풀과 추출물 대식세포 처리 결과와 같이 고농도일수록 TNF-α의 생성 감소가 있으나 농도별 유의적 차이점은 없었다.

## 요 약

가미십전대보탕(이하 KSD로 표기) 추출물은 생약 성분으로

인체 및 동물에 투여 시 세포 독성 및 장기에 중금속 등에 의한 독성 물질이 발생할 수 있어 안전성이 매우 중요하다. 따라서 본 연구에서는 KSD의 안전성 확보를 위해 중금속 검사, 간과 신장 기능 지표 검사 및 RAW 264.7 세포 생존 시험을 거친 후 RAW 264.7 세포를 이용하여 KSD 추출물의 항산화 및 항염증 효과를 알아보았다. KSD 추출물에서 중금속은 발견되지 않거나 기준치 미만으로 검출되었다. 간 기능지표인 AST, ALT는 정상군에 비해 낮게 나타났으며 신기능 지표인 Cr, BUN도 정상군과 같거나 낮아 인체에 안전함을 확인하였다. RAW 264.7 세포 독성은 대조군 대비 농도별 생존율에 차이가 없었다. KSD 추출물의 항산화 효능 측정 결과 DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능은 10 µg/mL 이상의 농도에서 의존적으로 활성이 증가하였다. 항염증 효과 측정 결과 NO 생성량은 대조군에 비해 10, 100 µg/mL에서 유의성 있는 감소를 보였으며, IL-1β와 IL-6는 농도 의존적으로 발현량이 감소하였고, TNF-α는 유의적 차이점을 발견할 수 없었다. 이상의 결과를 보아 KSD는 골절 치료를 위한 생약으로 안전성 및 항산화 및 염증 감소에 효과가 있을 것으로 생각된다.

## REFERENCES

- Jung GM, Goo BH. 1980. Literature review on sipjeondaebotang. *The Journal of East-West Medicines* 5: 16-20.
- KOA. 2000. Orthopedic surgery. In *Latest Medical*. Korean Orthopaedic Association, Seoul, Korea. p 5.
- Kim YS, Lim SJ. 1997. *Punghak*. Sewondang, Seoul, Korea. p 67.
- Kim EH, Lee DK. 2009. Anti-oxidative properties of ginseng. *J Ginseng Res* 33: 1-7.
- Cho SI. 2003. Anti-oxidative effects of RADIX REHMANNIAE PREPARATA on toxic agent induced kidney cell injury. *Kor J Herbol* 18: 119-126.
- Chang MS, Yang WM, Yu TW, Kim DL, Park EH, Ko EB, Choi MJ, Kim HY, Oh JH, Sim KJ, Yoon J, Park SK. 2007. Antioxidant effects of Rehmanniae Radix Preparat in CG-1 cells. *Kor J Herbol* 22: 81-86.
- Lee S, Son J, Sohn J, Kim W, Lee S, Lee PJ, Leem K. 2009. Effects of herbal composition and fermented Cervi Pantotrichum Cornu on longitudinal bone growth in adolescent male rats. *Kor J Herbol* 24: 121-131.
- Lee SY, An TW. 2007. The anti-aging effect of oral administration of NokYongDabotang (NYD) in rats. *J Daejeon Oriental Medicine* 16: 327-348.
- Lee HJ, Jo HS, Whang MS, Jung CY, Lee DG, Kim EJ, Kim GS, Kim GH. 2008. Effect of Cervi pantotrichum cornu pharmacopuncture on suppressing the expression of iNOS and production of NO in Type II collagen-induced arthritis mice. *J Korean Acupunct & Mox Med Sci* 25: 105-116.
- Choi HY. 1999. Study for the identification on pharmaceutical Pyritum and Preparata. *Kor J Herbol* 14: 23-27.
- Hu J. 1999. *Donguibogam*. Pubinmunwhasa, Seoul, Korea. p 1522.
- Lim HH, Keum DH. 2002. Healing effect of pyrite on tibia fractured rats. *J Orient Rehabil Med* 12: 51-68.
- Tang W, Eisenbrand G. 1992. *Chinese drugs of plant origin*. Springer-Verlag, New York, NY, USA. p 919-929.

14. Zhu YP. 1998. *Chinese material medica:chemistry, pharmacology and applications*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Netherlands. p 519-520.
15. Lin YY, Kakisawa H, Shiobara Y, Nakanishi K. 1965. The structure of davallic acid. *Chem Pharm Bull* 13: 986-995.
16. Einhorn TA. 2005. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma* 19: S4-S6.
17. Liu HC, Chen RM, Jian WC, Lin YL. 2001. Cytotoxic and antioxidant effects of the water extract of the traditional Chinese herb gusuibu (*Drynaria fortunei*) on rat osteoblasts. *J Formos Med Assoc* 100: 383-388.
18. Ma K, Zhu T, Liu X, Liu W. 1995. Promoting effects of rhizoma *Drynariae* on the calcification of cultivated chick embryo bone primordium. *China J Chinese Materia Medica* 20: 178-180.
19. Lee SI. 1981. *Herbology*. Susewon, Seoul, Korea. p 89.
20. Lee JD. 1990. *Pathology*. Korea Medicine, Seoul, Korea. p 196.
21. John W, Hole J. 1993. *Human anatomy and physiology*. Wm. C. Brown Publisher, Oxford, UK. p 170-227.
22. <http://www.nhis.or.kr/bbs7/boards/B0039/15329> (accessed Oct 2015).
23. Melhus H, Michaëlsson K, Holmberg L, Wolk A, Ljunghall S. 1999. Smoking, antioxidant vitamins, and the risk of hip fracture. *J Bone Miner Res* 14: 129-135.
24. Basu S, Michaëlsson K, Olofsson H, Johansson S, Melhus H. 2001. Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 275-279.
25. Sontakke AN, Tare RS. 2002. Aduality in the roles of reactive oxygen species with respect to bone metabolism. *Clin Chim Acta* 318: 145-148.
26. Lee EJ, Oh MS. 2014. Effects of Keonbodan on MIA-induced osteoarthritis in rat. *J Korean Med Rehab* 24: 51-64.
27. Arnao MB. 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. *Trends Food Sci Technol* 11: 419-421.
28. Lee JH, Kim YS, Lim EM. 2011. Effects of *Angelicae pubescentis* Radix water extract on immune property in Raw 264.7 macrophages. *J Korean Oriental Med* 32: 175-184.
29. Cha JH, Kim YS, Lee EM. 2010. Effects of *Prunellae Spica* water extract on immune response in macrophage cells. *J Orient Obstet Gynecol* 23: 91-100.
30. Tsai ML, Lin CC, Lin WC, Yang CH. 2011. Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils from five selected herbs. *Biosci Biotechnol Biochem* 75: 1977-1983.
31. Kim HS, Kang JS. 2008. Preparation and characteristics of bread by medicinal herb composites with immunostimulating activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 109-116.
32. Kounsar F, Rather MA, Ganai BA, Zargar MA. 2011. Immuno-enhancing effects of the herbal extract from Himalayan rhubarb *Rheum emodi* Wall. ex Meissn. *Food Chem* 126: 967-971.