



Original Article / 원저

위령탕 혼합단미연조엑스의 항염증 효과

김명진, 김세진, 남원희, 임현희, 전영희, 손수미, 김정옥*

한국한의학진흥원

Anti-inflammatory Effects of Wiryeong-tang Mix Soft Extract

Myoung-Jin Kim, Se-Jin Kim, Won-Hee Nam, Hyun-Hee Leem, Young-Hee Jeon,
Su-Mi Son, Jung-Ok Kim*

National Institute for Korean Medicine Development

ABSTRACT

Objectives : Wiryeong-tang (WRT) is a traditional herbal medicine used to treat kidney-related diseases. However, the anti-inflammatory and anti-gastritis effect of Wiryeong-tang was not well known. Therefore, we experimented to confirmed the anti-inflammatory and anti-gastritis effects of Wiryeong-tang.

Methods : The RAW 264.7 cells were pre treated with Wiryeong-tang mix soft extract (WRT-mse; 50, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 1 hrs, and then incubated with lipopolysaccharide (LPS; 500 ng/mL). Cell viability was measured by the MTT method, and nitric oxide (NO) was measured with griess reagent. In addition, pro-inflammatory cytokines were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). For anti-gastritis effect in vivo, acute gastritis was induced using 150 mM HCl/60% ethanol used ICR mice. WRT-mse (133 mg/kg) was pre treated for 3 days and then treated with 150 mM HCl/60% ethanol 1 hrs later. Then gastritis was observed and inflammatory cytokines in the gastric tissue was measured.

Results : The 8 marker components of the WRT-mse were determined by simultaneous analysis using HPLC. WRT-mse was not toxic and inhibited pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α at NO production, protein and mRNA levels. Also, it was confirmed that WRT-mse improved bleeding and edema in gastritis, and suppresses inflammatory cytokines.

Conclusion : In summary, our results suggest that the treatment of the WRT-mse reduced and improved the 150 mM HCl/60% ethanol induced acute gastritis and the inflammation caused by LPS stimulation in RAW 264.7 cells. Therefore, this study may provide useful drug or clinical evidence for WRT-mse to prevent inflammation.

Key words : Wiryeong-tang mix soft extract (WRT-mse), lipopolysaccharide (LPS), acute gastritis, pro-inflammatory cytokines, anti-inflammatory, anti-gastritis.

I. 緒論

염증은 감염이나 상처로 인한 생체조직 내에서 방어기전으로 작용할 뿐 아니라 병리 생화학적 반응으로 염증매개물질을 분비하여 신체를 보호하는 보호기전이다^{1,2}. 염증의 진행은 inflammatory cell들의 과도한 반응으로 염증성 사이토카인들에 의해 염증반응이 일어나고, 류마티스 관절염, 패혈증과 같은 질환들이 나타난다^{3,4}. 따라서 염증질환을 치료하는데 있어 염증반응을 억제하는 것은 중요한 목표가 된다.

그람 음성균의 외막성분으로 알려진 Lipopolysaccharide (LPS)는 대식세포에 존재하는 Toll-like receptor 4 (TLR4)와 결합하게 되며^{5,6}, 감염초기에 반응하며 숙주 방어에 주요 역할을 한다⁷⁻⁹. RAW 264.7 대식세포에서 LPS의 자극으로 활성화된 대식세포에서 염증 관련 연구에 많이 사용되는 모델로써, 과도한 LPS의 자극은 대식세포에서 Interleukin (IL)-1 β , IL-6 및 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 사이토카인과 nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂) 등 염증매개물질을 분비시킨다⁷⁻¹⁰.

위장 질환은 세계 인구의 4~5% 정도가 평생동안 한 번 이상 겪게 되는 흔한 질환이다¹¹. 위염의 주요 발병원인은 Helicobacter pylori균 감염, 불규칙한 식습관, NSAID (non-steroid anti-inflammatory drugs), 스트레스, 알코올 등이 있다^{12,13}. 정상적인 위 점막상태에서의 방어기전은 공격인자로부터의 보호하지만, 위 점막의 손상이 발생하여 방어인자가 약해지면 부종, 출혈, 발적 등의 증상이 나타나게 되는데 이러한 증상을 위염이라 한다¹⁴. 염산/알코올을 이용한 동물실험 모델은 직접적인 위의 손상으로 위

벽의 출혈과 같은 손상을 관찰할 수 있다¹⁵.

위령탕은 평위산과 오령산의 합방한 처방으로 감초, 계지, 대조, 백출, 생강, 저령, 적복령, 진피, 창출, 택사, 후박, 백작약 등 총 12종의 약재로 구성되어 있다^{16,17}. 위를 조화시키고 기를 화평하게 하는 처방으로 동의보감에 기록되어 있으며 복통을 동반한 급 만성 설사와 대장염, 소변불리 등에 사용되었다^{17,18}. 이러한 위령탕은 고지혈증, 신장염¹⁹ 및 당뇨병성 신장손상¹⁸에 대한 효과가 있다는 보고가 되어있다. 이와 같이 위령탕에 대한 선행연구가 보고되었으나 LPS로 유도된 마우스 대식세포에서 항염증반응 및 염산/에탄올을 이용한 위염 모델에 대한 연구는 진행되지 않았다.

이에 본 연구에서는 위령탕의 제형개발과 함께 항염증 및 항위염에 대한 효과를 확인하고자 위령탕 혼합단미연조엑스를 개발하여 LPS로 유도한 대식세포에서 NO, 전염증성 사이토카인의 발현 및 염산/에탄올을 이용한 위염 모델에서 위점막의 개선효과를 조사하여 유의성 있는 결과를 확인하였기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 연구에 사용된 위령탕의 한약재 구성 및 용량은 Table 1과 같다. 이 한약재들은 동일약업사 (Daegu, Korea)에서 구입하여 전문가의 감별 후 사용되었다. 위령탕의 구성 한약재들의 표본은 한국한의약진흥원 한의기술R&D2팀의 한약재보관실에 보관하였다.

*Corresponding author: Jung-Ok Kim, National Institute for Korean Medicine Development, 94, Hwarang-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38540, Republic of Korea.

Tel : +82-53-810-0395, E-mail : kjo1226@nikom.or.kr

•Received : November 12, 2020 / Revised : November 23, 2020 / Accepted : November 27, 2020

Table 1. Composition of Wiryeong-tang

Name	Amount (g)	Yield (%)	Soft extract (g)	Solid content (%)
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	0.63	16.9	0.24	45.0
<i>Cinnamomum cassia</i> Presl	0.63	3.2	0.07	30.0
<i>Zizyphus jujuba</i> MILL	0.67	36.4	0.49	50.0
<i>Paeonia lactiflora</i> PALL	1.25	17.0	0.43	50.0
<i>Atractylodes japonica</i> Koidzumi	1.25	23.0	0.48	60.0
<i>Zingiber officinale</i> ROSCOE	0.50	3.5	0.12	15.0
<i>Polyporus umbellatus</i> Fries	1.25	1.7	0.14	15.0
<i>Poria cocos</i> Wolf	1.25	1.0	0.03	50.0
<i>Citrus unshiu</i> MARKOVICH	1.25	20.0	0.50	50.0
<i>Atractylodes chinensis</i> Koidzumi	1.25	24.0	0.46	65.0
<i>Alisma canaliculatum</i> ALL. BR. et BOUCHE	1.25	10.3	0.23	55.0
<i>Machilus thunbergii</i> S. et Z.	1.25	5.0	0.14	45.0
Total amount	12.43		3.33	

2) 시약

연조엑스 제조를 위한 sodium-benzoate, β-cyclodextrin, xylitol 및 CMC-Na는 (주)화원약품 (Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

시료 전처리 및 HPLC 분석을 위해 아세토니트릴과 메탄올은 액체크로마토그래피용 (J.T. Baker, USA)으로 구입하였으며, phosphoric acid는 Junsei (Japan)에서 구입하여 사용하였다.

표준물질로 사용된 5-hydroxymethylfurfural, 3,4-dihydroxybenzaldehyde, paeoniflorin, hesperidin, cinnamic acid, glycyrrhizic acid, 6-gingerol 및 honokiol은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였으며, YMC C18 (5, 4.6×250 mm, phenomenex, Torrance, CA, USA) column으로 분리하였다.

세포배양을 위해 DMEM/high glucose (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin은 Hyclone (Logan, UT, USA), lipopolysaccharide (LPS), ethanol, chloroform, griess reagent는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 사이토카인의 검출을 위한 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit는 R&D system (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하여 사용하였다. RNA 추출 및 DNA 합성 키트는 각각 Takara (Shiga, Japan)에서, cDNA 합성과 PCR에 사용한 모든 시약은 iNtRON (Seongnam, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

동물실험을 위한 hydrochloric acid은 Wako Pure

Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였다.

3) 위령탕 혼합단미연조엑스의 제조

위령탕 혼합단미연조엑스를 제조하기 위해 Table 1과 같이 구성약재별로 각각의 중량의 10배에 해당하는 정제수를 넣고 100℃에서 3시간 추출 여과 후, 농축하여 각각의 연조엑스 (soft extract)를 얻은 후 구성 한약재의 비율에 따라 혼합하여 혼합단미연조엑스를 얻었다. 혼합비율은 Table 2와 같다.

Table 2. Composition contents of Wiryeong-tang mix soft extract

Name	Content (g)	Ratio (%)
Wiryeong-tang soft extract	3.330	41.62
Sodium benzoate	0.005	0.06
β-Cyclodextrin	0.400	5.00
Xylitol	0.400	5.00
CMC-Na	0.064	0.80
D.W	3.801	47.52
Total amount	8.000	100

4) 세포배양

RAW 264.7 세포는 마우스 대식세포주로 한국세포주은행 (KCLB : Seoul, Korea)으로부터 분양받았다. 세포배양을 위해 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 DMEM/high glucose 배지를 사용하였다. 세포는 37℃, 5% CO₂

조건에서 배양하였다.

5) 실험동물

ICR 마우스 6주령 수컷 30마리를 중앙실험동물에서 구입하여 1주일 동안 한국한약진흥원 동물실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육조건은 conventional system으로 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, 명암주기 (light : dark cycle)는 12 시간 주기로 조절하였다. 고형사료와 물을 충분히 공급하였다.

2. 방법

1) 시료 및 제조

효능평가를 위해 50% DMSO에 위령탕 제제를 100 mg/mL로 맞춘 후 0.2 μm membrane 여과 후 시료로 사용하였다.

2) 성분분석

지표물질의 8종은 methanol을 용매로 1 mg/mL의 농도로 제조하여 4°C 에 보관하였다. 각 지표물질을 혼합하여 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 희석하여 표준액으로 사용하였다. 위령탕 혼합단미연조엑스 1회 해당량을 칭량한 후 100 mL의 50% methanol을 첨가하여 30분간 초음파 추출한 후 원심분리된 상층액을 0.2 membrane으로 여과 후 검액으로 사용하였다. 유속 1.0 mL/min으로 하였고 시료 주입량은 10 μL 였다. 8종 지표성분의 검출은 PDA검출기로 280 nm의 파장으로 분석하였다. 이동상은 Table 3과 같이 기울기 용매 조건으로 최적의 분리조건을 확립하였다.

Table 3. Solvent gradient conditions for HPLC-PDA analysis

Time (min)	Solvent A*	Solvent B [†]
0	95	5
10	95	5
15	87	13
50	68	32
75	25	75
80	25	75

*A : 0.05% H_3PO_4 in water [†]B : 0.05% H_3PO_4 in acetonitrile

3) 세포실험

RAW 264.7세포에서 염증의 유발로 인한 항염증 실험을 진행하기 위해 위령탕 혼합단미연조엑스 (50,

100 and 200 $\mu\text{g/mL}$)와 dexamethasone (10)을 LPS 처리 1시간 전에 전처리하였으며, LPS는 위령탕 연조엑스와 dexamethasone을 처리 1시간 후 처리하여 6 그리고 24시간 배양하여 실험을 진행하였다.

4) MTT 분석

RAW 264.7 cell의 세포 생존율은 MTT 환원으로 인한 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물을 측정하는 MTT 분석법을 사용하였다. 위령탕 혼합단미연조엑스를 여러 가지로 농도로 처리하였으며, 24시간 동안 배양하였다. 5 mg/mL의 농도로 MTT용액을 첨가하여 30분 동안 배양하였다. MTT-formazan의 생성물은 DMSO를 첨가하여 용해하였다. Formazan의 양은 용해액을 96 well plate에 loading 후, 540 nm에서 흡광도로 측정하였다. 세포의 생존율은 어떠한 처치도 가하지 않은 control cell 과의 비율로 나타내었다.

5) Nitric oxide (NO) 농도의 측정

세포의 상층액을 획득하여 96 well plate에 loading한 다음 griess reagent를 이용하여 측정하였다. 570 nm에서 흡광도로 측정하였다. NO 생성량을 백분율로 나타내었다.

6) Cytokine 측정

세포 상층액에서 전염증성 사이토카인의 염증매개 물질은 ELISA법으로 정량하였다.

7) Total RNA 추출

세포를 포집하여 RNA iso reagent 500 μL 을 이용하여 세포를 포집한 후, 200 μL 의 chloroform용액을 가하고 잘 섞어준 뒤 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 취한다. 그 후 isopropanol과 1:1로 섞은 후 10분간 상온보관후 15,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 남은 침전물을 80% ethanol로 2회 씻은 후 침전물을 건조시켰다. 그리고 침전물에 DEPC 처리한 증류수를 15 μL 씩 넣어 RNA를 용해시켜 정량하였다. RNA는 Maxime RT premix kit (iNtRON, Seongnam, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였고 유전자 증폭을 위해 특정 primer를 넣고 각 primer에 따른 PCR 조건에 따라 실시하였다. 사용한 primer는 다음과 같다.

IL-1 β	F : 5'-TCATTACACAGGACAGGTAT-3'
	R : 5'-CATTAACAACACTGCACTACA-3'
IL-6	F : 5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAG-3'
	R : 5'-GGAAATTGGGGTAGGAAGGA-3'
TNF- α	F : 5'-GGCAGGTCTACTTTGGAGTC-3'
	R : 5'-ACATTTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG-3'
GAPDH	F : 5'-CAACTCCCACTCTTCCACCT-3'
	R : 5'-CTTGCTCAGTGTCTTGGCTG-3'

각 DNA는 1.5% agarose gel에 전기영동시킨 후 UV 검출기로 확인하였다.

8) 150 mM HCl/60% ethanol 유도 급성 위염

ICR 마우스를 군당 6마리씩 3그룹으로 구분하여 실험을 실시하였다. 위점막 손상 유발 실험 24시간 전부터 절식시킨 후, 실험 전에 정상군과 위점막 손상 대조군은 증류수를 경구투여하였고, 위령탕 혼합단미연조엑스 (133 mg/kg; 1회 복용량)는 증류수에 희석하여 3일간 경구투여하였으며, 마지막 투여 한 후 1시간 후 위점막 손상을 유발하기 위하여 150 mM HCl/60% ethanol을 각 0.5 mL 씩 경구투여한 다음 한 시간 후 회복하여 위 조직을 적출하였다.

9) 통계처리

모든 실험 결과는 3회 이상 실시하여 그 평균값을 기초로 Mean \pm S.D.로 나타내었다. 실험결과에 대한 통계처리는 SPSS 분석프로그램으로 one way ANOVA test를 실시한 후 Turkey test로 사후 검증하였다. *P*-value가 0.05, 0.01 그리고 0.001 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

III. 연구결과

1. 위령탕 혼합단미연조엑스 (WRT-mse)의 성분분석

위령탕의 구성 한약재 중 복령의 5-hydroxymethylfurfural, 저령의 3,4-dihydroxybenzaldehyde, 작약의 paeoniflorin, 진피의 hesperidin, 육계는 cinnamic acid, 감초의 glycyrrhizic acid, 생강의 6-gingerol 및 후박의 honokiol 등 총 8종의 지표물질에 대한 동시분석법을 확립하였다 (Fig. 1). 각 지표물질을 설정하여 최적분석파장은 280 nm로 위령탕 혼합단미연조엑스와 표준액 8종의 피크의 UV spectrum 탐색 결과, 모두 동일한 스펙트럼으로 각기 다른 성분들의 피크에 간섭없이 분리됨을 확인하였다.

2. 위령탕 혼합단미연조엑스 (WRT-mse)의 RAW 264.7 세포에 대한 독성

위령탕 혼합단미연조엑스의 RAW 264.7 세포에서 세포 독성에 영향을 주는 농도 구간을 조사하기 위해 위령탕 혼합단미연조엑스를 25~200 μ g/mL 24시간 처리하여 MTT 방법을 이용한 세포의 생존율을 측정하였다. 그 결과 위령탕 혼합단미연조엑스 200 μ g/mL 농도까지 세포 독성을 보이지 않았다. 이에 본 연구에서는 200 μ g/mL까지 농도를 사용하였다 (Fig. 2).

3. 위령탕 혼합단미연조엑스 (WRT-mse)가 NO 생성에 미치는 영향

위령탕 혼합단미연조엑스의 항염증 효과를 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 위령탕 혼합단미연조엑스를 1시간 전처리 한 후, LPS로 24시간 동안 자극하여 유도된 염증 매개 물질인 NO의 생성에 미치는 영향을 확인하였다. Griess 반응을 통해 NO의 생성을 측정된 결과 LPS의 자극은 NO의 생성을 증가시켰으며, 위령탕 혼합단미연조엑스를 전처리하는 농도의존적으로 NO의 생성을 억제하는 것으로 확인하였다 (Fig. 3). Dex와 위령탕 혼합단미연조엑스의 NO 생성 억제를 비교했을 때, 위령탕 혼합단미연조엑스 200 μ g/ml에서 유의적으로 더 억제하였다.

4. 위령탕 혼합단미연조엑스 (WRT-mse)의 단백질 수준에서 전 염증성 사이토카인의 생성에 미치는 영향

위령탕 혼합단미연조엑스가 RAW 264.7 세포에서 전염증성 매개물질에 미치는 영향을 조사하기 위해 단백질 수준에서 염증성 사이토카인을 측정하였다. 위령탕 혼합단미연조엑스를 1시간 전처리 한 후 LPS를 24시간 동안 자극으로 전 염증성 사이토카인의 생성에 미치는 영향을 확인하였다. LPS의 자극은 단백질 수준에서 전 염증성 사이토카인이 증가하였으며, 위령탕 혼합단미연조엑스의 전처리하는 농도의존적으로 전 염증성 사이토카인의 생성을 농도의존적으로 억제하는 것으로 확인하였다 (Fig 4). Dex와 위령탕 혼합단미연조엑스의 전 염증성 사이토카인의 억제를 비교했을 때, 위령탕 혼합단미연조엑스 100 그리고 200 μ g/mL에서 유의적으로 더 억제하였다.

5. 위령탕 혼합단미연조엑스 (WRT-mse)의 mRNA 수준에서 전 염증성 사이토카인 (IL-1 β , IL-6 및 TNF- α)의 생성에 미치는 영향

위령탕 혼합단미연조엑스는 RAW 264.7 세포에서 전 염증성 사이토카인들을 단백질 수준에서 억제하였음을 확인하여 mRNA 수준에서도 전 염증성 사이토카인의 활성을 억제할 수 있는지 확인하였다. 위령탕 혼합단미연조엑스를 1시간 전처리한 후 LPS를 6시간 동안 자극하여 mRNA 수준에서 전 염증성 사이토카인의 생성에 미치는 영향을 확인하였다. LPS의 자극은 mRNA 수준에서 전 염증성 사이토카인이 증가하였으며, 위령탕 혼합단미연조엑스를 전 처리 하였을 때 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 mRNA 발현은 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인하였다 (Fig 5).

6. 위령탕 혼합단미연조엑스 (WRT-mse)에 의한 위 점막 손상 및 전 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향

위령탕 혼합단미연조엑스 (WRT-mse)가 150 mM HCl/60% ethanol으로 유도한 급성위염에 대한 개선 효과를 확인하였다. 먼저 위 점막의 손상 정도를 육안으로 확인한 결과 정상군 그룹 (Fig. 6A)의 위 점막은 손상이 일어나지 않았다. 하지만 150 mM HCl/60% ethanol을 유도된 급성위염 그룹 (Fig. 6B)에서 위 점막의 손상으로 출혈이나 부종이 증가하는 것을 확인하였다. 위령탕 혼합단미연조엑스를 처리한 그룹 (Fig. 6C)에서는 위 점막의 손상으로 출혈 및 부종이 개선됨을 확인할 수 있었다. 또한, 위 조직에서 단백질 수준에서 전 염증성 사이토카인의 발현을 확인한 결과 급성위염에 증가한 염증성 사이토카인 (IL-1 β , IL-6 및 TNF- α)는 위령탕 혼합단미연조엑스를 처리하였을 때 억제되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 6D).

IV. 고찰

한약제제는 사용되는 원료, 추출방법, 제형 등에 따라 차이가 있어 품질과 효능에 대한 논란이 빈번하게 제기되어 왔다.

본 연구에서는 위령탕의 혼합단미연조엑스의 제형 개발을 통해 위령탕을 구성하는 한약재의 성분을 분석하고 효능에 대한 평가를 통해 위령탕제제의 표준

화를 위한 기초자료를 확보하고자 하였다. 주요성분과 효능에 대한 평가를 진행하였다. 위령탕 혼합단미연조엑스의 주요성분 분석을 위해 8종의 지표성분 즉, 5-hydroxymethylfurfural, 3,4-dihydroxybenzaldehyde, paeoniflorin, hesperidin, cinnamic acid, glycyrrhizic acid, 6-gingerol, honokiol을 동시에 효과적으로 분석하는 동시분석법을 확립하였다. 위령탕의 주요성분의 동시분석법은 기존의 지표성분들을 개별적으로 분석하는 것보다 효율적인 분석이 가능하여 품질관리를 위한 기초자료로 사용될 수 것으로 사료된다.

염증반응이 일어나게 되면 대식세포와 같은 염증세포들은 NO를 생성하게 되며 통증, 부종, 열과 같은 염증반응이 일어나면 염증매개인자들이 생성된다⁸⁾. NO는 NO synthase (NOS)의해 L-arginine으로부터 생산되며, 특히 LPS의 자극은 대식세포에서 iNOS 활성에 의해 NO가 생성되어 면역반응에 관여하는 것으로 알려져 있다²⁰⁻²²⁾. LPS의 자극에 의해 발현되는 염증매개인자들은 염증질환들에 관여하게 된다. 또한, 염증을 나타내는 지표로 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 와 같은 전 염증성 사이토카인은 다양한 염증매개체들을 유도하거나 면역반응의 조절에 있어 중요한 역할을 한다⁸⁾. 본 연구의 결과에 따르면, RAW 264.7 세포에서 위령탕 혼합단미연조엑스를 세포에 독성이 없는 농도 범위의 설정으로 염증 반응에 중요한 매개체인 NO의 생성 및 전 염증성 사이토카인 (IL-1 β , IL-6 및 TNF- α)의 분비를 효과적으로 억제하여 위령탕 혼합단미연조엑스의 항염증 효과에 대한 우수함을 확인하였다. 염증억제제인 Dexamethasone 과 위령탕 혼합단미연조엑스를 비교하였을 때 200 μ g/ml에서 NO의 생성 및 전 염증성 사이토카인의 생성의 억제에 대한 효능이 더 우수한 것으로 확인하였다.

위염의 통증은 상부 중앙 복부에서 일어나 메스꺼움, 구토 및 체중감소 등의 증상들이 흔하게 일어난다고 보고되어 있으며, 위산, 알코올 및 각종 약물 등에 의해 위점막의 손상으로 출혈 및 염증이 나타나는 염증성 질환이다^{23,24)}. 동물을 이용한 실험모델에서 염산/알코올을 이용한 위벽의 손상으로 출혈과 직접적인 위 손상을 관찰할 수 있다¹⁵⁾. Ethanol은 위 점막의 자극으로 출혈과 손상을 유발하고 HCl은 위의 운동을 촉진하여 위의 상태를 악화시키는 것으로 알려져 있다²⁵⁾. 위령탕 혼합단미연조엑스를 3일간 전처

리하고 1시간 후 150 mM HCl/60% ethanol을 경구 투여 후 부검을 통하여 위 조직을 육안으로 관찰한 결과 위령탕 혼합단미연조엑스는 위 점막의 손상으로 출혈 및 부종을 개선하며 또한, 위 조직의 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인을 유의성 있게 억제하여 위령탕 혼합단미연조엑스가 급성 위염에 대한 항위염 효과가 우수함을 확인하였다.

이와 같은 결과로써, 위령탕의 제형개발을 통해 보관 및 복용의 편의성이 높은 연조엑스제로 개발하여 위령탕 혼합단미연조엑스의 주요성분과 효능을 확인하였다. 본 실험 결과로 얻어진 위령탕의 주요성분의 동시분석법과 효능평가의 결과는 다양한 처방의 한약 제제의 제형개발과 표준화 연구를 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

V. 결론

본 연구에서는 위령탕을 보관 및 복용의 편의성이 좋은 연조엑스로 제형을 개발을 하였고, HPLC-PDA를 통한 주요성분을 분석 및 효능 평가를 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 위령탕 혼합단미연조엑스 (WRT-mse)의 품질관리를 위하여 HPLC-PDA를 이용하여 위령탕의 8가지 지표성분인 5-hydroxymethylfurfural, 3,4-dihydroxybenzaldehyde, paeoniflorin, hesperidin, cinnamic acid, glycyrrhizic acid, 6-gingerol, honokiol의 동시분석법을 확립하였다.
2. 위령탕 혼합단미연조엑스 (WRT-mse)는 농도의존적으로 NO의 생성을 억제하였다.
3. 위령탕 혼합단미연조엑스 (WRT-mse)는 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인의 생성을 단백질 및 mRNA 수준에서 억제하였다.
4. 위령탕 혼합단미연조엑스 (WRT-mse)는 150 mM HCl/60% ethanol으로 유도한 급성위염에서 위점막의 손상으로 인한 출혈 및 부종을 개선하였다.
5. 위령탕 혼합단미연조엑스 (WRT-mse)는 150 mM HCl/60% ethanol으로 유도한 급성위염조직에서 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인의 생성을 단백질수준에서 억제하였다. 이상의 결과로 위령탕 혼합단미연조엑스 (WRT-mse)

의 주요성분에 대한 동시분석법과 항염증 및 항위염 효과는 다양한 한약제제에 대한 품질관리 및 제형개발을 위한 연구에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. Kim MR, Kang OH, Kong R, Seo YS, Zhou T, Kim SA, Kim ES, et al. The study of anti-inflammatory effect of Hyeonto-dan extract in RAW 264.7 macrophage. *Kor. J. Herbology.* 2017 ; 32(2) : 77-85.
2. Laroux FS. Mechanisms of inflammation : the good, the bad and the ugly. *Front. Biosci.* 2004;9:3156-3162.
3. Behrens EM. Macrophage activation syndrome in rheumatic disease: what is the role of the antigen presenting cell?. *Autoimmun Rev.* 2008;7(4):305-308.
4. Kim MJ, Bae GS, Choi SB, Jo IJ, Kim DG, Shin JY, et al. The anti-inflammatory effect of *Taraxacum coreanum* on lipopolysaccharide induced inflammatory response on RAW 264.7 cells. *Kor. J. Herbology.* 2014 ; 29(6) : 21-26.
5. Kuzmich NN, Sivak KV, Chubarev VN, Porozov YB, Savateeva-Lyubimova TN, Peri F. TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis. *Vaccines.* 2017;5(4):34.
6. Jung JY, Byun SH, Park CA, Cho IJ, Kim SC. Anti-inflammatory effects of *Epimedium* Herba water extract through inhibition of nuclear factor- κ B in RAW 264.7 Cells. *Kor. J. Herbology.* 2018 ; 33(2) : 19-28.
7. Kim DH, Park SJ, Jung JY, Kim SC, Byun SH. Antiinflammatory effects of the aqueous extract of *Hwangnyenhaedok-tang* in LPS- activated macrophage cells. *Kor J Herbology.* 2009 ; 24(4):39-47.
8. Choi SB, Bae GS, Jo IJ, Park KC, Seo SH, Kim DG, et al. The anti-inflammatory effect of *Lithospermum Erythrorhizon* on lipopolysaccharide - induced inflammatory response in RAW 264.7

- cells. Kor. J. Herbology. 2013 ; 28(2) : 67-73.
9. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. Proc Soc Exp Biol Med. 1996 ; 211(1):24-32.
 10. Hwang DH, Kang MJ, Jo MJ, Seo YB, Park NG, Kim GD. Anti-inflammatory activity of β -thymosin peptide derived from Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) on NO and PGE₂ production by down-regulating NF- κ B in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells. Mar Drugs. 2019;17(2):129.
 11. Kim HJ, Han JS, Kim SH, Park HJ, Park HS, Ko MK et al. Study on the effects of natural herb extract against acute gastritis induced by HCl-ethanol in SD rats. Journal of Animal Assisted Psychotherapy. 2017;6(1):55-67.
 12. Kim OK, Nam DE, You YH, Jun WJ, Le JM. Protective effect of *Canavalia gladiata* on gastric inflammation induced by alcohol treatment in rats. J Korean Soc Fod Sci Nutr. 2013;42(5):690-696.
 13. Lee JJ, Choi HS, Lee JH, Jung CJ, Lee MY. The effects of ethylacetate fraction of *Sanguisorba officinalis* L. on Experimentally-induced acute gastritis and peptic ulcers in rats. J Korean Soc Fod Sci Nutr. 2005; 34(10):1545-1552.
 14. Lee AR, Lee JY, Kim MY, Shin MR, Shin SH, Seo B, et al. Protective effects of a *Lycium chinense* ethanol extract through anti-oxidative stress on acute gastric lesion mice. Kor J Herbology. 2015 ; 30(6) : 63-68.
 15. Jeong CS, Hyun JE, Kim YS. Anti - oxidative effect of Ginsenoside Rb1 on the HCl, ethanol - induced gastric tissue in rats. Kor. J. Pharmacogn. 2002;33(3):252-256.
 16. Kim MG, Lee YJ, Choi ES, Yoon JJ, Han BH, Kang DG, et al. Wiryeongtang regulates hypertonicity-induced expression of aquaporin-2 water channels in mIMCD-3 cells. MOLECULAR MEDICINE REPORTS. 2017;15(5):2665-2672.
 17. Yoon JJ, Han BH, Choi ES, NamGung S, Jeong DH, Kin HY, et al. Wiryeongtang attenuates diabetic renal dysfunction in human renal mesangial cels. Kor J Herbology. 2016 ; 31(5) : 71-78.
 18. Yun GY. Oriental herbal formula science. Seoul, Publisher myeongbo. 1985;198-204.
 19. Jang HJ, Shin GC, Le WC. Effect of Wiryeongtang on triton WR-139-induced hyperlipidemia rat. J of Oriental Chr Dis. 1988;4(1):98-121.
 20. Kwqamata H, Ochiai H, Mantani N, terasawa K. Enhanced expression of inducible nitric oxidied RAW264.7 cells, a murine macrophage cell line. Am J Chin Med. 2000;28(02):217-226.
 21. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxidied biosynthesis in RAW264.7 macrophages. Life Sci. 2001;69(6):625-635.
 22. Kim MS, Jeong JS, Lee HY, Ju YS, Bae GS, Seo SW, et al. The anti-inflammatory effect of *Achyranthes japonica* on lipopolysaccharide-induced inflammatory activity in murine macrophages. Kor. J. Herbology. 2011;26(2):51-57.
 23. Lee JA, Kim SH, Kim MJ, Ahn JH, Park HJ, Lee WR, et al. Protective effects of *Chrysanthemi indici* Flos extract and Flaxseed oil mixture on HCl/ethanol-induced Acute Gastric Lesion Mice. Kor J Herbology. 2018 ; 33(6) : 19-28.
 24. Park IJ, Yun SH, Choi GH, Kim HJ, Seo YH, Cho JH. Protective effect of *Litsea japonica* fruit flesh extract on stress- induced gastritis in rats. J. Food Hyg. Saf. 2017;32(6):536-541.
 25. Hong SH, Lee HA, Lee YS, Kim DW, Oh GW, Woo JW, et al. Protective effect of halophyte *Salsola komarovi* ljin against gastric ulcer Induce by alcohol treatment in rats. J Biomed Res. 2014;15(4):170-175.

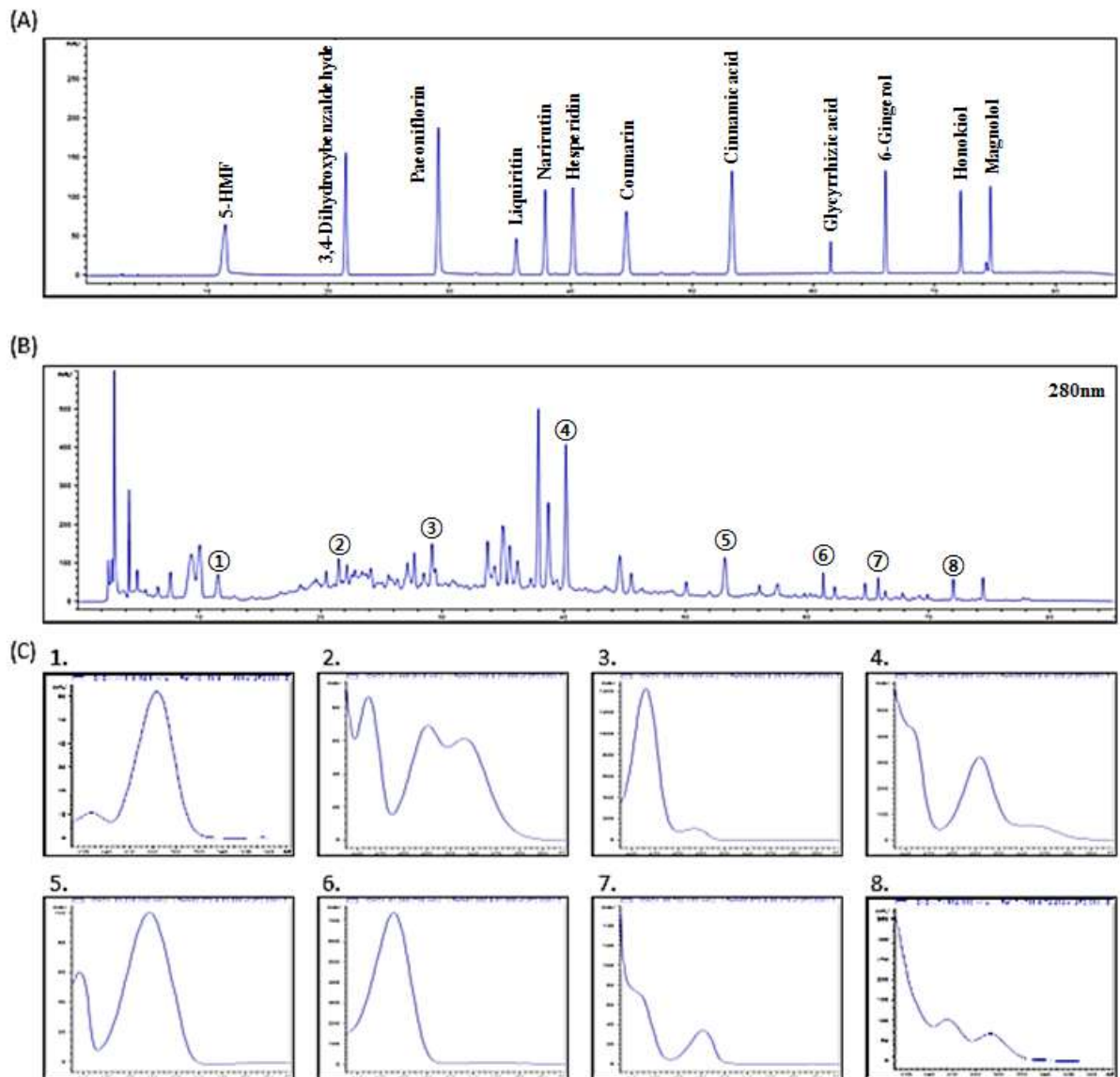


Fig. 1. Simultaneous analysis used HPLC method. (A) Wiryeong-tang standard mixture and (B) Wiryeong-tang mix soft extract (WRT-mse) are HPLC chromatogram. (C) Identification of the ingredients used to compare with the UV spectrum of WRT-sf and standard mixture ; 1. 5-hydroxymethylfurfural, 2. 3,4-dihydroxybenzaldehyde, 3. paeoniflorin, 4. hesperidin, 5. cinnamic acid, 6. glycyrrhizic acid, 7. 6-gingerol 8. honokiol.

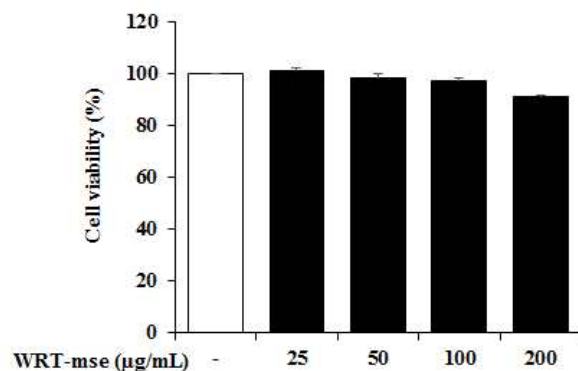


Fig. 2. The effect of Wiryeong-tang mix soft extract (WRT-mse) on cytotoxicity in RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cells were incubated with Wiryeong-tang mix soft extract at indicated dose for 24 hrs. The cell viability was measured by MTT assay. The similar results were obtained in three experiments.

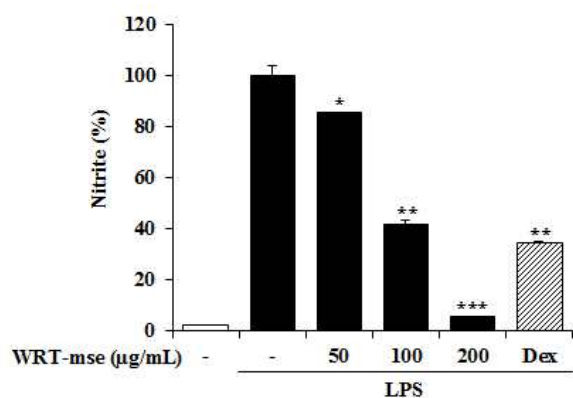


Fig. 3. The effect of Wiryeong-tang mix soft extract (WRT-mse) on NO production by LPS induction in RAW 264.7 cells. The cells were treated of Wiryeong-tang mix soft extract at indicated concentration for 1 hrs and then incubated with LPS for 24 hrs. NO was measured by Griess reagent. The similar results were obtained in three experiments. LPS treatment alone vs * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. “Dex” is “Dexamethasone”

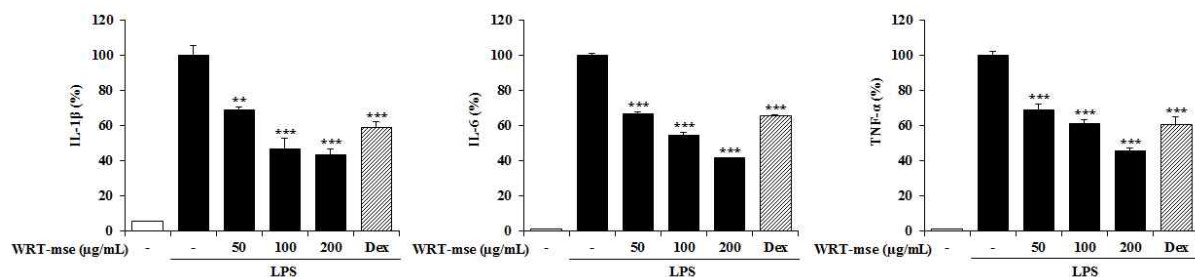


Fig. 4. The effect of Wiryeong-tang mix soft extract (WRT-mse) on production of cytokine (IL-1 β and IL-6) in RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated Wiryeong-tang mix soft extract at indicated concentrations for 1hrs and then incubated with LPS for 24 hrs. Inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α were measured by ELISA. The similar results were obtained in three experiments. LPS treatment alone vs * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

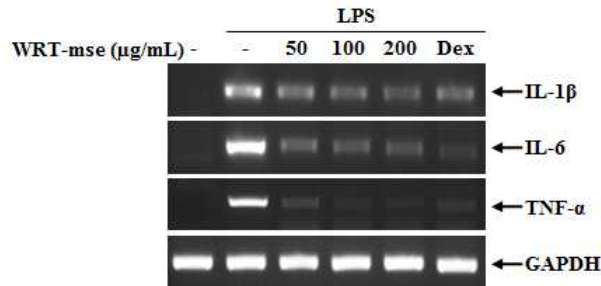


Fig. 5. The effect of Wiryeong-tang mix soft extract (WRT-mse) on inflammatory cytokines at the levels of mRNA. The cells were pre treated Wiryeong-tang mix soft extract at indicated concentration for 1 hrs, and then incubated with LPS for 6 hrs. The levels of mRNA IL-1 β , IL-6 and TNF- α was measured by RT-PCR. Representative RT-PCR of at least three separate experiments are shown.

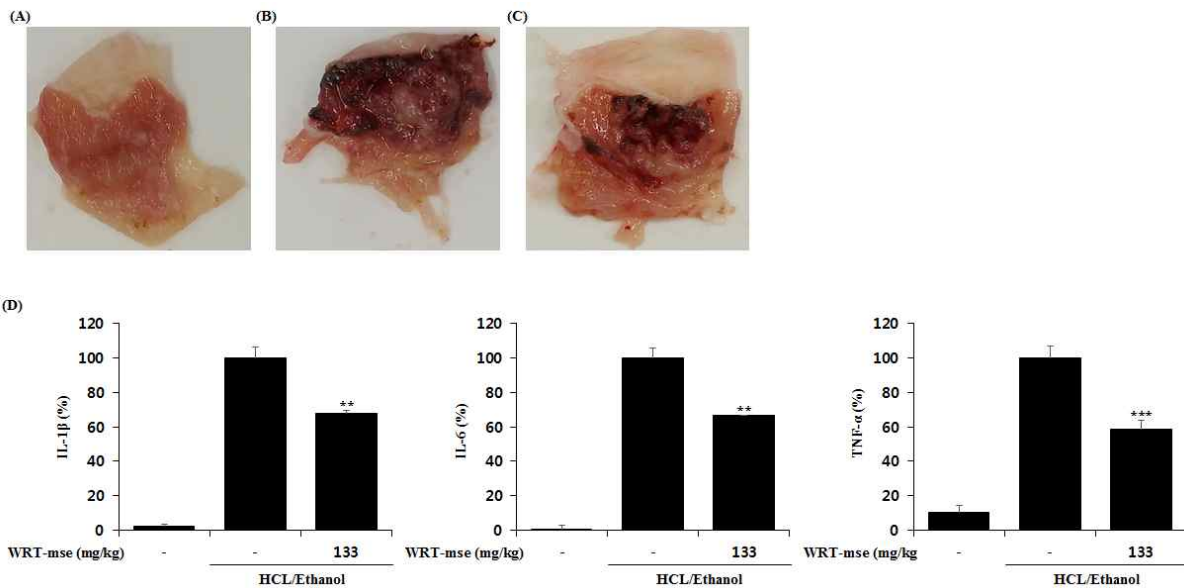


Fig. 6. Effect of Wiryeong-tang mix soft extract (WRT-mse) on 150 mM HCl/60% ethanol-induced gastritis. (A) Normal, normal mice, (B) 150 mM HCl/60% ethanol-induced gastritis control mice administered with distilled water, (C) 150 mM HCl/60% ethanol-induced gastritis mice administered 133 mg/kg Wiryeong-tang mix soft extract, (D) The protein levels of the gastric tissues of IL-1 β , IL-6 and TNF- α were measured by ELISA. All data show the mean \pm S.D. for 6 mice for each group. The similar results were obtained in three experiments. 150 mM HCl/60% ethanol treatment alone vs * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.