

육군자탕의 정제 개발과 성분함량 및 약리효과 평가

김명진[#], 최혜민, 유병우, 홍영주, 라채숙, 김민주, 김정옥^{*}

한국한의학진흥원

Development of tablets and evaluation of ingredient content and pharmacological effects of Yukgunja-tang

Myoung-Jin Kim[#], Hye-min Choi, Byung-Woo Yu, Young-Ju Hong
Chae-Suk Ra, Min-Ju Kim, Jung-Ok Kim^{*}

National Institute for Korean Medicine Development, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38540, Korea

ABSTRACT

Objective : Yukgunja-tang is one of the herbal prescriptions widely used for functional indigestion. In this study, we evaluated the pharmacological effect through the Yukgunja-tang formulation development.

Methods : The RAW 264.7 cells were pretreated with Yukgunja-tang tablet (YGJT-T : 50, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and then stimulated with lipopolysaccharide (LPS : 500 ng/ml). Cell viability, inflammatory mediators such as nitric oxide (NO) and prostaglandin E_2 (PGE_2) and inflammatory cytokines (IL- 1β , IL-6, and TNF- α) were measured. Also, ICR mice induced acute gastritis by oral administration of 150 mM HCl in 60% ethanol. The YGJT-T (30 mg/kg) was pretreated for 3 days, and 150 mM HCl in 60% ethanol was orally administered 1 hour after the last drug treatment. Mice were sacrificed 1 hour after oral administration of 150 mM HCl in 60% ethanol. The gastric mucosa was observed, and inflammatory cytokines in the gastric tissue were measured.

Results : The marker components of YGJT-T were determined by simultaneous analysis using HPLC. In RAW 264.7 cells, pretreatment of YGJT-T was non-toxic and inhibited the production of inflammatory mediators such as NO and PGE_2 and suppressed inflammatory cytokines. In addition, pretreatment of YGJT-T improved bleeding and edema due to gastric lesions caused by acute gastritis and suppressed inflammatory cytokines.

Conclusion : In summary, our results confirmed that treatment with YGJT-T has anti-inflammatory and anti-gastritis effects in vitro and in vivo. Therefore, in this study, YGJT-T could support a potential strategy for the prevention and treatment of gastritis.

Key words : Yukgunja-tang tablet (YGJT-T), lipopolysaccharide (LPS), pro-inflammatory cytokines, acute gastritis, anti-inflammatory, anti-gastritis

I. 서 론

한약은 수천 년 동안 사용됐지만, 과학적으로 안정성 및 유효성이 검증되지 않아 국민의 신뢰를 확보하지 못하고 있다. 따라서 본 연구는 한약탕제와 개발 제형의 화학적 동등성 평가

및 효능 분석으로 개발 제형의 안정성 및 유효성에 대한 과학적 근거 마련하고자 하였다. 또한, 국내 한약제제에 대한 소비자 만족도 조사를 한 결과 한약 및 한약제제 시장은 소비자시장 성과지수에서 가장 낮은 평가를 받았다. 이는 한약제제가 전통적인 탕제, 환제로 국한되어 있어 복용 및 휴대의 불편함으로

*Corresponding author : Jung-Ok Kim, National Institute for Korean Medicine Development, Gyeongsan-si, Gyeongbuk 712-260, Korea.
· Tel : +82-53-810-0395 · E-mail : kjo1226@nikom.or.kr

#First author : Myoung-Jin Kim, National Institute for Korean Medicine Development, Gyeongsan-si, Gyeongbuk 712-260, Korea.
· Tel : +82-53-810-0367 · E-mail : widebody@naver.com

· Received : 10 Nov 2020 · Revised : 05 Jan 2021 · Accepted : 25 Jan 2021

인한 것으로 조사되어 졌다. 액상형태로 되어 있는 한약탕제는 체내의 흡수가 용이하다는 장점이 있지만, 지표성분 함량에 대한 표준화 및 장기 보관이 어렵고, 맛과 향으로 인하여 다양한 계층에 대한 복용순응도가 낮다는 단점이 있다. 이러한 문제점을 해결하고자 현대적인 제형인 정제, 과립제 그리고 캡슐제 등 여러 형태의 제형 연구를 통한 한약제제의 개발이 진행되고 있다¹⁾.

염증은 조직 손상, 감염 및 기타 이물질 등과 같은 다양한 자극으로 인한 방어 반응으로 과도한 염증 반응이 일어나게 되며 대식세포의 활성화로 인하여 염증성 장 질환, 죽상 동맥 경화증 및 당뇨병을 포함한 염증성 질환을 유발할 수 있다²⁻⁴⁾. 면역반응은 염증에 의해 시작되고 유지되며 내인성 또는 외인성 자극으로 대식세포의 활성화가 일어나며 염증 매개체들이 생성되지만, 대식세포 활성화의 조절은 다양한 염증성 질환의 치료를 위한 잠재력을 가질 수 있다⁵⁾. 그람 음성균의 외막의 주요 성분인 lipopolysaccharide (LPS)의 선천적 면역의 자극제 역할로 세포반응을 유도한다⁶⁾. RAW 264.7 대식세포에서 LPS의 자극은 대식세포의 활성화에 의한 염증에 관련된 연구에 많이 사용되는 모델이다⁷⁾.

소화가 질환 중 하나인 위장 질환은 세계 인구의 4~5%가 평생동안 한 번 이상 겪게 되는 흔한 질환이다⁸⁾. 위염은 염증성 질환으로 위 점막내 염증의 균형을 이루고 있는 정상적인 상태에서 소염제 등의 약물의 과다복용, 불규칙한 식습관, 비스테로이드 항염증제 (Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs/NAIDs), 스트레스, Helicobacter pylori균 감염, 펩신, 위산 및 알코올 등의 유해인자에 의한 불균형으로 발생한다^{9,10)}. 동물실험 모델에서 염산/알코올의 이용은 위벽에 출혈과 같은 손상으로 직접적인 위의 손상을 관찰할 수 있다¹¹⁾. 에탄올은 위 점막에서 H⁺-K⁺-ATP의 발현을 촉진시켜 free radical의 형성을 유도하여 항산화 인자인 catalase,

glutathione의 생성을 억제 하고 reactive oxygen species (ROS)를 형성해 항산화의 불균형을 일으키고 염증성 인자 분비 및 지질과산화물을 통한 세포막의 손상으로 위 점막의 염증이 발생하게 된다¹⁰⁻¹²⁾.

육군자탕 (六君子湯)은 동아시아 국가에서 널리 사용되는 전통 처방으로써 식욕부진, 메스꺼움과 같은 다양한 위장장애 치료에 사용되며, 일본의 캄포의학에서 Rikkunshito, 중국에서는 Liu Jun Zi Tang으로 불리며, 반하, 백출, 진피, 복령, 인삼, 감초, 생강 및 대추와 같은 8가지 약재로 구성된 처방이다.¹³⁻¹⁶⁾ 육군자탕은 위의 비우기의 촉진과 저장 능력을 유지하여 위의 운동성과 소화불량을 개선¹⁷⁻¹⁹⁾, 항암제인 Cisplatin의 유발로 인한 식욕부진을 치료하는데 효과^{20,21)}가 있으며, 또한, 수술 후 장폐색증²²⁾ 및 신장 손상²³⁾으로 인한 항염증 및 에탄올로 유발된 위병변²⁴⁾에 대한 효과가 있는 것으로 보고되어 있다.

이에 본 연구에서는 염증 및 위 병변에 효과가 있는 육군자탕을 정제로 제형변화를 통하여 현대적인 제형에 대한 연구를 진행하였으며, 동시분석법 확립을 통하여 품질관리 방법, 항염증 및 항위염 실험을 통하여 유의성 있는 결과를 확인하였기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 육군자탕의 구성 한약재 및 용량은 Table 1과 같다. 사용된 한약재들은 동일약업사 (Daegu, Korea)에서 구입하여, 육군자탕의 구성 한약재들의 표본은 한국한의학진흥원 한의기술R&D2팀의 한약재보관실에 보관하였다.

Table 1. Composition of Yukgunja-tang

| Name | Amount (g) | Yield (%) | Dry extract (g) |
|--|------------|-----------|-----------------|
| <i>Pinellia ternata</i> Thunb. | 1.88 | 15.3 | 0.288 |
| <i>Atractylodes japonica</i> Koidzumi | 1.88 | 23.0 | 0.432 |
| <i>Citrus unshiu</i> MARKOVICH | 1.25 | 20.0 | 0.250 |
| <i>Wolfiporia extensa</i> (Peck) Ginns | 1.25 | 1.0 | 0.013 |
| <i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer | 1.25 | 15.0 | 0.188 |
| <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer | 0.63 | 15.7 | 0.099 |
| <i>Zingiber officinale</i> ROSCOE. | 0.50 | 3.5 | 0.018 |
| <i>Zizyphus jujuba</i> Miller | 0.67 | 36.4 | 0.244 |
| Total amount | 9.31 | | 1.532 |

2) 시약

육군자탕 정제 제조를 위한 lactose, starch, croscamellose sodium, ludipress, SiO₂, 및 magnesium는 (주)화원약품 (Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

시료의 전처리 및 HPLC 분석을 위한 아세토니트릴과 메탄올은 액체 크로마토그래피용 (J.T. Baker, USA)으로 사용하였으며, phosphoric acid는 (Junsei, Japan)을 사용하였다. 동시분석을 위한 표준물질로 사용된 narirutin, hesperidin,

glycyrrhizic acid 및 atractylenolide III은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, YMC C18 (5 μm, 4.6×250 mm, phenomenex, Torrance, CA, USA) column으로 분리하였다.

세포배양은 DMEM/high glucose (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin은 Hyclone (Logan, UT, USA)에서 구입하였으며, lipopolysaccharide (LPS), ethanol, chloroform, griess reagent는 Sigma-Aldrich에서

구입하였다. 사이토카인의 검출을 위한 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit는 R&D system (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하여 사용하였다.

동물실험을 위한 hydrochloric acid은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였다.

3) 육군자탕 단미엑스산 및 정제 제조

육군자탕 단미엑스산을 제조하기 위해 Table 1에 구성된 개별 약재를 약탕기 (대웅약탕기, 서울, 한국)로 중량의 10배에 해당하는 정제수를 넣고 100℃에서 3시간 개별 추출하였다. 추출액은 Whatman filter paper No. 4 (25 μm)로 여과 후, 농축한 연조엑스를 얻은 것으로 분부건조기 (Seogang Eng., 충남, 천안)로 건조하여 각각의 건조엑스를 얻었다. 건조된 각각

의 약재의 건조엑스를 대한민국의약품(생약)규격집 (KHP, The Korean Herbal Pharmacopoeia) 기준에 따라 혼합하여 사용하였다.

육군자탕 정제 제조를 위한 구성 한약재 각각의 건조엑스와 첨가제들의 혼합 비율은 Table 2에 나타내었다. 건조엑스와 첨가제들은 40 mesh sieve로 체과하여 입도를 균일화하였으며, 각각의 혼합비율에 따라 칭량한 후 균질하게 혼합하였다. 첨가제로 사용된 부형제는 lactose, 활택제는 SiO₂ 및 magnesium stearate, 붕해제로는 croscamellose sodium을 균질하게 사용하였다. 육군자탕 정제는 혼합된 건조엑스제와 첨가제들을 단발타정기 (TRB 16, Ereweka, Germany)를 이용하여 타정한 다음, 제조한 정제는 데시케이터에 보관하였다.

Table 2. Composition contents of Yukgunja-tang tablet

| Component | Type I | | Type II | | Type III | | Type IV | |
|----------------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|
| | Ratio (%) | Weight (g) | Ratio (%) | Weight (g) | Ratio (%) | Weight (g) | Ratio (%) | Weight (g) |
| YGJT powder | 85.0 | 1,532 | 85.0 | 1,532 | 85.0 | 1,532 | 85.0 | 1,532 |
| Lactose | 13.0 | 0,234 | 6.5 | 0,117 | 6.5 | 0,117 | - | - |
| Starch | - | - | 6.5 | 0,117 | - | - | 6.5 | 0,117 |
| Ludipress | - | - | - | - | 6.5 | 0,117 | 6.5 | 0,117 |
| Croscamellose sodium | 1.0 | 0,018 | 1.0 | 0,018 | 1.0 | 0,018 | 1.0 | 0,018 |
| SiO ₂ | 0.5 | 0,009 | 0.5 | 0,009 | 0.5 | 0,009 | 0.5 | 0,009 |
| Magnesium stearate | 0.5 | 0,009 | 0.5 | 0,009 | 0.5 | 0,009 | 0.5 | 0,009 |
| 합계 | 100.0 | 1,802 | 100.0 | 1,802 | 100.0 | 1,802 | 100.0 | 1,802 |

4) 세포주

RAW 264, 7는 마우스 대식세포주로 한국세포주은행 (KCLB : Seoul, Korea)으로부터 분양받아 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 DMEM/high glucose 배지를 사용하여 배양하였다. 세포는 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

5) 실험동물

ICR 마우스 6주령 수컷 30마리를 중앙실험동물에서 구입하여 한국한약진흥원 동물실험실에서 1주일 동안 환경에 적응 시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육조건은 conventional system으로 온도 23 ± 2℃, 습도 50 ± 5%, 명암주기 (light : dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였다. 고형사료와 물을 충분히 공급하였다.

2. 방법

1) 육군자탕 정제의 물성평가

육군자탕 구성 건조엑스와 첨가제 혼합물의 물성평가를 위해

겉보기 밀도 (bulk density)와 탭 밀도 (tap density)를 측정하여 흐름성을 평가하였다. 건조엑스와 첨가제 혼합물은 메스실린더에 넣어 탭 밀도를 이용하여 부피를 측정하여 나타난 겉보기 밀도와 혼합물이 들어 있는 메스실린더에 200회 tapping 한 후 측정과 Hausner ratio 값을 산출하여 흐름성을 평가하였다.

$$\text{Hausner ratio} = \frac{\rho^{\text{tapped}} (\text{탭 밀도})}{\rho^{\text{bulk}} (\text{겉보기 밀도})}$$

육군자탕 정제의 물성평가는 무게, 지름, 두께, 경도는 Hardness Tester (TBH 325, Ereweka, Germany)를 위하여 3회를 반복 측정하였다. 붕해도 평가는 disintegration tester (Disintegration 3100, DISTEK, USA)를 사용하여 37 ± 0.5℃의 정제수를 이용하여 시험하였고, 붕해시간은 유리관 안에서 검체의 잔여물이 존재하지 않거나 남아 있어도 원형의 형태를 나타내지 않는 연질의 물질이 존재하는 시간으로 나타내었다. 마손도 평가는 10개의 정제를 friability tester (TAR 120, Ereweka, Germany)에서 4분 동안 25 rpm으로 회전시킨 후, 손실된 무게를 측정하여 수식을 이용하여 계산하였다.

$$\% \text{ Friability} = \frac{\text{Initial weight of tablets} - \text{Final weight of tablets}}{\text{Initial weight of tablets}} \times 100$$

2) 성분분석

지표물질 4종은 methanol을 용매로 하여 1 mg/ml의 농도로 제조한 다음, 각 지표물질을 혼합하여 100 µg/ml 농도로 희석하여 표준액으로 사용하였다. 육군자탕 정제 1회 해당량을 칭량한 후 100 ml의 50% methanol을 첨가하여 30분간 초음파 추출한 후 원심분리된 상층액을 0.2 µm membrane으로 여과 후 검액으로 사용하였다. 유속은 1.0 ml/min으로 하였고 시료 주입량은 10 µl였다. 4종 지표성분의 검출은 PDA검출기로 230 nm의 파장으로 분석하였다. 이동상은 Table 3에 기술기 용매 조건으로 최적의 분리조건을 확립하였다.

Table 3. Solvent gradient conditions for HPLC-PDA analysis

| Time (min) | Solvent A* | Solvent B* |
|------------|------------|------------|
| 0 | 90 | 10 |
| 5 | 90 | 10 |
| 50 | 70 | 30 |
| 60 | 70 | 30 |
| 70 | 60 | 40 |
| 90 | 0 | 100 |
| 95 | 0 | 100 |

*A : 0.05% H₃PO₄ in water *B : 0.05% H₃PO₄ in Acetonitrile

3) 시료 및 제조

효능평가를 위해 50% DMSO에 육군자탕 정제를 100 mg/ml로 맞춘 후 0.2 µm membrane 여과 후 시료로 사용하였다.

4) MTT 분석

RAW 264.7 세포의 생존율은 MTT 환원으로 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛의 formazan 생성물을 측정하는 분석법이다. 세포들은 DMEM/high glucose배지에서 2×10^5 의 밀도로 현탁하여 여러 가지 농도로 YGJT-T를 24시간 동안 처리하였다. MTT용액 5 mg/ml의 농도를 첨가하여 30분 동안 배양하였다. MTT-formazan의 생성물은 DMSO를 첨가하여 용해하였으며, 96 well plate에 loading 후 540 nm 흡광도로 측정하였다. 세포의 생존율은 control cell과의 비율로 나타내었다.

5) Nitric Oxide (NO) 농도의 측정

세포들은 DMEM/high glucose배지에서 2×10^5 의 밀도로 현탁하여 여러 가지 농도의 YGJT-T를 처리하였다. LPS (500 ng/ml)로 24시간 동안 자극하여 배양한 뒤, 세포의 상층액을 획득하여 96 well plate에 50 µl 후 griess reagent (A : 0.1% n-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride, B : 1% sulfanilamide, 5% phosphoric acid)를 1:1 비율로 100 µl loading 하여 570 nm에서 흡광도로 측정하였다. NO 생성량을 백분율로 나타내었다.

6) Prostaglandin E₂ (PGE₂)의 측정

세포들은 DMEM/high glucose배지에서 2×10^5 의 밀도로 현탁하여 여러 가지 농도의 YGJT-T를 처리하였다. LPS (500 ng/ml)로 24시간 동안 자극하여 배양한 뒤, 세포의 상

층액을 획득하여 Prostaglandin E₂의 측정은 제조사의 방법에 따라 그 양을 측정하였다.

7) Cytokine 측정

세포들은 DMEM/high glucose배지에서 2×10^5 의 밀도로 현탁하여 여러 가지 농도의 YGJT-T를 처리하였다. LPS (500 ng/ml)로 24시간 동안 자극하여 배양한 뒤, 세포 상층액에서 전염증성 사이토카인은 ELISA법으로 정량하였다.

8) 150 mM HCl in 60% ethanol 유도 급성위염

ICR 마우스를 군당 6마리씩 3그룹으로 구분하여 실험을 실시하였다. 위점막 손상 유발 실험 24시간 동안 절식을 시킨 후, 실험 전에 정상군과 위점막 손상 대조군은 증류수를 경구 투여하였고, 육군자탕 정제 (30 mg/kg : 1회 복용량) 투여군은 위점막 손상 유발 전 3일간 마우스용 존대를 이용하여 1회에 0.5 ml를 경구투여하였다. 육군자탕 정제 마지막 투여 1시간 후에 150 mM HCl in 60% ethanol을 각 0.5 ml 씩 경구투여하여 위점막 손상을 유발하였으며 1시간 후 회복하여 위 조직을 적출하였다. 적출된 위 조직은 1×PBS에 조직을 담가 조직을 분쇄한 후 3,000 rpm, 4℃로 20분간 원심분리 한 후 상층액을 이용하여 전염증성 사이토카인은 ELISA법으로 정량하였다.

9) 통계처리

모든 실험 결과는 3회 이상 실시하여 그 평균값을 기초로 Mean ± S.D.로 나타내었다. 유의성 검사는 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. 결 과

1. 육군자탕 정제 (YGJT-T)의 정제 제조 및 물성평가

육군자탕 정제 (YGJT-T) 제조를 위하여 Table 2의 비율로 배합된 혼합물들의 기초 물성을 측정된 값을 Table 4에 표시하였다. 혼합물의 흐름성을 알아보기 밀도, 탭 밀도를 측정하여 Hausner ratio를 산출하여 평가하였다. Hausner ratio는 Excellent (1.00-1.11), Good (1.12-1.18), Fair (1.19-1.25), Passable (1.26-1.34), very poor (1.46-1.59), Very poor (>1.60) 등 총 7개의 등급으로 흐름성을 평가하였다. 또한, 육군자탕 정제의 첨가제 혼합비에 따른 경도, 마손도 및 봉해도를 측정하여 Table 4에 나타냈다. Type I~IV의 Hausner ratio의 값은 각각 1.09, 1.09, 1.12 및 1.09로 모두 우수하였으며, 제조된 정제의 경도는 각각 13.90, 12.15, 14.21 및 12.78 모두 10 KP 이상의 경도를 보여주었다. 봉해도를 측정한 결과 20분 이내에 모두 봉해되는 것으로 나타났다. 이상의 측정결과 우수한 제제학적 특성을 나타낸 Type I을 육군자탕 정제 제조를 위한 최적 배합비로 설정하였다.

Table 4. Post-compression parameters of Yukgunja-tang tablet

| Parameter | Type I | Type II | Type III | Type IV |
|-----------------------|-----------|-----------|----------|-----------|
| Weight variation (mg) | 600 | 600 | 600 | 600 |
| Diameter (mm) | 15.40 | 15.43 | 15.40 | 15.43 |
| Thickness (mm) | 5.63 | 5.63 | 5.61 | 5.62 |
| Hardness (KP) | 13.90 | 12.15 | 14.21 | 12.78 |
| Friability (%) | 0.70 | 0.72 | 0.68 | 0.72 |
| Disintegration (min) | < 16 | < 18 | < 17 | < 18 |
| Hausner ratio | 1.09 | 1.09 | 1.12 | 1.09 |
| Flow Character | Excellent | Excellent | Good | Excellent |

2. 육군자탕 정제 (YGJT-T)의 성분분석

육군자탕의 구성 한약재 중 진피의 narirutin 및 hesperidin, 감초의 glycyrrhizic acid, 백출의 atractylenolide III 등 총 4종의 지표물질에 대한 동시분석법을 확립하였다 (Fig. 1). 각 지표물질의 최대흡수파장을 검토한 결과 narirutin 및

hesperidin, glycyrrhizic acid, atractylenolide III 는 230 nm를 최적분석파장으로 하여 육군자탕 정제와 표준액 4종의 피크의 UV spectrum 탐색 결과, 모두 동일한 스펙트럼으로 각기 다른 성분들의 피크에 간섭없이 나타남을 확인하였다.

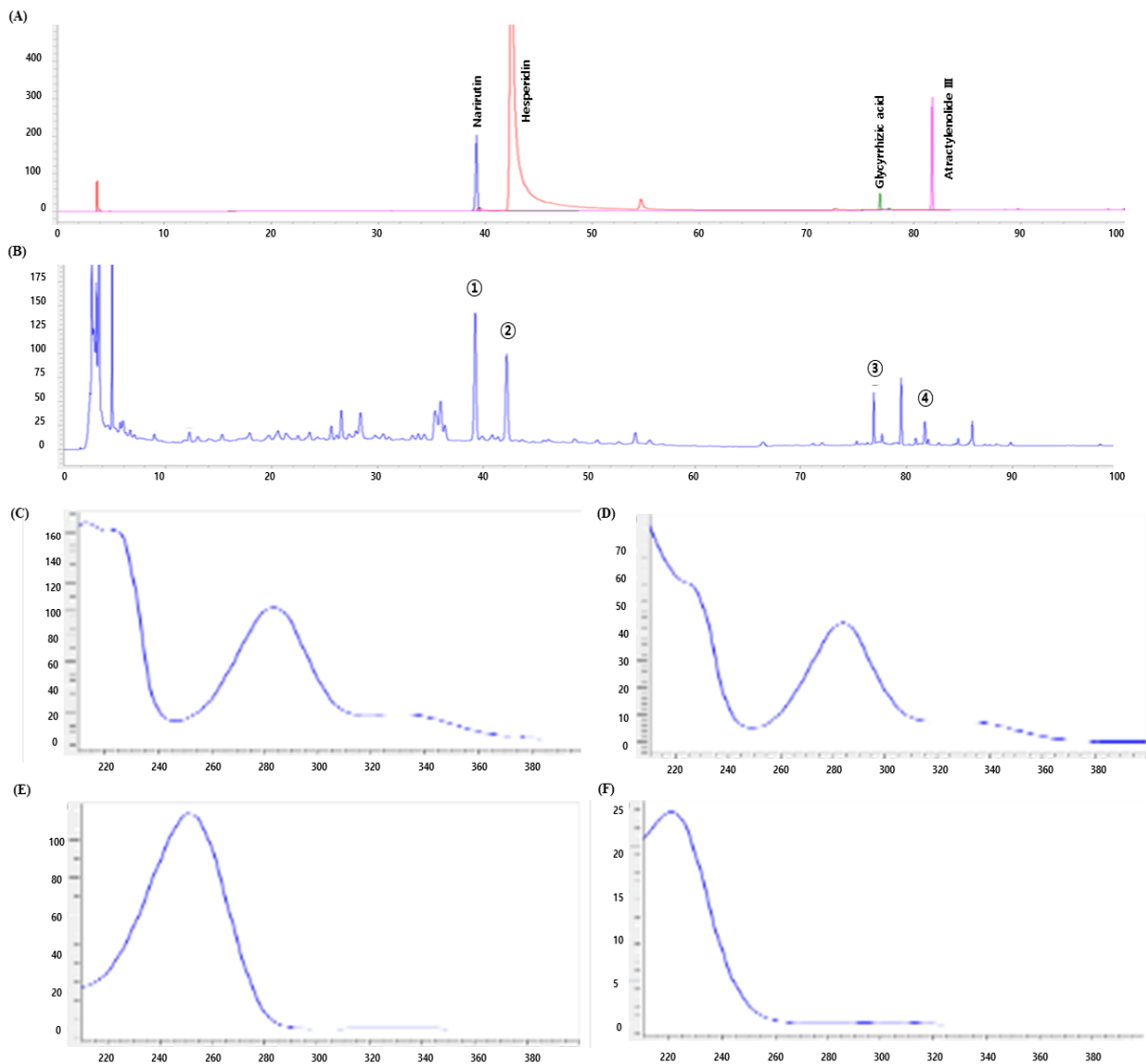


Fig. 1. Simultaneous analysis used HPLC method.

(A) Yukgunja-tang standard mixture and (B) Yukgunja-tang tablet (YGJT-T) are HPLC chromatogram. Identification of the ingredients used to compare with the UV spectrum of YGJT-T and standard mixture ; (C) narirutin, (D) hesperidin, (E) glycyrrhizic acid, (F) atractylenolide III .

3. 육군자탕 정제 (YGJT-T)의 RAW 264.7 세포에 대한 독성

육군자탕 정제의 RAW 264.7 세포에서 세포 독성에 영향을 주는 농도 구간을 조사하였다. 육군자탕 정제를 10~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$

24시간 처리하여 MTT 방법을 이용하여 세포의 생존율을 측정하였다. 그 결과 육군자탕 정제 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 세포 독성을 보이지 않았다. 이에 육군자탕 정제 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 최고농도로 하여 연구를 진행하였다 (Fig. 2).

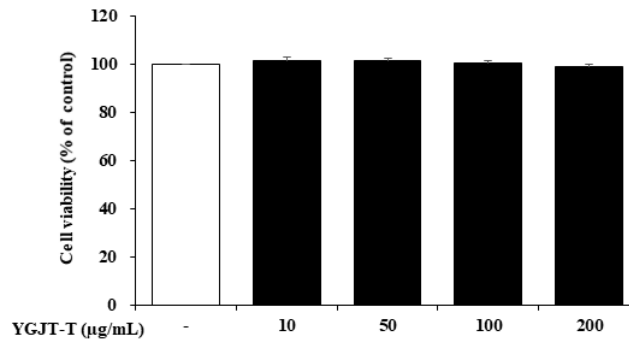


Fig. 2. The effect of Yukgunja-tang tablet (YGJT-T) on cytotoxicity in RAW 264.7 cells. In RAW 264.7 cells, Yukgunja-tang tablet was incubated for 24 hours at the indicated dose. The cell viability was measured by MTT assay. The data obtained similar results in three experiments.

4. 육군자탕 정제 (YGJT-T)가 NO 및 PGE₂ 생성에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에서 육군자탕 정제를 전처리 후 LPS를 처리하였을 때, NO 및 PGE₂ 생성의 억제 효과를 확인하였다.

그 결과 육군자탕 정제는 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 NO (Fig. 3A) 및 PGE₂ (Fig. 3B)를 억제하였으며, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 Dexamethasone보다 더 높은 억제율을 보이는 것을 확인하였다 (Fig. 3).

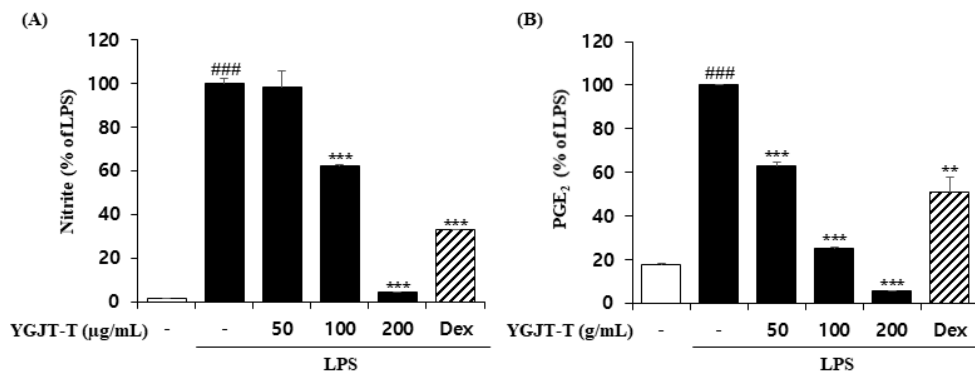


Fig. 3. The effect of Yukgunja-tang tablet (YGJT-T) on NO and PGE₂ production in LPS-stimulated RAW 264.7 Cells. Yukgunja-tang tablet (50, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was pretreated for 1 hour and then incubated with LPS (500 ng/mL) for 24 hours. NO and PGE₂ was measured. The data obtained similar results in three experiments. $^{##}P < 0.01$, $^{###}P < 0.001$ vs distilled water treatment alone, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs LPS treatment alone. "Dex" is "dexamethasone".

5. 육군자탕 정제 (YGJT-T)의 단백질 수준에서 전염증성 사이토카인의 생성에 미치는 영향

육군자탕 정제가 RAW 264.7 세포에서 전염증성 매개물질에 미치는 영향을 조사하기 위해 단백질 수준에서 염증성 사이토카인을 측정하였다. 육군자탕 정제를 1시간 전처리 한 후 LPS를 24시간 동안 자극한 후 전염증성 사이토카인의 발현을 측정하였다. 그 후 단백질 수준에서 전염증성 사이토카인을 측정하고, 육군자탕 정제는 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 는 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 전염증성 사이토카인을 억제하는 것으로 확인하였다 (Fig. 4).

6. 육군자탕 정제 (YGJT-F)에 의한 급성위염의 위 점막의 손상 및 염증성 사이토카인에 미치는 영향

150 mM HCl in 60% ethanol로 유도한 급성위염에서 육군자탕의 정제에 대한 위 점막의 손상 및 염증성 사이토카인의 발현 억제를 확인하였다. 먼저 위 점막의 손상 정도를 육안으로 관찰한 결과, 정상군 마우스 (Fig. 5A)의 위 점막에서는 손상이 일어나지 않았지만 증류수를 처리한 대조군 마우스 (Fig. 5B)에서는 150 mM HCl in 60% ethanol에 의해 위 점막에 손상으로 출혈 및 부종이 관찰됨을 확인할 수 있었다.

육군자탕 정제를 처리한 마우스 (Fig. 5C)는 위점막의 손상으로 출혈 및 부종이 억제됨을 확인할 수 있었다. 또한 위 조직에서 단백질 수준에서 염증성 사이토카인의 발현을 확인한 결

과 급성위염에 증가한 염증성 사이토카인 (IL-1 β , IL-6 및 TNF- α)은 육군자탕 정제를 처리하였을 때 억제되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5D).

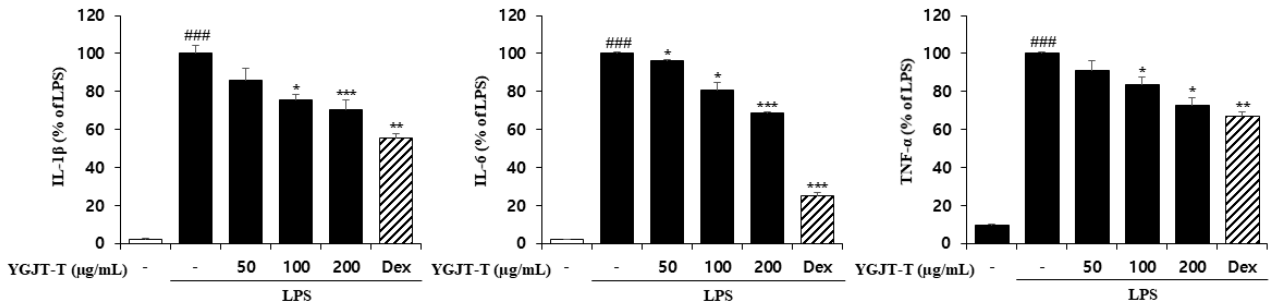


Fig. 4. The effect of Yukgunja-tang Formulation on Pro-inflammatory Cytokine Production in RAW 264.7 Cells. Yukgunja-tang tablet (50, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was pretreated for 1 hour and then incubated with LPS (500 ng/mL) for 24 hours. Pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, and TNF- α were measured by ELISA. The data obtained similar results in three experiments. ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs distilled water treatment alone, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs LPS treatment alone. "Dex" is "dexamethasone".

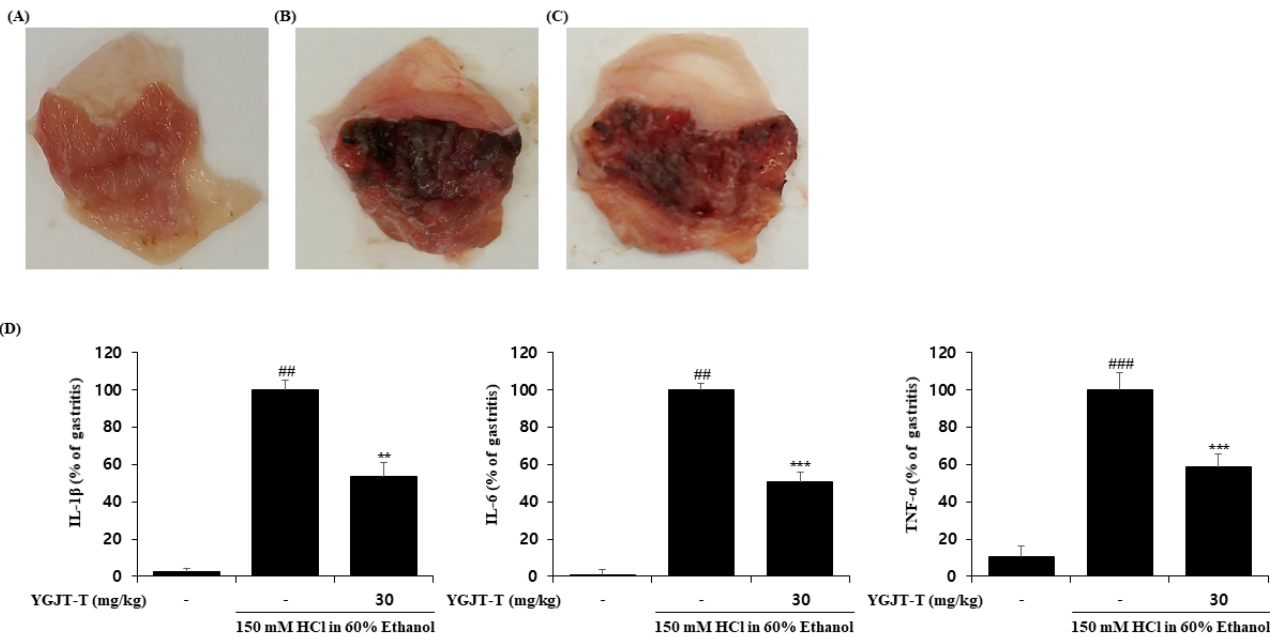


Fig. 5. The effect of tablets on 150 mM HCl in 60% ethanol-induced gastritis. After pre treatment of Yukgunja-tang tablet (30 mg/kg , oral) for 3 days, 0.5 mL of 150 mM HCl in 60% ethanol was injected 1 hour later. It was sacrificed 1 hour after 150 mM HCl in 60% ethanol oral administration. (A) Normal mice, (B) 150 mM HCl in 60% ethanol-induced gastric lesion control mice administered with distilled water orally, (C) 150 mM HCl in 60% ethanol-induced gastritis mice administered orally with Yukgunja-tang tablet (30 mg/kg), (D) Inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, and TNF- α were measured by ELISA at the protein level of gastric tissue. The data obtained similar results in three experiments. ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs distilled water treatment alone, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 150 mM HCl in 60% ethanol treatment alone.

IV. 고찰

육군자탕은 補氣 補脾하는 사군자탕 (四君子湯)과 燥濕化痰 理氣和中的 이진탕 (二陳湯)의 함방에 대조를 더하여 사용하는 처방으로²⁵⁾, 일본 및 중국에서 중요한 의약품으로 사용되고 있으며 위 질환에 대한 예방 효과가 있는 것으로 알려져 있다²⁴⁾. 본 연구에서는 육군자탕 정제의 제형개발 및 육군자탕의 구성된 한약재의 주요성분을 분석하고 항염증 및 항위염에 대한

약리효능 평가를 진행하여 육군자탕 정제의 표준화를 위한 기초자료를 확보하고자 하였다. 육군자탕의 주요성분인 narirutin, hesperidin, glycyrrhizic acid 및 atractylenolide III 4종의 분석을 위해 HPLC-PDA를 이용하여 각각의 성분들에 영향을 주지 않으면서 동시에 효과적으로 확인 할 수 있는 동시분석법을 확립하였다. 동시분석법은 기존 지표성분들을 개별적으로 분석하는 것보다 효율적인 분석이 가능하여 품질관리를 위한 기초자료로 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

염증은 외부 자극으로 인하여 일어나는 생체조직의 방어반응으로써 유해물질이나 화학적 자극에 의해 발생한다²⁶⁾. 염증반응이 일어나면 많은 양의 NO 및 PGE₂와 같은 염증매개인자들이 생성하게 된다. 본 실험에서는 육군자탕 정제가 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 iNOS 및 COX-2 발현에 의한 NO 및 PGE₂의 생성과 다양한 염증매개물질의 발현에 대하여 연구하였다. NO의 합성효소에 의해 L-아르기닌으로부터 생성되는 NO는 LPS의 자극에 의해 iNOS의 발현으로 NO를 생성하면서 면역반응에 관여하는 것으로 보고되어 있다^{27,28)}. 또한, PGE₂는 COX-2에 의해 생성되며 염증반응에서 중요한 역할로써 혈관생성을 유도하여 종양을 생성하는 역할을 한다²⁸⁾. LPS에 자극에 의한 염증 매개인자들은 염증질환들에 관여하게 되는데 이상의 결과는 육군자탕 정제가 iNOS의 발현을 억제함으로써 NO의 생성을 억제한다는 것을 보여준다. 또한 COX-2의 발현을 억제함으로써 PGE₂의 생성을 억제한다. IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인은 염증을 나타내는 지표로서 다양한 염증매개체들을 유도하거나 면역반응을 조절하는데 있어 중요한 역할을 한다. 육군자탕 정제를 전처리한 후 LPS를 처리하였을 때, IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인은 염증의 생성을 단백질 수준에서 유의성 있게 억제되는 것으로 나타났다.

위염은 상부 중앙 복부의 통증과 메스꺼움, 구토 및 체중감소 등이 가장 흔한 증상으로 보고되어있으며 위산, 알코올, 각종 약물 등에 의하여 위 점막이 손상되어 출혈 및 염증이 나타나는 염증성 질환이다^{9,29)}. 본 연구에서는 150 mM HCl in 60% ethanol 모델을 이용하여 급성위염을 유발하였다. Ethanol은 위의 점막을 자극하여 출혈과 손상을 유발하고 HCl은 위 운동의 촉진으로 상태를 악화시키는 것으로 알려져 있다³⁰⁾. 육군자탕 정제를 3일간 전처리한 후 150 mM HCl in 60% ethanol을 처리하고 부검으로 위 조직을 육안으로 관찰한 결과 위 점막의 출혈 및 부종 그리고 위 조직의 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인을 유의성 있게 억제하였다.

이를 통해 육군자탕을 보관 및 복용의 편의성이 높은 현대적인 제형인 정제로 개발하여 육군자탕의 정제의 주요성분과 효능을 확인하였다. 본 실험의 결과로 얻어진 육군자탕의 주요성분에 대한 동시분석법과 효능평가 결과는 한약제제의 제형개발과 표준화 연구를 위한 기초자료로 활용될 수 있는 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서 육군자탕 (YGJT)을 현대적인 제형인 정제로 개발하였으며, 육군자탕 정제의 성분분석 및 약리효과에 대한 평가를 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 육군자탕의 제형 개발을 위하여 겉보기 밀도, 탭 밀도 등으로 측정으로 흐름성을 평가하였으며, 경도, 마손도 및 붕해도 등의 확인을 통해 물성평가를 통해 높은 경도와 빠른 붕해도를 나타낸 정제를 제조하였다.
2. 육군자탕 정제 (YGJT-T)의 품질검사를 위해 HPLC-

PDA를 통하여 육군자탕의 4가지 지표성분인 narirutin, hesperidin, glycyrrhizic acid 및 atractylenolide III의 동시분석법을 확립하였다.

3. 육군자탕 정제 (YGJT-T)는 NO 및 PGE₂의 생성을 억제하였다.
4. 육군자탕 정제 (YGJT-T)는 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인의 생성을 단백질 수준에서 억제하였다.
5. 육군자탕 정제 (YGJT-T)는 150 mM HCl in 60% ethanol로 유도한 급성위염에서 위점막의 손상으로 인한 출혈 및 부종을 개선 및 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인의 생성을 단백질 수준에서 억제하였다.

이상의 결과로 육군자탕을 휴대성 및 복용에 대한 편의성을 지닌 정제로 개발하였으며, 항염증 및 항위염 효과를 통하여 염증성 질환에 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. Choi SI, Ahn EJ, Lee MY. Research Trend for the Formulation of Traditional Chinese Medicine. Korean Herb. Med. Inf, 2016 ; 4 : 11-19.
2. Yu Q, Zeng KW, Ma XL, Song FJ, Jiang Y, Tu PF, Wang XM. Resokaempferol-mediated anti-inflammatory effects on activated macrophages via the inhibition of JAK2/STAT3, NF- κ B and JNK/p38 MAPK signaling pathways. International Immunopharmacology. 2016 ; 38 : 104-14.
3. Liu J, Tang J, Zuo Y, Yu Y, Luo P, Yao X, Dong Y, Wang P, Liu L, Zhou H. Stauntonside B inhibits macrophage activation by inhibiting NF- κ B and ERK MAPK signalling. Pharmacological Research, 2016 ; 111 : 303-315.
4. Yim MJ, Lee JM, Choi G, Lee DS, Park WS, Jung WK, Park SW, Seo SK, Park JG, Choi IW, Ma SY. Anti-Inflammatory Potential of *Carpomitra costata* Ethanolic Extracts via Inhibition of NF- κ B and AP-1 Activation in LPS-Stimulated RAW264.7 Macrophages. Evid. Based Complementary Altern. Med, 2018 ; 2018 : 6914514.
5. Lee JY, Lee MS, Choi JW, Shin TS, Woo HC, Kim HR. Dichloromethane fraction of *Laminaria japonica* ethanolic extract inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in RAW 264.7 cells via NF- κ B pathway. Inflammation, 2012 ; 35 : 1650-1658.
6. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides

- and innate immunity. *J Endotoxin Res.* 2001 ; 7 : 167-202.
7. 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 : 129.
 8. Kim HJ, Han JS, Kim SH, Park HJ, Park HS, Ko MK, Le CY, Kim OJ. 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 : 57-6.
 9. Lee JA, Kim SH, Kim MJ, Ahn JH, Park HJ, Lee WR, Roh SS. Protective Effects of Chrysanthemi Indici Flos Extract and Flaxseed Oil Mixture on HCl/ethanol-induced Acute Gastric Lesion Mice. *Kor. J. Herbol.* 2018 ; 3 : 19-28.
 10. Kim MY, Kwon OJ, Noh JS, Roh SS. Inhibitory Activities of Water Extracts of Black Ginseng on HCl/Ethanol Induced Acute Gastritis through Anti-Oxidant Effect. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2016 ; 45 : 1249-1256.
 11. 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 : 252-256.
 12. del Valle JC, Salvatella M, Rossi I, Andrade R, Gutiérrez Y, Pereda C, Samper B, Felú JE. Impairment of H⁺-K⁺-ATPase-dependent proton transport and inhibition of gastric acid secretion by ethanol. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001 ; 280 : G1331-40.
 13. Ko SJ, Park JW, Lee JH, Cho SH, LeeJH, Nam SU, Kim JS. Herbal medicine Yukgunja-tang for functional dyspepsia protocol for a systematic review of randomized controlled trials. *Medicine.* 2018 ; 97 : e12555.
 14. Tominaga K, Iwakiri R, Fujimoto K, Fujiwara Y, Tanaka M, Shimoyama Y, Umegaki E, Higuchi K, Kusano M, Arakawa T. Rikkunshito improves symptoms in PPI-refractory GERD patients: a prospective, randomized, multicenter trial in Japan. *J Gastroenterol.* 2012 ; 47 : 284-92.
 15. Tatsuta M, Iishi H. Effect of treatment with Liu-Jun-Zi-Tang (TJ-43) on gastric emptying and gastrointestinal symptoms in dyspeptic patients. *Aliment Pharmacol Ther.* 1993 ; 7 : 459-62.
 16. Kang HJ, Jeong MK, Park SJ, Jun HJ, Yoo HS. Efficacy and safety of Yukgunja-Tang for treating anorexia in patients with cancer The protocol for a pilot, randomized, controlled trial. *Medicine (Baltimore).* 2019 ; 98 : e16950.
 17. Ko SJ, Park JW, Lee JH, Lee JE, Ha NY, Nam SU, Lee JH, Jeon SH, Kim JW, Kang CW, Yeo IK, Kim JS. An Herbal Medicine, Yukgunja-Tang is more Effective in a Type of Functional Dyspepsia Categorized by Facial Shape Diagnosis: A Placebo-Controlled, Double-Blind, Randomized Trial. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2018 ; 2018 : 8546357.
 18. Mogami S, Hattori T. Beneficial effects of rikkunshito, a Japanese kampo medicine, on gastrointestinal dysfunction and anorexia in combination with Western drug: a systematic review. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014 ; 2014 : 519035.
 19. Suzuki H, Inadomi JM, Hibi T. Japanese herbal medicine in functional gastrointestinal disorders. *Neurogastroenterol Motil.* 2009 ; 21 : 688-96.
 20. Takeda H, Sadakane C, Hattori T, Katsurada T, Ohkawara T, Nagai K, Asaka M Rikkunshito, an herbal medicine, suppresses cisplatin-induced anorexia in rats via 5-HT₂ receptor antagonism. *Gastroenterology.* 2008 ; 134 : 2004-13.
 21. Ohno T, Yanai M, Ando H, Toyomasu Y, Ogawa A, Morita H, Ogata K, Mochiki E, Asao T, Kuwano H. Rikkunshito, a traditional Japanese medicine, suppresses cisplatin-induced anorexia in humans. *Clin Exp Gastroenterol.* 2011 ; 4 : 291-6.
 22. Endo M, Hori M, Ozaki H, Oikawa T, Hanawa T. Rikkunshito, a Kampo Medicine, Ameliorates Post-operative Ileus by Anti-inflammatory Action. *J Pharmacol Sci.* 2014 ; 124 : 374-85.
 23. Azushima K, Uneda K, Wakui H, Ohki K, Haruhara K, Kobayashi R, Haku S, Kinguchi S, Yamaji T, Minegishi S, Ishigami T, Yamashita A, Tamura K. Effects of rikkunshito on renal fibrosis and inflammation in angiotensin II-infused mice. *Sci Rep.* 2019 ; 9 : 6201.
 24. Goso Y, Ogata Y, Ishihara K, Hotta K. Effects of Traditional Herbal Medicine on Gastric Mucin against Ethanol-Induced Gastric Injury in Rats. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 1996 ; 113 : 17-21.
 25. Jang WS, Shin YJ, Ko SJ, Ha YJ, Kwon YM, Shin SH. Effect of Yukgunja-tang on Glutamate-induced Apoptosis in C6 Glial Cel. *Korean J. Orient.Int. Med.* 2010 ; 31 : 586-599.
 26. 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, COX-2 and pro-inflammatory cytokines via the downregulation of NF- κ B pathway in

- LPS-stimulated murine macrophages. *Int Immunopharmacol*. 2009 ; 9 : 1049-57.
27. Ajizian SJ, English BK, Meals EA. Specific inhibitors of p38 and extracellular signal regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways block inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor accumulation in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide and interferon-gamma. *J Infect Dis*. 1999 ; 179 : 939-44.
28. Choi SB, Bae GS, Jo IJ, Park KC, Seo SH, Kim DG, Shin JY, Gwak TS, Lee JH, Lee GS, Park SJ, Song HJ. The anti-inflammatory effect of *Lithospermum Erythrorhizon* on lipopolysaccharide - induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. *Kor. J. Herbology*. 2013 ; 28 : 67-73.
29. IJ Park, SH Yun, GH Choi, HJ Kim, YH Seo, JH Cho. Protective Effect of *Litsea japonica* Fruit Flesh Extract on Stress-induced Gastritis in Rats. *Journal of Food Hygiene and Safety. J Physiol & Pathol Korean Med*. 2017 ; 31 : 255-263.
30. Hong SH, Le HA, Le YS, Kim DW, Oh GW, Woo JW, Cho YD, Jeong JH, Kim OJ. Protective effect of halophyte *Salsola komarovi* ljin against gastric ulcer Induce by alcohol treatment in rats. *J Biomed Res*. 2014 ; 15 : 170-175.