

제조방법에 따른 당귀수산(當歸鬚散)의 성분분석 및 항염증 효과

전영희[#] · 남원희[#] · 임현희 · 김세진 · 유병우 · 손수미 · 김명진 · 최혜민 · 권현숙 · 김정옥*

한국한의약진흥원

Anti-inflammatory Effect and Analysis of Functional Constituents of Dangguisu-san by Processing Methods

Young-Hee Jeon[#], Won-Hee Nam[#], Hyun-Hee Leem, Se-Jin Kim, Byung-Woo Yu, Su-Mi Son, Myoung-Jin Kim, Hye-Min Choi, Hyun-Sook Kwon, and Jung-Ok Kim*

National Development Institute of Korean Medicine (NIKOM), 94, Hwarang-ro (Gapje-dong), Gyeongsan-si, Gyeongbuk 38540, Korea

Abstract – Dangguisu-san (DGSS) is widely known traditional herbal medicinal formula in Korea for treatment of traumatic injury by traffic accident, ecchymosis, abdominal distension and anti-thrombosis of blood. This study was conducted to develop the simultaneous analyze method using high performance liquid chromatography (HPLC) and examine the effect of anti-inflammatory activity of DGSS-dry extract (DGSS-DE) and DGSS-mix extract powder (DGSS-MEP). Physicochemical characteristics of DGSS-DE and DGSS-MEP showed that there is no significant difference in pH, titratable acidity, total soluble solid content and browning degree except for color value (*L*, *a*, *b*). 15 functional constituents of DGSS were identified and the correlation coefficient values of DGSS-DE and DGSS-MEP were conformed 0.950. Also, DGSS-DE and DGSS-MEP significantly decreased the secretion of nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) through inhibited expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), IL-1β, IL-6, and TNF-α. From these result, DGSS-MEP showed similar chemical composition and anti-inflammatory effect to DGSS-DE. Therefore, DGSS-DE and DGSS-MEP may be useful as potential source of drug to prevent inflammation.

Keywords – Dangguisu-san, Processing method, HPLC, Functional constituent, Anti-inflammatory

한약제제(韓藥製劑)란 동물·식물 또는 광물에서 채취된 것으로서 주로 원형대로 건조·절단 또는 정제된 생약(生藥)을 한방 원리에 따라 배합하여 제조한 의약품을 의미한다(약사법 제2조 제 5,6항).^{1,2)} 한약제제는 제조방법에 따라 크게 두 가지로 나뉘어지며, 일반적인 탕제와 같이 구성약재들을 모두 혼합하여 추출한 복합제제와 개별 한약재로부터 단미엑스제를 제조한 다음 처방 비율에 따라 혼합한 혼합제제(혼합단미엑스제)가 있다.³⁾ 전통 한약 탕제의 경우 액상형태로 보관이 불편하고 약재가 가지는 고유의 향과 쓴 맛 등으로 인해 복용 편의성이 낮으며, 품질의 표준화·과학화·규격화가 어렵다. 최근에는 이러한 단점들을 보완하기 위해 품질 표준화를 위한 성분프로파일 평가와 복용 편의성을 개선시킨 과립제(*granule*), 정제(*tablet*), 캡슐제(*capsule*) 그리고 연

조엑스제(*soft extract*) 등과 같은 제형 개발 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 제조방법에 따른 복합제제와 혼합제제의 성분 및 효능을 비교·분석하는 연구도 진행되고 있다.^{4,5)}

전통적으로 한약처방은 다양한 약재와 약리효능을 나타내는 유효성분의 상호작용으로 여러 질환들의 예방 또는 치료를 위해 사용되어왔다.^{6,7)} 그 중에서도 당귀수산(當歸鬚散)은 의학입문(醫學入門)에 처음 수록된 처방으로 당귀(*Angelica gigas*), 적작약(*Paeonia obovata*), 오약(*Linderastrichnifolia*), 향부자(*Cyperus rotundus*), 소목(*Caesalpinia sappan*), 홍화(*Carthamus tinctorius*), 도인(*Prunus persica*), 계피(*Cinnamomum cassia*) 및 감초(*Glycyrrhiza uralensis*) 등 9종의 생약으로 구성되어 있으며, 동의보감(東醫寶鑑)에서는 원기(元氣)와 혈액(血液)의 순환을 도우며 어혈(瘀血)을 없애는 효능이 있어 타박이나 낙상 등으로 전신 또는 국소에 혈전(血栓)이나 혈관울혈(血管鬱血)이 생겨 아프고 복부팽만감이 있을 때 사용되어 왔다.^{8,9)} 이러한 당귀수산은 타박상 등 외상으로 인

[#]These authors contributed equally to this work.

*교신저자(E-mail): kjo1226@nikom.or.kr

(Tel): +82-53-810-0395, ***-****-****

한 피하혈중 개선,¹⁰⁾ 항혈전,¹¹⁾ 뇌허혈 개선,¹²⁾ 알레르기성 자반증(紫斑證) 개선,¹³⁾ 혈관이완,¹⁴⁾ 긴장형 두통 완화,¹⁵⁾ 대사성질환 예방¹⁶⁾ 등의 효과가 보고되었으며, 특히 Bak 등¹⁷⁾은 lipopolysaccharide(LPS)로 활성화된 대식세포에서 당귀수산 주정추출물이 염증매개물질인 nitric oxide(NO), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6(IL-6) 및 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등의 활성을 억제하는 것으로 보고하였다. 또한, Lyu 등¹⁸⁾의 연구에서는 LPS로 유도된 급성 폐 염증 마우스 모델에서 당귀수산이 항 염증 인자인 NF-E2-related factor 2(Nrf2)를 활성화시킬 뿐만 아니라 염증인자인 nuclear factor- κ B(NF- κ B)를 억제한다고 보고한 바 있다. 또한, 당귀수산의 구성성분에 대한 연구로는 LC-MS/MS를 이용하여 당귀수산 건조엑스(복합제제) 17종 성분에 대한 함량 분석,¹⁹⁾ LC를 이용하여 제조방법에 따른 당귀수산 물 및 70% 에탄올추출물의 3종 성분 분석²⁰⁾과 LC-MS를 이용하여 보관 조건에 따른 당귀수산 전탕액의 3종 성분에 대한 비교 분석²¹⁾ 등이 보고되었으나 제조방법에 따른 당귀수산 건조엑스(복합제제)와 혼합단미엑스산(혼합제제)간의 화학적 유사도를 평가할 수 있는 HPLC-PAD를 이용한 분석법 개발과 항염증에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 제조방법에 따른 당귀수산 건조엑스(복합제제)와 혼합단미엑스산(혼합제제)의 성분 분석을 위해 HPLC-PDA를 이용하여 15가지 유효성분을 분석할 수 있는 동시분석법을 개발하였으며, LPS를 처리한 RAW 264.7 cell을 이용하여 nitric oxide(NO), prostaglandin E₂(PGE₂), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6(IL-6), 및 tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 생성 그리고 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2)의 발현에 미치는 영향을 측정된 결과를 통해 당귀수산 건조엑스와 혼합단미엑스산간의 구성성분 및 항염증에 대한 비교분석을 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 연구에 사용된 당귀수산의 구성 한약재인 당귀, 소목, 오약, 적작약, 향부자, 홍화, 도인, 계피 및 감초는 동일약업사(Daegu, Korea) 및 (주)휴먼허브(Gyeongsan, Korea)에서 구입하여 전문가(신전희, 백초당한약방)의 감별 후 사용하였다. 각각의 구성 한약재들의 표본은 한국한의약진흥원 한의기술R&D2팀의 한약재보관실에 보관하였다.

시약 및 기기 - 동시분석을 위한 15종의 표준물질(Amygdalin, Safflorin A, Brazilin, Norisoboldine, Protosappanin B, Albiflorin, Paeoniflorin, Liquiritin, Coumarin, Nodakenin, Decursinol, Cinnamic acid, Glycyrrhizic acid, Decursin 및 Decursinol angelate) 및 시약은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였으며, 95% 이상의 순도를 가지는 제품으로 사용하였다. 분석용매는 특급 또는 일급을

사용하였다. 세포 배양을 위해 fetal bovine serum(FBS), Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM), penicillin-streptomycin, phosphate buffered saline(PBS)는 Hyclone(USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 lipopolysaccharide(LPS), griess reagent, ethanol, chloroform은 Sigma-Aldrich(USA)에서, MTS reagent와 agarose는 Promega(USA)에서, PGE₂ 및 TNF- α , IL-1 β , IL-6에 대한 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit는 R&D System(USA)에서 구입하여 사용하였다. 단백질 분석을 위해 사용한 1차 항체인 iNOS는 BD Bioscience(USA)에서, COX-2는 cell signaling technology(USA)에서, β -actin과 2차 항체인 goat anti-Mouse IgG-HRP는 Santa Cruz(USA)에서 구입하였다. Total RNA extraction을 위해 사용한 RNAiso는 TaKaRa(Japan)에서, cDNA 합성과 PCR에 사용한 모든 시약은 Intron(Korea)에서 구입하여 사용하였다.

세포주 및 세포배양 - 실험에 사용한 RAW 264.7(mouse macrophage cell line) 세포주는 american type culture collection(ATCC, USA)에서 구입하였고, 세포 배양을 위해 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

당귀수산 전탕액 및 혼합단미엑스 제조 - 복합제제인 당귀수산 건조엑스(DGSS-DE)는 Table I과 같이 1회 분량에 해당하는 무게로 각 약재를 칭량한 뒤 혼합하여 약재 중량의 10배에 해당하는 정제수를 넣고 100°C에서 3시간 동안 추출한 뒤 진공 건조하였다. 이때 DGSS-DE의 추출 수율은 19.41%로 나타났다. 혼합제제인 당귀수산 혼합단미엑스산(DGSS-MEP)은 구성약재 별로 각각 칭량한 후 각 중량의 10배에 해당하는 정제수를 넣고 100°C에서 3시간 동안 개별 추출한 후 적정 농도로 농축한 뒤 진공건조하여 단미건조엑스산을 얻었다(Table I). 건조된 각각의 단미건조엑스산을 대한민국의약전의 한약(생약) 규격집(KHP, The Korean Herbal Pharmacopoeia) 기준에 따라 혼합하여 사용하였다.

이화학적 품질특성 - 제조방법에 따른 DGSS-DE와 DGSS-MEP의 이화학적 품질특성(pH, 산도, 당도, 색도 및 갈색도)을 측정하기 위해 앞서 Table I을 참고하여 DGSS-DE와 DGSS-MEP를 각각 1회 분량씩 취한 후 증류수를 가하여 8 mL로 정용한 다음 검액으로 사용하였다. pH는 각 시료를 증류수로 50배 희석한 후 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 다음 상등액을 취하여 pH meter(Seven Easy, Mettler-toledo, Switzerland)로 측정하였다. 산도는 pH 측정에 사용한 시료와 동일한 시료를 비커에 취하여 0.005 N NaOH로 pH 8.2가 될 때까지 적정한 후 소요된 0.005 N NaOH의 양으로부터 DGSS-DE와 DGSS-MEP 100 g 당 acetic acid로 환산하여 나타내었다. 당도는 디지털 굴절계(RX-5000i, Atogo, Tokyo, Japan)로 측정하여 °Brix로 나타내었으며, 색도는 증류수로 50배 희석한 다음, 색차계(CM3600D, Minolta, Japan)를 이용하여 측정 후 Hunter's scale L(lightness), a(redness),

Table I. Composition and yields of Dangguisusan-dry extracts (DGSS-DE) and Dangguisusan-mix extract powder (DGSS-MEP)

Herbal name	Amount (g)	Yield (%)		Extract (g, dry weight)	
		DGSS-DE	DGSS-MEP	DGSS-DE	DGSS-MEP
Angelicae Gigantis Radix	1.88		23.00		0.43
Paeoniae Radix Rubra	1.25		17.00		0.21
Linderae Radix	1.25		4.90		0.06
Cyperi Rhizoma	1.25		19.80		0.25
Caesalpiniae Lignum	1.25	19.41	3.00	1.97	0.04
Carthami Flos	1.00		23.60		0.24
Persicae Semen	0.88		18.00		0.16
Cinnamon Bark	0.75		3.20		0.02
Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	0.63		16.90		0.11
Total amount (g, single dose)	10.14	-	-	1.97	1.52

b(yellowness) 값으로 표시하였다. 이때 사용된 표준 백색판의 색도는 L=98.82, a=-0.02, b=0.01이었다. 갈색도는 증류수로 200배 희석한 후 분광광도계(P-Class-P330, Implen, Munich, Germany)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

동시분석조건 확립 - 15종의 표준물질을 각각 메탄올에 용해한 후 2 mg/mL의 농도로 조제하여 4°C에 보관하였고, 각 표준물질을 혼합하여 100 µg/mL 농도로 희석하여 표준액으로 사용하였다. DGSS-DE와 DGSS-MEP를 각각 1회분량씩 취한 후 50% 메탄올을 가하여 초음파추출기(Power Sonic 420, 50/60 Hz, 700 W, Hwashin Instrument, Seoul, Korea)에서 30분간 1회 추출한 다음, 여과지(Whatman No.2, Maidstone, UK)로 여과한 후 50% 메탄올을 사용하여 35 mL로 정용한 것을 검액으로 사용하였다. DGSS-DE와 DGSS-MEP의 15종 유효성분을 분석하기 위한 동시분석 조건은 Table III과 같이 설정하였다. 이동상은 H₂O과 acetonitrile을 사용하였으며, 분리능을 높이기 위해 각 용매에 0.05% H₃PO₄를 첨가하였고, 기온/기압조건으로 흘려주었다. 칼럼은 YMC-Triart C18(5 µm, 4.6×250 mm, Kyoto, Japan)을 사용하였으며, 칼럼온도는 37°C, 유속은 1.0 mL/min, 주입량은 20 µL, 검출파장은 230 nm으로 설정하였다.

시료 조제 - 효능 실험을 위하여 DGSS-DE와 DGSS-MEP를 각각 100 mg씩 정확히 취한 후 50% DMSO를 첨가하여 1 mL로 정용한 다음 0.2 µm membrane 여과 후 사용하였다.

세포독성평가 - RAW 264.7 세포에 대한 시료의 처리 농도를 결정하기 위해 MTS(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt, Promega, USA)assay를 실시하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 1×10⁴ cells/well로 분주하고, DGSS-DE와 DGSS-MEP를 농도별(0, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 µg/mL)

로 처리한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 그 후 MTS reagent를 20 µL씩 첨가하여 4시간 동안 반응시켜 microplate reader(Tecan sunrise)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료를 처리하지 않은 배양액으로 세포 생존율은 다음과 같이 계산하였다.

$$[\text{Cell viability}(\%) = 100 \times (\text{treated sample}/\text{Non-treated sample})]$$

Nitric oxide(NO) 생성량 측정 - DGSS-DE와 DGSS-MEP의 염증억제효과를 확인하기 위해 NO량을 측정하였다. RAW 264.7 세포를 12 well plate에 1×10⁵ cells/mL로 분주하고 DGSS-DE와 DGSS-MEP를 각각 50, 100, 200 µg/mL 농도로 처리한 다음 LPS를 1 µg/mL로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양액 내의 nitrite 농도를 측정하기 위해 배양액 100 µL에 동량의 griess reagent(Sigma, USA)를 넣고 10분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. sodium nitrite의 standard curve를 이용하여 배양액 내의 NO 농도를 계산하였으며, 양성 대조군으로 dexamethasone(DEX)을 사용하였다.

효소 결합면역측정법(ELISA)에 따른 cytokine 측정 - DGSS-DE와 DGSS-MEP가 염증매개물질의 생성에 미치는 영향을 확인하기 위해 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)법을 수행하였다. RAW 264.7 세포를 12 well plate에 1×10⁵ cells/mL로 분주하고 DGSS-DE와 DGSS-MEP를 각각 50, 100, 200 µg/mL 농도로 처리한 후 LPS를 1 µg/mL로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후 배양액을 취하여 적절한 농도로 희석한 다음 PGE₂, TNF-α, IL-6 및 IL-1β의 농도를 manufacture's protocol에 따라 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 각 cytokine의 농도는 standard curve와 비교하여 계산하였으며, 양성대조군으로 DEX를 사용하였다.

역전사 중합효소 연쇄반응법(RT-PCR)에 따른 염증성 cytokine의 유전자 발현 측정 - DGSS-DE와 DGSS-MEP가

mRNA의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction)을 수행하였다. RAW 264.7 세포를 12 well plate에 1×10^5 cells/mL로 분주하고 DGSS-DE와 DGSS-MEP를 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 다음 LPS를 처리하여 6시간 배양한 세포를 수거한 후 RNAiso reagent를 이용해 total RNA를 분리하였다. Total RNA는 Maxime RT PreMix Kit(iNtRON, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였고, 유전자 증폭을 위해 특정 primer를 넣고 각 primer에 따른 PCR조건에 따라 실시하였다. 이때 iNOS(F:5'-CCTCCTCCACCTACCAAGT-3', R: 5'-CACC CAAAGTGCTCAGTCA-3')와 IL-6(F:5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAG-3', R: 5'-GGAAATTGGGTAGGAAGGA-3') 그리고 TNF- α (F:5'-GGCAGGCTACT TTGGAGTC-3', R: 5'-ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG-3')는 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초 동안 30 cycle로 반응시켰고, COX-2(F: 5'-GAGGCCACTGATACCTATTG-3', R: 5'-ACAAAGAAGGGTCCCAATT-3')와 GAPDH(F:5'-CAACTCCACTCTTCCACCT-3', R:5'-CTTGCTCAGTGTCTTCTT GCTG-3')는 94°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 30초 동안 30 cycle로 반응시켰으며, IL-1 β (F: 5'-CATTAGCAACTGCACTACA-3', R: 5'-TCATTA CACAGGACAGGTAT-3')는 94°C에서 30초, 52°C에서 20초, 72°C에서 30초 동안 30 cycle로 반응시켰다. 각 DNA는 1.5% agarose gel에 전기영동시킨 후 UV 검출기로 확인하였다.

Western blotting에 따른 iNOS, COX-2 단백질 발현 측정 - DGSS-DE와 DGSS-MEP로 처리한 RAW 264.7 세포를 PBS로 두 번 세척한 후 protease & phosphatase inhibitor cocktail을 함유한 lysis buffer(50 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 5% glycerol, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 2 mM DTT)로 부유시킨 후 10분 동안 ice에 방치시킨 다음, 4°C에서 13,000 rpm으로 20분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 따로 분리한 후 BCA protein assay kit(Thermo, USA)를 사용하여 단백질을 정량하였고, 20~30 μg 의 lysate를 4~12% gel을 사용하여 SDS-PAGE system으로 분리하였다. 이를 PVDF(polyvinylidene fluoride) membrane(Millipore, Germany)에 100 V로 1시간 동안 transfer한 후, blocking을

5% BSA가 함유된 1 \times PBS-T(1 \times PBS, 0.1%Tween-20) 용액으로 상온에서 1시간 동안 실시하였다. iNOS, COX-2, β -actin 등 primary antibody는 4°C에서 overnight 반응 시킨 후, 1 \times PBS-T로 세 번 세척하고, secondary antibody는 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후 1 \times PBS-T로 세 번 세척하고 enhanced chemiluminescence(ECL, Thermo Scientific, USA)로 발색시킨 후 ChemiDoc-It imaging system(UVP, Canada)로 감광하였다.

통계처리 - 모든 실험결과는 3회이상 반복 실험한 결과의 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며, 통계적 유의성 검사는 one way ANOVA test를 실시한 후 T-test로 사후 검증하였다. *p*-value가 0.05 미만일 때만 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

이화학적 품질특성 - 복합추출방식으로 제조된 DGSS-DE와 개별로 추출된 단미건조엑스산을 혼합하여 만든 DGSS-MEP의 이화학적 품질 특성을 살펴보기 위해 pH, 산도, 당도, 색도 및 갈색도를 측정된 결과는 Table II와 같다. DGSS-DE와 DGSS-MEP의 pH는 각각 5.22 ± 0.01 , 5.29 ± 0.06 , 산도는 각각 0.70 ± 0.01 , $0.69 \pm 0.01\%$, 당도는 각각 19.86 ± 0.18 , $19.54 \pm 0.31^\circ\text{Brix}$ 그리고 갈색도는 각각 0.60 ± 0.01 , 0.58 ± 0.01 로 나타났으며, 제조방법에 따른 DGSS-DE와 DGSS-MEP 간의 pH, 산도, 당도 및 갈색도는 유의적인 차이가 없음을 확인하였다. 반면, DGSS-DE와 DGSS-MEP의 색도를 조사한 결과, 각각 *L*(lightness)값은 82.01 ± 0.49 , 87.92 ± 0.35 , *a*(redness)값은 -0.07 ± 0.05 , -5.44 ± 0.04 , *b*(yellowness)값은 66.77 ± 0.28 , 64.56 ± 0.32 로 유의적인 차이를 보였다. 이러한 결과를 통해 제조방법에 따른 DGSS-DE와 DGSS-MEP의 이화학적 품질 특성을 확인함으로써 당귀수산의 제형개발 및 품질 검사 기초자료로 활용 될 수 있을 것으로 기대된다.

동시분석 - HPLC-PDA를 이용하여 용매의 구성 및 검출 과정에 대한 분석 조건을 검토하여 당귀수산을 구성하는 9종의 한약재 중 감초의 glycyrrhizic acid 및 liquiritin, 육계의 coumarin 및 cinnamic acid, 도인의 amygdalin, 소목의 brazilin

Table II. Physicochemical characteristics of DGSS-DE and DGSS-MEP

Samples	Physicochemical characteristics						
	pH	TA ¹⁾ (%)	TSSC ²⁾ ($^\circ\text{Brix}$)	Color value			Browning degree (AU)
				<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	
DGSS-DE	5.22 ± 0.01	0.70 ± 0.01	19.86 ± 0.18	82.01 ± 0.49	-0.07 ± 0.05	66.77 ± 0.28	0.60 ± 0.01
DGSS-MEP	5.29 ± 0.06	0.69 ± 0.01	19.54 ± 0.31	$87.92 \pm 0.35^{**}$	$-5.44 \pm 0.04^{***}$	$64.56 \pm 0.32^{**}$	0.58 ± 0.01

Values are mean \pm S.D(n=3).

p*<0.01, *p*<0.001 vs DGSS-DE.

¹⁾TA : titratable acidity (%) as acetic acid.

²⁾SSC : total soluble solid content ($^\circ\text{Brix}$).

Table III. HPLC condition for qualitative analysis of functional constituents in DGSS-DE and DGSS-MEP

Parameters	Conditions		
HPLC	Agilent 1260 infinity HPLC system equipped photodiode array detector and autosampler		
Analytical Column	YMC-Triart C18 column (5 μ m, 4.6 \times 250 mm)		
Column temperature	37°C		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	20 μ L		
UV detection	230 nm		
Gradient elution	Time (min)	0.05% H ₃ PO ₄ in water	0.05% H ₃ PO ₄ in Acetonitrile
	0	91.5	8.5
	25	91.1	8.9
	50	90.2	9.8
	52	87.6	12.4
	82	85.5	14.5
	84	82.0	18.0
	105	79.0	21.0
	110	60.0	40.0
	125	30.0	70.0
	130	91.5	8.5
	135	91.5	8.5

및 protosappanin B, 오약의 norisoboldine, 작약의 paeoniflorin 및 albiflorin, 홍화의 safflomin A, 당귀의 nodakenin, decursinol, decursin 및 decursinol angelate 등 15종 표준물질에 대한 동시분석 조건을 확립하였다(Table III). 0.05% phosphoric acid가 함유된 water와 acetonitrile을 이용하여 시간에 따라 용매 조성을 변화시키는 기울기 용리법으로 피크 분리능을 향상시켰으며, 각 표준물질의 농도와 UV spectrum 확인을 통해 전반적으로 가장 적절한 230 nm로 검출 파장을 설정하였다. 확립된 분석조건으로 DGSS-DE와 DGSS-MEP를 동시분석한 결과, amygdalin, safflomin A, brazilin, norisoboldine, protosappanin B, albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, coumarin, nodakenin, decursinol, cinnamic acid, glycyrrhizic acid, decursin 및 decursinol angelate 순으로 검출되었으며, 시료 내 다른 성분들에 의해 간섭 받지 않으면서 효과적으로 분리됨을 확인하였다(Fig. 1).

성분 비교분석 - 복합제제인 DGSS-DE와 혼합제제인 DGSS-MEP 간의 15가지 유효성분에 대한 비교분석을 하기 위해 HPLC-PDA를 이용하여 동등상관계수를 측정된 결과는 Table IV와 같다. 동시분석을 통해 측정된 DGSS-D와 DGSS-SE에 함유된 15종 유효성분의 평균 peak area 값은 각각 amygdalin(1147.198, 1146.834), safflomin A(254.693, 1788.056), brazilin(8465.368, 8619.559), norisoboldine (726.289, 1265.078), protosappanin B(5914.526, 5739.948), albiflorin(8115.237, 5324.874) paeoniflorin(7755.243, 5541.650),

liquiritin(890.616, 904.340), coumarin(2365.193, 1981.957), nodakenin(4526.612, 3095.808), decursinol(231.935, 314.073), cinnamic acid(254.806, 206.595), glycyrrhizic acid(1116.497, 1320.111), decursin(5076.311, 4503.031) 및 decursinol angelate (1597.715, 1463.105)으로 나타났으며, 그 결과 동등상관계수는 0.950으로 DGSS-DE와 DGSS-MEP가 95%이상 화학적으로 동등하다는 것을 확인하였다. 이는 Lee 등⁴⁾의 연구에서 황련해독탕 정제(혼합제제)와 전당액(복합제제)의 화학적 동등성이 0.972로 나온 결과와 유사하게 나타났다. 이러한 결과를 통해 제조방법에 따른 DGSS-DE와 DGSS-MEP 간의 유효성분에 대한 동등성을 확인함으로써 한약제제 품질 표준화 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

세포독성 평가 - RAW 264.7 대식세포에 대한 DGSS-DE와 DGSS-MEP의 세포독성을 확인하기 위해 농도별로 처리한 결과, 두 시료 모두 250 μ g/mL 농도까지 독성이 없는 것으로 나타났다. 따라서 본 실험에서는 유효 활성을 나타내는 250 μ g/mL 이하의 농도를 실험 농도로 결정하여 실험을 진행하였다(Fig. 2).

NO 생성과 iNOS 발현 억제 효능 비교 - NO는 다양한 외부 자극으로부터 대식세포가 활성화되어 생성되는 염증 매개물질의 일종으로 iNOS에 의해 과량 생성되며 염증반응을 촉진시켜 심혈관계 질환, 당뇨, 종양 등의 다양한 염증성 질환을 야기하는 것으로 알려져 있다.²²⁾ LPS 자극에 의해 염증반응이 유도된 RAW 264.7 대식세포에서 DGSS-

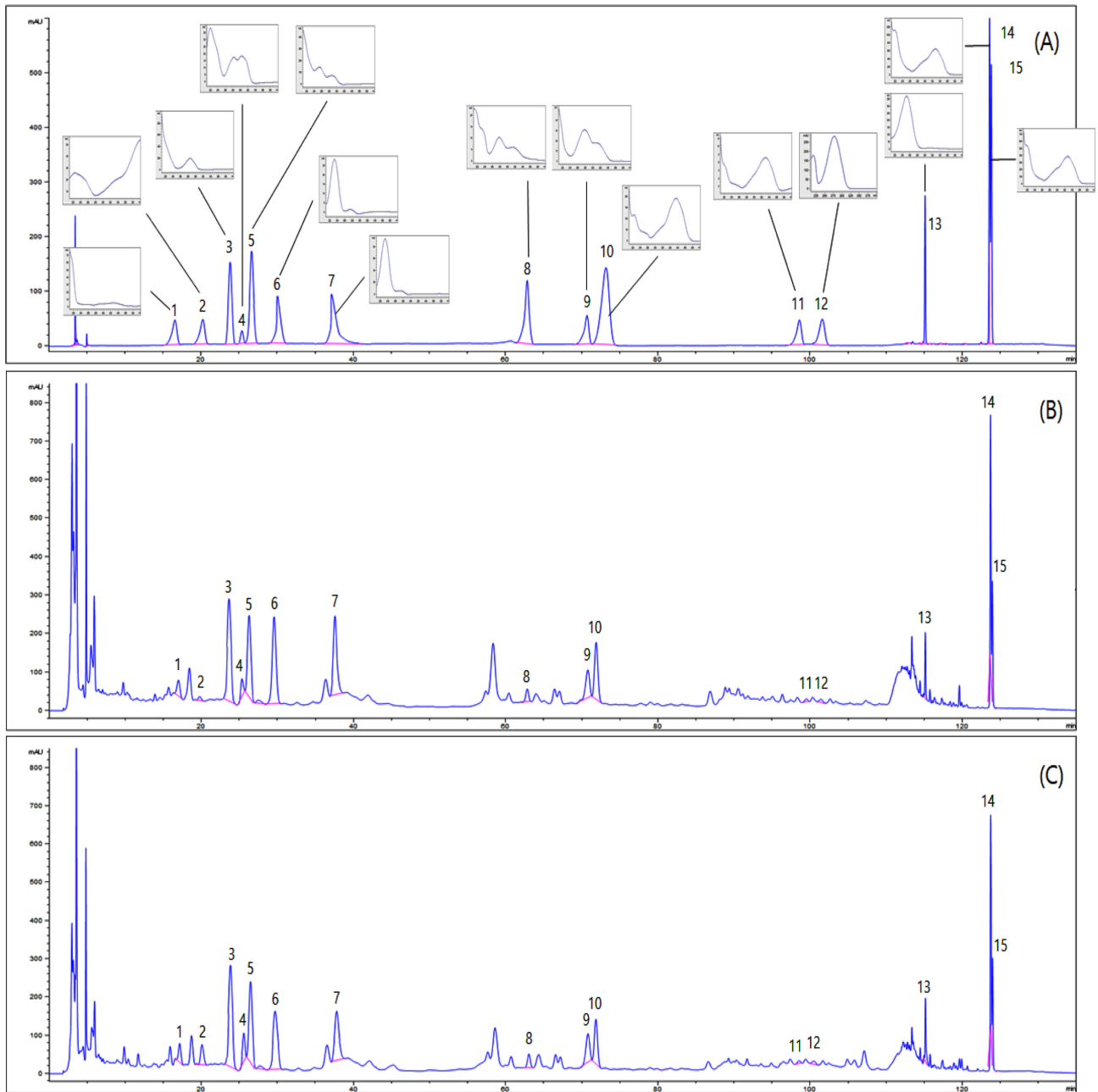


Fig. 1. HPLC chromatograms of standard mixtures (A), dry extract (B) and mix extract powder (C) of DGSS. 1, Amygdalin; 2, Safflomin A; 3, Brazilin; 4, Norisoboldine; 5, Protosappanin B; 6, Albiflorin; 7, Paeoniflorin; 8, Liquiritin; 9, Coumarin; 10, Nodakenin; 11, Decursinol; 12, Cinnamic acid; 13, Glycyrrhizic acid; 14, Decursin; 15, Decursinol angelate

DE와 DGSS-MEP가 NO 생성과 iNOS 발현에 미치는 영향을 확인한 결과는 Fig. 3과 같다. LPS만 처리한 군과 비교하였을 때, DGSS-DE와 DGSS-MEP는 NO 생성을 농도의존적으로 억제하였으며($p < 0.001$), 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 DGSS-D와 DGSS-SE의 NO 생성율은 각각 37.38%, 37.38%로 동일하게 나타났다. 이는 양성대조군인 DEX를 20 μM 의 농도로 처리한 군에서 42.40%의 NO 생성율을 보인 것과 비교

했을 때 DGSS-DE와 DGSS-MEP가 DEX보다 NO 생성을 억제하는 효능이 우수하다는 것을 알 수 있다(Fig. 3A). 또한, DGSS-DE와 DGSS-MEP가 NO를 생성하는 iNOS의 단백질과 mRNA 발현을 농도의존적으로 억제하였고, DEX와 유사하게 iNOS 발현을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 3B). Jeong 등²³⁾은 iNOS 발현 억제가 NO 생성 억제에 영향을 미친다고 보고하였으며 본 연구에서도 유사한 경향을 보였

Table IV. Comparison of equivalence of 15 compounds of DGSS by extraction method

Compound	DGSS-DE			DGSS-MEP		
	Area ($\times 10^4$)	STDV ¹⁾ (%)	RSD ²⁾ (%)	Area ($\times 10^4$)	STDV (%)	RSD (%)
Amygdalin	1147.198	4.433	0.386	1146.834	33.896	2.956
Safflomin A	254.693	4.827	1.895	1788.056	60.540	3.386
Brazilin	8465.368	189.076	2.234	8619.559	297.053	3.446
Norisoboldine	726.289	5.522	0.760	1265.078	22.684	1.793
Protosappanin B	5914.526	44.073	0.745	5739.948	13.398	3.386
Albiflorin	8115.237	67.425	0.831	5324.874	48.231	3.446
Paeoniflorin	7755.248	10.228	0.132	5541.650	175.092	3.160
Liquiritin	890.616	6.202	0.696	904.340	15.909	1.759
Coumarin	2365.193	56.055	2.370	1981.957	31.340	1.581
Nodakenin	4526.612	96.667	2.136	3095.808	12.785	0.413
Decursinol	231.935	4.764	2.054	314.073	6.919	2.203
Cinnamic acid	254.806	6.522	2.560	206.595	8.025	3.884
Glycyrrhizic acid	1116.497	0.561	0.050	1320.111	38.998	2.954
Decursin	5076.311	4.191	0.083	4503.031	12.975	0.288
Decursinol angelate	1597.715	1.844	0.115	1463.105	2.143	0.146
Correlation coefficient	0.950					

Each value is presented as mean (n=5).

¹⁾STDV: Standard deviation.

²⁾RSD: Relative standard deviation.

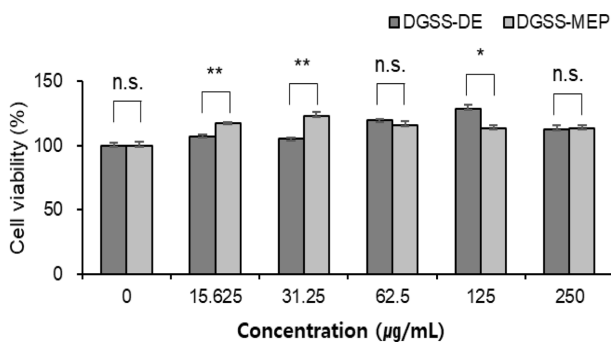


Fig. 2. Cell viability of DGSS-DE and DGSS-MEP on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The macrophages were treated with various concentration (0, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 $\mu\text{g/mL}$) of DGSS-DE and DGSS-MEP for 24 hrs. The results were expressed as the mean \pm S.D. from the two independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ indicates significant difference from the DGSS-DE and DGSS-MEP. n.s. show not significant from the DGSS-DE and DGSS-MEP.

다. 이러한 결과를 통해 DGSS-DE와 DGSS-MEP가 염증반응을 개선시키는 한약제제로 사용될 수 있음을 시사하고 있다.

PGE₂ 생성과 COX-2 발현 억제 효능 비교 – COX는 arachidonic acid를 prostaglandin로 전환하는 효소로 COX-1과 COX-2로 나뉜다. COX-1은 정상 세포에서 정상적인 생

체기능을 하는 반면, COX-2는 염증반응 부위에서 발현되며 염증매개물질인 PGE₂ 생성을 촉진시켜 통증, 발열 등을 포함한 염증 반응에 관여한다.²⁴⁾ LPS 자극에 의해 염증반응이 유도된 RAW 264.7 세포에서 DGSS-DE와 DGSS-MEP가 PGE₂ 생성 및 COX-2 발현에 미치는 영향을 알아본 결과, LPS만 처리한 군과 비교했을 때 DGSS-DE와 DGSS-MEP가 PGE₂ 생성 및 COX-2 발현을 유의적으로 억제함을 확인하였다(Fig. 4). 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 처리 농도에서 DGSS-DE와 DGSS-MEP의 PGE₂ 생성율은 각각 35.90%, 28.13%로 양성대조군인 DEX(28.46%, 20 μM)와 유사한 PGE₂ 억제 효과를 보였다(Fig. 4A). 또한, PGE₂ 합성 효소인 COX-2의 단백질과 mRNA 발현에서도 DGSS-DE와 DGSS-MEP가 DEX와 유사하게 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 4B). 이러한 결과를 통해 DGSS-DE와 DGSS-MEP가 활성화된 대식세포에서 PGE₂ 생성 및 COX-2 발현을 감소시킨다는 것을 확인함으로써 당귀수산이 염증질환의 예방과 치료에 사용될 수 있을 것이라 사료된다.

염증성 cytokine 생성과 유전자 발현 억제 효능 비교 – Cytokine은 저분자량의 비구조 단백질로써 염증 및 면역 반응에 복합적으로 작용한다.²⁵⁾ TNF- α , IL-1 β 및 IL-6와 같은 전염증성 cytokine은 활성화된 면역세포에서 주로 생성되며, 대식세포를 활성화시켜 신경퇴행성 질환, 골관절염 등의 염

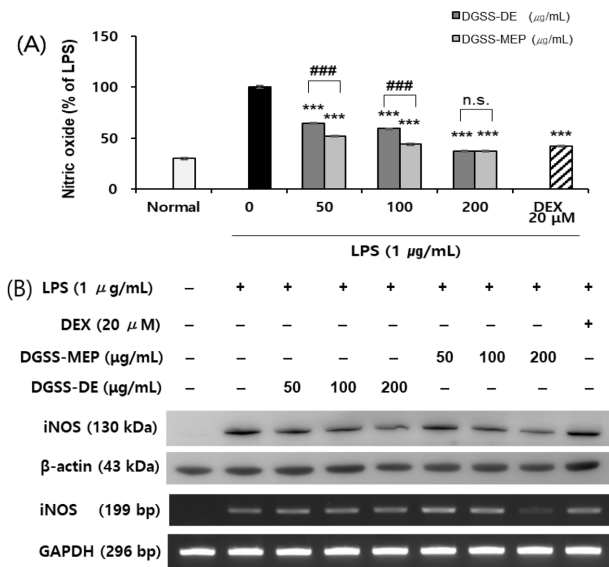


Fig. 3. Inhibitory effect of DGSS-DE and DGSS-MEP on NO production (A), iNOS protein and mRNA expression (B) in LPS-stimulated RAW264.7 cells. (A) Cells were treated with various concentrations (50, 100, 200 μg/mL) of DGSS-DE and DGSS-MEP for 1hr and then incubated with LPS (1 μg/mL) for 24 hr. The results were expressed as the mean±S.D. from the three independent experiments. ****p* < 0.001 indicates significant difference from LPS. ###*p* < 0.001 indicates significant difference from DGSS-DE and DGSS-MEP. n.s. show not significant from the DGSS-DE and DGSS-MEP. (B) For immunoblot and RT-PCR, cells were pretreated with various concentrations of DGSS-DE and DGSS-MEP for 1hr, and then incubated with LPS (1 μg/mL) for 24 hr and 6 hr, respectively.

증성 질환을 유발시킬 수 있다.²⁶⁻²⁹⁾ Fig. 5에서 보는 것과 같이 DGSS-DE와 DGSS-MEP가 LPS만 처리한 군에 비해 염증성 cytokine의 생성 및 유전자 발현을 유의하게 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. IL-1β와 IL-6의 경우 DGSS-DE와 DGSS-MEP를 200 μg/mL의 농도로 처리했을 때 생성량이 각각 71.63%, 77.82%와 36.00%, 35.33%로 양성대조군인 DEX(89.43%, 44.00%, 20 μM)보다 강한 억제 효과를 보였고, mRNA 발현 억제효과는 DEX와 유사하게 나타났다(Fig. 5B, C, D). 한편, TNF-α의 경우 DGSS-DE(47.60%, 200 μg/mL)는 DEX(47.47%, 20 μM)와 유사한 TNF-α 억제 효과를 보인 반면, DGSS-MEP(63.81%, 200 μg/mL)는 DEX보다 낮은 억제 효과를 보였다. mRNA 발현 억제 효능은 DGSS-DE와 DGSS-MEP가 DEX와 유사하게 나타났다(Fig. 5A, D). 이는 황금작약탕 및 가미소요산 전탕액(복합제제)과 정제(혼합제제)의 염증성 cytokine 생성과 유전자 발현 억제효과를 측정 한 Kim 등³⁰⁾ 및 Choi 등³⁾의 연구결과와 유사하게 나타났다. 이러한 결과로부터 DGSS-DE와 DGSS-MEP가 과도한 면역반응에 의해 생성되는 전염증성 cytokine

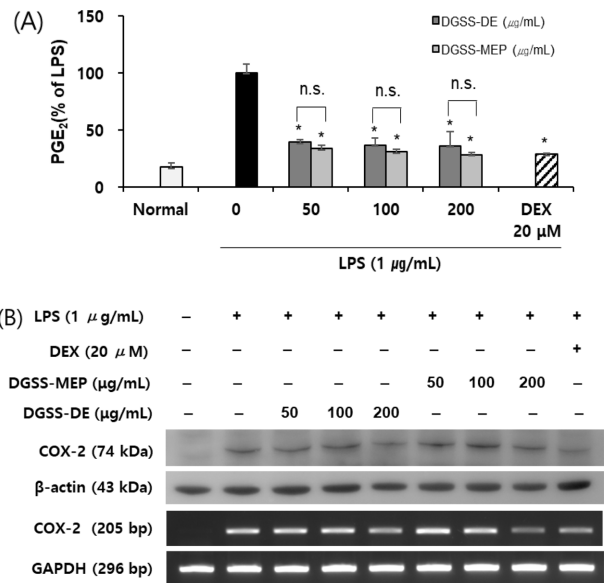


Fig. 4. Inhibitory effect of DGSS-DE and DGSS-MEP on PGE₂ production (A), COX-2 protein and mRNA expression (B) in LPS-stimulated RAW264.7 cells. (A) Cells were treated with various concentrations (50, 100, 200 μg/mL) of DGSS-DE and DGSS-MEP for 1hr, and then incubated with LPS (1 μg/mL) for 24 hrs. The results were expressed as the mean±S.D. from the three independent experiments. **p* < 0.05 indicates significant difference from LPS. n.s. show not significant from the DGSS-DE and DGSS-MEP. (B) For immunoblot and RT-PCR, cells were treated with various concentrations of DGSS-DE and DGSS-MEP for 1hr, and then incubated with LPS (1 μg/mL) for 24 hr and 6 hr, respectively.

및 유전자 발현을 억제하여 세포 및 조직 손상을 예방할 뿐만 염증반응을 억제시키는 우수한 한약제제라고 판단되며, 향후 당귀수산을 이용한 제품 및 제형 개발 연구 등에 기초 자료로 활용 할 수 있을 것이라 기대된다.

결론

본 연구에서는 제조방법에 따른 당귀수산의 성분 및 효능을 비교 분석하기 위해 복합제제인 당귀수산 건조엑스(DGSS-DE)와 혼합제제인 당귀수산 혼합단미엑스산(DGSS-MEP)의 이화학적 품질 특성, 화학적 유사도(동등성 상관계수) 및 항염증 효능을 측정하였으며, 결과는 다음과 같다. 우선, DGSS-DE와 DGSS-MEP의 이화학적 품질 특성을 측정 한 결과, 색도(L, a, b)를 제외한 pH, 산도, 당도 및 갈색도는 DGSS-DE와 DGSS-MEP 간에 유의적인 차이가 없음을 확인하였다. 다음, DGSS-DE와 DGSS-MEP의 구성성분에 대한 화학적 유사도를 확인하기 위해 HPLC를 이용하여 15가지 유효성분인 amygdalin,

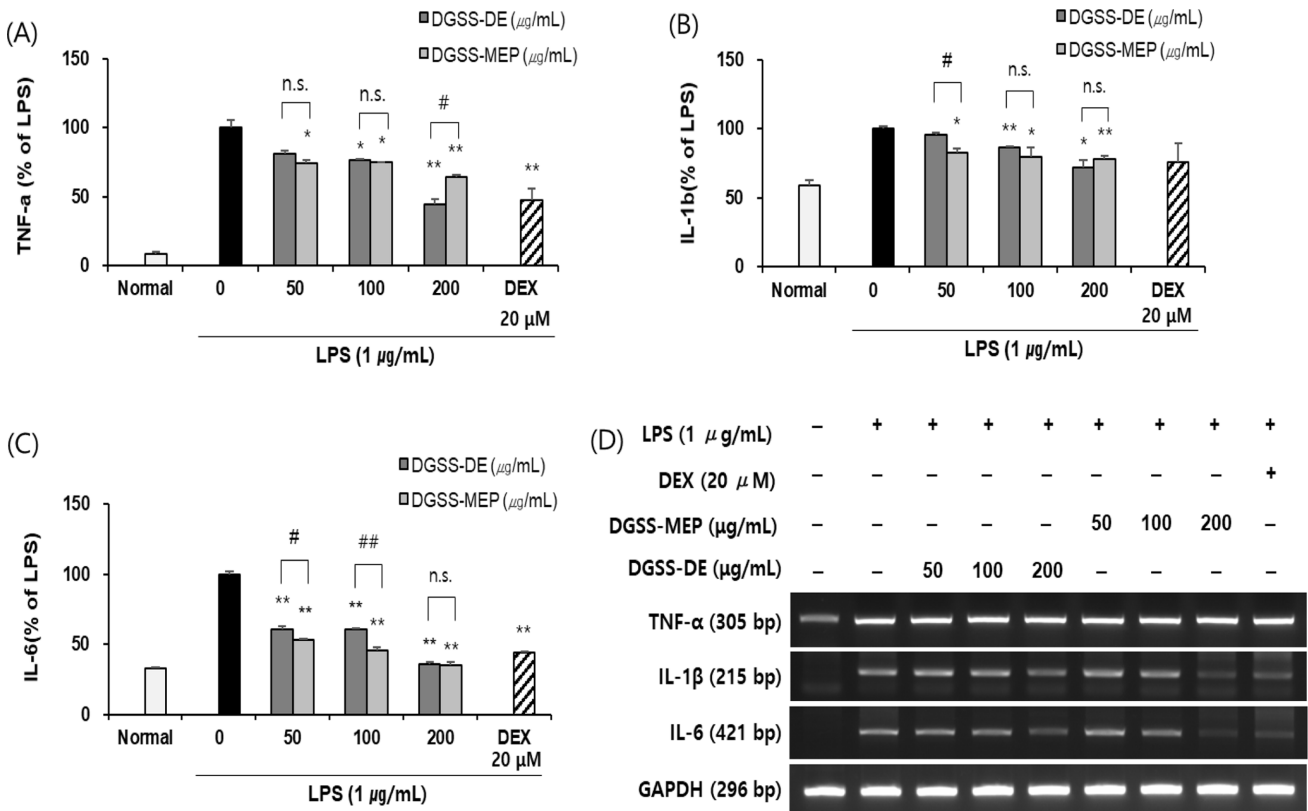


Fig. 5. Inhibitory effect of DGSS-DE and DGSS-MEP on the secretion of pro-inflammatory cytokines (A-C) and the expression of mRNAs (D). (A-C) Cells were pretreated with various concentrations (50, 100, 200 μg/mL) of DGSS-DE and DGSS-MEP for 1hr before being induced inflammation with LPS for 24 hr. The results were expressed as the mean±S.D. from the three independent experiments. **p* < 0.05 and ***p* < 0.01 indicates significant difference from LPS. #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01 indicates significant difference from DGSS-DE and DGSS-MEP. n.s. show not significant from the DGSS-DE and DGSS-MEP. (D) For RT-PCR, cells were treated with various concentrations of DGSS-DE and DGSS-MEP for 1hr, and then incubated with LPS (1 μg/mL) for 6 hr.

safflomin A, brazilin, norisoboldine, protosappanin B, albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, coumarin, nodakenin, decursinol, cinnamic acid, glycyrrhizic acid, decursin 및 decursinol angelate를 동시에 분석할 수 있는 분석법을 개발한 다음, 대응하는 각 피크 면적을 통하여 동등성 상관 계수를 측정 한 결과 0.950으로 시료 간 화학적으로 매우 유사함을 확인하였다. 마지막으로, LPS 자극에 의해 염증이 유도된 RAW 264.7 대식세포에 DGSS-DE와 DGSS-MEP를 처리하여 항염증 활성을 평가한 결과, 염증매개물질인 NO, PGE₂와 전염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 생성이 현저히 감소되었으며, iNOS와 COX-2의 단백질과 유전자 발현 및 TNF-α, IL-1β 그리고 IL-6의 유전자 발현이 억제되었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 제조방법에 따른 DGSS-DE와 DGSS-MEP의 구성성분과 효능의 비교·분석 결과는 당귀수산의 품질향상을 위한 품질관리법 개발 및 제형개발 연구 등에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 보건복지부 한의약산업육성 기반구축사업의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. The Korean Food and Drug Administration Notification 2007-89. The Korean Pharmacopoeia Ninth Edition.
2. Korea Ministry of Government Legislation. Available from: URL: <http://www.law.go.kr/main.html>
3. Choi, H. M., Kim, S. J., Kim, I. S., Lee, J. B., Kim, J. B., Moon, S. O. and Lee, H. D. (2016) Evaluation on anti-oxidant activity and anti-inflammatory effect for the new formulation of Gamisoyosan. *Korea J. Herbol.* **31**: 1-9.
4. Lee, J. B., Choi, H. M., Kim, J. B., Kim, J. O., Moon, S. O. and Lee, H. D. (2018) Evaluation on pharmacological effects and compound contents of Hwangryunhaedok-tang formu-

- lation for tablet. *Korea J. Herbol.* **33**: 9-18.
5. Kim, J. O., Baek, K. Y. and Lee, H. D. (2018) Comparison of marker components and biological activities of Gamiguibi-tang (Jiaweiguipi-tang) decoction and commercial extract granules. *J. Physiol. & Pthol. Korean Med.* **32**: 333-340.
 6. Qiu, J. (2007) Back to the future for Chinese herbal medicines. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**: 506.
 7. Wang, L., Zhou, G. B., Liu, P., Song, J. H., Liang, Y., Yan, X. J., Xu, F., Wang, B. S., Mao, J. H., Shen, Z. X., Chen, S. J. and Chen, Z. (2008) Dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Realgar-Indigo naturalis as an effective treatment for promyelocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**: 4826.
 8. Shin, H. G. (2018) Standard herbal medicine formulary, Deajeon:KIOM; p. 163-71.
 9. Heo, J. (1983) Donguibogam, 109,578, 581. Namsandang, Seoul.
 10. Kim, K. H. (1985) Effects of Dangkwisoo-san on subcutaneous hematoma. *K. H. Univ. O. Med. J.* **8**: 23-31
 11. Kim, T. S. and Ahn, K. S. (1988) Effect of Dangkwisoo-san and Dodamtang on the intravascular coagulation induced by endotoxin in rat. *J. Korean Oriental Med. Pathol.* **3**: 91-98.
 12. Kim, J. H., Park, S. H., Kim, Y. W., Ha, J. M., Bae, S. S., Lee, G. S., Cho, S. I., Choi, B. T. and Shin, H. K. (2011) The traditional herbal medicine, Dangkwisoo-san, prevents cerebral ischemic injury through nitric oxide-dependent mechanisms. *J. Evid. Based Complement Altern. Med.* 718302.
 13. Kim, J. H. and Yoon, H. J. (2005) Study of two cases for allergic purpura. *J. Physiol. & Pthol. Korean Med.* **19**: 821-825
 14. Ko, H., Shin, S. M. and Park, S. Y. (2019) Endothelium-dependent vasorelaxation effects of Dangguisu-san, Samhwangsasim-tang extract on rabbit carotid artery. *J. Physiol. & Pthol. Korean Med.* **33**: 198-206.
 15. Yun, Y. J., Kim, K. L., Jin, M. H., Kang, Y. G., Nam, W. J. and Park, D. I. (2013) A case report of tension type headache patient with Dangkwisoo-san and acupuncture. *Herb. Formula Sci.* **21**: 206-212.
 16. Kim, B. J. (2018) Effects of Dangkwisoo-San, ginger and curcumin on transient receptor potential melastatin 7 channels. *J. Korean Med. Obes. Res.* **18**: 10-18.
 17. Bak, J. W., Sim, B. Y. and Kim, D. H. (2014) The effects of Danggwisusan on restoration ability in wound induced animal models. *Korea J. Herbol.* **29**: 55-63.
 18. Lyu, J. H., Kim, K. H., Kim, H. W., Cho, S. I., Ha, K. T., Choi, J. Y., Han, C. W., Jeong, H. S., Lee, H. K., Ahn, K. S., Oh, S.R., Sadikot, R. T., Christman, J. W. and Joo, M. (2012) Dangkwisoo-san, an herbal medicinal formula, ameliorates acute lung inflammation via activation of Nrf2 and suppression of NF- κ B. *J. Ethnopharmacol.* **140**: 107-116.
 19. Seo, C. S. and Shin, H. K. (2014) Quantitative analysis of the seventeen marker components in dangguisu-san using ultra-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Yakhak Hoeji* **58**: 158-164.
 20. Lee, D. Y., Lee, H. S., Jo, J. H., Yi, Y. W., Kim, S. J., Kang, K. and Lee, I. H. (2020) Comparison of ingredients and activities of Danggwisoo-san and Jakyakgamcho-tang by extraction method. *J. Korean Med. Rehabil.* **30**: 31-39.
 21. Do, H. J., Shin, Y. S., Lee, J. H., Ahn, Y. J., Ha, I. H., Lee, Y. J., Kim, M. R., Ko, W. I., Song, S. H., Chung, H. J., Lee, I. H., Lee, J. W., Kim, E. J. and Kim, M. J. (2016) Stability of Danggwisoo-san(Dangguixu-san) water extract, a herbal medicine, under various storage conditions. *J. Korean Med. Rehabil.* **26**: 1-8.
 22. Liu, Y. C., Zou, X. B., Chai, Y. F. and Yao, Y. M. (2014) Macrophage polarization in inflammatory diseases. *Int. J. Biol. Sci.* **10**: 520-529.
 23. Jeong, H. R., Sung, M. S., Kim, Y. H., Ham, H. M., Choi, Y. M. and Lee, J. S. (2012) Anti-inflammatory activity of *salvia plebeia* R. Br. leaf through heme oxygenase-1 induction in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **47**: 888-894.
 24. Kim, D. W., Yun, H. J., Heo, J. Y., Kim, T. H., Cho, H. J. and Park, S. D. (2010) Anti-oxidative and anti-inflammatory effect of Do-Ki-Tang methanol extract in mouse macrophage cells. *Korea J. Herbol.* **25**: 103-112.
 25. Gulati, K., Guhathakurta, S., Joshi, J., Rai, N. and Ray, A. (2016) Cytokines and their role in health and disease: A brief overview. *MOJ Immunol.* **4**: 00121.
 26. Schweizer, A., Feige, U., Fontana, A., Muller, K. and Dinarello, C. A. (1988) Interleukin-1 enhances pain reflexes. Mediation through increased prostaglandin E2 levels. *Agents Actions* **25**: 246-251.
 27. Klein, M. A., Moller, J. C., Jones, L. L., Bluethmann, H., Kreutzberg, G. W. and Raivich, G. (1997) Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice. *Glia* **19**: 227-233.
 28. Boka, G., Anglade, P., Wallach, D., Javoy-Agid, F., Agid, Y. and Hirsch, E. C. (1994) Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **172**: 151-154.
 29. Wojdasiewicz, P., Poniatowski, L. A. and Szukiewicz, D. (2014) The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm.* **2014**: 561459.
 30. Kim, S. J., Lee, J. B., Choi, H. M., Lee, H. Y., Kim, M. J., Lee, M. H., Kim, J. O. and Lee, H. D. (2018) Evaluation on pharmacological effects and component analysis of Hwanggeumjakyak-tang formulation for tablet. *Kor. J. Pharmacogn.* **49**: 362-371.

(2021. 7. 20 접수; 2021. 9. 3 심사; 2021. 9. 8 게재확정)