

顛倒散의 추출용매에 따른 항염 및 항산화 비교 연구

서형식

상지대학교 한의과대학 안이비인후피부과교실

The Comparative Study of Anti-inflammation and Anti-oxidation in Accordance with Extraction Solvents of *Jeondo-san*

Hyung-Sik Seo

Objective : The purpose of this study was to compare anti-Inflammation and anti-oxidation of *Jeondo-San*(JDS) extracted with two kinds of solvents, ethanol and water.

Methods : Two kinds of JDS extractions were prepared 20, 50, 100 μ l/mg. The Cytotoxicity was measured by MTT assay in Raw 264.7 cell. The anti-inflammation effects were measured by inhibitory efficacy on PGE₂, NO, TNF- α , COX-2 and iNOS in Raw 264.7 cell. The anti-oxidation effects were measured by ROS inhibitory efficacy, intracellular GSH synthesis and DPPH Radical scavenging in HaCaT cell.

- Results** :
1. All of JDS extraction groups had no cytotoxicity in Raw 264.7 cell.
 2. All of JDS extraction groups showed significantly inhibitory effect on production of PGE₂. Inhibitory efficacy increased in accordance with concentration.
 3. All of JDS extraction groups showed significantly inhibitory effect on production of NO. Inhibitory efficacy increased in accordance with concentration.
 4. All of JDS extraction groups did not show significantly inhibitory effect on production of TNF- α .
 5. 100 μ g/ml JDS extracted with ethanol and 50 μ g/ml, 100 μ g/ml JDS extracted with water showed inhibitory effect on iNOS expression.
 6. All of JDS extraction groups showed significantly inhibitory effect on production of ROS. Inhibitory efficacy increased in accordance with concentration. Ethanol extractions were better than water extractions.
 7. 100 μ g/ml JDS extracted with ethanol only produced GSH of $32 \pm 5.2\%$.
 8. All of JDS extraction groups showed significantly scavenging effect of DPPH radicals. Inhibitory efficacy increased in accordance with concentration. Ethanol extractions were better than water extractions.

Conclusion : Two kinds of JDS extractions have not cytotoxicity and inhibit production of NO. JDS extracted with water was effective in anti-inflammation, JDS extracted with ethanol was effective in anti-oxidation.

Key words : *Jeondo-San*, Extration Solvent, Anti-inflammation, Anti-oxidation.

I. 緒 論

顛倒散은 大黃과 硫黃으로 구성되어 等分으로 細末하여 凉水調敷하는 방법으로 肺風分刺 및 酒 黷癩를 치료하는 외용 치료제이다¹⁾.

敷法을 활용하기 위해서는 細末한 약제와 혼합할 용매가 필요하며, 사용될 수 있는 용매로는 예전부터 흔히 水, 酒, 醋, 蜜 등이 이용되어 왔다. 이러한 용매는 자극성을 줄일 것인지, 혈액순환을 촉진 할 것인지, 영양을 보충할 것인지 등에 따라 선택될 수 있다.

한의학적으로는 주로 환자 및 질병의 상태에 따라 혼합할 용매를 선택하여 사용하여 왔다. 그러나 최근 들어 다양한 종류의 추출용매가 등장하고 추출물의 효능을 연구하는 방법들이 개발되면서 추가적으로 고려되어야 할 사항으로 동일 약제라 하여도 추출용매에 따라 추출성분과 효능의 정도가 달라 질 수 있다는 것이며, 이와 관련된 연구²⁻⁶⁾가 여러 분야에서 보고 되고 있다.

이에 본 연구는 敷法을 활용하여 이용되는 顛倒散을 에탄올과 물로 추출하여 PGE₂, NO, TNF- α 생성 저해능과 iNOS, COX-2 발현 억제능을 통한 항염 효능과 ROS 생성 저해능, GSH 합성능, DPPH 소거능을 통한 항산화 효능을 비교하여 추출용매에 따른 차이를 알아보고 외용 치료제인 顛倒散의 임상적인 활용가치를 높이고자 하였다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 약물

본 실험에 사용된 한약재는 《醫宗金鑑》에 수록된 顛倒散(JDS)의 처방에 따른 구성약물로 상지대학교부속한방병원 약제과에서 엄선하여 구입한 후 실험에 사용하였다(Table 1).

Table 1. Prescription of *Jeondo-San*

韓藥名	生藥名	重量(g)
大 黃	<i>Rhei Radix et Rhizoma</i>	12,5
硫 黃	<i>Sulfur</i>	12,5
Total amount		25

2) 균주 및 세포주

세포독성과 항염에 사용된 Raw 264,7(Mouse Macrophage cell line) 세포주는 한림대학교 TIC에서, 항산화에 사용된 HaCaT(Human Keratinocyte cell line) 세포주는 강원대학교 생화학과에서 분양받아 사용하였다.

3) 시약 및 기기

실험에 사용한 2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH), Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT), Griess reagent, Dimethyl sulfoxide (DMSO), N^G-methyl-L-arginine acetate salt (NMMA) Lipopolysaccharide(LPS)는 Sigma(USA)에서 구입하였으며 Fetal Bovine Serum(FBS), Penicillin-Streptomycin, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)/High glucose는 Hyclone (USA)에서 구입하였다. 기기로는 ebioscience

교신저자 : 서형식, 강원도 원주시 우산동 238번지 상지대학교 부속 한방병원 안이비인후피부과 (Tel: 033-741-9266, E-mail: aran99@sangji.ac.kr)

* 이 논문은 2010년도 상지대학교 교내 연구비 지원에 의한 것임.
• 접수 2010/07/01 • 수정 2010/07/29 • 채택 2010/08/05

(USA), R&D system(USA), ELISA reader (Perkin-Elmer, Singapore)와 Multi-photon Confocal Laser Scanning Microscope system(Carl Zeiss Jena GmbH, Germany)을 사용하여 실험하였다.

2. 방법

1) 시료조제

JDS 50 g을 분쇄기를 이용하여 분말로 만든 후 25 g씩 나누어, 에탄올 추출물은 70% EtOH 500 ml와 혼합하여 교반기로 25℃에서 180분 동안 추출하고, 열수 추출물은 2차 증류수 1 l와 혼합하여 약탕기로 100℃에서 150분 동안 전탕한 후 추출하였다. 각 추출물을 여과지(Whatman 4 → ADVANTEC 5C)로 여과하고 여과액을 회전감압 농축기를 이용하여 완전 농축하고 에탄올 추출물은 50℃에서 EtOH 제거후 70℃에서 H₂O를 제거하였고, 열수 추출물은 70℃에서 H₂O를 제거하여 시료를 얻었다. JDS를 microtube에 담은 후 100% DMSO를 이용하여 20 mg/ml의 농도로 만들어 실험에 사용하였다.

2) 균주 및 세포 배양

Raw 264.7(Mouse Macrophage cell line) cell 을 10% fetal bovine serum, penicillin(100 units/ml), streptomycin(100 units/ml)이 첨가된 DMEM 배지로 5% CO₂, 37℃에서 배양하였으며, 배지는 3~4일 간격으로 교체하고 배양용기에 90% 이상 자라게 되면 계대 배양하여 실험에 사용하였다⁷⁾.

3) 세포 독성 측정

Raw 264.7 세포를 배양접시의 바닥에 접종한 후, Penicillin(100 U/ml), Streptomycin(100 µg/ml), 10% FBS를 함유하는 DMEM배지를 넣고 37℃, 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기 내에서 배

양하였다. Raw 264.7세포를 96well plate에 5×10⁵/ml의 농도로 희석하여 100 µ씩 접종한 후 24시간 배양하였다. 배양 후 배지를 모두 제거하고 혈청이 포함되지 않은 배지 90 µ씩을 각 well에 넣고 JDS의 농도가 20, 50, 100 µg/ml가 되도록 혈청이 포함되지 않은 배지를 이용하여 희석한 시료를 10 µ씩 well에 처리하여 주었다. 24시간 배양 후 PBS를 이용하여 5 mg/ml의 농도로 녹여져 있는 MTT 시약을 20 µ씩 넣어주고 4시간 배양하였다. MTT 시약과 시료가 포함된 배지를 모두 제거하고 각 well에 100 µ acid isopropanol (0.04N HCl in iso-propanol)을 첨가하여 30분간 교반하여 주고, ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광값을 측정하였다⁸⁾.

4) 항염 효능 측정

① PGE₂ 생성 저해 효능 측정

Raw 264.7 세포를 1×10⁶/well의 농도로 6 well plate에 접종하였다. 24시간 배양 후 무혈청 배지를 이용하여 시료의 최종 농도가 20, 50, 100 µ/ml이 되도록 처리하여 준 후 LPS를 100 ng/ml의 농도로 처리하였다. 24시간 후 배지를 회수하여 12000 rpm으로 5분 동안 원심 분리하여 상층액을 회수하여 -70℃에서 보관하였다. 상온에서 측정 배지를 녹인 후 Calibrator Diluent를 사용하여 5배 희석하였고 또한 PGE₂ standard를 2500, 1250, 625, 312.5, 156, 39의 농도가 되도록 Calibrator Diluent를 이용하여 희석하였다. 희석되어진 시료와 standard를 각 well에 100 µ씩 넣고, PGE₂ conjugate와 PGE₂ antibody 용액을 각각 50 µ씩 넣어준 후 shaker위에서 2시간 반응시킨 후 PGE₂는 washing buffer를 이용하여 4~5번 세척하였다. Substrate Solution (Color reagent A와 B 용액을 각각 1:1로 섞어서 필요한 만큼 준비)을 각 well에 200 µ씩 넣어 준 후 빛이 들어오지 않는 곳에서 30분 동안 반응시켰다. 반응을 중지시키기 위하여

2N HCl 용액을 각 well당 50 μ l씩 넣어준 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

② NO 생성 저해 효능 측정

96 well plate에 well당 $5 \times 10^5/ml$ 의 Raw 264.7 세포가 들어있는 부유액 100 μ l를 넣고 24시간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, 무혈청 배지에 최종 농도가 20, 50, 100 $\mu g/ml$ 가 되도록 JDS를 처리한 후 염증 반응 유도인자인 LPS를 100 ng/ml의 농도로 처리하였다. 24시간 배양 후 배지를 이용하여 NO의 생성 정도를 측정하였다⁹⁾. 세포배양액 50 μ l와 Griess시약 50 μ l를 혼합하여 10분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 NO 생성 억제제인 NMMA를 50 μM 이 되도록 시료와 같은 방법으로 처리하여 NO 생성 저해 효능을 비교하였다.

③ TNF- α 생성 저해 효능 측정

Raw 264.7 세포를 $1 \times 10^6/well$ 의 농도로 6 well plate에 접종하였다. 24시간 배양 후 무혈청 배지를 이용하여 시료의 최종 농도가 20, 50, 100 $\mu g/ml$ 가 되도록 처리한 후 LPS를 100 ng/ml의 농도로 처리하였다. 24시간 후 배지를 회수하여 12000 rpm으로 5분 동안 원심 분리하여 상층액을 회수하여 $-70^\circ C$ 에서 보관하였다. 상온에서 측정 배지를 녹인 후 1 \times assay diluent를 사용하여 50배 희석하였다. 새 plate에 antibody를 코팅해주고 1 \times coating buffer로 capture Ab를 1/250으로 희석한 후 100 μ l/well 넣어 주고 $4^\circ C$ 에서 보관하였다. Washing buffer를 이용하여 4~5번 정도 세척한 후 1~2분 정도 Washing solution을 넣고 흔들었으며 이 과정을 4~5번 반복하여 수행하였다. 1 \times assay diluent 용액을 200 μ l/well 넣어주고 실온에서 1시간 반응시킨 후 Washing buffer를 이용하여 4~5번 정도 세척한 후, 1~2분 정도 Washing solution을 넣고 흔들었으며 이 과정을 4~5번 반복하여 수행하였다. TNF- α standard를

100 μ l/ml 넣어주고, TNF- α 측정할 세포 배양액을 1 \times assay diluent 용액으로 50~100배 희석하여 100 μ l/ml 넣어주고 실온에서 2시간 반응시켰다. Washing buffer를 이용하여 4~5번 정도 세척한 후 1~2분 정도 Washing solution을 넣고 흔들었으며 이 과정을 4~5번 반복하여 수행하였다. Detection Ab를 1 \times assay diluent 용액으로 1/250으로 희석하여 100 μ l/ml 넣어주고 실온에서 1시간 반응시켰다. 이후 Washing buffer를 이용하여 4~5번 정도 세척한 후 1~2분 정도 Washing solution을 넣고 흔들었으며 이 과정을 4~5번 반복하여 수행하였다. Avidin-HRP를 1 \times assay diluent 용액으로 1/250으로 희석하여 100 μ l/ml 넣어주고 실온에서 30분간 반응시켰다. Washing buffer를 이용하여 4~5번 정도 세척한 후 1~2분 정도 Washing solution을 넣고 흔들었으며 이 과정을 4~5번 반복하여 수행하였다. TMB solution을 100 μ l/ml 넣어주고 실온에서 15분간 반응시킨 후 Stop solution을 50 μ l/ml 넣어주고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

④ COX-2, iNOS 발현 억제 효능 측정

6 well plate에 well당 $1 \times 10^6/ml$ 의 Raw 264.7 세포가 들어있는 부유액 1 ml를 넣고 24시간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, 무혈청 배지에 최종 농도가 20, 50, 100 $\mu g/ml$ 이 되도록 시료를 처리한 후 염증 반응 유도 인자인 LPS를 100 ng/ml의 농도로 처리하였다. 세포를 scraper를 이용하여 회수하여 12000 rpm에서 5분 동안 원심 분리한 후에 상층액을 제거하고, PBS를 이용하여 세척한 후 RIPA buffer를 100 μ l씩 넣고 혼합한 후에 얼음에서 30분 동안 세포를 용해시켰다. 세포를 용해시킨 후 12000rpm에서 5분 동안 원심 분리 하여 상층액을 이용하여 Bicinchoninic Acid(BCA)법을 이용한 단백질 정량을 수행하였다. 단백질 정량 후 well당 35 μg 정도의 단백질을 10% SDS-PAGE에 놓고 100 V에서 1시간 동안

전기영동을 수행하였다. 전기영동 후 PVDF membrane에 단백질을 옮긴 후 COX-2, iNOS 1차 antibody를 반응시킨 후 2차 Antibody를 반응하여 단백질의 발현 정도를 확인하였다. 단백질 보정을 위하여 β -actin도 함께 수행하였다.

5) 항산화 효능 측정

① 세포내 ROS 생성 저해능 측정

HaCaT 세포를 $1 \times 10^5/ml$ 의 농도로 96 well plate에 100 μ 씩 접종한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 무혈청 배지를 이용하여 JDS의 최종농도가 20, 50, 100 $\mu g/ml$ 가 되도록 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 PBS 100 μ 를 넣은 후 세척하였다. 이 과정을 3회 반복하여 수행하였다. DMSO에 녹아 있는 DCFHDA를 20 μM (in PBS)로 희석하여 100 μ 넣은 후 20분 동안 배양하였다. PBS 100 μ 를 넣은 후 세척하였다(3~5번 반복). H_2O_2 100 μM (in PBS) 100 μ 를 넣은 후 ELISA를 이용하여 10분 간격으로 형광의 세기를 측정하였다(485 nm/535 nm).

② Intracellular GSH content 측정

HaCaT 세포를 6 well plate에 $1 \times 10^5/ml$ 의 농도가 되도록 접종한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 혈청이 포함되지 않은 배지를 이용하여 JDS의 최종농도가 20, 50, 100 $\mu g/ml$ 가 되도록 처리하였다. 12시간 동안 배양 후 1% Triton X-100이 포함되어 있는 PBS 완충용액을 300 μ 넣고 scrapping한 후 30분 정도 얼음에서 세포를 용해시키고 10000 rpm에서 5분 동안 원심 분리 후 상층액을 이용하여 실험에 사용하였다. 96well plate에 10 mM EDTA가 포함되어 있는 0.1 M 인산 완충 용액 160 μ , 4.8 mM NADPH 10 μ , 6 units/ml GSH reductase 5 μ , 3.78 mM 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 5 μ , 시험시료 20 μ 를 넣어 총 200 μ

가 되도록 한 후 25°C에서 10분 동안 반응시켰다. 반응 후 ELISA reader를 이용하여 412 nm에서 흡광도를 측정하였다.

③ DPPH Radical 소거능 측정

DPPH의 환원성을 이용하여 JDS의 DPPH Radical 소거효과를 측정하였다. DPPH를 메탄올에 용해시켜 0.1 mM DPPH 용액 1 ml에 JDS를 20, 50, 100 $\mu g/ml$ 농도별로 제조하여 1 ml씩 넣어주고 잘 혼합하여 준 후, 실온에서 10분 동안 반응시킨 뒤 565 nm에서 흡광도를 측정하였다¹⁰⁾.

6) 통계분석

실험 결과는 SPSS 10.0 for Windows를 사용하여 평균±표준편차로 표기하고 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다. 각 실험군 간의 통계적 유의성은 one-way ANOVA로 하였으며, 사후분석은 Duncan's multiple comparison test를 시행하였다.

III. 實驗結果

1. 세포 독성

JDS 에탄올 및 열수 추출물의 Raw 264.7 세포에 대한 세포 독성 실험에서 열수 추출물 50, 100 $\mu g/ml$ 의 농도는 90%의 세포 생존율을 보였으며, 나머지는 세포 독성이 나타나지 않았다(Table 2).

2. 항염 효능

1) PGE₂ 생성 저해능

JDS 에탄올 및 열수 추출물의 LPS로 유도된 Raw 264.7 세포에 대한 PGE₂ 생성 저해능 실험에서 에탄올 및 열수 추출물 모두 유의성 있게 농도 의존적인 저해능을 보였으며, 20, 50 $\mu g/ml$ 의 농도에서 에탄올 추출이 열수 추출보다 높은 저해능을 보였다(Table 3).

Table 2. The Cytotoxicity of *Jeondo-san* Extract on Macrophage Raw 264.7 Cells by MTT Assay

Group		Average Viability(%)	D	p-value
Control		100±1,0	a	< 0,01
JDS(EtOH Ex)	20 $\mu\text{g/ml}$	104±4,4	a,b	
	50 $\mu\text{g/ml}$	108±2,9	b,c	
	100 $\mu\text{g/ml}$	100±2,6	a	
JDS(Water Ex)	20 $\mu\text{g/ml}$	109±0,3	c	
	50 $\mu\text{g/ml}$	91±0,5	d	
	100 $\mu\text{g/ml}$	92±2,4	d	

Statistical significances were tested by oneway ANOVA among groups.

D : The same letters indicate non-significant difference between groups based on Duncan's multiple comparison test.

JDS : *Jeondo-san*

Ex : extract

Table 3. Inhibitory Efficacy of *Jeondo-san* on PGE2 Production in LPS-induced Macrophage Raw 264,7 Cell

Group		Average Viability(%)	D	p-value
Indomethacin	1 $\mu\text{g/ml}$	95±2,6	d	< 0,01
JDS(EtOH Ex)	20 $\mu\text{g/ml}$	67±1,3	b	
	50 $\mu\text{g/ml}$	76±7,5	c	
	100 $\mu\text{g/ml}$	93±0,6	d	
JDS(Water Ex)	20 $\mu\text{g/ml}$	56±1,4	a	
	50 $\mu\text{g/ml}$	66±3,5	b	
	100 $\mu\text{g/ml}$	91±5,1	d	

Statistical significances were tested by oneway ANOVA among groups.

D : The same letters indicate non-significant difference between groups based on Duncan's multiple comparison test.

JDS : *Jeondo-san*

Ex : extract

Table 4. Inhibitory Efficacy of *Jeondo-san* on NO Production in LPS-induced Macrophage Raw 264,7 Cell

Group		Average Viability(%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	D	p-value
NMMA	20 $\mu\text{g/ml}$	73±2,3	6,96	e	< 0,01
JDS(EtOH Ex)	20 $\mu\text{g/ml}$	8±2,1	107	a	
	50 $\mu\text{g/ml}$	12±3,0		b	
	100 $\mu\text{g/ml}$	45±1,9		d	
JDS(Water Ex)	20 $\mu\text{g/ml}$	5±1,2	86,3	a	
	50 $\mu\text{g/ml}$	29±1,9		c	
	100 $\mu\text{g/ml}$	58±2,2		f	

Statistical significances were tested by oneway ANOVA among groups.

D : The same letters indicate non-significant difference between groups based on Duncan's multiple comparison test.

NMMA: N^G-methyl-L-arginineacetatesalt

JDS : *Jeondo-san*

Ex : extract

2) NO 생성 저해능

JDS 에탄올 및 열수 추출물의 LPS로 유도된 Raw 264.7 세포에 대한 NO 생성 저해능 실험에서 에탄올 및 열수 추출물 모두 유의성 있게 농도 의존적인 저해능을 보였으며, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 에탄올 추출보다 열수 추출이 높은 저해능을 보였다(Table 4).

3) TNF- α 생성 저해능

JDS 에탄올 및 열수 추출물의 LPS로 유도된 Raw 264.7 세포에 대한 TNF- α 생성 저해능 실험에서 에탄올 및 열수 추출물 모두 유의한 결과가 나타나지 않았다(Table 5).

4) COX-2, iNOS 발현 억제능

JDS 에탄올 및 열수 추출물의 LPS로 유도된 Raw 264.7 세포에 대한 COX-2, iNOS 발현 억제능 실험에서 에탄올 및 열수 추출물 모두 COX-2의 발현 억제능은 나타나지 않았으나, 에탄올 추출 100 $\mu\text{g/ml}$, 열수 추출 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 iNOS의 발현 억제능이 있는 것으로 나타났다(Fig. 1).

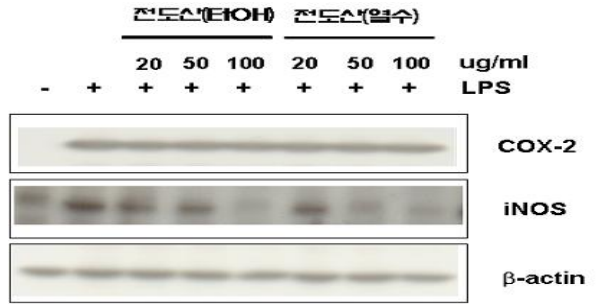


Fig. 1. Inhibitory Efficacy of *Jeondo-san* on iNOS, COX-2 Expression in LPS-induced Macrophage Raw 264.7 Cell

3. 항산화 효능

1) 세포내 ROS 생성 저해능

JDS 에탄올 및 열수 추출물로 처리한 HaCaT 세포에 대한 ROS 생성 저해능 실험에서 에탄올 및 열수 추출물 모두 유의성 있게 농도 의존적인 저해능을 보였으며, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 에탄올 추출이 열수 추출보다 높은 저해능을 보였다 (Table 6).

Table 5. Inhibitory Efficacy of *Jeondo-san* on TNF- α Production in LPS-induced Macrophage Raw 264.7 Cell

Group		Average Viability(%)	D	p-value
JDS(EtOH Ex)	20 $\mu\text{g/ml}$	-	a	ns
	50 $\mu\text{g/ml}$	-	a	
	100 $\mu\text{g/ml}$	3 \pm 6.7	a	
JDS(Water Ex)	20 $\mu\text{g/ml}$	1 \pm 2.4	a	
	50 $\mu\text{g/ml}$	3 \pm 1.0	a	
	100 $\mu\text{g/ml}$	4 \pm 0.1	a	

Statistical significances were tested by oneway ANOVA among groups.

D : The same letters indicate non-significant difference between groups based on Duncan's multiple comparison test.

JDS : *Jeondo-san*

Ex : extract

ns : non-significant

Table 6. Inhibitory Efficacy of *Jeondo-san* on ROS Production in HaCaT cell stimulated with H₂O₂

Group		Average Viability(%)	D	p-value
Quercetin	20 $\mu\text{g/ml}$	23 \pm 1.1	a	< 0,01
JDS(EtOH Ex)	20 $\mu\text{g/ml}$	38 \pm 0.6	b	
	50 $\mu\text{g/ml}$	51 \pm 0.8	d	
	100 $\mu\text{g/ml}$	61 \pm 2.2	e	
JDS(Water Ex)	20 $\mu\text{g/ml}$	36 \pm 1.9	b	
	50 $\mu\text{g/ml}$	46 \pm 3.9	c	
	100 $\mu\text{g/ml}$	53 \pm 2.3	d	

Statistical significances were tested by oneway ANOVA among groups.

D : The same letters indicate non-significant difference between groups based on Duncan's multiple comparison test.

JDS : *Jeondo-san*

Ex : extract

Table 7. The Facilitation Efficacy of *Jeondo-san* on Intracellular GSH Synthesis in HaCaT Cell

Group		Average Viability(%)	D	p-value
JDS(EtOH Ex)	20 $\mu\text{g/ml}$	-	a	< 0,01
	50 $\mu\text{g/ml}$	-	a	
	100 $\mu\text{g/ml}$	32 \pm 5.2	b	
JDS(Water Ex)	20 $\mu\text{g/ml}$	-	a	
	50 $\mu\text{g/ml}$	-	a	
	100 $\mu\text{g/ml}$	-	a	

Statistical significances were tested by oneway ANOVA among groups.

D : The same letters indicate non-significant difference between groups based on Duncan's multiple comparison test.

JDS : *Jeondo-san*

Ex : extract

- : No Inhibition

Table 8. The Scavenging Efficacy of *Jeondo-san* on DPPH Radical in HaCaT Cell

Group		Average Viability(%)	D	p-value
Quercetin	20 $\mu\text{g/ml}$	43 \pm 2.2	a	< 0,01
JDS(EtOH Ex)	20 $\mu\text{g/ml}$	62 \pm 2.5	b	
	50 $\mu\text{g/ml}$	79 \pm 0.3	e	
	100 $\mu\text{g/ml}$	79 \pm 0.7	e	
JDS(Water Ex)	20 $\mu\text{g/ml}$	41 \pm 0.9	a	
	50 $\mu\text{g/ml}$	70 \pm 0.3	c	
	100 $\mu\text{g/ml}$	71 \pm 0.5	d	

Statistical significances were tested by oneway ANOVA among groups.

D : The same letters indicate non-significant difference between groups based on Duncan's multiple comparison test.

JDS : *Jeondo-san*

Ex : extract

2) 세포내 GSH 합성 촉진능

JDS 에탄올 및 열수 추출물로 처리한 HaCaT 세포에 대한 세포내 GSH의 합성 촉진능 실험에서 에탄올 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서만 $32 \pm 5.2 \%$ 로 나타났다(Table 7).

3) DPPH 라디칼 소거능

JDS 에탄올 및 열수 추출물로 처리한 HaCaT 세포에 대한 DPPH 라디칼 소거능 실험에서 에탄올 및 열수 추출물 모두 유의성 있게 농도 의존적인 소거능을 보였으며, 20, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 에탄올 추출이 열수 추출보다 높은 소거능을 보였고, 에탄올 추출 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 동일한 소거능을 보였다(Table 8).

IV. 考 察

얼굴, 목, 어깨 및 등에 면포, 구진, 농포, 낭종, 결절, 반흔 등의 증상을 보이는 모낭-피지선 단위를 침범하는 만성 염증성 질환인 여드름의 국소 치료는 약용 비누, Benzyl peroxide, Retinoic acid, 항생제 국소 도포, 압출 요법, 스테로이드 병변 내 주사 등이 있으며¹¹⁾, 약용 비누 및 약물의 국소 도포는 한의학적 치료법 중에서 외용약을 사용하는 외치법과 동일하다.

외용약은 외치법에 의해 시술되는 것으로 국소적 혹은 전신적 치료를 목적으로 신체 외부에 직접 이용되는 약물로 본초를 적당하게 가공 제약하여 체외에 敷, 搽, 擦, 吹, 点, 熏, 洗 등의 방법으로 각종 질병을 치료하거나 예방하고자 사용된다. 특히 敷法은 약제를 가루 내어 보관하였다가 사용 직전에 水, 酒, 蜜, 醋 등에 상온에서 혼합하거나 또는 가온하면서 혼합하여 국부에 붙이는 치료법이다¹²⁾.

敷法을 활용하기 위해 사용되는 혼합 용매는 질

병의 성질에 따라 아주 다양하여, 가장 무난하게는 水를, 散瘀解毒에 醋를, 助行藥力에 酒를, 辛香散邪에 蔥薑韭蒜汁을, 清涼解毒에 菊花絲瓜葉汁 및 銀花露를, 緩和刺戟에 鷄子清을, 潤澤肌膚에 油를 사용한다. 또는 陽證에 菊花汁·銀花露를, 半陰半陽에 蔥薑韭汁 및 蜂蜜을, 陰證에 醋·酒를 사용한다¹³⁾. 이처럼 敷法을 활용함에 있어 혼합 용매는 예전부터 다양하게 이용되어 왔던 것이 사실이다.

외용약을 이용한 여드름 치료와 관련된 연구 논문들을 살펴보면 서로 다른 외용약을 여드름 환부에 직접 도포한 임상적 논문^{14,15)}, 여드름에 활용되는 서로 다른 외용약의 염증과 관련된 기전을 연구한 실험적 논문¹⁶⁻¹⁸⁾, 외용약을 중심으로 이전에 발표한 연구들을 review한 논문¹⁹⁾이 있었다. 이 논문들은 모두 여드름에 敷法으로 활용될 수 있는 본초 및 방제에 대한 연구들로 혼합 용매에 따른 추출의 차이에 대한 연구는 이루어지지 않았다.

이에 동일 약제라 하여도 추출용매에 따라 추출 성분과 효능의 정도가 달라 질 수 있음을 고려하여 粉劑 및 酒醴에 외용 치료제로 敷法을 이용하여 활용되는 顛倒散을 에탄올과 물로 각각 추출하여 NO, PGE₂, TNF- α 생성 저해능과 iNOS, COX-2 발현 억제능을 통한 항염 효능과 ROS 생성 저해능, GSH 합성능, DPPH 소거능을 통한 항산화 효능을 비교하여 추출용매에 따른 차이를 알아보고자 하였다.

염증과 관련된 실험에 앞서 顛倒散 에탄올 및 열수 추출물의 Raw 264.7 세포에 대한 세포 독성 실험에서 에탄올 추출물 20, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 및 열수 추출물 20 $\mu\text{g/ml}$ 는 세포 독성을 보이지 않았으며, 열수 추출물 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 91 ± 0.5 , 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 92 ± 2.4 의 세포 생존율을 보였다(Table 2). 따라서 에탄올 및 열수 추출 모두 안전하게 사용될 수 있을 것으로 나타났다.

염증반응은 세포손상을 일으키는 자극이나 손상 인자를 제거하거나 회식을 위한 생체 방어로서, 혈

관을 가진 결합조직에서 볼 수 있는 복합적 반응으로 많은 화학적 물질에 의하여 매개된다²⁰⁾. LPS, cytokine 및 bacterial toxin 같은 세포손상을 일으키는 자극이나 손상인자들에 의해 iNOS와 COX-2의 발현이 증가하게 된다. COX-2는 arachidonic acid를 PGs로 변환시켜주는 효소이며, iNOS는 L-arginine을 L-citrulline으로 전환시키면서 반응성이 강한 자유라디칼인 NO를 생성하는 효소로 이들로 인해 생성되는 과량의 NO와 PGE₂는 염증반응을 매개한다. 또한 TNF- α 는 여러 가지 염증질환이나 알러지 및 바이러스 질환 등에 관여하는 pro-inflammatory cytokine의 하나로 LPS에 의해 자극을 받은 대식세포나 혈액 내 단핵구 등에 의해 분비된다.

顛倒散 에탄올 및 열수 추출물의 LPS로 유도된 Raw 264.7 세포에 대한 PGE₂ 생성 저해능과 NO 생성 저해능 실험에서는 에탄올 및 열수 추출물 모두 유의성 있게 농도 의존적인 저해능을 보였으며(Table 3, 4), COX-2, iNOS 발현 억제능 실험에서는 에탄올 추출 100 $\mu\text{g/ml}$, 열수 추출 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 iNOS의 발현 억제능이 있는 것으로 나타났으며(Fig. 1), TNF- α 생성 저해능 실험에서는 에탄올 및 열수 추출물 모두 유의한 결과가 나타나지 않았다(Table 5). 결과적으로 顛倒散 에탄올 및 열수 추출물의 항염 기전은 iNOS 효소를 억제하여 NO의 생성을 억제하는 것으로 이해할 수 있으며, NO 생성 저해능에서 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 에탄올 추출보다 열수 추출이 높은 저해능을 보인 것으로 보아 열수 추출물을 활용하는 것이 보다 효과적일 것이라 사려된다.

호기성 생물계에서는 산소를 이용하는 대사 작용이 필연적이며, 대사과정에서 잉여된 산소는 reactive oxygen species(ROS)의 형태로 세포에 각종 산화적 스트레스를 야기시킨다. 특히 생체내 여러 대사경로를 거쳐 유발되는 산화적 스트레스는 세포의 노화와 밀접한 관련이 있고, ROS는 세포의

막을 파괴하거나 혹은 형성 자체의 불능을 일으킨다^{21,22)}. 따라서 ROS 및 reactive nitrogen species(RNS)의 차단은 생체 방어계에서 매우 중요한 수단이다^{21,23)}. 산화적 스트레스를 방어하기 위하여 SOD, Catalase, 비타민 C, E, Uviquinol, Glutathione(GSH) 등이 존재한다. 저분자량의 항산화제인 GSH는 대표적인 Thiol 화합물로서 세포 내에서 항산화 기능을 담당하고 있다. DPPH는 안정한 유리기로 cysteine, glutathione과 같은 아미노산과 ascorbic acid, aromatic amine 등에 환원되어 탈색되므로 항산화물질의 항산화능을 측정할 수 있다.

顛倒散 에탄올 및 열수 추출물로 처리한 HaCaT 세포에 대한 ROS 생성 저해능과 DPPH 라디칼 소거능 실험에서는 에탄올 및 열수 추출물 모두 유의성 있게 농도 의존적인 저해능과 소거능을 보였으며(Table 6, 8), GSH의 합성 촉진능 실험에서는 에탄올 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서만 32 \pm 5.2%로 나타났다(Table 7). 결과적으로 顛倒散은 항산화 기능으로 활성산소를 제거하는 기능을 가지고 있으며 동일 농도에서 에탄올 추출이 열수 추출보다 높은 저해능과 소거능을 가지고 있어 에탄올 추출물을 활용하는 것이 보다 효과적일 것이라 사려된다.

전체적으로 顛倒散의 에탄올 및 열수 추출물은 항염과 항산화능을 가지고 있는 것으로 나타났으며, 항염에서는 열수 추출이 항산화능에서는 에탄올 추출이 효과적일 것이라 사려된다.

V. 結 論

顛倒散의 에탄올 및 열수 추출에 따른 항염과 항산화능을 살펴본 결과는 다음과 같다.

1. 顛倒散의 에탄올 및 열수 추출물 모두 세포 독

성이 없는 것으로 나타났다.

2. 顛倒散의 에탄올 및 열수 추출물은 PGE₂ 생성 저해능 실험에서 모두 유의성 있게 농도 의존적인 저해능을 보였다.
3. 顛倒散의 에탄올 및 열수 추출물은 NO 생성 저해능 실험에서 모두 유의성 있게 농도 의존적인 저해능을 보였다.
4. 顛倒散의 에탄올 및 열수 추출물은 TNF- α 생성 저해능 실험에서 모두 유의한 결과가 나타나지 않았다.
5. 顛倒散의 에탄올 및 열수 추출물은 COX-2, iNOS 발현 억제능 실험에서 에탄올 추출 100 $\mu\text{g/ml}$, 열수 추출 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 iNOS의 발현 억제능이 있는 것으로 나타났다.
6. 顛倒散의 에탄올 및 열수 추출물은 ROS 생성 저해능 실험에서 모두 유의성 있게 농도 의존적인 저해능을 보였으며, 에탄올 추출이 열수 추출보다 높게 나타났다.
7. 顛倒散의 에탄올 및 열수 추출물은 GSH의 합성 촉진능 실험에서 에탄올 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서만 32 \pm 5.2 %로 나타났다.
8. 顛倒散의 에탄올 및 열수 추출물은 DPPH 라디칼 소거능 실험에서 모두 유의성 있게 농도 의존적인 소거능을 보였으며, 에탄올 추출이 열수 추출보다 높게 나타났다.

이상의 결과를 종합해 보면 顛倒散의 에탄올 및 열수 추출물은 세포 독성이 없으며, 두 추출물은 iNOS 효소를 억제하여 NO의 생성을 억제하는 것으로 항염 효과를 보일 것이라 사려된다. 항염에서는 열수 추출물을, 항산화능에서는 에탄올 추출물을 활용하는 것이 보다 효과적일 것이라 사려된다.

參考文獻

1. 吳謙. 醫宗金鑑. 서울:일지사. 1991:1733.
2. Lee EJ, Kwon JH. Characteristics of Microwave-Assisted Extraction for Grape Seed Components with Different Solvents. Korean J. Food Preserv. 2006;13(2):216-22.
3. Pang TS, Lee KG, Ham IH, Bu YG, Kim HC, Rhee JS, Choi HY. A Study on the Content Changes of β -asarone and α -asarone in *Acorus gramineus* According to its Parts, Extraction Solvent, and Fermentation. Kor. J. Herbology. 2008; 23(4):149-57.
4. Baik JA, Baek YH, Chiang MH. Phenol Contents of Solvent Extraction in Several Domestic Thymus Quinquecostatus Celak. Journal of Bio-Environment Control. 2009;18(4):468-74.
5. Jeong HJ, Kim SA, Kwon JH, Kim HK. Physiological Activities of Gardeniae Fructus Extracts by Microwave-Assisted Extraction as Affected by Solvents. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2008; 37(3):282-7.
6. Kim MJ, Park EJ. Antioxidative and Antigenotoxic Effect of *Omiga*(*Schizandra chinensis* B.) Extracted with Various Solvents. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2010;39(4):487-93.
7. H. Kim, H. Lim, B. Kim, H. Kim, S. Choi, C. Yoon, Studies on the anti-acne effect of *Agrimonia pilosa* Ledeb. J. Soc. Cosmet. Scientists Korea, 2006;32(1):53-8.
8. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application of

- proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Methods*, 1983;65:55.
9. S. M. Han, K. G. Lee, J. H. Yeao, H. Y. Kweon, and K. K. Park, Anti-inflammatory effect of the venom from asian honeybees (*Apis cerana* L.) on inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α in Raw 264,7 cell line, *Korean J. Apiculture*, 2004;19:89.
 10. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 1958;181:1199.
 11. Gang YH. *Atlas of Skin Disease*. Seoul, Hanmibook, 2006:205-7.
 12. Yu HJ, Choi IH. A Practical Application on the External Treatment of Acne (A Focus on the Medical Herbs Published in the Woman's Monthly Magazines). *The Journal of Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology* 2004; 17(1):34-44.
 13. 顧伯康. 中醫外科學. 北京:人民衛生出版社, 1987:60.
 14. Du IS, Seo YJ, Woo WH, Oh HC, Park MC, Hwang CY, Lim KS, Kim NK. Clinical Study on the Effect of External Treatment of 5% *Herba Houttuyniae* Extract Solution on the Acne. *Korean journal of oriental physiology & pathology*. 2004;18(2):612-20.
 15. Hong SH. The Clinical Study on the Effect of Jeondo-san(Diandao-san) on Acnes. *Journal of Korean oriental medical society*. 2005;26(3):74-9.
 16. Lee SY, Seo HS. The Effects of Sulfur extract on Anti-Inflammation and Anti-Propionibacterium acnes. *The journal of Korean oriental medical ophthalmology & otolaryngology & dermatology*. 2007;20(2):68-76.
 17. Yoo JG, Seo HS. The Effects of Yeouigeumhwang-san on Anti-Inflammation and Anti-Propionibacterium acnes. *The journal of Korean oriental medical ophthalmology & otolaryngology & dermatology*. 2007;20(2):77-88.
 18. Choi KH, Seo HS. The Effects of Jeondo-san on Anti-Inflammation and Anti-Propionibacterium acnes. *The journal of Korean oriental medical ophthalmology & otolaryngology & dermatology*. 2007; 20(2):89-101.
 19. Kim MA, Kim MB, Shin SH, Byun SM, Ko WS, Lee HS, Park SG, Yoon HJ. The study on external treatment of oriental medical care on acne. *The journal of Korean oriental medical ophthalmology & otolaryngology & dermatology*. 2008;21(2):102-11.
 20. 대한병리학회. 병리학. 서울:고문사. 2000:34,43.
 21. Kim H, Lee MJ, Lee HS, Jung HJ, Choi SK, Lee CH, Park WH. Preventive Effects of *GLEDITSIAE SPINA* Ethanol Extracts and its Fraction in Oxidative Stress and Human LDL Oxidation. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2009;23(3):631-8.
 22. Yagi, K. Lipid peroxides and human disease. *Chem. Phys. Lipids*. 1987;45: 337-51.
 23. Barnen, A.L. Toxicological and biochemistry of BHA, BHT. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1975;52:59-64.