

四物湯加味方の 항산화 활성에 대한 실험적 연구

¹동국대학교 한의과대학 한방부인과교실, ²동국대학교 바이오시스템대학 생명과학과
정재중¹, 구선영², 고은비², 성정석², 김동일¹

ABSTRACT

Anti-oxidant Effects of *Samultang-Gami* on MEF Cells

Jae-Joong Jung¹, Sun-Young Goo², Eun-Bi Go², Jung-Suk Sung², Dong-Il Kim¹
¹Dept. of OB & GY, Graduate school of Oriental Medicine, Dong-Guk Univ.
²Dept. of Life Science, Dong-Guk Univ.

Purpose: This experiment is designed to find out anti-oxidant effects of *Samultang-Gami* which was composed of *Rehmanniae Radix(RR)*, *Angelicae Gigantis Radix*, *Cnidii Rhizoma(CR)*, *Paeoniae Radix(PR)*, *Cortex Moutan Radicis*, *Hedyotis Diffusa(HD)* and *Caesalpinia Sappan* on MEF cells.

Methods: In vitro antioxidant effects were measured by MTT assay, DPPH assay, cell cycle analysis, AnnexinV-FITC/PI assay and DAPI staining using MEF cells treated with various concentrations of 70% ethanol extract of *Samultang-Gami*.

Results:

1. In the scavenging for DPPH radical, the each treated groups of *PR*, *CR* and *HD* showed positive effects. *RR* and *CR* increased the viability of oxidative damaged MEF cells in a dose-dependent manner.
2. 70% ethanol extract of *Samultang-Gami* was shown best antioxidative effect in the concentration of 0.5mg/ml.
3. The treatment of *Samultang-Gami* in oxidative damaged MEF cells didn't have any effect on cell cycle restoration. but it could lower late apoptosis rate a little and be observed the protection of nucleus.

Conclusion: It can be concluded that *Samultang-Gami*, *RR* and *CR* have antioxidant effects on MEF cells.

Key Words: *Samultang-Gami*, MEF cells, Anti-oxidant.

I. 서론

최근 식생활의 변화와 운동량 부족 등으로 질병의 양상이 각종 암, 고혈압 등 순환기계 질환, 간장 장애, 당뇨병 등 각종 퇴행성 질환의 발생률이 높아지는 추세에 있으며¹⁾, 이러한 질환들의 원인이 활성 산소에 기인된 것이라는 산소유해설이 점차 인정받고 있다²⁾. 활성 산소는 단백질, DNA 등에 작용하여 세포막의 구성 성분인 불포화지방산을 공격하여 지질의 과산화반응을 일으켜 세포막의 파괴, 세포의 노화 및 괴사 등을 일으켜 노화 촉진, 스트레스성 호르몬이나 면역물질의 활성도가 감소하고 각종질환을 일으킨다는 보고가 있으며, 질병의 약 90%가 활성산소에 의해 발생한다고 한다^{3,4)}.

인체 내의 항산화 방어계는 항산화 효소계와 비효소적 항산화 물질들로 이루어져 있다. 항산화 효소계는 자유 라디칼(free radical)의 초기 생성을 억제하고 이미 생성된 자유 라디칼에 대해서는 항산화 물질들이 산화 연쇄반응을 차단함으로써 우리 인체 내에서 항산화 물질과 과산화물질, 자유기 등의 산화 촉진물질 사이에 균형이 유지되게 한다⁵⁾. 그러나 항산화 영양소의 부족한 섭취와 환경오염, 자외선, 또는 부적절한 운동, 스트레스, 흡연, 음주 등의 잘못된 생활습관은 인체의 산화적 스트레스를 증가시키고 항산화 방어계의 교란을 초래하게 된다⁶⁾. 산화 스트레스의 증가는 혈중 항산화 물질들을 고갈시킬 뿐만 아니라, 심혈관계 질환과 암, 관절염, 백내장, 당뇨병 등의 만성 퇴행성 질병의 위험도를 증가시

키는 것으로 알려져 있다^{7,8)}.

현재 합성 항산화제의 사용은 간 비대, 간 중 microsomal 효소활성 증가, 체내 흡수물질의 독성화 및 발암 가능성 등⁹⁾의 부작용의 문제가 제기 되고 있어 천연물을 대상으로 부작용이 적으면서 유효한 천연 항산화 물질의 탐색이 많이 시도되고 있는 실정이다¹⁰⁾. 또한 국민소득 증대와 경제성장 그리고 현대과학과 의학의 발전에 힘입어 평균 수명의 증가와 고령화 현상이 급격히 진행되고 있으며, 건강과 노화억제에 대한 국민의 관심 또한 크게 증가하고 있다¹¹⁾.

이에 저자는 부작용이 적고 안정적인 항산화제 개발을 위한 연구의 일환으로 調益營衛, 滋養血의 대표적인 처방인 四物湯을 기본으로 하되, 方中의 熟地黃을 生地黃으로 대체하고, 牧丹皮, 白花蛇舌草, 蘇木을 가미한 四物湯加味方을 구성하여, 생쥐 배아섬유아세포(MEF cells ; Mouse embryonic fibroblast cells)에 四物湯加味方 추출액을 처리하여 세포의 생존율, 세포 주기의 변화, apoptosis의 발생률, 세포 내핵의 변화를 관찰하였다. 이러한 일련의 연구를 통해 유의한 결과를 얻었기에 이 논문을 통하여 발표하고자 한다.

II. 연구 방법

1. 재료 및 추출물의 제조

四物湯加味方 구성약물은 生地黃(SJH) 當歸(DK) 白芍藥(BJY) 川芎(CK) 蘇木(SM) 牧丹皮(MDP) 白花蛇舌草(BSC) 로써 각각 옴니허브(서울, 한국)를 통하여 구입하여 정선하여 사용하였고 한 침

의 용량은 Table 1과 같다.

Table 1. Prescription of *Samultang-Gami*

Herbal Name	Scientific Name	Amount (g)
生地黃	<i>Rehmanniae Radix</i>	8
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	4
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	4
白芍藥	<i>Paeoniae Radix</i>	4
牡丹皮	<i>Cortex Moutan Radicis</i>	3
白花蛇舌草	<i>Hedyotis Diffusa</i>	8
蘇木	<i>Caesalpinia Sappan</i>	3
Total amount		34

fluorescent mounting medium (DakoCytomation, CA)를 제외한, 4'-6-diamidino-2-phenylindole(DAPI), [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT), dimethylsulfoxide(DMSO) 및 모든 화학약품은 Sigma(USA)에서 구입하였다.

에탄올 추출물(ethanol extract)은 수직으로 환류냉각관을 부착시킨 둥근 플라스크에 시료의 10배에 해당하는 70% ethanol을 넣고 70°C의 수욕상에서 3시간 동안 추출한 후 추출액을 filter paper (Whatman No. 5)로 여과하였다. 남은 잔사를 위와 같은 방법으로 2회 더 추출하여 모은 각 추출액을 감압농축하여, 동결건조기(freeze dryer, Ilshin Lab Co., LTD, Korea)로 동결건조하여 시료로 사용하였다. 四物湯加味方 추출물 ×1는 100mg/ml 농도로 추출하였으며, 각 실험에 필요에 따라 희석하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 세포와 세포배양

실험에 사용된 세포주는 MEF cells로 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection, USA)에서 분양받았다. MEF 세포는 10% FBS와 1× penicillin/streptomycin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)(PAA, Austria)에서 배양하였다. 배양 시 온도는 37°C를 유지하고 5% CO₂와 95% 공기를 공급하였다.

2) 세포 활성도 측정

세포활성도(cell viability)는 MTT 분석법으로 측정하였다. MEF cells는 4.0 × 10⁴ cells/mL로, HeLa, HepG2, AGS cells는 각각 5.0 × 10⁴ cells/mL로 96-well 배양접시에 분주하고 24시간 동안 배양하였다.

MEF cells에 24시간 동안 PBS를 처리한 Control군을 설정하고, 四物湯加味方 개별약물을 처리한 것과 四物湯加味方を 처리한 것을 각각 실험군으로 설정하여 개별 실험을 진행하였다.

그 후 MEF 세포에 산화적 스트레스를 주기 위하여 세포를 H₂O₂ (500 μM)가 첨가된 배지에 24시간 배양하였고, 四物湯加味方 및 四物湯加味方 개별 약물의 산화적 스트레스에 대한 세포 보호 효과를 알아보기 위해 H₂O₂(500 μM)와 四物湯加味方(×1000, ×500, ×100, ×50, ×10) 또는 四物湯加味方 개별약물(0.1, 0.5, 1.5 mg/ml)이 함께 첨가된 배지에 세포를 24시간 배양하여 각 실험군 별 세포 생존율을 비교하였다.

세포를 PBS(Welgene, Korea)로 2회 세척하고 MTT 용액(5 mg/ml) 10 μl 첨가하여 37°C 배양기에서 3시간 동안 두었다.

배지를 제거하고 DMSO를 200 μ l 첨가했다. 10분 간 배양기에 둔 후, microplate reader (Molecular Devices)를 이용하여 595nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) DPPH assay를 통한 항산화 활성 측정

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 소거능

150mM DPPH/EtOH 450 ml에 四物湯加味方과 개별약물 각각을 1000, 500, 250, 125, 62.5 μ g/ml 농도로 희석하여 50 ml씩 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이를 흡광도 517nm에서 측정하여 아래의 방법으로 계산하였다.

DPPH 소거능 (%) = (대조군의 흡광도 - 四物湯加味方 투여군의 흡광도) / 대조군의 흡광도 \times 100

4) 세포 주기 분석

대조군 및 실험군 세포(1×10^6 cells/mL)를 24시간 동안 배양한 다음, PBS로 세척하고 매우 차가운 100% 에탄올에 고정하여 4 °C에서 하룻밤 동안 두었다. 다시 세포를 PBS로 세척한 다음, PI agent (0.1% Triton X-100, 0.1 mM EDTA, 50 μ g/mL RNase A 그리고 50 μ g/mL propidium iodide)를 첨가하여 반응시켰다. 형광은 FAC scan laser 유속세포측정기를 사용하여 측정하고, Becton Dickinson software(Lysis II, Cellfit)를 사용하여 분석하였다.

5) Annexin V-FITC/PI assay

Annexin V-FITC / PI (propidium iodide) apoptosis detection kit를 이용하여 apoptotic cells에서 phosphatidylserine의 외전(surface exposure)을 검출함으로써 세포자멸사를 정량화하였다. 대조군 및 실험군 MEF 세포를 100mm 배양접

시에 분주한 다음, 24시간 동안 배양하고, 유착 세포와 부유 세포를 결합시켜 제조사의 지침에 따라 처리하고 FITC/PI 염색 후 유식세포측정기를 사용하여 측정하였다.

6) DAPI staining

세포를 glass chamber slide에 분주한 다음, 24시간 동안 추출물에 노출시키고 30분 간 자외선과 24시간 동안 四物湯加味方 추출물 처리를 하거나 하지 않았다. 그런 다음, 세포를 PBS로 세척하고 4% formaldehyde로 20분 간 고정시켰다. Chamber를 PBS로 2회 세척하고 2 μ g/mL DAPI를 처리하여 20분 동안 배양기에 두었다. 마지막으로, 세포를 PBS로 세척하고 형광현미경으로 세포핵을 관찰하였다.

7) Statistical analysis

실험 결과는 Mean \pm SD값으로 나타내었으며, 본 실험에서 얻은 결과를 one-way ANOVA Tukey's test(GraphPad Prism)으로 분석하여 p값을 구하였다. 대조군을 각 실험군에 비교하여 p<0.05일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 四物湯加味方の 항산화효과

1) DPPH assay를 통한 四物湯加味方 개별 약제의 항산화효과 측정

DPPH 소거활성능의 분석을 통하여 BHT를 사용한 대조군과 四物湯加味方 구성 약제 각각을 다양한 농도로 처리하여 비교한 결과 白芍藥에서 농도가 증가함에 따라 오차범위를 크게 벗어나지 않는 범위 안에서 free radical 소거능이 조

금 감소한 양상으로 긍정적인 결과를 얻었다. 牧丹皮의 경우 전체적으로 free radical 소거능이 양호한 결과를 보였으나 약재 농도증가에 따라 소거능이 오히려 감소하는 양상을 보였다(Fig. 1).

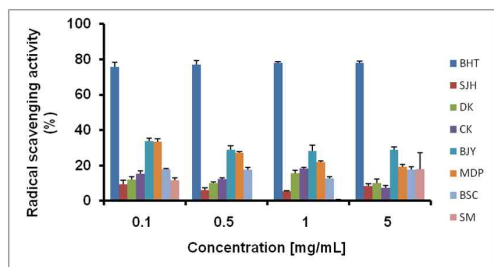


Fig. 1. The Effects of 7 Medicinal Herb Extracts on Viability of MEF Cells Determined by DPPH Assay.

7 Medicinal Herbs extracts were reacted at 37°C, and the absorbance at 517nm due to DPPH radical was determined. The results are the mean ± SD of three independent experiments.

2) MTT assay를 통한 四物湯加味方 개별 약재의 항산화효과 측정

산화적 손상을 가한 MEF cells에 四物湯加味方 구성 약재들을 각각 처리하여 MTT assay를 통하여 항산화능을 측정된 결과 生地黃, 川芎에서 약재 농도가 증가함에 따라 MEF cells 생존율이 증가하였고 當歸에서도 양호한 결과를 보였으며, 牧丹皮의 경우 5mg/ml 농도에서 높은 생존율을 보였다(Fig. 2).

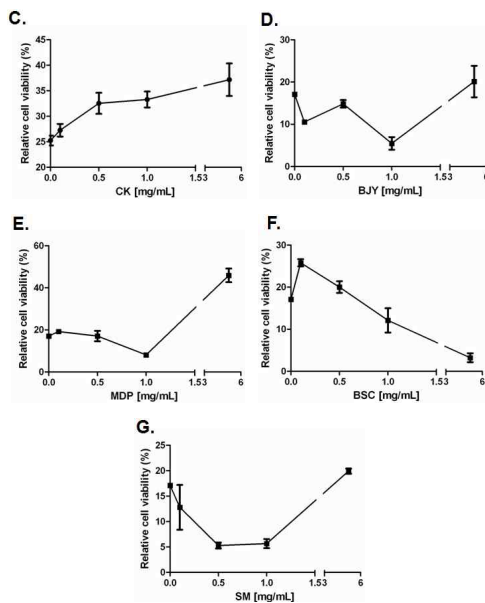
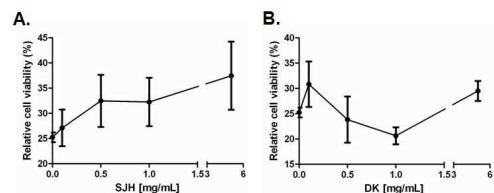


Fig. 2. The Antioxidant Effects of 7 Medicinal Herb Extracts on Oxidative Damaged MEF Cells Determined by MTT Assay.

MEF wild-type cells(were treated with various concentration(0.1, 0.5, 1, 5 mg/ml) of 70% ethanol extracts of 7 medicinal herb in the presence of H2O2 (500 μM) for 24 h. Results are expressed as the mean + S.D. of three independent experiments.

3) DPPH assay를 통한 四物湯加味方の 항산화효과 측정

四物湯加味方の 항산화능을 측정하기 위해 DPPH 소거능을 측정된 결과 ×500의 농도에서 우수한 DPPH 소거능을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

4) MTT assay를 통한 四物湯加味方の 항산화효과 측정

H₂O₂농도에 따른 MEF cells 활성도를 측정하여 농도의존적으로 세포활성도가 감소하는 것을 확인한 후, 500μM 농도로 H₂O₂를 처리하고 다양한 농도로 四物湯加味方 추출액을 처리한 결과 ×1000, ×500, ×10 mg/ml 농도에서 대조군에 비해 높은 항산화력을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

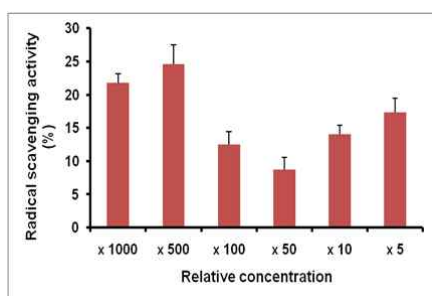


Fig. 3. The DPPH Free Radical Scavenging Effect of *Samultang-Gami* Extracts Determined by DPPH Assay.

Freshly prepared 150mM DPPH - ethanolic solution was treated with various relative concentration of extracts of *Samultang-Gami* in the dark for 30 min.

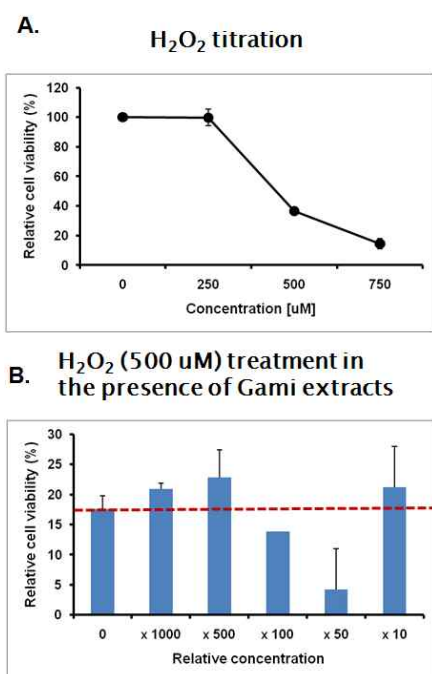


Fig. 4. The Antioxidant activity of *Samultang-Gami*.

(A) MEF cells were cultured in DMEM containing 10% FBS and penicillin-streptomycin. Each concentration of H₂O₂ was treated on MEF cells(4.0×10³ cells per mL) and incubated in humidified 5% CO₂ incubator for 24 h in 37°C. The absorbance was read at wavelength of 570 nm. All test were performed in triplicate, and values are means ± SD (n=3).

(B) MEF cells(4×10⁴ cells per mL) were treated

for 24 h with *Samultang-Gami* extract in the presence of H₂O₂ (500 μM). All test were performed in triplicate, and values are means ± SD (n=3).

5) MEF Cells의 세포 주기의 변화

다음은 H₂O₂ 및 四物湯加味方 처리가 MEF cells의 각 세포 주기에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 cell cycle analysis를 수행하였다. H₂O₂ 처리군과 H₂O₂와 四物湯加味方を 함께 처리한 군을 대조군과 비교했을 때 G2/M arrest가 된 것을 볼 수 있다. 대조군에 비해 四物湯加味方を 처리한 군은 세포주기의 회복에 도움을 주는 것을 확인할 수 있었으나, H₂O₂로 산화적 손상을 받은 MEF cells의 경우는 세포주기 회복에 영향을 주지 못했다(Fig. 5).

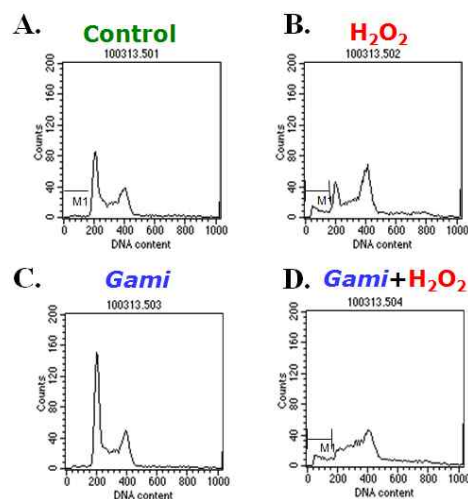


Fig. 5. The Cell Cycle Analysis of MEF cells.

Propidium iodide staining was performed and samples were analyzed by flow cytometry. (A) untreated cells. (B) H₂O₂ was treated on MEF cells. (C) MEF cells (4×10⁴ cells per mL) were treated for 24 h with *Samultang-Gami* extract (×500). (D) MEF cells were treated for 24 h with *Samultang-Gami* extract (×500) in the presence of H₂O₂ (500 μM).

6) MEF Cells의 apoptosis의 발생률 대조군에 비해 四物湯加味方처리 군에서 apoptosis로 가는 세포수가 소폭 줄어들었고, H₂O₂ 처리군에 비해 H₂O₂와 四物湯加味方を 함께 처리한 군에서 apoptosis 발생률이 다소 감소하는 것을 확인할 수 있다(Fig. 6).

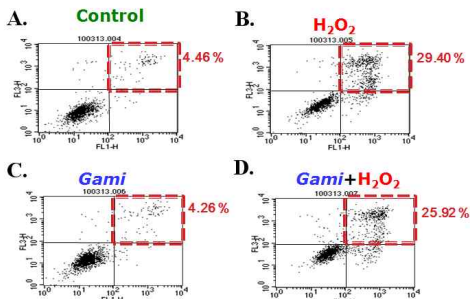


Fig. 6. The Quantification of Apoptosis by Annexin V plus PI Staining in MEF cells.

FACs analysis Via Annexin V-FITC/PI Staining was used to observe the induction of apoptosis. The induction of apoptosis was determined by flow cytometric analysis of annexin V-FITC and PI-staining. Live cells are confined to the left lower quadrant. Dead cells appear first in the right lower quadrant (apoptosis) due to the externalization of PS (detected with Annexin V-FITC) and then in the upper right quadrant as a result of the loss of cell membrane integrity (PI incorporation). Cells in the right lower quadrant indicate Annexin-positive, early apoptotic cells. The cells in the upper right quadrant indicate Annexin-positive/PI-positive, late apoptotic cells.

7) MEF cells의 세포내핵의 변화

H₂O₂와 四物湯加味方の 처리가 세포내핵의 형태에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 DAPI 염색법을 수행하였다. 대조군의 핵 모양에 비해 H₂O₂ 처리군에서 다수의 핵 응축 및 DNA 손상이 일어난 것을 관찰할 수 있었고, 四物湯加味方 처리군에서는 대조군과 거의

유사한 형태를 보였으며, H₂O₂와 四物湯加味方を 같이 처리한 경우에는 핵 응축 및 DNA 손상이 관찰되나 H₂O₂ 처리군에 비해서는 그 정도가 약한 것을 볼 수 있다(Fig. 7).

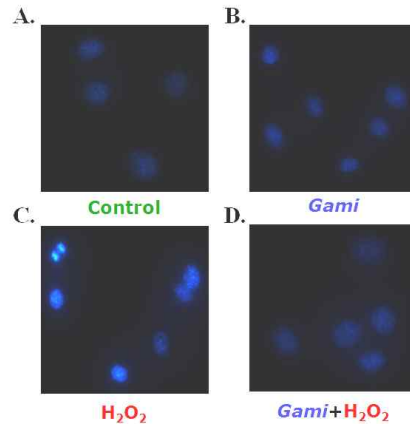


Fig. 7. The Morphological Changes of MEF cells Induced by *Samultang-Gami*, H₂O₂ and *Samultang-Gami*+H₂O₂.

Typical apoptotic morphological changes were detected in 0 (A), ×500 *Samultang-Gami* extracts (B), 500 μM H₂O₂ (C) and ×500 *Samultang-Gami* + 500 μM H₂O₂ (D)-treated MEF cells. Cells were stained with DAPI and visualized by fluorescent Microscope (×200 magnification).

IV. 고 찰

본 연구에 사용된 사물탕과 개별약제에 대해 살펴보면, 四物湯은 宋代 陳師文的《太平惠民和劑局方》에 최초로 수록된 처방으로 “調益營衛 滋養血 治衛任虛損 月經不調……”라 하여 血虛 및 血不和로 發하는 諸證을 治한다 하였다. 當歸, 川芎, 白芍藥, 熟地黃으로 구성되고 當歸는 養血, 補血, 行血 등의 효능이 있어 一切 血證에 응용하는 補血, 養陰藥으로 血中の 主藥이 된다. 川芎은 順

氣, 行血의 要藥으로 血中の 氣藥이 되며, 白芍藥은 瀉肝, 安脾緩中, 去水의 要藥으로 補血, 養血, 婦人一切病 등에 유효한 補血 및 養陰藥이다. 熟地黃은 補腎壯水의 陰虧, 虛損에 응용되는 補血養陰藥이다.

熟地黃은 南北朝 시기 宋代(AD 4C 경)의 雷敫의 《雷公炮炙論》에 최초로 명시되었으며, 그 이후 熟地黃의 제법이 널리 성행되어 生地黃, 乾地黃, 熟地黃으로 나뉘어 사용되었다. 《神農本草經》에 최초로 生地黃에 대하여 수록되어 있으며 熟地黃과 그 기원 식물이 같고 번역반응에서 유사한 효과를 나타내며^{12,13)}, 항산화에 대한 다수의 논문¹⁴⁻¹⁷⁾이 있어 본 실험에서는 熟地黃을 生地黃으로 대체하였다.

蘇木은 行血祛瘀와 消腫止痛의 效能이 있어 產後腰痛, 經閉, 跌打損傷 등을 치료한다 하였으며¹⁸⁾, 항산화 효과와 항염 효과 등을 보고한 연구가 있다¹⁹⁻²²⁾.

白花蛇舌草는 性이 寒, 平, 無毒하며 味는 甘, 苦하고 清熱解毒, 利濕, 通淋, 消癰 등의 효능이 있으며¹⁸⁾, 항산화 효과에 관한 실험이 실시되어 그 효과가 입증되고 있다^{23,24)}.

牡丹皮은 味는 辛, 苦하고 性은 微寒하며 清熱涼血, 活血行瘀 등의 효능이 있고¹⁸⁾, 항산화에 관한 다수의 실험 논문들이 발표되었다²⁵⁻²⁹⁾.

이를 토대로 調益營衛 滋養血의 대표적인 처방인 四物湯에서 熟地黃을 生地黃으로 대체하고, 항암효과와 항산화 효과가 규명된 白花蛇舌草, 蘇木, 牡丹皮를 가미하여 四物湯加味方 처방을 구성하였다.

생체 내에서 물질대사와 에너지 생산

을 위해 필수적으로 이용되는 산소는 정상적인 대사과정에서는 완전히 환원되지 못하고 생성된 활성산소종은 정상적인 환경에서는 대식세포의 살균작용 정보전달 및 오래된 단백질 제거 등에 이용되므로 적당량은 생성되어야 하지만, 생체 방어기전을 벗어나 과도하게 생성 될 경우 세포막에 존재하는 지질과 결합하여 과산화물을 만들고, 연속반응에 의하여 단백질 변형 또는 번역 후 변형을 일으켜 암을 유발할 뿐만 아니라, 세포노화, 세포막 분해, 지방산화 등 심각한 생리적 장애를 일으켜 각종 성인병과 난치성 질환을 유발하여 의학적으로 중요한 관심을 불러일으키고 있다³⁰⁻³⁹⁾. 여기에 생활수준이 향상되고 인간의 수명이 증가함에 따라 노화와 관련된 각종 퇴행성 신경 질환과 심혈관계 등의 질병에 관심이 커지고 있으며, 그 원인이 활성산소에 기인된 것이라는 산소 유해설이 점차 인정받으며⁴⁰⁾, 노화 및 암·염증·동맥경화·심장병·치매 등 각종 질병과 free radical과의 관련성이 대두되어, 최근 항산화제에 대한 연구가 활발해지고 있다⁴¹⁾.

즉 활성산소를 제거하는 항산화 기전이 인체에서 제대로 작동하지 않을 때 DNA의 손상과 변형으로 암이 유발될 수 있으므로 암의 예방에 있어 항산화능은 중요한 부분이라 할 수 있다.

이에 저자는 四物湯加味方에 MEF cells를 사용하여 항산화효과를 규명하기 위한 실험을 실시하였다.

四物湯加味方の 항산화 효과를 검증하기 위해 먼저 四物湯加味方 구성 약제 각각의 Free Radical 소거능을 DPPH assay를 통해 관찰하였다. 이 실험에서는 대표적 항산화제인 BHT와, 四物湯加

味方 개별 약재의 에탄올 추출물의 DPPH 상쇄 능력을 비교하여 항산화 효과를 검증하고자 하였다. DPPH는 그 자체가 매우 안정한 free radical로서 517nm에서 특징적인 광 흡수성을 나타내는 보라색 화합물이며 proton-radical scavenger에 의해 탈색되어 항산화 활성을 육안으로도 쉽게 관찰할 수 있는 장점 때문에 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다⁶⁸⁾. DPPH assay 결과 白芍藥에서 양호한 결과가 관찰되었고, 牡丹皮와 白花蛇舌草에서도 비교적 긍정적 결과가 관찰되었으나 牡丹皮는 0.1, 0.5, 1.0 mg/ml 농도에서 우수한 결과를 나타내었고, 白花蛇舌草는 소거능이 20%미만으로 우수하지는 않았다.

四物湯加味方 개별 약재 각각의 MEF cells에 대한 산화적 손상 방어능력을 MTT assay로 실험한 결과, 川芎 生地黃에서 농도가 증가함에 따라 MEF 세포 생존율이 증가하고, 當歸의 경우도 농도에 따라 편차가 있으나 생존율이 비교적 높게 측정되어 산화적 손상에 대한 방어능이 있음을 확인할 수 있었다. 牡丹皮의 경우 실험군 중 가장 고농도인 5 mg/ml에서 뛰어난 항산화능을 보였다.

四物湯加味方の 항산화능을 MEF cells를 이용한 MTT assay로 분석한 결과 $\times 500(0.5\text{mg/ml})$ 농도에서 가장 뛰어난 항산화 능력을 보였다.

H_2O_2 및 四物湯加味方 처리가 MEF cell의 각 세포 주기에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 cell cycle analysis를 수행한 결과 四物湯加味方 처리군이 세포주기의 회복에 긍정적 영향을 주는 것을 확인할 수 있었으나, 산화적 손상을 입힌 MEF cells의 세포주기에는 영

향을 주지 못했다. 이를 통해 볼 때 四物湯加味方이 세포주기에 미치는 영향은 정상세포에만 제한적이라 생각할 수 있다.

MEF cells의 대조군과 실험군에서의 apoptosis 발생률을 Annexin V-FITC/PI assay로 분석한 결과 대조군에 비해 四物湯加味方 처리군에서 apoptosis로 가는 세포수가 소폭 줄어들었고, H_2O_2 처리군에 비해 H_2O_2 와 四物湯加味方을 함께 처리한 군에서 apoptosis 발생률이 다소 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다. 이를 통해 四物湯加味方이 산화적 스트레스 상태에서 세포자멸을 억제하는 항산화능을 확인할 수 있다.

H_2O_2 와 四物湯加味方の 처리가 세포 내핵의 형태에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 DAPI 염색법을 수행한 결과, H_2O_2 와 四物湯加味方을 같이 처리한 실험군에서 핵 응축 및 DNA 손상이 관찰되는 정도가, H_2O_2 를 처리한 군에 비해 다소 감소되어 있으므로 四物湯加味方이 H_2O_2 로 유발된 산화적 손상으로 부터 세포 내핵을 보호하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

이상의 실험을 통하여 四物湯加味方과 개별약물로는 川芎과 生地黃이 정상세포에서 매우 뛰어난 항산화 효과를 보이는 것을 확인하였다.

V. 결 론

四物湯加味方이 MEF cells의 생존율, 세포 주기의 변화, apoptosis의 발생률, 세포 내핵의 변화에 대한 실험을 통해 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 四物湯加味方 구성 약재 각각의 Free Radical 소거능을 DPPH assay를 통해 관찰한 결과 白芍藥, 牡丹皮, 白花蛇舌草에서 양호한 결과가 관찰되었고, MTT assay를 통한 산화적 손상 방어능력을 실험한 결과 川芎 生地黃에서 농도가 증가함에 따라 항산화 능력이 증가함을 관찰할 수 있었다.
2. 四物湯加味方 추출물을 MEF cells를 이용 MTT assay를 통해 분석한 결과 0.5mg/ml의 농도에서 가장 뛰어난 항산화 능력을 보였다.
3. 세포주기분석에서 四物湯加味方은 산화적 손상을 받은 MEF cells의 세포 주기에는 영향을 주지 못하였다.
4. Annexin V-FITC/PI assay에서 四物湯加味方이 산화적 손상을 받은 MEF cells에 대한 apoptosis 발생률을 소폭 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다.
5. DAPI staining을 통해 四物湯加味方이 산화적 손상으로부터 MEF cells 내핵을 보호하는 효과가 있음을 관찰할 수 있었다.

□ 투 고 일 : 2010년 7월 28일

□ 심 사 일 : 2010년 8월 3일

□ 심사완료일 : 2010년 8월 10일

참고문헌

1. Folkow B. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol*. 1982;62:347.
2. Lee SO et al. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ulung island. *Korean J. Food Sci. Technol*. 2005;37:233-43.
3. Cha BC, Lee EH, Noh MA. Antioxidant activity of *Smilacis chinae radix*. *Korean J. Pharmacogn*. 2005;36:195-200.
4. Kim HJ et al. Antioxidant activity and inhibitive effects on human leukemia cells of edible mushrooms extracts. *Korean J. Food Preserv*. 2005;12:80-5.
5. Papas AM. Determinants of antioxidant status in humans. *Antioxidant status, diet, nutrition and health*:CRC Press. 1999;21-36.
6. Davis KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp*. 1995;61:1-31.
7. Polidori MC et al. Oxidative stress status: Profiles of antioxidants in human plasma. *Free Radic Biol Med*. 2001;30(5):456-62.
8. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:7915-22.
9. Branen AL. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Journal of the American Oil Chemists Society*/ 1975;52:59-65.
10. Ody P. Herbal insights: A close look at active constituents of medicinal herbs. *J. SOFW*. 1995;121:8-11.
11. Kim HK. Current Status and Prospect of Nutraceuticals. *Food Industry and Nutrition* 2004;9:1-14.
12. 김봉현 등. 지황의 법제와 포제법에

- 관한 문헌적 고찰. 동서의학. 2008; 33(3):25-47.
13. 황영명, 고병희, 송일병. 生地黃, 乾地黃, 熟地黃이 細胞性免疫反應 및 體液性免疫反應에 미치는 影響. 경희한의대논문집. 1987;10:207-18.
 14. 유호진, 우은란. 수종의 생약이 과산화수소에 의한 Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyl Transferase(HPRT) 유전자 돌연변이 억제에 미치는 효과. 한국생약학회지. 2004;53(1):28-34.
 15. 김주연 등. 생지황이 자궁경부암세포에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2006;19(1):69-80.
 16. 김성범, 김경준. 생지황이 혈관신생, 세포생존 및 염증관련 단백질 발현에 미치는 영향. 한방안이비인후피부과학회지. 2006;19(3):22-3.
 17. 서형식. 청대와 생지황의 항염 및 항산화 효과에 대한 실험적 연구. 한방안이비인후피부과학회지. 2008;21(3):104-10.
 18. 신민교. 임상본초학. 서울:영림사 2000: 385-7, 522-23.
 19. Namikosi M, Saito T. Homoisoflavoids and related compound. IV. Absolute configurations of homoisoflavonoids from caesalpinia sappan L. Chem. Pharm. Bull. 1987;35(9):3579-602.
 20. Park KJ et al. Cytotoxic effect of Korean traditional prescription on the human gastric cancer cell lines, Kor. J. Pharmacogn. 1987;28(4):233-8.
 21. Kim YS et al. Inhibitory effects of herbal medicines on hyaluronidase activity. Kor. J. Pharmacogn. 1995; 26(3):265-72.
 22. 문연자 등. A549 폐암세포주에 대한 蘇木 水抽出物の 세포고사 유도효과. 동의생리병리학회지. 2002;16(3):521-7.
 23. 김형환 등. 간세포의 산화적 손상에 대한 백화사설초의 항산화효과. 대한한방내과학회지. 2002;23(1):57-64.
 24. 서인교 등. 백화사설초 추출물의 항균실험 및 SOD류사활성, 전자공여능에 관한 연구. 대한한의학방제학회지. 2000;8(1):299-318.
 25. 부용출, 전체옥. 녹차와 목단피의 항산화 성분. J. Korean Agric Chem. Soc. 1993;36(5):326-31.
 26. 권오근 등. 목단피 추출물의 항균 및 항산화 작용. Korean J. Postharvest SCL Technol. 1998;5(3):281-5.
 27. 손무성 등. 목단피의 PC12 cell 항산화 효과와 관련 HO, MIF, COMT 유전자 발현에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2003;17(4):905-13.
 28. 김현희 등. 목단피의 PC12 cell 산화억제 효과 및 neuronal 유전자 발현 profile 분석에 대한 연구. 동의생리병리학회지. 2003;17(2):529-41.
 29. 유진균 등. 목단피 물 추출물의 항산화 및 Tyrosinase 억제효과. 한국식품영양학회지. 2009;38(3):292-6.
 30. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. FEBSLett. 1991;281:9-19.
 31. Zablocka A, Janusz M. The two faces of reactive oxygen species. Postepy Hig Med Dosw. 2008;62:118-24.
 32. Marletta MA, Tayeh MA, Hevel JH. Unraveling the biological significance of nitric oxide. Bidfactors. 1990;2

- :219-25.
33. Dean RT, Giese S, Davies MJ. Reactive species and their accumulation on the radical damaged proteins. Trends Biochem. Sci. 1993;18:437-41.
34. TS Hahm, DL King, DB Min. Food antioxidants. Food and Biotechnology. 1993;2:1-8.
35. Zablocka A, Janusz M. The two faces of reactive oxygen species. Postepy Hig Med Dosw. 2008;62:118-24.
36. Marletta MA, Tayeh MA, Hevel JH. Unraveling the biological significance of nitric oxide. Bidfactors. 1990;2:219-25.
37. 문진영, 임종국. 시호 약침제제의 자유기 소거능 및 지질과산화 억제효능에 관한 연구. 대한침구학회지. 1998;15(2):135-45.
38. Dean RT, Giese S, Davies MJ. Reactive species and their accumulation on the radical damaged proteins. Trends Biochem. Sci. 1993;18:437-41.
39. Hahm TS, King DL, Min DB. Food antioxidants. Food and Biotechnology. 1993;2:1-8.
40. Goldberg I. Functional foods. New York. Chapman & Hall Press. 1994:3-550.
41. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993;90:7915-22.