

원저

## 의이인탕 추출방법에 따른 생리활성 연구

박경무 · 염도성\* · 김학주\* · 고성규‡ · 임형호 · 송윤경

가천대학교 한의과대학 한방재활의학교실, 나사렛 한방병원 한방재활과\*  
(주) 서진바이오테크<sup>†</sup>, 경희대학교 한의과대학 예방의학교실<sup>‡</sup>

### Study on Biological Effect of *Euiiin-tang*(*Yiyiren-tang*) Extracts by Extraction Methods

Kyung-Moo Park, O.M.D., Do-Sung Yeom, O.M.D.\*, Hak-Ju Kim, Ph.D.†  
Seong-Gyu Ko, O.M.D.‡, Hyung-Ho Lim, O.M.D., Yun-Kyung Song, O.M.D.

Dept. of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Ga-Chon University  
Dept. of Oriental Rehabilitation Medicine, Nazareth Hospital of Oriental Medicine\*  
SeoJin Biotech Co., Ltd†, Dept. of Preventive Medicine, College of Korean Medicine, Kyung-Hee University‡

#### Objectives

The purpose of this study is to investigate biological effects of *Euiiin-tang*(*Yiyiren-tang*) extracts by extraction methods.

#### Methods

To investigate the effects of anti-oxidative and anti-inflammatory activity, we measured DPPH radical scavenging assay, collagenase inhibition assay and COX-2 inhibition assay.

#### Results

In case of measuring anti-oxidative and anti-inflammatory activities of *Euiiin-tang*(*Yiyiren-tang*) by collagenase and COX-2 inhibition activity, it came out that *Euiiin-tang*(*Yiyiren-tang*) was unable to inhibit collagenase, but was effective to inhibit COX-2. Cytotoxicity analysis of *Euiiin-tang*(*Yiyiren-tang*) extracts by MTT assay principles, there was no cytotoxicity in aqueous and 50% ethanol extracts in any level of concentration.

#### Conclusions

This results suggest that *Euiiin-tang*(*Yiyiren-tang*) extracts have anti-oxidative and anti-inflammatory activities.

**Key words :** *Euiiin-tang*(*Yiyiren-tang*), Obesity, anti-oxidative activities, anti-inflammatory activities

■ 교신저자 : 송윤경, 인천시 남동구 구월동 1200-1 가천대학교 부속 한방병원 한방재활의학과  
Tel : 070-7120-5013 E-mail : oxyzen@korea.com  
■ 접수 : 2012년 12월 13일 수정 : 2012년 12월 22일 채택 : 2012년 12월 23일

## I. 서론

한국에서는 다양한 종류의 질병치료 및 예방 목적으로 한약재를 사용해 왔으며, 최근 한약재로 구성된 신약에 대한 관심이 높아지면서 상용 한약재 및 복합처방에 대한 성분 조성 및 효능 분석이 활발하게 연구되고 있다.

이번 연구에서 사용한 의이인탕의<sup>1,2)</sup> 구성은 의이인, 창출, 마황, 당귀, 계지, 작약, 감초 7종의 약재로 구성되어 있다. 의이인탕은 전통적으로 濕痺, 肩臂痛에 사용하는 처방으로 지금까지 의이인탕에 대한 실험연구로는 관절염에 대한 항염증 효과를 실험한 연구<sup>3)</sup>와 LPS로 염증상태가 유도된 대식세포에서 NO발현 억제 효과를 실험한 연구<sup>4)</sup>가 있다. 특히, 의이인탕의 처방을 구성하는 의이인, 창출, 마황, 당귀, 작약 등은 이미 單味로서도 충분한 항비만 효과가 보고된바 있으나<sup>5)</sup>, 아직까지 개별 한약재 및 복합 처방에서 생리활성에 대한 연구는 미비한 실정이다. 이에 본 논문에서는 의이인탕 및 구성 한약재에서의 생리활성에 대한 연구를 시행하였다.

## II. 재료 및 연구방법

### 1. 시료의 준비 및 추출

의이인탕(『明醫指掌』) 처방<sup>1,2)</sup>의 구성은 마황, 당귀, 백출 각 4.0 g, 의이인 10 g, 계지, 백작약 각 3.0 g, 감초 2.0 g으로 이루어져 있다.

의이인탕 처방 추출물의 추출용매에 따른 생체 적합성을 조사하기 위하여, 증류수(D.W.)와 50% 주정알콜(이하 50% Ethanol로 표기), 100% 주정알콜(이하 100% Ethanol로 표기)을 사용하여, 각각

150 g씩 각각의 용매 1.0 L를 넣고 1.5시간 동안 순환냉각방식으로 끓인 후 종이필터(Watman No.2)로 여과하였다. 여과한 추출액을 회전진공증발기(Rotary vacumm evaporator, N-1000, Eyela Co., Tokyo, Japan)로 진공감압 농축하여 건조시킨 후 건조된 추출물을 1 mg/ml 농도로 증류수에 용해하여 실험에 사용하였다. 그 중 추출액 50 ml를 회전진공증발기로 60 °C에서 감압 농축 건조하여 건조중량을 사용하였다(Table I).

Table 1. Composition of *Euiiin-tang*

Herb medicine Name	Scientific Name	Weight (g)
薏苡仁	<i>Coicis Semen</i>	10.0
當歸	<i>Angelicae sinensis Radix</i>	4.0
白朮	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	4.0
麻黃	<i>Ephedrae Herba</i>	4.0
桂枝	<i>Cinnamomi Ramulus</i>	3.0
白芍藥	<i>Paeoniae Radix</i>	3.0
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2.0

### 2. 시료의 추출

의이인탕을 구성하고 있는 각 약재와 의이인탕 처방탕약의 추출용매에 따른 생리활성을 조사하기 위하여, 증류수(D.W.)와 50% 주정알콜(이하 50% Ethanol로 표기), 100% 주정알콜(이하 100% Ethanol로 표기)을 사용하여, 각각 150 g씩 각각의 용매 1.0 L를 넣고 1.5시간 동안 순환냉각방식으로 끓인 후 종이필터(Watman No.2)로 여과하였다. 여과한 추출액을 회전진공증발기(Rotary vacumm evaporator, N-1000, Eyela Co., Japan)로 진공감압 농축하여 건조시킨 후 추출수율을 계산하였다. 그리고 건조된 추출물을 1 mg/ml 농도로 용해하여 실험에 사용하였다. 그 중 추출액 50 ml를 회전진공증발기로 60 °C에서 감압 농축 건조하여 건조중량을 측정하였다.

### 3. 시료의 성분분석

#### 1) 단백질 정량(Lowry's method)

Lowry의 방법<sup>6)</sup>을 사용하여 단백질을 정량하였다. 시료 20 µl에 200 µl의 lowry's solution I (1% CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O : 2% K · Na-tartrate : 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in NaOH = 1 : 1 : 98) 혼합 후 10분간 반응시킨 다음에 20 µl의 lowry's solution II (2N Folin-ciocalteu's phenol reagent : water = 1 : 1) 넣고 실온에서 30분간 반응 시킨다. ELISA Reader(Biotek, USA)를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. BSA (Bovine Serum Albumin) 표준용액을 이용하여 표준곡선을 작성하였다.

#### 2) 환원당 정량(DNS method)

환원당 DNS(3,5-dinitrosalicylic acid)와 Rochelle 염으로 발색하여 흡광도를 측정하는 방법이다<sup>7)</sup>. 시료 100 µl에 DNS 시약 200 µl 가하고 잘 혼합 후 15분간 끓여 반응하게 한 다음 15분간 냉각시킨다. ELISA Reader(Biotek, USA)를 이용하여 546 nm에서 흡광도를 측정하였다. Glucose 표준용액을 이용하여 표준곡선을 작성하였다.

#### 3) 총 당 정량(phenol-sulfuric acid method)

당 정량분석에는 phenol-sulfuric acid법<sup>7)</sup>을 사용하였다. 시료 100 µl, 5% phenol 100 µl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 500 µl을 혼합 후 실온에서 30분간 반응시켰다. ELISA Reader(Biotek, USA)를 이용하여 480 nm에서 흡광도를 측정하였다. Glucose 표준용액을 이용하여 표준곡선을 작성하였다.

### 4. DPPH radical scavenging activity 측정

항산화활성을 측정하기 위해 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) free radical scavenging activity를 측정하였다<sup>8)</sup>. 전자공여능(EDA, electron donating ability) 측정법으로 Blois의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료용액 10 µl에 0.1 mM DPPH용액을 190 µl을 가하고 잘 혼합 후 37 °C에서 30분간 반응시킨 다음에 얼음물로 반응을 종료시킨다. ELISA Reader(Biotek, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군은 BHA를 사용하였다.

### 5. 의이인탕의 세포독성(cytotoxicity)

세포독성의 지표가 되는 세포생존율은 MTT assay로 측정하였다<sup>9)</sup>. MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 시약은 Sigma-Aldrich사로 부터 구입하여 사용하였으며, 사용된 cell은 NIH/3T3 mouse fibroblast(1X104)를 96well plate에서 24시간 배양하여 사용하였다. 의이인탕은 농도별로 희석하여 cell에 처리하였으며, 2시간 후 LPS(Lipopolysaccharide)를 처리하였으며, 0.5 mg/ml의 MTT 시약을 이용하여 0.1 mg MTT/(200 µl) well 에 넣고 2시간 동안 배양하였다. 각 실험군당 시료는 3개씩 처리하였고, 배양 후 상등액을 제거하고, 200 µl의 PBS로 세척한 후, 100µl의 DMSO를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan을 용해시킨 후, ELISA microplate reader(Model: MQX200R, BioTek, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 control cell에 대한 백분율로 표시하였다.

viability(% of control) =

$$\frac{\text{absorbance of treated sample}}{\text{absorbance of control}} \times 100$$

## 6. 선별된 약제에 대한 생리활성분석

### 1) 실험 약제 선별

1차 추출결과에서 항산화활성이 우수하며 세포 독성이 없는 한약재를 선별한 후 이들 약제와 의이인탕 처방에 대하여 생리활성을 분석하였다.

### 2) Collagenase 저해 활성 측정

Collagenase 저해활성 측정은 ninhydrin방법을 변형하여 사용하였다<sup>10)</sup>. 50 mM Tris-HCl buffer 50 µl에 1 mg/ml의 Collagenase(Type IA, Sigma C-9891, USA) 10 µl과 시료액 20 µl을 혼합 후 37 °C에서 10분간 방치한 후 6 mg/ml gelatin 500 µl을 가하여 37 °C에서 30분간 반응시켰다. 효소반응을 종지시키기 위해 10% TCA(trichloroacetic acid) 500 µl을 첨가한 후 10분 방치하였다. 이 반응액을 50 µl 취하여 ninhydrin 용액 500 µl 첨가 후 10분간 끓이고 얼음에서 5분간 냉각시킨다. 가수분해 되지 않은 단백질을 침전시키기 위해 50% 1-propanol 500 µl을 가하여 얼음에서 15분간 방치 후 원심분리 하였다. ELISA Reader(Biotek, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3) 항염증 활성 측정(COX-2 inhibition activity)

COX-2(Cyclooxygenase-2) 의 저해활성을 측정하였다. 실험방법은 다음과 같다: 96 well plate의 2 well 에 10 µl heme, 10 ul assay buffer(100 mM Tris-HCl, pH 8.0) 그리고 10 µl solvent(inhibitor를 녹였던 용매)를 첨가하였다. Background well에는 2 well 에 10 µl heme, 10 ul assay buffer 그리고 10 µl의 solvent를 첨가하였고, 100% initial activity 측정을 위해 2 well 에 10 µl heme, 10ul 효소(COX-2) 그리고 10 µl의 solvent를 첨가하였다. Sample(inhibitor)

의 COX 저해활성측정을 위해 2 well에 10 µl heme, 10 µl 효소(COX-2) 그리고 10 µl의 sample을 첨가하였다. Standard inhibitor로는 Indomethacin을 dimethyl sulfoxide에 녹여 처리하였고, Sample은 100 mM Tris-HCl(pH 8.0)에 녹여 농도별로 처리하였으며, 모든 well에 200 µl의 assay buffer를 첨가하여 실온에서 반응시킨 후, Luminometer(SpectraMax L, Molecular devices, USA)에 부착되어 있는 2개의 dispenser를 이용하여 하나의 dispenser로 모든 well에 10 µl의 chemiluminescent substrate를 첨가하고, 즉시 다른 하나의 dispenser를 이용하여 50 µl 의 arachidonic acid를 첨가한 후 Relative Luminescent Units(RLU)를 Luminometer로 측정하였다. Standard inhibitor는 indomethacin을 사용하였다<sup>11-13)</sup>.

## 7. 통계처리

실험에 사용한 통계분석시스템은 SAS Clinical Data Integration solution(ver. 9.1)(SAS, USA)을 사용하여 분석하였으며, 분석결과는 mean±SD로 나타내었다. 각 군간 평균차이는 Student *t*-test와 ANOVA test로 분석하여,  $p < 0.05$ 인 경우 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

## III. 연구결과

### 1. 시료의 추출수율 검증

의이인탕을 구성하고 있는 각 약제와 의이인탕 처방탕약의 추출용매에 따른 생리활성을 조사하기 위하여, Water와 50% Ethanol, 100% Ethanol을 사용하여, 각각 150 g씩 각각의 용매1.0 L를 넣고 1.5시간 동안 순환냉각방식으로 끓인 후 종이

필터(Watman No.2)로 여과하여 진공 감압 건조하여 그 수율을 저울로서 정량하여 확인하였다. 그 결과 의이인탕 물추출물은 13.12%, 50% Ethanol 추출물은 9.560%, 100% Ethanol 추출물은 5.384%로 확인되었다(Table II).

Table II. Yield of Herb Medicine Extract

Solvents	Sample Name	Yield(% w/w)
Water extract	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	13.376±0.234
	<i>Angelicae sinensis Radix</i>	31.978±0.631
	<i>Paeoniae Radix</i>	10.714±0.321
	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	33.124±0.663
	<i>Coicis Semen</i>	3.768±0.161
	<i>Cinnamomi Ramulus</i>	1.862±0.053
	<i>Ephedrae Herba</i>	12.220±0.366
	<i>Yujiren-tang</i>	13.102±0.395
50% Ethanol extract	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	10.470±0.231
	<i>Angelicae sinensis Radix</i>	26.690±0.812
	<i>Paeoniae Radix</i>	6.166±0.132
	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	17.872±0.543
	<i>Coicis Semen</i>	0.858±0.027
	<i>Cinnamomi Ramulus</i>	2.066±0.063
	<i>Ephedrae Herba</i>	10.620±0.399
	<i>Yujiren-tang</i>	9.560±0.298
100% Ethanol extract	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	5.792±0.186
	<i>Angelicae sinensis Radix</i>	9.780±0.512
	<i>Paeoniae Radix</i>	2.088±0.073
	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	4.666±0.143
	<i>Coicis Semen</i>	1.626±0.051
	<i>Cinnamomi Ramulus</i>	1.482±0.053
	<i>Ephedrae Herba</i>	4.636±0.136
	<i>Yujiren-tang</i>	5.384±0.173

All experimental data were mean±SD of triple determinations(P<0.05)

## 2. 구성성분 분석

의이인탕을 구성하고 있는 각 약재와 의이인탕 처방 각 추출물들에 대한 구성성분을 분석하였다. 그 결과 의이인탕 물 추출물은 단백질 2.11%, 환

원당 0.79%, 총 당 8.35%로 확인 되었으며, 50% Ethanol 추출물은 단백질 1.95%, 환원당 0.87%, 총 당 6.52%, 100% Ethanol 추출물은 단백질 5.05%, 환원당 1.23%, 총 당 4.94%로 분석되었다(Table III).

Table III. Component Analysis for Dry Samples

Solvents	Sample Name	Protein (%,w/w)	Reducing Sugar (%,w/w)	Total Sugar (%,w/w)
Water extract	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4.71±0.23	0.54±0.02	2.74±0.12
	<i>Angelicae sinensis Radix</i>	1.19±0.05	0.25±0.01	0.83±0.03
	<i>Paeoniae Radix</i>	1.39±0.07	1.39±0.06	6.43±0.19
	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	0.80±0.02	2.36±0.07	1.29±0.13
	<i>Coicis Semen</i>	0.64±0.01	1.86±0.05	6.42±0.11
	<i>Cinnamomi Ramulus</i>	18.15±0.54	4.24±0.13	3.87±0.13
	<i>Ephedrae Herba</i>	5.66±0.18	1.37±0.04	1.18±0.04
	<i>Yujiren-tang</i>	2.11±0.07	0.79±0.03	8.35±0.25
50% Ethanol extract	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	5.89±0.18	1.04±0.03	6.37±0.19
	<i>Angelicae sinensis Radix</i>	2.12±0.06	0.37±0.01	1.32±0.07
	<i>Paeoniae Radix</i>	4.93±0.15	1.57±0.05	9.29±0.19
	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	1.14±0.04	2.53±0.08	1.64±0.04
	<i>Coicis Semen</i>	1.17±0.04	10.02±0.34	12.00±0.38
	<i>Cinnamomi Ramulus</i>	19.60±0.57	4.84±0.16	8.18±0.26
	<i>Ephedrae Herba</i>	5.65±0.17	1.69±0.05	5.02±0.17
	<i>Yujiren-tang</i>	1.95±0.06	0.87±0.03	6.52±0.24
100% Ethanol extract	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	9.32±0.23	1.55±0.05	5.52±0.17
	<i>Angelicae sinensis Radix</i>	10.13±0.31	0.72±0.02	5.09±0.16
	<i>Paeoniae Radix</i>	12.45±0.38	3.02±0.06	6.61±0.23
	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	1.59±0.06	1.71±0.06	6.94±0.21
	<i>Coicis Semen</i>	2.03±0.07	3.81±0.12	4.43±0.14
	<i>Cinnamomi Ramulus</i>	12.69±0.32	4.99±0.16	5.06±0.15
	<i>Ephedrae Herba</i>	17.99±0.54	2.33±0.08	4.25±0.18
	<i>Yujiren-tang</i>	5.05±0.17	1.23±0.05	4.94±0.16

All experimental data were mean±SD of triple determinations (P<0.05)

### 3. 추출물에 대한 DPPH radical scavenging activity 분석

전자공여능은 지질과산화 반응의 연쇄반응에 관여하는 산화성 free radical에 전자를 제공하여 연쇄반응을 정지, 산화를 억제시킨다. 이에 DPPH 법을 사용하여 항산화물질의 전자공여능으로 인해 방향족 화합물 및 방향족 아민류에 환원되어

생긴 자색이 탈색되는 정도를 나타내어 항산화 활성 능력을 측정하였다. 그 결과 물 추출물의 경우 백작약 37%, 계지61%, 마황 50%, 의이인탕이 4%의 항산화활성이 확인되었으며, 50% 에탄올추출물의 경우 백작약 43%, 계지 72%, 마황 72%, 의이인탕 40%, 100% 에탄올의 경우 감초 75%, 당귀 44%, 백작약 79%, 계지 56%, 마황 80%, 의이인탕이 38%의 활성이 확인되었다(Table IV).

Table IV. DPPH Radical Scavenging Activity of Herb Medicine Extract

Solvents	Sample Name	DPPH radical scavenging activity(%)
Water extract	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	-3±0.06
	<i>Angelicae sinensis Radix</i>	-4±0.07
	<i>Paeoniae Radix</i>	37±0.73
	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	-2±0.04
	<i>Coicis Semen</i>	-12±0.24
	<i>Cinnamomi Ramulus</i>	61±1.21
	<i>Ephedrae Herba</i>	50±0.98
	<i>Yiyiren-tang</i>	4±0.08
50% Ethanol extract	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	12±0.23
	<i>Angelicae sinensis Radix</i>	8±0.15
	<i>Paeoniae Radix</i>	43±0.85
	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	-1±0.01
	<i>Coicis Semen</i>	12±0.23
	<i>Cinnamomi Ramulus</i>	72±1.32
	<i>Ephedrae Herba</i>	72±1.41
	<i>Yiyiren-tang</i>	40±1.12
100% Ethanol extract	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	75±1.43
	<i>Angelicae sinensis Radix</i>	44±0.89
	<i>Paeoniae Radix</i>	79±1.62
	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	15±0.37
	<i>Coicis Semen</i>	12±0.24
	<i>Cinnamomi Ramulus</i>	56±1.06
	<i>Ephedrae Herba</i>	80±1.58
	<i>Yiyiren-tang</i>	38±0.78
Control	BHA(1.0 mg/ml)	85±1.16

All experimental data were mean±SD of triple determinations(P<0.05)

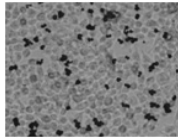
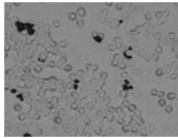
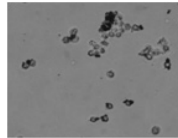
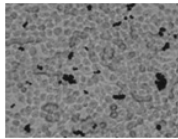
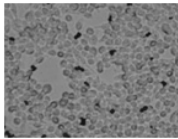
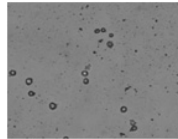
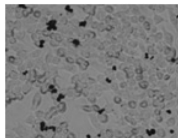
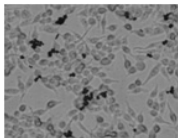
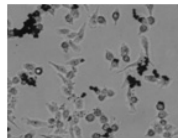
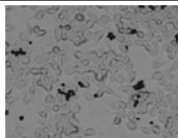
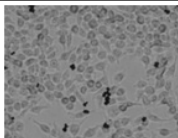
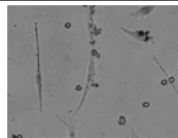
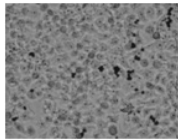
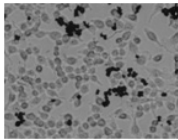
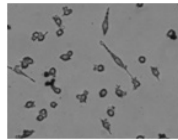
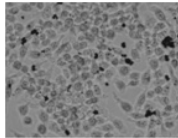
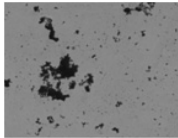
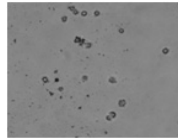
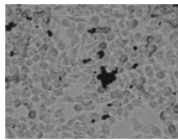
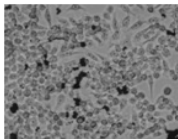
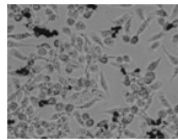
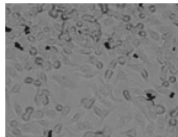
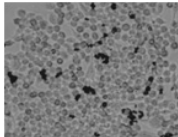
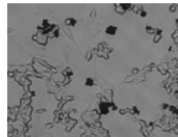
#### 4. NIH/3T3 mouse fibroblast cell에 대한 세포독성 확인

각 약재별로 Water, 50% Ethanol, 100% Ethanol 을 사용하여 추출한 추출물에 대한 세포독성을 분석하였다. 그 결과 50% Ethanol 추출물 중 계지 추출물과 100% Ethanol 추출물 중 감초, 당귀, 백출, 의이인, 계지 추출물의 경우 NIH/3T3 mouse fibroblast cell의 개체수가 눈에 띄게 줄어드는 것으로 확인 되어 세포독성이 있는 것으로 확인 되었다

(Table V).

의이인탕 시료는 세 종류로 의이인탕 처방 물 추출물, 50% Ethanol 추출물, 100% Ethanol 추출물 을 사용하였으며, 시료는 각각 10, 25, 50, 100 µg/ml 씩 농도별로 처리하였다. 그 결과 의이인탕 물 추출물과, 50% Ethanol 추출물의 경우 세포생존율이 80% 이상으로 독성이 없는 것으로 확인이 되었으며, 100% Ethanol 추출물의 경우 25 µg/ml 이상 농도에서 모두 세포독성이 있는 것으로 확인되었다(Fig. 1).

Table V. Cytotoxicity Analysis of NIH/3T3 Mouse Fibroblast Cell(3T3-L1)

Solvents		Water extract	50% Ethanol extract	100% Ethanol extract
Pre-adipocyte		<i>Glycyrrhizae Radix</i>	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	<i>Glycyrrhizae Radix</i>
				
		<i>Angelicae sinensis Radix</i>	<i>Angelicae sinensis Radix</i>	<i>Angelicae sinensis Radix</i>
				
		<i>Paeoniae Radix</i>	<i>Paeoniae Radix</i>	<i>Paeoniae Radix</i>
				
		<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>
				
		<i>Coicis Semen</i>	<i>Coicis Semen</i>	<i>Coicis Semen</i>
				
Adipocyte		<i>Cinnamomi Ramulus</i>	<i>Cinnamomi Ramulus</i>	<i>Cinnamomi Ramulus</i>
				
		<i>Ephedrae Herba</i>	<i>Ephedrae Herba</i>	<i>Ephedrae Herba</i>
				
		<i>Yiyiren-tang</i>	<i>Yiyiren-tang</i>	<i>Yiyiren-tang</i>
				



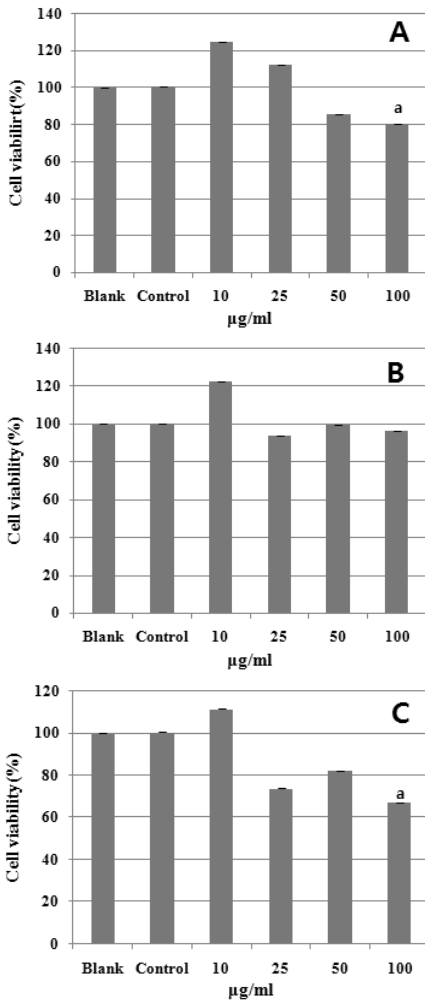


Fig. 1. NIH/3T3 mouse fibroblast cell viability of each *Yiyiren-tang* extracts

A : water extract, B : 50% Ethanol extract, C : 100% Ethanol extract.

Statistical analysis with one-way ANOVA and LSD test were performed.

a, represent statistically significant as  $p < 0.01$  compared with control group

## 5. 선별된 약재에 대한 생리활성분석

- 1) 항산화활성 및 세포독성에 의한 실험 약재의 선별  
항산화 활성은 우수하나 세포독성에 영향을 미

치는 약재를 제외하고 실험 약재를 선별하여 물 추출물의 백작약, 계지, 마황과 의이인탕, 50% Ethanol로 추출한 의이인탕, 100% Ethanol로 추출한 의이인탕을 실험에 사용하였다. 추가로 감초의 경우 물 추출물과, 50% Ethanol 추출물의 경우 항산화 활성이 낮다가 100% Ethanol에서 항산화 활성이 급격히 증가하여, 세포독성에 영향을 주지만 대조군 실험에 사용하였다.

### 2) 항염증(COX-2) 활성 측정

COX-2 활성 측정결과 의이인탕 물 추출물은 81%, 의이인탕 50% Ethanol 추출물은 93%, 의이인탕 100% Ethanol 추출물은 98%, 마황 물 추출물은 82%, 백작약 물 추출물은 66%의 저해 활성이 확인 되었다. 특히 계지 물 추출물과 감초 100% Ethanol 추출물은 100%로 확인 되었다(Table VI).

Table VI. Inhibitory Effect of the Extract on COX-2

Sample name	COX-2 inhibition activity(%)
<i>Yiyiren-tang</i> water Extract	81±1.71
<i>Yiyiren-tang</i> 50% Ethanol extract	93±4.01
<i>Yiyiren-tang</i> 100% Ethanol extract	98±6.71
<i>Ephedrae Herba</i> water extract	82±3.16
<i>Cinnamomi Ramulus</i> water extract	100±2.28
<i>Paeoniae Radix</i> water extract	66±2.20
<i>Glycyrrhizae Radix</i> 100% Ethanol extract	101±3.60

All experimental date were mean±SD of triple determinations. ( $P < 0.05$ )

### 3) Collagenase 저해 활성 측정

Collagenase 저해 활성 측정결과 의이인탕 물 추출물은 17%, 의이인탕 50% Ethanol 추출물은 4%, 의이인탕 100% Ethanol 추출물은 13%의 collagenase저해 활성이 있는 것으로 확인되었다. 단일 약재인 백작약 물 추출물은 11%, 계지 물 추출물 2%, 감초 100% Ethanol 추출물은 5%의 저

해활성을 가지는 것으로 확인 되었으며, 마황 물 추출물은 Collagenase 저해활성이 없는 것으로 확인 되었다(Table VII).

Table VII. Inhibitory Effect of the Extract on Collagenase

Sample name	Collagenase inhibition activity (%)
<i>Yiyiren-tang</i> water extract	17±2.36
<i>Yiyiren-tang</i> 50% Ethanol extract	4±1.35
<i>Yiyiren-tang</i> 100% Ethanol extract	13±0.71
<i>Ephedrae Herba</i> water extract	-3±0.90
<i>Cinnamomi Ramulus</i> water extract	11±1.18
<i>Paeoniae Radix</i> water extract	2±2.36
<i>Glycyrrhizae Radix</i> 100% Ethanol extract	5±0.20

All experimental data were mean±SD of triple determinations. (P<0.05)

#### IV. 고찰 및 결론

본 연구에서는 의서에 기록된 처방에 가감을 하지 않은 의이인탕을 원방 용량으로 하여 개별 약재 및 처방의 단백질 및 당 정량 분석을 통하여 구성 성분을 분석하였고, 자유기 소거능 측정과 세포생존율을 통해 항산화 효능이 높으며, 세포생존율이 높은 시료를 1차 선택하여 Collagenase 저해활성 및 COX-2의 저해활성을 추가로 측정하여 생리활성 분석을 하였다.

의이인탕을 구성하고 있는 각 약재와 의이인탕 처방탕약의 추출용매에 따른 생리활성을 조사하기 위하여, Water와 50% Ethanol, 100% Ethanol의 추출 용매별로 추출수율을 측정한 결과 의이인탕 물추출물은 13.12%, 50% Ethanol 추출물은 9.560%, 100% Ethanol 추출물은 5.384%로 측정되어 Ethanol의 농도가 높아질수록 회수율은 떨어지는 것으로 확인되었다. 물 추출물의 경우 전분당이 많이 추출되어 회수된 결과로 사료된다(Table II).

의이인탕을 구성하고 있는 각 약재와 의이인탕

처방의 추출 용매에 따른 구성성분을 분석한 결과 의이인탕 물 추출물은 단백질 2.11%, 환원당 0.79%, 총 당 8.35%로 확인 되었으며, 50% Ethanol 추출물은 단백질 1.95%, 환원당 0.87%, 총 당 6.52%, 100% Ethanol 추출물은 단백질 5.05%, 환원당 1.23%, 총 당 4.94%로 분석되었다(Table III). 따라서 물 추출물의 회수율이 Ethanol 추출물에 비해 높은 것은 총 당의 함량이 높기 때문인 것으로 생각된다.

DPPH법을 사용하여 항산화물질의 전자공여능으로 인해 방향족 화합물 및 방향족 아민류에 환원되어 생긴 자색이 탈색되는 정도를 나타내어 항산화 활성 능력을 측정한 결과 물 추출물의 경우 백작약 37%, 계지61%, 마황 50%, 의이인탕이 4%의 항산화활성이 확인되었으며, 50% 에탄올추출물의 경우 백작약 43%, 계지 72%, 마황 72%, 의이인탕 40%, 100% 에탄올의 경우 감초 75%, 당귀 44%, 백작약 79%, 계지 56%, 마황 80%, 의이인탕이 38%의 활성이 확인되었다(Table IV).

따라서 의이인탕의 경우 50% Ethanol로 추출할 경우 항산화 활성이 가장 높은 것으로 나타났으며 이것은 백작약, 마황, 계지가 항산화활성에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 100% Ethanol로 추출할 경우 의이인탕 항산화 활성에 감초, 당귀, 백작약, 계지, 마황이 골고루 영향을 미치는 것으로 생각 된다.

NIH/3T3 mouse fibroblast를 사용하여 세포독성의 지표가 되는 세포생존율을 MTT assay로 측정하였다. 각 약재별로 Water, 50% Ethanol, 100% Ethanol을 사용하여 추출한 추출물에 대한 세포독성 분석 결과에서는 50% Ethanol 추출물 중 계지 추출물과 100% Ethanol 추출물 중 감초, 당귀, 백출, 의이인, 계지 추출물의 경우 NIH/3T3 mouse fibroblast cell의 개체수가 눈에 띄게 줄어드는 것으로 확인 되어 세포독성이 있는 것으로 확인 되

었다(Table V).

의이인탕 물 추출물, 50% Ethanol 추출물, 100% Ethanol 추출물의 시료는 각각 10, 25, 50, 100 µg/ml 씩 농도별로 처리하였다. 그 결과 의이인탕 물 추출물과, 50% Ethanol 추출물의 경우 세포생존율이 80% 이상으로 독성이 없는 것으로 확인이 되었으며, 100% Ethanol 추출물의 경우 25 µg/ml 이상 농도에서 모두 세포독성이 있는 것으로 확인되었다(Fig. 1).

염증반응이 유발되었을 경우 증가하는 단백질 중에서 세포자멸사 및 암발생과 관련이 있는 것으로 알려진 단백질로서 COX-2가 있다. COX는 거의 모든 세포에서 발현하고 있는 constitutive form인 COX1과 다양한 자극에 의해 발현이 유도되는 inducible form인 COX-2가 있다. 유전자조작으로 유도한 비만동물모델인 Zucker rat에서 azoxymethane에 의해 유도되는 대장암 발생에서 식이제한을 할 경우 Zucker(fa/fa) rat에서 COX-2의 발현이 감소하고 대장암의 전단계인 Atypical crypt foci(ACF)가 감소한다는 연구가 있다<sup>14)</sup>. 즉, 비만의 개선과 COX-2 발현의 저해는 밀접한 관련이 있고, 그로 인해 염증 반응이나 암 세포의 활성화 등도 저해되는 것을 알 수 있다. 본 연구에서는 효소반응을 통한 저해활성을 분석하는 방법인 Chemiluminescent COX inhibitory screening assay를 통하여 항염증 활성에 대한 효과를 측정하였다. 이 방법의 경우 최근에 개발된 방법으로 빠르게 항염증 활성을 동시분석이 가능한 방법으로 알려져 있으며, 항염증과 관련된 많은 논문에서 사용하고 있다. Cyclooxygenase (COX)효소는 물리적 자극에 의해 염증이 발생할 경우 COX-1효소가 발현하고, 염증자극에 의해서는 COX-2효소가 발현하는데 이것은 세포에 상처가 나게 되면 아라키돈산(Arachidonic acid)이 COX효소에 의해 산화되어 prostaglandin으로 전환되면서 염증이 발생하게 된다. COX실험의 목적은 바

로 이러한 효소의 발현을 억제하는 정도가 얼마인가에 따라 항염증활성의 활성이 결정된다. COX-2 활성 측정결과 의이인탕 물 추출물은 81%, 의이인탕 50% Ethanol 추출물은 93%, 의이인탕 100% Ethanol 추출물은 98%, 마황 물 추출물은 82%, 백작약 물 추출물은 66%의 저해활성이 확인되었고, 특히, 계지 물 추출물과 감초 100% Ethanol 추출물은 100%로 나타났다(Table VI). 따라서 의이인탕은 항염증활성이 우수한 것으로 생각되며, 최근 연구에서 염증과 비만, 2형 당뇨병의 경우 같은 기전 내에서 서로 영향을 주고 있는 것으로 보고되고 있어<sup>15,16)</sup>, 비만으로 인한 대사증후군에도 영향을 미칠 것으로 추정된다.

Free radical 소거능으로 확인된 항산화 효과를 추가로 확인하기 위해 Collagenase 저해 활성을 측정하였다. Collagenase효소는 진피 층에 존재하는 Collagen을 분해하는 효소로서 피부노화에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 의이인탕 처방이 피부노화를 예방하는 효과가 있는지 검증하기 위하여 본 실험을 실시하였다. Collagenase 저해 활성 측정결과 의이인탕 물 추출물은 17%, 의이인탕 50% Ethanol 추출물은 4%, 의이인탕 100% Ethanol 추출물은 13%의 collagenase저해 활성이 있는 것으로 확인되었다. 단일 약재인 백작약 물 추출물은 11%, 계지 물 추출물 2%, 감초 100% Ethanol 추출물은 5%의 저해활성을 가지는 것으로 확인되었으며, 마황 물 추출물은 Collagenase 저해활성이 없는 것으로 확인 되었다(Table VII).

이상의 결과로 의이인탕 추출물은 항염증 및 항산화 효과가 있는 것으로 확인되었으며 비만치료 뿐만 아니라 염증기전에 의한 대사증후군에 대해서도 임상적으로 효과가 있을 것으로 생각되며 향후 이에 대한 연구가 필요할 것으로 사려된다.

## 감사의 글

본 연구는 한의약선도기술개발사업 한의약임상연구(과제고유번호 B110068)의 일환으로 시행된 것임.

## 참고문헌

1. 失數道明. 새 한방처방 해설. 서울:대한교과사. 1985:447.
2. 皇甫中. 明医指掌. 북경:中國中醫藥出版社. 1999: 185.
3. 조중현, 권오곤, 우창훈, 안희덕. Collagen으로 유발된 마우스의 관절염에 대한 의이인탕 추출물의 억제 효과. 한방재활의학과학회지. 2010; 20(1):37-60.
4. 배주연. LPS로 활성화된 복강 대식세포에서 마황이 배오된 10종 처방의 NO 억제 효과. 원광대학교 대학원 석사학위논문. 2009.
5. 정양삼, 윤기현, 노영호, 장형근, 양유인, 김경철, 신순식. 항비만의 한약재와 그 유효성분, 방제에 대한 기초 연구. 한의학연구소 동의한의원 제8집. 2004;12:5-9.
6. Chae SW, Kim JS, Kang KA, Bu HD, Lee Y, Hyun JW. Antioxidant Activity of Jionoside D from *Clerodendron trichotomum*. *Biol Pharm Bull.* 2004;27(10):1504-8.
7. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 1956;28:350-6.
8. Han SS, Lo SC, Choi YH, Kim JH, Baek SH. Antioxidant activity of crude extract and pure compounds of *Acer ginnala* Max. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2004;25(3):389-91.
9. Susumu K, Tomiyasu M, Ayumi S, Chihiro I, Mehrdad I, Kiyomi H, Norio K. Methyl galbanate, a novel inhibitor of nitric oxide production in mouse macrophage RAW264.7 cells. *Journal of natural medicines.* 2011;65(2): 353-9.
10. Anthony S, Murray CM, John JR. Collagenase and collagenase inhibitor levels following changes in bone resorption in vitro. *Calcified Tissue International.* 1980;31(1):35-43.
11. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, House S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994;91: 12013-7.
12. Linton MF, Fazio S. Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis. *Current Opinion in Pharmacology.* 2004;4:116-23.
13. Kortz F, Schiele TM, Klaus V, Sohn HY. Selective COX-2 inhibitors and risk of myocardial infarction. *Journal of Vascular Research.* 2005; 42:312-24.
14. Raju J, Bird RP. Energy restriction reduces the number of advanced aberrant crypt foci and attenuates the expression of colonic transforming growth factor beta and cyclooxygenase isoforms in Zucker obese (fa/fa) rats. *Cancer Res.* 2003;63:6595-601.
15. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006;444(7121):860-7.
16. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual Review of Immunology.* 2011;29:415-44.