

추출 방법에 따른 육미지황탕의 항염증 작용 평가

대전대학교 한의과대학 한방부인과교실
이귀희, 유동열

ABSTRACT

Evaluation of Anti-Inflammatory Effects of Yukmijihwangtang and Individual Drug Substances Based on the Extraction Methods

Gui-Hee Lee, Dong-Youl Yoo

Dept. of Oriental Gynecology, College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University

Objectives: This study was performed to develop therapeutic prescription that is more significant than existing ones through extraction method and formulation changes.

Methods: Yukmijihwangtang(YMJHT) was extracted in 80% ethanol, and their relative anti-oxidant activities as well as anti-inflammatory effects through immune modulation were measured.

Results: Both water and ethanol extracted YMJHT showed dose-dependent DPPH elimination activities. ROS inhibition activity was greater in water extracted YMJHT except for Moutan Cortex. NO inhibition assay results indicated that all groups showed higher NO inhibition activities in RAW 264.7 cells in dose dependent manner. Water extracted group showed higher NO inhibition activity than that of ethanol extracted group. TNF- α secretion inhibition assay using RAW 264.7 cells, water extracted YMJHT showed higher activity than ethanol extracts. Growth rate of spleen cells was greater in all tested groups, with higher rate in YMJHT-EtOH than YMJHT-DW. Suppression of gene expression of IFN- γ in spleen cells stimulated by Con A was higher in YMJHT-EtOH than YMJHT-DW. Suppression of gene expression of IL-10 in spleen cells stimulated by Con A was highest in YMJHT-DW with 40%. Suppression of gene expression of IL-4 in spleen cells stimulated by Con A were significant with 90% or higher in all groups and that of IL-12p35 were also higher than 90% in all cases.

Conclusions: From the results, it shows that YMJHT has anti-inflammatory effects through immune modulation. However, the difference between YMJHT-EtOH and YMJHT-DW was not that significant. Further studies are needed to find out effective extraction methods of herbal medicine.

Key Words: Yukmijihwangtang(YMJHT), anti-oxidant activities, anti-inflammatory effects, immune modulation, extraction methods

I. 서 론

육미지황탕은 《金匱要略》¹⁾에서 기원하고 八味地黃丸을 변형한 것인데, 宋代의 錢乙의 《小兒藥證直訣》²⁾에서 육계와 부자를 처방에서 제외하고 六味地黃元이라고 명명하였으며 탕제로 복용가능 하도록 조절한 처방이다. 滋陰補血의 효능을 지니고 있고, 숙지황, 산약, 산수유, 택사, 목단피, 복령 등 6종의 약재로 구성되어 있으며³⁾ 지금까지 임상에서 널리 활용되고 있다.

육미지황탕은 널리 활용되는 만큼 각종 논문도 많이 발표되고 있는데, 육미지황탕의 실험적 연구로는 신장 기능 조절 및 신장 조직 보호효과에 관한 연구⁴⁻⁶⁾, 인지기능 강화 및 뇌 조직 보호효과^{7,8)}, 성장 및 골 형성에 미치는 영향^{9,10)}, 항 당뇨 효능¹¹⁻¹⁴⁾, 면역기능 조절 효능^{15,16)}, 항산화 효능^{17,18)}, 근육운동과 피로 회복에 미치는 영향¹⁹⁾, 간 기능^{17,20)}, 생식능력 증강²¹⁾, 항암^{22,23)}, 혈압강하²⁴⁾ 등에 대해 보고된 바 있다. 또한 최근에 이²⁵⁾는 간질성 방광염에 육미지황탕가미방이 유효한 효과가 있음을 실험적으로 입증하였다. 이상의 연구 보고들은 육미지황탕이 임상에서 부인과 질환 중 염증 질환에 활용될 수 있음을 시사한다.

한의학에서는 염증과 관련한 병증이 다양하게 언급되고 있는데, 특히 부인과 질환 중 痛經, 經行腹痛, 帶下, 熱入血室, 癥瘕, 不妊, 產後腹痛, 產後發熱 등의 병증은 급·만성 골반염, 질염, 자궁 내 유착성 염증, 산욕기 감염 등과 밀접한 관련이 있다²⁶⁾. 치료에 있어서 급성 염증성 증후는 清熱解毒, 祛風利濕, 涼血活血

法을, 만성 염증성 증후는 補氣補血하는 扶正法을 기본으로 하여 清熱解毒, 祛風利濕, 活血化癥法 등이 활용되고 있다²⁷⁻⁸⁾.

한약에 함유되어 있는 성분 중 생리활성 성분이라고 알려져 있는 많은 성분이 양약과 달리 장내미생물에 의해서 일차적으로 대사가 일어난 후 흡수가 된다고 보고되어 있다²⁹⁾. 따라서 추출방식에 따라 생리활성물질의 흡수가 영향을 받을 수 있다고 보여 지는데, 이에 대한 연구로 천마³⁰⁾, 방풍통성산³¹⁾에 대한 연구 등이 있지만 아직 미흡한 실정이다.

이에 저자는 추출 방법에 따른 육미지황탕의 항염증 작용을 평가하고자 각 물과 에탄올로 추출하여, 항산화 활성에 미치는 영향, RAW 264.7 세포주에서 염증 관련 cytokine의 유전자 발현 및 생성에 미치는 영향, 생쥐 모델의 비장 내 cytokine 변화에 미치는 영향 등에 대해 실험한 결과 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실 험

1. 재 료

1) 동 물

Balb/c 생쥐 수컷은 한일실험동물(주)에서 구입했다. 동물실내의 명암은 12시간으로 자동 조절시켰으며 물과 사료를 자유롭게 섭취하도록 했다.

2) 세 포

실험에 사용된 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행에서 구입하였다.

3) 약 재

본 실험에 사용한 육미지황탕의 구성 약재들은 ○○대학교 지역혁신센터 난치

성 면역질환의 동서생명의학 연구센터에서 구입하여 정선 후 사용하였고, 그 내용과 분량(1첩)은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Prescription of Yukmijihwang-tang (1첩)

한약명	생약명	용량 (g)
熟地黄	<i>Rehmanniae Radix Preparata</i>	16
山藥	<i>Dioscoreae Rhizoma</i>	8
山茱萸	<i>Corni Fructus</i>	8
白茯苓	<i>Poria Sclerotium</i>	6
牡丹皮	<i>Moutan Cortex</i>	6
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	6
Total amount		50

4) 시 약

Lipopolysaccharide(LPS), dimethyl sulfoxide (DMSO), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)는 Sigma-Aldrich사(st. Louis, MO, USA)에서, Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), Penicillin 및 Streptomycin은 Hyclone사(Logan, Ut, USA)에서, Cell viability assay kit은 Daeillab sevice사 (Seoul, Korea)에서, Nitric Oxide detection kit은 Intron Biotechnology사(Suwon, Korea)에서 구입하였다. PCR premix kit은 Bioneer사(Daejeon, Korea)에서, Cytokine Milliplex Map Immunoassay kit은 Millipore 사(Bellerica, MA, USA)에서, HPLC 분석에 이용된 water와 acetonitrile은 Ducksan 사(Ansan, Korea)에서 구입하였다.

5) 기 기

본 실험에 사용된 기기는 rotary vacuum evaporator(EYELA, Japan), Freeze dryer (IlShin, Korea), ELISA reader(Molecular Devices, USA), Luminex(Millipore, USA), HPLC(Shimadzu LC-20AD, Japan), HPLC

column(ACE 5 C18, 250×4.6 mm, 5 μ m)을, Flow cytometry system(BD Biosciences immunocytometry systems, USA)를, PCR은 Corbett research사(Mortlake, Australia)를, real time PCR은 Applied Biosystem사 (Applied Biosystem, USA)를 이용하였다.

2. 방 법

1) 시료 추출

(1) 육미지황탕의 물 추출

육미지황탕 1첩을 물 500 ml에 넣고, 3시간동안 환류추출 하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50 ml로 감압, 농축하여 동결건조 하였다. 완전 건조된 육미지황탕(11.8 g)을 냉동보관하여 사용하였다.

(2) 육미지황탕의 에탄올 추출

육미지황탕 1첩을 80% 에탄올 500 ml에 넣고, 3시간동안 환류추출 하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50 ml로 감압, 농축하여 동결건조 하였다. 완전 건조된 육미지황탕(19.8 g)을 냉동보관하여 사용하였다.

2) HPLC 분석

육미지황탕의 물과 에탄올 추출물 10~30 mg을 물과 에탄올 각각 1 ml에 녹여 0.45 μ m membrane filter로 여과 후 이중 20 μ l를 HPLC 시료로 사용하였다. HPLC는 Shimadzu(Japan)사의 system controller(CBM-20A), pump(LC-20AD), column oven(CTO-20A), UV/VIS detector (SPD-20A)를 사용하였으며, column은 ACE 5 C18(250×4.6 mm, 5 μ m)을 사용하였다. 이동상은 water(A)와 acetonitrile (B)로 gradient elution system을 적용시켜 0%(5분 B), 0~40%(25분 B), 40~70%(10분 B), 70~100%(10분 B)로 설

정하였다. 유속은 1.0 ml/min이었으며 column 온도는 40°C를 유지하였다. UV wavelength는 육미지황탕은 254 nm로 설정하여 분석하였다.

3) 세포 배양 및 세포 생존율 측정

Raw 264.7 cells은 96well plates에 10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 육미지황탕을 각각 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 10 μl 의 WST solution을 첨가한 후 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 30분 반응시킨 후, 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

4) 항산화능 측정

(1) DPPH 소거능 측정

자유라디칼 소거 활성 시험은 안정한 자유라디칼 DPPH를 사용하는 방법으로 에탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 150 μl 와 육미지황탕(25, 50, 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g/ml}$) 100 μl 를 각각 혼합하고, 37°C에서 30분간 반응 시킨 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료액 대신 물을 넣었으며, DPPH 용액대신 에탄올을 넣어 보정값을 얻었다. 자유라디칼 소거율은 아래의 식에 따라 계산하였으며, 그 결과는 자유라디칼을 50% 소거할 수 있는 농도(IC₅₀)로 나타내었다.

$$\text{소거율 (\%)} = \left(\frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

(2) 세포내 ROS 생성 측정

Raw 264.7 세포 내에서 reactive oxygen speies(ROS)를 측정하기 위하여 2',7'-dichlorofluorescin diacetate(DCF-DA)를 이용하였다. 48 well plate에 Raw 264.7

세포를 2×10^5 cells/well이 되게 분주하였다. 24시간 동안 배양 한 후, 여기에 LPS 및 육미지황탕(50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$)를 각각의 well에 첨가한 후, 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후 1,200 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 모은 세포를 차가운 PBS로 2회 세척한 후 DCF-DA 10 μM 이 되도록 첨가하여 15분 동안 빛이 차단된 상온에서 염색하였다. 염색 후 차가운 PBS를 넣어 1,200 rpm에서 5분간 원심분리한 다음 상청액을 제거하고 다시 PBS 400 μl 를 부유시켜 유세포 분석기(Flow cytometer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA)를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 변화를 분석하였다.

5) 항염증 효능 측정

(1) RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction)

RAW 264.7 세포에서 발현되는 mRNA 발현 양상을 조사하기 위해 역전사 중합효소 연쇄반응법(Reverse tracsctiptase-Polymerase chain reaction, RT-PCR)을 실시하였다. RAW 264.7 macrophages를 6×10^5 cells/well 로 6well에 분주하고 24시간 동안 배양 한 후, LPS(1 $\mu\text{g/ml}$)와 육미지황탕(50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$)을 각각 처리 하여, 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양한 후, 수거한 세포를 trizol reagent (Invitrogen)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA로 RT-PCR kit(Bioneer)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA(1 μg)와 각 primer (1 μl)를 섞어 PCR premix kit을 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR 산물은 1-2% agarose gel 상에서 전기영동하여 relative intensity로 측정하였다. 한

편, RT-PCR의 정확성을 평가하기 위하여 internal standard인 GAPDH의 증폭

을 동시에 실시하였다. 사용된 primers는 아래와 같다(Table 2).

Table 2. The Primers for PCR

Primer		Sequences
IL-1β	Sense	5'-GTGTCTTTCCTGGACCTT-3'
	Sense	5'-TCGTTGCTTGGTTCTCCTTG-3'
IL-6	Sense	5'-CCTTCCTACCCCAATTTCCA-3'
	Antisense	5'-CGCACTAGGTTTGCCGAGTA-3'
TNF-α	Sense	5'-AGCACAGAAAGCATGATCCG-3'
	Antisense	5'-GTTTGCTACGACGTGGGCTA-3'
GAPDH	Sense	5'-GGAGATTGTTGCCATCAACG-3'
	Antisense	5'-ATGATGACCCTTTTGCTCC-3'

(2) Total Nitric oxide 생성 억제 효과 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent System을 이용하여 측정하였다. Raw 264.7 cells은 96well plates에 10⁴ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 한 후, 옥미지황탕(50, 100, 200 μg/ml)을 처리하고, LPS 1 μg/ml을 처리하여, 다시 24시간 동안 배양하였다. N1 buffer를 50 μl를 각 well에 처리한 후, 10분간 상온에서 암소 반응 후, N2 buffer 50 μl를 각 well에 처리하고, 10분간 반응시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite standard의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

(3) Cytokine 생성량 측정

Raw 264.7 cells을 6 well plates에 3×10⁵ cells/ml이 되도록 분주하고, 24시간 동안 배양한 후, 옥미지황탕(50, 100, 200 μg/ml)을 처리하고, LPS 1 μg/ml을 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후 세포배양액을 수거하여 배양액에 함유된 IL-1β, IL-6, MCP-1, TNF-α를 custom-made 4-plex cytokine Milliplex panel을 이용하

여 측정하였다. 분석은 Milliplex analyst를 통해 이루어졌다.

6) 비장세포에서 cytokine에 미치는 영향 측정

(1) 세포 증식능 측정

T 림프구의 증식을 관찰하기 위해 EZ-cytox assay를 실행했다. 생쥐 비장세포를 분리하여 10% FBS과 1% penicillin/streptomycin이 함유된 RPMI 1640에 2×10⁵ 세포를 96 well plate에 분주하고 시료(100 μg/ml, 10 μg/ml)를 처리한 후 24시간 동안 37 °C에서 배양했다. 배양된 배지를 버리고 난 다음 신선한 배지를 넣고, EZ-cytox(10 μl/well)를 첨가하여 24 시간동안 다시 배양한 다음 450nm에서 ELISA reader로 분석하였다.

(2) IFN-γ, IL-4, IL-10, IL-12p35 유전자 발현

① RNA 추출

Balb/c 생쥐에서 비장을 적출하여 100mesh로 비장세포를 분리한 후 ACK 용액(8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, in 1 L of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고, 다시 D-PBS로 2회 세척

한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 총 비장세포를 측정하여 2×10^6 세포로 조정하였다. 2.0×10^6 ml을 24 well plate에 분주한 다음 시료를 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하고, 양성대조군 Con-A(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 자극한 뒤 4시간 후에 세포를 얻었다. 배양 종료 후 세포에 Trizol(Ambion) 시약을 1 ml 넣고 튜브에 넣은 후 클로로포름(Sigma Co.)을 100 μl 넣었다. 얼음에 17분 동안 두고 13000 rpm으로 15분 동안 원심분리한다. 층이 분리되면 eptube에 상층액을 옮겨 담고, 동량으로 이소프로판올(Sigma Co.)을 넣어 얼음에 10분 정도 두었다가 13000 rpm으로 15분 동안 원심분리 하였다. 상층액은 버리고 80% 에탄올(Sigma Co.)로 세척하고 13000 rpm으로 10분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 완전히 제거하고 투명해질 때까지 말린 후 DEPC water (Invitrogen)로 cell 양에 따라 20~30 μl 넣어 녹였다.

② 역전사-중합효소 연쇄반응(real-time PCR)

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μg 을 75 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5

분 동안 변성(denaturation)시키고, 여기에 2.5 μl 10 mM dNTPs mix, 1 μl random sequence hexanucleotides(25 pmole/ 25 μl), RNA inhibitor로서 1 μl RNase inhibitor(20 U/ μl), 1 μl 100 mM DTT, 4.5 μl 5 \times RT buffer(250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl_2)를 가한 후, 1 μl 의 M-mlV RT(200 U/ μl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 물로서 최종 부피가 20 μl 가 되도록 하였다. 이 20 μl 의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 방치하여 M-mlV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다.

③ cDNA PCR

Real time quantitative RT-PCR은 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였다. 사용된 primers는 아래와 같다(Table 3).

Table 3. Primer Sequence for Real-time PCR Analysis

Primer		Sequences
GAPDH	VIC	5' - TGCATCCTGCACCACCAACTGCTTAG - 3'
IL-4	Forward	5' - CCTCACAGCAACGAAGAACA - 3'
	Reverse	5' - TGCAGCTCCATGAGAACACT - 3'
IL-10	Forward	5' - AAGCAGCCTTGCAGAAAAGA - 3'
	Reverse	5' - TGGGAAGTGGGTGCAGTTAT - 3'
IL-12p35	Forward	5' - GTCCTTCAGGAATCTGTTC - 3'
	Reverse	5' - GGCTCATGTACTTTCATGAG - 3'
INF- γ	FAM	5' - TGCATCCTGCACCACCAACTGCTTAG - 3'

유전자 발현은 Taqman PCR Master mix(ABI)를 사용하였고, internal standard 를 G3PDH를 사용하였으며, primer의

최종 농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은: pre-denaturation : 50 $^{\circ}\text{C}$, 2분, 94

℃, 10분, 그리고 40 cycles을 95 ℃, 0.15 분, 60 ℃, 1분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. Target group의 RQ(relative quantitative)는 Quantitative PCR로 아래와 같이 측정하였다.

$$y = x(1+e)^n, x = \text{starting quantity}$$

$$y = \text{yield}, n = \text{number of cycles}, e = \text{efficiency}$$

3. 통계처리

실험 결과는 SPSS 11.0의 unpaired student's T-test를 사용하여 통계처리 하였으며 P<0.05, P<0.01 및 P<0.001 수준에서 유의성을 검정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. HPLC 분석

1) 육미지황탕 HPLC pattern

육미지황탕 물 추출물을 HPLC로 pattern 분석한 결과 254 nm에서 retention time이 14.2, 15.2분, 19.2분, 21.3분대에 peak를 확인할 수 있었다(Fig. 1).

2) 육미지황탕 에탄올 추출물 HPLC pattern

육미지황탕 에탄올 추출물을 HPLC로 pattern 분석한 결과 254 nm에서 retention time이 15.2분, 19.2분, 21.2분, 24.4분, 37.4분대에 peak를 확인할 수 있었다(Fig. 2).

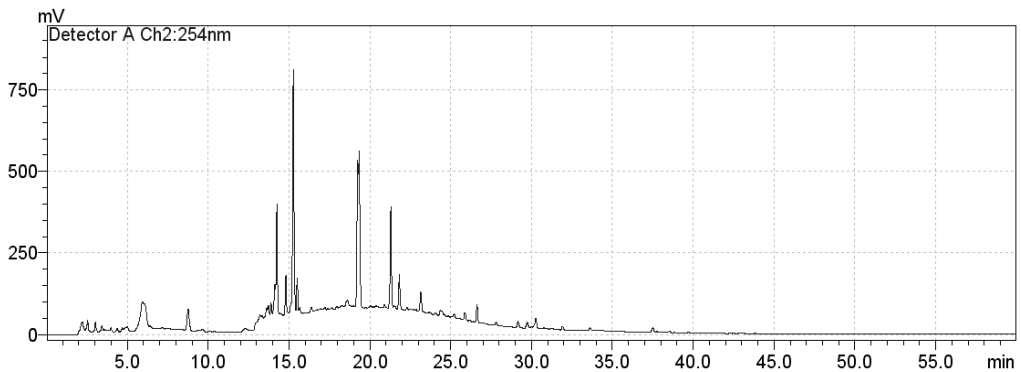


Fig. 1. HPLC Chromatogram of Water Extract of Yukmijihwangtang.

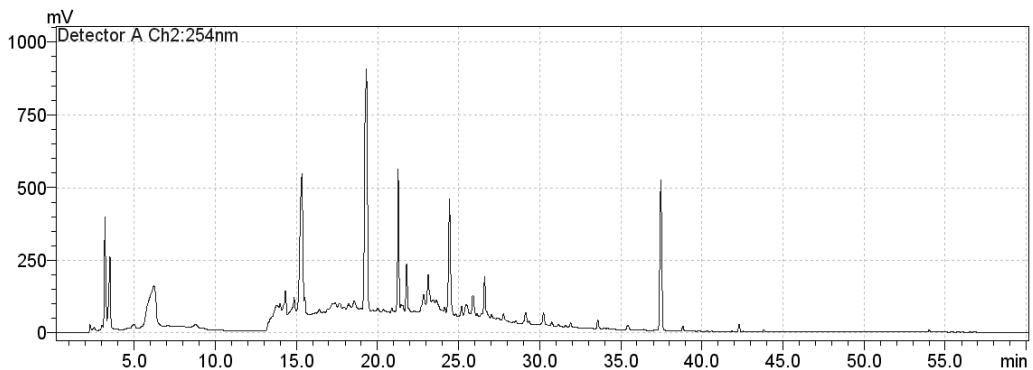
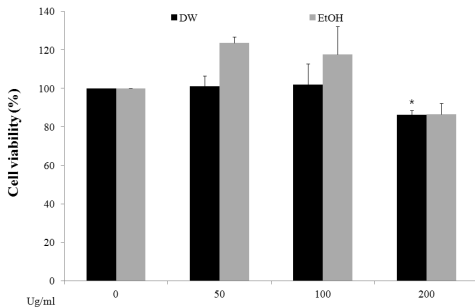


Fig. 2. HPLC Chromatogram of 80% Ethanol Extract of Yukmijihwangtang.

2. 세포독성

물 추출물과 에탄올 추출물 모두 50 $\mu\text{g/ml}$ 과 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 세포독성이 나타나지 않았고, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 86% 세포 생존율을 나타내었다(Fig. 3).



(DW : 물 추출물, EtOH : 에탄올 추출물)
 Fig. 3. Effects of Yukmijihwangtang on the Cell Viability of RAW 264.7 Cells
 Cells were treated with 0~200 $\mu\text{g/ml}$ of Yukmijihwangtang for 24 hrs. Cell viability was determined using the WST assay. The results are expressed as mean \pm SEM from three independent experiments. Statistical significance is based on the difference when compared with 0 $\mu\text{g/ml}$ (* $P<0.05$).

3. 항산화능

1) DPPH 소거능 효과

물 추출물의 DPPH 소거 효율은 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 10.8%, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 19.2%, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 36%, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 63.5%, 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 87.6%, 800 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 94.7%로 농도 의존적으로 증가하였다. 에탄올 추출물의 DPPH 소거 효율은 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 14.7%, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 22%, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 43.2%, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 61.6%, 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 77.4%, 800 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 86.7%로 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 4).

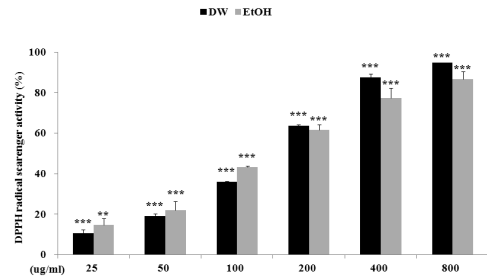


Fig. 4. DPPH Free Radical Scavenging Activity of Yukmijihwangtang at Various Concentration.

Extracts were incubated with DPPH solution at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 30 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 517 nm (** $P<0.01$, *** $P<0.001$).

2) ROS 생성 효과

물 추출물은 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 80.6 \pm 12.6, 79.6 \pm 16.9, 66.4 \pm 22.3 (%)로 LPS 처리군에 비해 모두 감소하였다. 에탄올 추출물은 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 83.2 \pm 16, 60.7 \pm 16.1, 53.8 \pm 14.7(%)로 LPS 처리군에 비해 모두 감소하였다(Fig. 5).

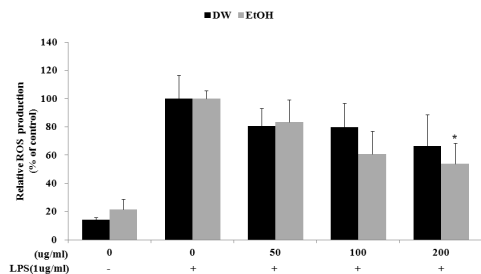


Fig. 5. Inhibitor Effects of Yukmijihwangtang on the ROS Production in Raw 264.7 Cells

The Raw 264.7 cells were stimulated with LPS and treated with medium, Yukmijihwangtang (50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hours. The ROS production was analysed following incubation with DCFH-DA by flow cytometry. The results were presented by the mean \pm S.E (* $P<0.05$).

4. 항염증 효능

1) mRNA 발현 측정

물 추출물은 LPS 처리된 대조군이 정상군보다 cytokine의 mRNA가 증가되었고, IL-1 β 는 모든 농도에서, IL-6에서는 100과 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 mRNA expression이 감소하였다. 에탄올 추출물에서는 전혀 효과가 없었다(Fig. 6).

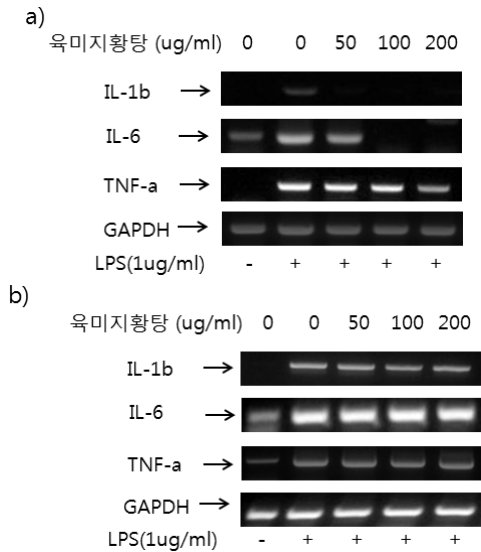


Fig. 6. Effects of Yukmijihwangtang on LPS-induced mRNA Expression
Cells treated with 50, 100 or 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of aqueous extract(a) or ethanol extract(b) from Yukmijihwangtang in the presence of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS or with LPS alone for 24 hrs.

2) Total Nitric oxide 생성 억제 효과

물 추출물은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 9%, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 21%, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 49% NO 생성 저해 효과를 나타내었다. 에탄올 추출물은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 5%, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 7%, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 11%의 NO 생성 저해 효과를 나타내었다(Fig. 7).

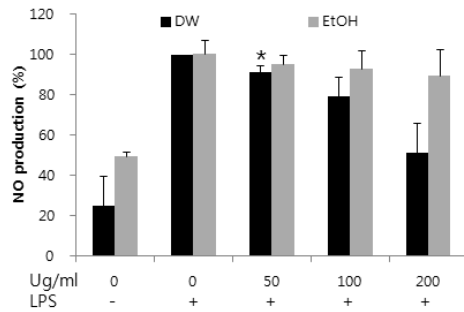


Fig. 7. Inhibition of Lipopolysaccharide (LPS)-induced Nitrite(NO) production by Yukmijihwangtang in RAW 264.7 Cells
Cells were treated with LPS(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and 0 ~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Yukmijihwangtang for 24 hrs. The results are expressed as mean \pm SEM from three independent experiments. Statistical significance is based on the difference when compared with 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (* P<0.05).

3) RAW 264.7 세포에서의 IL-1 β 생성량 분비에 미치는 영향

대조군을 100%로 보았을 때, 물 추출물은 정상군에 비해 5배 이상, 에탄올 추출물은 3배 이상 증가하였으나, 물 추출물이나 에탄올 추출물 처리에 의한 IL-1 β 생성억제는 관찰되지 않았다(Fig. 8).

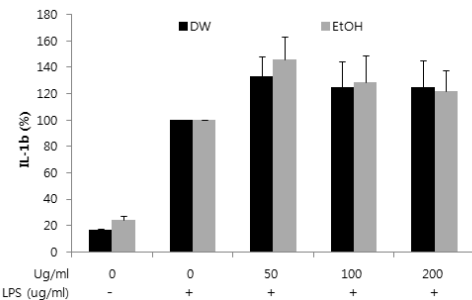


Fig. 8. Effects of Lipopolysaccharide(LPS)-induced IL-1 β production in RAW 264.7 Cells by Yukmijihwangtang
Cells treated with 50, 100 or 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Yukmijihwangtang in the presence of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS or with LPS alone for 24 hrs.

4) RAW 264.7 세포에서의 IL-6 생성량 분비에 미치는 영향

대조군의 IL-6 생성량을 100%로 보았을 때, 정상군에 비해 100배 가까이 증가하였으나, 물 추출물이나 에탄올 추출물 처리에 의한 IL-6 생성억제는 관찰되지 않았다(Fig. 9).

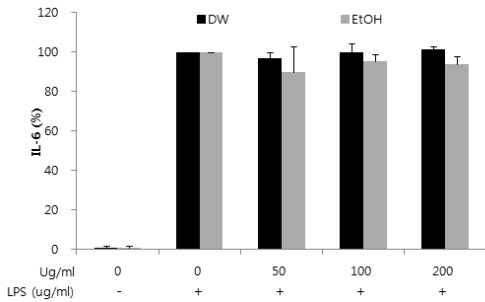


Fig. 9. Effects of Lipopolysaccharide (LPS)-induced IL-6 Production in RAW 264.7 Cells by Yukmijihwangtang Cells treated with 50, 100 or 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Yukmijihwangtang in the presence of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS or with LPS alone for 24 hrs.

5) RAW 264.7 세포에서의 TNF- α 생성량 분비에 미치는 영향

물 추출물은 대조군의 TNF- α 생성량을 100%로 보았을 때, 정상군에 비해 30배 이상 증가하였고, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 24%, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 17%, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 13% TNF- α 생성 억제 효과가 있었다. 에탄올 추출물은 정상군에 비해 대조군이 10배 가까이 증가하였으나, 에탄올 추출물 처리에 의한 감소는 거의 나타나지 않았다(Fig. 10).

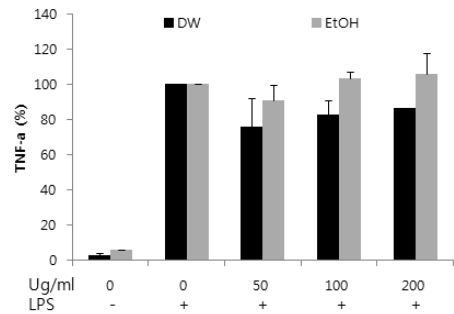


Fig. 10. Effects of Lipopolysaccharide (LPS)-induced TNF- α Production in RAW 264.7 Cells by Yukmijihwangtang Cells treated with 50, 100 or 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Yukmijihwangtang in the presence of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS or with LPS alone for 24 hrs.

6) RAW 264.7 세포에서의 MCP-1 생성량 분비에 미치는 영향

대조군의 MCP-1 생성량을 100%로 보았을 때, 정상군에 비해 100배 가까이 증가하였으나, 물 추출물이나 에탄올 추출물 처리에 의한 MCP-1 생성억제는 거의 관찰되지 않았다(Fig. 11).

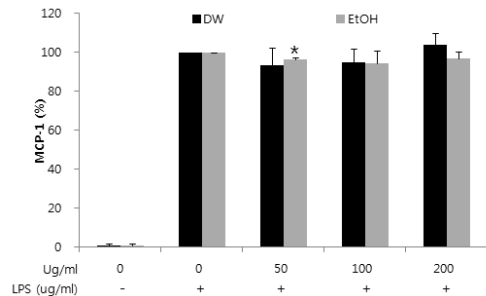


Fig. 11. Effects of Lipopolysaccharide (LPS)-induced MCP-1 Production in RAW 264.7 Cells by Yukmijihwangtang Cells treated with 50, 100 or 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Yukmijihwangtang in the presence of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS or with LPS alone for 24 hrs(* P<0.05).

5. 비장세포에 미치는 영향

1) 세포 증식율에 미치는 영향

대조군 증식율을 100%로 보았을 때, 육미지황탕에서 세포 증식율이 증가하였

다. 또한 에탄올 추출물에서 증식율이 높았다(Fig. 12).

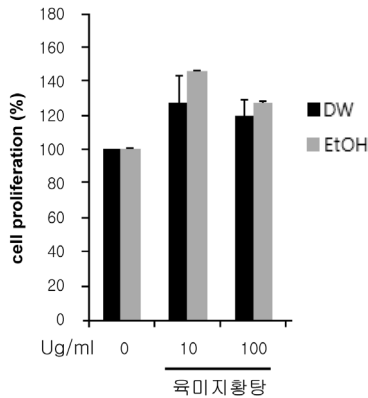


Fig. 12. Effects of Yukmijihwangtang on the Proliferation of Splenocytes
Cells were treated with 0~100 µg/ml of Yukmijihwangtang for 24 hrs. Cell proliferation was evaluated by EZ-Cytox assay. The results are expressed as mean±SEM from two independent experiments. Statistical significance is based on the difference when compared with 0 µg/ml.

2) 유전자 발현에 미치는 영향

(1) IFN- γ 에 미치는 영향

대조군을 1로 보았을 때, 육미지황은 물과 에탄올 추출물에서 모두 감소하였다(Fig. 13).

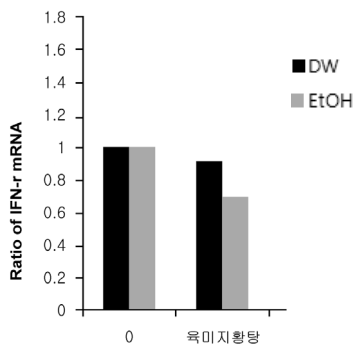


Fig. 13. Effects of Yukmijihwangtang on Con-A-induced IFN- γ Production
Cells were treated with 0~100 µg/ml of Yukmijihwangtang for 4 hrs. mRNA expression in spleen was determined by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction.

(2) IL-4에 미치는 영향

정상군을 1로 보았을 때, 대조군에서 10.342로 10배 이상 증가가 되었고, 약제를 처리하였을 때 정상군에 가깝게 감소되었다(Fig. 14).

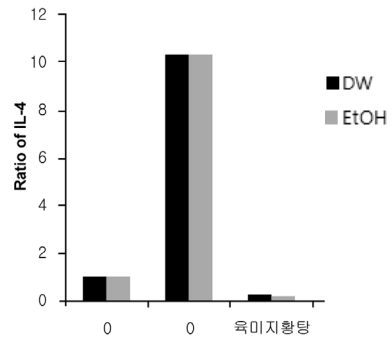


Fig. 14. Effects of Yukmijihwangtang on Con-A-induced IL-4 Production
Cells were treated with 0~100 µg/ml of Yukmijihwangtang for 4 hrs. mRNA expression in spleen was determined by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction.

(3) IL-10에 미치는 영향

정상군을 1로 보았을 때, 대조군은 1.556으로 증가 되었고, 육미지황 물 추출물 처리 시 0.921 감소되었다(Fig. 15).

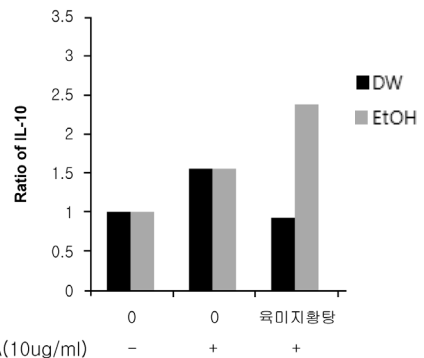


Fig. 15. Effects of Yukmijihwangtang on Con-A-induced IL-10 Production
Cells were treated with 0~100 µg/ml of Yukmijihwangtang for 4 hrs. mRNA expression in spleen was determined by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction.

(4) IL-12p35에 미치는 영향

정상군을 1로 보았을 때, 대조군에서 364로 증가되었고, 약재를 처리하였을 때 모두 정상군에 가깝게 감소되었다(Fig. 16).

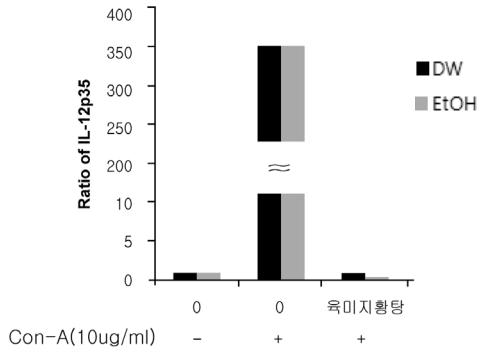


Fig. 16. Effects of Yukmijihwangtang on Con-A-induced IL-12p35 Production.

Cells were treated with 0~100 μ g/ml of Yukmijihwangtang for 4 hrs. mRNA expression in spleen was determined by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction.

IV. 고찰

한의학에서는 《素問》〈上古天真論〉³²⁾에서 “眞氣從之精神內守 病安從來”, 〈刺法論〉³²⁾에서 “五疫之氣 ……正氣存內 邪不可干”, 〈評熱病論〉³²⁾에서 “邪之所湊 其氣必虛”, 《靈樞》〈百病始生篇〉³³⁾에서 “風雨寒熱 不得虛邪不能獨傷人”이라 하여, 질병의 발생과 진행의 원리를 인체의 正氣와 발병인자인 邪氣의 상호투쟁 및 消長進退에 의한 것으로 보았는데, 이러한 正邪의 개념은 면역학 이론과 유사한 개념으로 볼 수 있다³⁴⁾. 正氣를 외부의 邪氣에 대항하는 면역기능과 관련된 개념으로 보고, 正氣부족을 면역기능저하와 관련지어 그 중요성을 설명하였는데, 補氣血하고 인체의 陰陽과 臟腑의 기능실조를 조정함으로써 扶正하는 것이 질병

에 대한 저항력을 증강시켜, 질병발생과 치료에 중요한 요소임을 강조하였다^{35,36)}.

육미지황탕은 錢乙의 《小兒藥證直結》²⁾에 최초로 수록된 처방으로 그 효능은 肝腎을 滋補하는 것으로 肝腎陰虛로 인한 여러 증상에 널리 활용된다³⁷⁾. 한방 부인과 영역에서는 육미지황탕에 부인과 적 질병특성을 고려한 약물들을 가미하여, 月經愆期, 月經量異常, 無月經, 五色帶下, 임신 중의 膀胱病, 妊娠血症, 妊娠眩暈, 임신 중의 消渴證, 임신 중 五官病, 產後腰痛 등의 증상에 사용되어 왔다³⁸⁾.

육미지황탕의 실험적 연구로는 신장 기능 조절 및 신장 조직 보호효과에 관한 연구⁴⁻⁶⁾, 인지기능 강화 및 뇌 조직 보호효과^{7,8)}, 성장 및 골 형성에 미치는 영향^{9,10)}, 항 당뇨 효능¹¹⁻¹⁴⁾, 면역기능 조절 효능^{15,16)}, 항산화 효능^{17,18)}, 근육운동과 피로 회복에 미치는 영향¹⁹⁾, 간 기능^{17,20)}, 생식능력 증강²¹⁾, 항암^{22,23)}, 혈압강하²⁴⁾ 등에 대해 보고된 바 있다. 또한 최근 근에 이²⁵⁾는 간질성 방광염에 육미지황탕가미방이 유효한 효과가 있음을 실험적으로 입증하였다. 이상의 연구 보고들은 육미지황탕이 임상에서 부인과 질환 중 염증 질환에 활용될 수 있음을 시사한다.

염증은 조직이 손상되거나 세균의 감염으로 인하여 발생하는 것으로, 생체 조직이 생물학적, 물리적, 화학적, 면역학적인 원인에 의하여 손상을 받았을 때, 이 손상을 국소화시키고 손상된 부위를 정상상태로 되돌리려는 면역과정의 일부분이다. 손상부위의 혈관, 신경, 세포, 체액 등에서 나타나는 염증반응은 살아있는 조직, 즉 혈관이 있는 조직에서만 일어나는 특징이 있다. 즉 염증은

미세혈관계를 통하여 나타나는 생체의 방어기전이다²⁶⁾.

한의학에서는 염증과 관련한 병증이 다양하게 언급되고 있는데, 특히 부인과 질환 중 痛經, 經行腹痛, 帶下, 熱入血室, 癥瘕, 不妊, 產後腹痛, 產後發熱 등의 병증은 급·만성 골반염, 질염, 자궁 내 유착성 염증, 산욕기 감염 등과 밀접한 관련이 있다^{28,39)}. 치료에 있어서 급성 염증성 증후는 清熱解毒, 祛風利濕, 涼血活血法을, 만성 염증성 증후는 補氣補血하는 扶正法을 기본으로 하여 清熱解毒, 祛風利濕, 活血化癥法 등이 활용되고 있다²⁷⁾.

육미지황탕의 구성 및 약물의 효능을 살펴보면 熟地黃은 滋陰補血, 益精填髓하고, 山茱萸는 補益肝腎, 澀精固脫하고, 山藥은 健脾, 補肺, 固腎, 益精하고, 澤瀉는 利水滲濕, 腎中瀉火하며, 熟地黃의 滋膩를 방지하고, 牡丹皮는 清熱涼肝, 瀉陰中之伏火하고, 茯苓은 山藥을 助하여 補脾하고, 澤瀉를 助하여 利水한다³⁷⁾. 이로써, 보음제의 대표적인 처방인 육미지황탕이 항산화 및 면역조절 작용을 통한 항염증 효과가 있을 것으로 사료되어 본 실험에 활용하였다.

한약처방은 주로 탕제의 형태로 경구 투여 된다. 경구투여 제제는 소화관을 통해서 흡수되는데, 에탄올과 같은 약물은 위에서 흡수되나 대부분의 약물은 소장 상의 장점막을 통하여 흡수된다. 소장 상의 장점막은 지질 이중층을 형성하고 있기 때문에 분자량이 작고 친유성인 물질이 흡수가 잘되는데 이러한 물질의 이동은 단순 확산에 의해 일어나며, 능동적 수송에 의해서도 이동이 일어날 수 있다. 그러므로 한약에 함유되어 있는 성분 중 생리활성 성분이라고 알려져 있는 많은

성분이 양약과 달리 장내미생물에 의해서 일차적으로 대사가 일어난 후 흡수가 된다고 보고되어 있다²⁹⁾. 따라서 추출방식에 따라 생리활성물질의 흡수가 영향을 받을 수 있을 것으로 보고, 본 실험에서는 향후 제형변화를 통한 임상 활용 제고를 위하여 육미지황탕의 물과 에탄올 추출물간에 생리활성을 비교하였다.

육미지황탕의 물과 에탄올 추출물 HPLC 패턴을 비교하였을 때, 물 추출물의 경우 에탄올 추출물보다 극성 성분이 많이 추출되었고, 에탄올 추출물은 비극성 성분이 많이 추출되어 40분대 이후에 물 추출물에서 나타나지 않았던 많은 peak를 확인 할 수 있었다(Fig. 1, 2).

안정성 검사의 일환으로 RAW 264.7 세포에 대한 세포독성 실험결과, 실험군에서 20% 이하의 세포독성을 나타내었다(Fig. 3).

인체에서 산소와 영양물질이 반응하여 에너지를 만드는 대사과정 중에 나오는 유해물질을 활성산소라 하는데 체내산화에 수반되는 활성 산소종(reactive oxygen species: ROS)으로는 oxygen(O_2), superoxide (O_2^-), hydroxy radical($\cdot OH$), hydrogen peroxide(H_2O_2) 등이 있으며, 이러한 활성 산소종들은 염증 반응에 관여한다⁴⁰⁾. 인체에 흡입된 산소의 일부가 superoxide anion ($\cdot O_2^-$), hydroxy radical($\cdot OH$), hydrogen peroxide(H_2O_2), singlet oxygen(O_2) 등과 같은 활성산소인 free radical로 변환되어 지질의 과산화반응을 진행시켜 세포막의 파괴, 세포의 노화, 세포의 괴사, 그리고 DNA에 대한 세포손상을 유발시켜 생체의 기능을 약화시킨다. 인체 내에는 활성산소의 독성으로부터 조직을 보호하고 항상성을 유지하려는 방어계로는 selenium,

Vitamine C, E 등의 비효소계와 SOD와 catalase, peroxidase 등과 같은 효소계가 존재한다⁴¹⁾.

DPPH는 안정한 free radical로서 cysteine, glutathione과 같은 항산화 아미노산과 aromatic amine 등에 의해 환원되어 탈색되고, 비교적 간단하여 항산화능 측정에 많이 이용되고 있다⁴²⁾. DPPH 소거능에서는 육미지황탕 물 추출물, 에탄올 추출물 모두 농도 의존적으로 증가하였다 (Fig. 4).

RAW 264.7 세포에 대한 ROS 생성 억제능에서는 육미지황탕의 물 추출물이 에탄올 추출물 보다 상대적으로 억제능이 높았다 (Fig. 5).

염증의 여러 가지 현상들 사이에 개재하여 염증반응을 증대하는 물질인 화학적 매개체는 혈장, 세포 및 손상 받은 조직으로부터 유래되는데 활성산소, 산화질소(NO), 프로스타글란딘(PG), 염증을 유발시키는 여러 cytokines 등이 있다²⁶⁾.

면역과 염증에 관련된 여러 cytokine 중 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 cytokine으로, IL-6는 B-cell과 T-cell의 증식과 분화를 촉진시키며 면역계와 조혈계에 다양한 기능을 나타내는데, 면역계에서 면역반응, 급성기 반응과 hemotopoiesis를 조절하는 역할과 함께 host defense mechanism에서 중요한 역할을 담당한다^{43,44)}. 또한 IL-6은 자궁내막의 상피세포와 기질세포 모두에서 발현되며, 생리주기에 따라 발현되는 빈도와 강도에서 차이가 있는 것과 관련하여, 세포간의 전달매개체로 작용하여 자궁내막의 정상적인 형태유지에 관여할 것이라는 보고도 있었다⁴⁵⁾.

TNF- α 는 대식세포와 비만세포 등에서 분비되어 종양세포에서 세포독작용을 하며 염증세포에서 IL-1과 유사한 염증 유발 작용과 세포의 증식과 분화를 조절하고 만성염증이나 감염에서도 역할을 하며 중성구를 자극하여 탐식작용과 탈과립 등을 증가시켜 염증반응에서 중요한 역할을 한다. 특히 TNF- α 는 염증이 발생된 부위에는 높은 농도로 존재하며, 최근에는 TNF- α 를 차단하는 약물들이 염증의 치료제로 연구되고 있다^{46,47)}.

Nitric oxide(이하 NO)는 혈관에서 강력한 혈관확장 작용을 하며 혈소판 응집을 저해하고 중성구나 혈소판이 혈관내피세포에 부착하는 것을 막는 역할을 하지만⁴⁸⁾, 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다^{49,50)}.

RAW 264.7 세포에 대한 NO 생성 억제능에서는 모든 실험군에서 농도 의존적으로 증가하였으며, 에탄올 추출물보다 물 추출물에서 NO 생성 억제능이 상대적으로 높았다 (Fig. 6).

RAW 264.7 세포에 대한 IL-1 β 의 분비량 억제능에서는 육미지황탕 물 추출물과 에탄올 추출물 간의 상대적인 차이는 발견하지 못했다 (Fig. 7).

RAW 264.7 세포에 대한 IL-6의 분비량 억제능에서는 육미지황탕 물과 에탄올 추출물 간의 상대적인 차이는 발견하지 못했다 (Fig. 8).

RAW 264.7 세포에 대한 TNF- α 의 분비량 억제능에서는 육미지황탕 물 추출물이 에탄올 추출물보다 상대적으로 효과가 높았다 (Fig. 9).

MCP1은 chemokine의 일종으로 백혈구에서 처음 분리되었고 혈관내피세포(endothelial cells), 평활근 세포(smooth muscle cells), 단핵구, 대식세포 등에서 interleukin-1, interleukin-4, tumor necrosis factor- α 등의 염증성 사이토카인(inflammatory cytokines)에 반응하여 발현이 증가된다^{51,52}. 혈관내벽에 감염으로 인한 염증이 발생하면 사이토카인들이 분비되고 그에 반응하여 MCP1의 발현이 증가하면 그 수용체인 chemokine receptor 2(CCR2)를 발현하는 세포들이 염증부위로 이동하여 활성화되고 혈관벽으로 침투하게 된다. 사람 평활근 세포에 IL-1 β 를 처리하여 MCP1의 발현을 확인해 본 결과, MCP1의 발현이 증가되고 이러한 증가가 전사인자인 NF- κ B의 활성화를 통한 MCP1의 mRNA 발현증가로 인한 것임을 알 수 있었다⁵³. 본 실험에서 RAW 264.7 세포에 대한 MCP-1의 분비량 억제능에서는 모든 실험군에서 유의성있는 결과가 나타나지 않았다(Fig. 10).

비장세포 증식율은 모든 실험군에서 대조군에 비하여 증가하였으며, 육미지황탕 에탄올 추출물이 물 추출물보다 상대적으로 증가하였다(Fig. 11).

보조 T 세포는 다른 임파구의 활성화를 촉진 하며 각종 세포활성물질을 생성하는데, 생성하는 세포활성 물질의 종류의 차이에 따라 type 1 T 세포와 type 2 T 세포의 집단으로 분류되며, IFN- γ 는 Th1 세포가 생성하는 대표적인 cytokine으로 알려져 있다⁵⁴.

Con-A로 자극한 비장세포 내 IFN- γ 유전자 발현에서는 육미지황탕 에탄올 추출물이 물 추출물에 비하여 상대적으로 발현을 감소시켰다(Fig. 12).

IL-4는 IgE 항체의 생성 및 미 감각 CD4 Th cell을 Th2 cell로 발생시키는 주요자극제이다. T 림프구에서 유래된 다른 종류의 cytokine들은 각각 특정 Ig E 동형으로서 전환을 유도한다. 이중 IL-4는 Ig E에 대한 중요한 전환인자이다. 즉, IL-4는 B cell을 plasma cell로의 발달을 이끌어 Ig E, Ig G 등의 생성을 유발시킨다. 이렇게 생성된 Ig E는 mast cell에 작용하여 granule 방출을 유도함으로써 과민반응을 일으킨다⁵⁵. IL-10은 T cell, B cells, monocytes와 macrophages에서 생성되는 anti-inflammatory cytokine이고, 면역과 염증반응을 억제시키는 작용을 한다. IL-12는 heterodimeric cytokine으로 p35와 p40 subunit으로 이루어져 있다. IL-12는 proinflammatory cytokine으로 macrophages, neutrophils와 다른 antigen-presenting cell에 의해 생성된다. IL-12는 LPS에 의해 유도된 IFN- γ 생성에 작용한다. 이처럼, IL-10과 IL-12는 T helper 1 cells과 Th2 cell 사이에서 균형을 조절한다⁵⁶.

Con A로 자극한 비장세포 내 IL-10 유전자 발현에서는 육미지황탕 물 추출물만이 대조군에 비하여 40% 이상 감소하였다(Fig. 13). Con A로 자극한 비장세포 내 IL-4 유전자 발현에서는 모든 실험군에서 대조군에 비하여 90% 이상 큰 폭으로 감소하였으며(Fig. 14), IL-12p35 유전자 발현 역시 모든 실험군에서 대조군에 비하여 90% 이상 큰 폭으로 감소하였으나, 두 유전자 발현 모두 물과 에탄올 추출물간의 상대적인 차이는 발견하지 못했다(Fig. 15).

이상으로 보아 육미지황탕의 항산화 및 면역조절 작용을 통한 항염증 효과에

있어 전반적으로 유의성 있는 결과가 나타났다. 임상에서도 만성 간염을 비롯한 염증성 질환에서 육미지황탕가미방을 활용한다는 점에서 본 연구 결과는 기초적 자료로 활용될 수 있을 것으로 보인다.

그러나 향후 제형변화를 통한 임상 활용 제고를 위하여 실시한 추출 방법에 대한 실험에서 물과 에탄올 추출물간의 상대적인 차이를 발견하고자 하였으나 절대적인 우위를 발견할 수 없었으며, 실험 대상에 따라 다양한 결과가 도출되어 관련 결과에 따른 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 보인다.

V. 결 론

기존 한방 처방의 추출 방식과 제형변화를 통하여 보다 효율성 있는 치료 방법을 찾기 위한 기초 작업으로 육미지황탕을 물과 에탄올 80%로 추출하여 이에 대한 항산화 효능과 면역조절 작용을 통한 항염증 효능을 상대적으로 평가하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 육미지황탕의 물과 에탄올 추출물 HPLC 패턴을 비교하였을 때, 물 추출물의 경우 에탄올 추출물보다 극성 성분이 많이 추출되었고, 에탄올 추출물은 비극성 성분이 많이 추출되어 40분대 이후에 물 추출물에서 나타나지 않았던 많은 peak를 확인 할 수 있었다.
2. 육미지황탕 물 추출물의 수득률은 9.44%, 에탄올 추출물의 수득률은 15.8%로 나타났다.
3. RAW 264.7 세포에 대한 세포독성에서는 모든 실험군에서 20% 이하의 세포독성을 나타내었다.
4. DPPH 소거능에서는 육미지황탕 물 추출물, 에탄올 추출물 모두 농도 의존적으로 증가하였다.
5. RAW 264.7 세포에 대한 ROS 생성 억제능에서는 육미지황탕은 물 추출물이 에탄올 추출물 보다 상대적으로 억제능이 높았다.
6. RAW 264.7 세포에 대한 NO 생성 억제능에서는 모든 실험군에서 농도 의존적으로 증가하였으며, 에탄올 추출물보다 물 추출물에서 NO 생성 억제능이 상대적으로 높았다.
7. RAW 264.7 세포에 대한 TNF- α 의 분비량 억제능에서는 육미지황탕 물 추출물이 에탄올 추출물보다 상대적으로 효과가 높았다.
8. 비장세포 증식율은 모든 실험군에서 대조군에 비하여 증가하였으며, 육미지황탕 에탄올 추출물이 물 추출물보다 상대적으로 증가하였다.
9. Con A로 자극한 비장세포 내 IFN- γ 유전자 발현에서는 육미지황탕 에탄올 추출물이 물 추출물에 비하여 상대적으로 발현을 감소시켰다.
10. Con A로 자극한 비장세포 내 IL-10 유전자 발현에서는 육미지황탕 물 추출물만이 대조군에 비하여 40% 이상 감소하였다.
11. Con A로 자극한 비장세포 내 IL-4 유전자 발현에서는 모든 실험군에서 대조군에 비하여 90% 이상 큰 폭으로 감소하였으며, IL-12p35 유전자 발현 역시 모든 실험군에서 대조군에 비하여 90% 이상 큰 폭으로 감소하였다.

- 투 고 일 : 2012년 04월 25일
- 심 사 일 : 2012년 05월 11일
- 게재확정일 : 2012년 05월 15일

참고문헌

1. 陳紀藩. 金匱要略. 北京:人民衛生出版社. 2000:203.
2. 錢乙. 小兒藥證直結. 서울:의성당. 2002:32.
3. 이준경 등. EBM 구축을 위한 육미지황탕 문헌 분석 연구. 동의생리병리학회지. 2009;23(1):15-26.
4. 정은경 등. 육미지황탕 전탕액투여가 백서의 현장기능에 미치는 영향. 한의생리학회지. 1996;11:73-9.
5. 정은경 등. 육미지황탕 전탕액투여가 백서의 혈장Renin활성도, 혈장Aldosterone 및 Atrial Natriuretic Peptide 농도에 미치는 영향. 대한한의학학회지. 1997;18:449-55.
6. 최우정 등. 左歸飲과 육미지황탕 전탕액투여가 家兔신기능 및 혈장 Aldosterone 농도에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2002;16:1263-9.
7. Rho SW et al. Effects of Yukmijihwnang-tang derivatives(YMJD), a memory enhancing herbal extract, on the gene-expression profile in the rat hippocampus. Biol Pharm Bull. 2005; 28:87-93.
8. Wei XL. Studies on learning and memory function-related genes in the hippocampus and the relationship between the cognitive enhancing effect of liuweidihuang decoction(LW) and gene expression. Sheng Li Ke Xue Jin Zhan. 2002:31:227-30.
9. Yang S et al. Effects of LiuweiDihuang decoction on ion channels and synaptic transmission in cultured hippocampal neuron of rat. Journal of Ethnopharmacology. 2006;106:166-72.
10. 김민정, 홍권의. 加味歸茸湯 및 육미지황탕 약침이 생쥐의 성장에 미치는 영향. 대한약침학회지. 2007;9(3):105-16.
11. 이상근, 김완희. 四物湯과 육미지황탕이 난소적출로 유도된 백서의 골다공증에 미치는 영향. 동의생리학회지. 1997;12(1):1-18.
12. 김우현 등. 육미지황탕 投與가 Rat의 成長 및 血清總Cholesterol含量에 미치는 影響. 경산한의학대논문집. 1978;1:111-5.
13. 서은경 등. 비만 실험동물 쥐에서의 육미지황탕의 항 당뇨효과. Korea Journal of Life Science. 2000;10:388-96.
14. Wu YC et al. Increase of insulin sensitivity in diabetic rats received Die-Huang-Wan, a herbal mixture used in Chinese traditional medicine. Acta Pharmacol Sin. 2002;23:1181-7.
15. 한일수, 김철중. 八味地黃湯 및 加味地黃湯이 생쥐의 복강 대식세포활성에 미치는 영향. 대전대한의과대학원 논문집. 1997;6:331-47.
16. 전진오, 정현우. 육미지황탕이 면역세포에 미치는 실험적 효과. 대한한방내과학회지. 2005;21:243-50.
17. 박성민 등. 補中益氣湯과 육미지황탕이 노화축진생쥐(SAM)의 간장 내 항산화 작용에 미치는 영향. 대한분초학회지. 2003;18:175-91.

18. 서영은 등. 육미지황탕구성약물이 PC12 세포의 산화억제에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2003;17:203-8.
19. 김길현, 김완희. 운동부하후의 피로 회복에 미치는 補中益氣湯 및 六味地黃湯의 효과. 동의생리학회지. 1987;1:1-13.
20. 한용주 등. 다용 한약처방 투여가 흰 쥐의 간 기능에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2006;27:78-90.
21. Oh MS et al. Yukmijhwangtang protects against cyclophosphamide-induced reproductive toxicity. Reproductive Toxicology. 2007;24:365-70.
22. Zhao L et al. Inhibitory effect of liuweidihuang decoction on induced mutation and spontaneous tumor. Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 1990;10:433-5.
23. Jiang TL et al. Preventing effect of "Liuweidihuangdecoction" on esophageal carcinoma. Gan To Kagaku Ryoho. 1989;16:1511-8.
24. 김우식, 김동희. 육미지황탕煎湯掖이 家免血壓 및 白鼠肝TBA에 미치는 영향에 대한 연구. 대전대한의과대학 논문집. 1979;2:142-52.
25. 이정원. 간질성방광염에 대한 육미지황탕가미방의 실험적 연구. 동국대학교 대학원 박사학위논문. 2010.
26. 대한병리학회. 병리학II. 서울:고문사. 1995:71-104, 112-20, 540-2.
27. 潘鴻鵠. 중의학치료염증학. 군사의학 과학기술출판사. 2000:3-15, 329, 650, 683.
28. 한의부인과학 편찬위원회. 한의부인과학(상). 서울:정담출판사. 2002:67, 164, 271-80.
29. 한방약리학 교재편찬위원회. 제 3판 한방 약리학. 서울:신일북스. 2010:9.
30. 김정임 등. 천마 분말, 에탄올 및 열수추출물이 고지방식을 급여한 흰 쥐의 혈청지질과 체지방에 미치는 영향. 한국식품과학회지. 2003;35(4):720-5.
31. 이상민 등 : 추출방식에 따른 防風通聖散이 지방세포 대사에 미치는 영향. 대한약침학회지. 2008;11(1):163-75.
32. 홍원식. 精校黃帝內經素問. 서울:동양 의학연구원출판사. 1985:38, 55, 78, 86-8, 104, 107, 110, 116-24, 213, 233, 247, 256, 273.
33. 홍원식. 精校黃帝內經靈樞. 서울:동양 의학연구원출판사. 1981:317, 347.
34. 채우석. 면역질환의 한방개념과 치료에 관한 문헌적 고찰. 대한한의학회지. 1990;11(2):54-8.
35. 황의옥 등. 면역학에 관한 문헌적 고찰. 대한한의학회지. 1989;10(1):193-226.
36. 조종관. 면역에 관한 동양의학적 고찰. 동양의학. 1986;12(1):19-23.
37. 한의과대학 방제학교실. 방제학. 서울:영림사. 2003:298.
38. 김시영, 이인선. 한방부인과영역에서 六味地黃湯과 附益地黃丸의 효능에 관한 문헌적 고찰. 대한한방부인과학회지. 1997;10(1):133-50.
39. 조문경. 골반염치료의 최신지견. 대한산부회지. 2010;53(11):961-6.
40. McCord JM. Free radicals and inflammation. protection of synorial fluid by superoxide dismutase. Science. 1974;185:529-31.
41. Harman D. Freeradicaltheory of aging:

- Role of freeradicals in the organization and evolution of life, aging and disease process. New York:Free Radicals, Aging and Degenerative Disease. Inc. 1986 :3-49.
42. Cheng ZJ et al.. Antioxidant properties of butein isolated from *Dalbergia odorifera*. *Biochim Biophys Acta*. 1987;1392:291-9.
 43. Aeberli D et al. Inhibition of the TNF-pathway use of infliximab and etanercept as remission-inducing agents in case of therapy-resistant chronic inflammatory disorders. *Swiss Med.Wkly*. 2002;132 :414-22.
 44. Feldman M et al. Anti-TNF- α therapy is useful in rheumatoid arthritis and Crohn's disease: analysis of the mechanism of action predicts utility in other disease. *Transplant Proc*. 1998;30:4126-7.
 45. Tabibzadeh S. Human endometrium an active site of cytokines production and action. 1991;12:272.
 46. Brian T et al. The effect of fetal acidemia on fetal-placental vascular tone and production of inflammatory cytokines interleukin-6 and tumor necrosis factor- α . *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2002; 187(4):894-7.
 47. Charles N et al. Expression of cyclooxygenase-2 in cervical, endometrial, and ovarian malignancies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2003;188(5):1174-6.
 48. 지병철, 문신용. Nitric Oxide가 인간 황체화 과립막세포의 아포프토시스에 미치는 영향. *대한산부회지*. 2002; 45(5):766-73.
 49. Ryu, JH et al. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS- activated macrophage. *Phytother Res*. 2003;17:485-9.
 50. Mu MM et al. The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *J. Endotoxin Res*. 2001;7:431-8.
 51. Rollins BJ and JS Pober. Interleukin-4 induces the synthesis and secretion of MCP-1/JE by human endothelial cells. *Am. J. Pathol*. 1991;138:1315-9.
 52. Rollins BJ et al. Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am. J. Pathol*. 1990;136 :1229-33.
 53. 임준희, 권택규. Luteolin의 IL-1 β 에 의한 MCP1 단백질 발현 증가에 미치는 영향. *생명과학회지*. 2009;19(4) :514-9.
 54. 표명윤, 정애희. Mancozeb이 마우스 비장세포의 IFN- γ 생성능에 미치는 영향. *환경독성보건학회*, 2005;20(3) :243-8.
 55. 김상찬, 변성희. 백화사실초가 Ovalbumin으로 유도된 천식동물 모델에서 Eosinophil의 수, IgE 및 IL-4에 미치는 영향. *대한분초학회지*. 2005;20(2) :35-42.
 56. 강재성 등. 세포분자면역학 제5판. 서울:범문사. 2004:255, 261, 337, 494.