

보중익기탕 (補中益氣湯)의 한국, 중국, 일본 처방에 대한 항염증 및 항산화 효과 비교 연구

최혜민[#], 김희훈, 이화동^{*}

한국한방산업진흥원, 한약제제사업단

Comparative Study of Bojungikgitang in Korea, Japan and China on the Anti-Inflammatory and Anti-Oxidative Effects

Hye-Min Choi[#], Hui-Hun Kim, Hwa-Dong Lee^{*}

Korean Traditional Medicine Agency, Korea Promotion Institute for Traditional Medicine Industry (KOTMIN)

ABSTRACT

Objectives : Bojungikgitang (BJT), the Oriental medical prescription has been traditionally used about improvement of immune response and infective disease at Asian nation. In this study, we has compared about the anti-inflammatory and antioxidative effects on BJT of three countries including Korea (Korean Traditional Medicine, KTM), China (Traditional Chinese Medicine, CTM) and Japan (Japanese Traditional Medicine, JTM).

Methods : We has basically using LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The expression of these inflammatory mediators has measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Also, free radical scavenging assay has tested for anti-oxidative activity as well as the contents of total flavonoid and polyphenol.

Results : As a result, we were founded the inhibitory effects of BJT (KTM, CTM, JTM) on LPS-induced production of NO, TNF- α and IL-6 as well as the anti-oxidative activities. Especially the KTM was most effective in anti-inflammatory and anti-oxidative activities.

Conclusions : These results indicate that BJT (KTM, CTM, JTM) has a good anti-inflammatory and anti-oxidative effects. But, there were degree of effects on between pharmacopoeia of the countries. Thus, further study is required that find appropriate methods for extracting as well as establish of standardized processes in order to improve the quality of BJT (KTM, CTM, JTM) as an anti-inflammatory and anti-oxidative agent for treatment of inflammatory diseases.

Key words : Traditional medicine, Bojungikgitang, anti-inflammatory effect, anti-oxidative effect, RAW 264.7 cell

서론

한약제제 (韓藥製劑)란 동물·식물 또는 광물에서 채취되어 주로 원형대로 건조·절단 또는 정제된 생약 (生藥)을 한방원리에 따라 배합하여 제조한 의약품을 의미한다 (약사법 제2조 제 5,6항). 또한, 한약제제에서의 한약 (韓藥)이란 이미 가공된 한약, 한약재, 한약조제품, 한약완제품을 포괄하며, 이들의 전통적인 사용의 효과와 안전성은 잘 확립되고 널리 알려져

있다고 세계보건기구 (WHO)에서 보고되고 있다. 이를 중국에서는 "중약" (중국어 간체: 中药, 정체: 中藥), 일본에서는 화한약 (和漢藥)·화약 (和藥)이라 칭하고 있다.

한편, 동일한 학문적 토대와 이론에 기반을 두고 있는 한국, 중국, 일본의 전통의학은 각국의 문화적 학문적 특성 및 정책방향으로 여러 가지 차이점을 보여 빈번하게 비교의 대상이 되고 있다¹⁾. 이는 각 국가 별 공정서에 수재된 생약 (한

*교신저자 : 이화동, 경북 경산시 화랑로 94(갑계동) 한국한방산업진흥원 한약제제사업단
· Tel : 053-810-0332 · Fax : 053-810-0245 · E-mail : lee00003@hanmail.net
#제1저자 : 최혜민, 경북 경산시 화랑로 94(갑계동) 한국한방산업진흥원 한약제제사업단
· Tel : 053-810-0358 · Fax : 053-810-0245 · E-mail : addaassa@nate.com
· 접수 : 2013년 12월 12일 · 수정 : 2014년 1월 20일 · 채택 : 2014년 1월 21일

약)이 약재의 명칭, 생물학적 동질성, 약용부위, 물리화학적 규격이 상이하거나, 기원의 함유성분 조성 및 함량이 상이함에 따라 각국의 한약제제의 효능 및 효과, 부작용 등 안전성 유효성의 차이를 보이는 것으로 보고되고 있다²⁻⁴⁾. 이에 많은 기관에서 각국의 품질 규격 (기준 및 시험방법)과 안전성유효성 심사규정에 대하여 비교, 검토를 위한 많은 연구가 이루어지고 있다. 본 연구에서는 각 국가 별 공정서에 따른 한약제제의 효능 규명 및 상이함을 밝히기 위해 처방의 사용빈도가 비교적 높은 보중익기탕 (補中益氣湯)을 선택하여 한, 중, 일 각국의 한약제제에 대한 효능 비교 실험을 진행하였다⁵⁾.

보중익기탕 (補中益氣湯)은 중국의 동원십서 (東垣十書)에 처음으로 기록된 이후 『동의보감 (東醫寶鑑)』, 『제중신편 (濟衆新編)』, 『방약합편 (方藥合編)』, 『동의수세보원 (東醫壽世保元)』 등에 전제되어,脾胃氣虛를 치료하는 補益劑로서, 면역기능 개선작용과 감염 방어 작용 효능의 대표적인 처방으로 알려져 있다^{6,7)}.

보중익기탕 (補中益氣湯)은 다방면으로 많은 연구가 이루어지고 있는데, 항암, 항균, 진통, 조혈증강, 남성생식기능 강화 및 항스트레스 등의 효과가 알려져 있으며⁸⁻¹³⁾, 한의학에서는 이 방제가 황기를 중용하여 脾肺의 氣를 補하고 인삼, 백출, 감초를 가하여 益氣하고 健脾하게 하며, 당귀가 養血하여 氣의 運행을 보조하고 진피가 理氣하며, 소량의 승마와 시호가 昇陽舉陷의 작용이 있다 하였다. 중국에서의 보중익기탕은 각종 암의 치료에 사용되어 왔고 최근 동물실험과 임상에서 화학적 발암 억제 및 항암 효과가 보고되었으며 일부 유효성분이 밝혀지고 있다¹⁴⁻¹⁷⁾. 또한 일본에서의 보중익기탕에 대한 최근 연구 경향을 살펴 보면, 면역질환에 사용된 경우가 가장 많았으며, 면역질환 중에서도 항생제에 내성을 가지는 MRSA 균 보균자의 음성화에 관한 논문이 가장 많았고, 이 외에도 암 환자의 면역 기능을 개선시킨 증례와 만성 피로 증후군을 개선시킨 증례 논문이 있었다. 이는 보중익기탕의 ‘中氣’를 補하는 작용과 밀접한 연관이 있다고 사려 된다¹⁸⁾.

우리 인체는 생체조직에 유해물질이나 화학적 자극 등 외부 자극이 침투하면 이에 대한 방어반응의 하나로서 염증이 발생 한다¹⁹⁾. 하지만, 염증의 과도한 반응은 다량의 염증 매개물질을 분비하여 임상적으로 발적, 발열, 종창, 동통, 기능장애 등의 증상을 유발하는 원인이 된다. 또한, 과량의 활성산소는 산화적 스트레스로 인해 생체 내에서 DNA나 세포막 등에 작용하여 산화적 손상을 일으킴으로써 퇴행성 질환이나 암, 동맥경화, 관절염 등의 만성 염증성 질병을 일으키게 된다²⁰⁾. 이에 따른 질병에 대한 처방인 보중익기탕의 補益劑의 효능을 바탕으로 항염증 및 항산화 실험을 통하여 각 국가 별 공정서에 따른 보중익기탕의 효능을 비교하고자 진행 하였다. 각 국가 별 보중익기탕(BJT)은 대한민약전 (Korean Pharmacopoeia, KP)에 따라 제조한 보중익기탕 (KTM)과 일본약국방 (日本藥局方, JP)에 따라 제조된 보중익기탕 시판제제 (JTM), 중국의 중화인민공화국약전 (中華人民共和國藥典, CP)에 따른 보중익기탕 시판제제 (CTM)를 사용하였다. 이에 진행한 비교 실험으로는 내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide (LPS)²¹⁾ 처리로 염증반응이 일어나는 마우스 대식세포 RAW 264.7 세포에서 분비되는 전염증성 매개물질인 Nitric oxide (NO) 및 TNF- α , IL-6 등과 같은 사이토카인 (cytokine)을 확인함으로써 항염증 효능을 비교하

고, 총 페놀 및 플라보노이드 함량, DPPH 자유 라디칼 소거능 측정을 통해 항산화 활성을 비교 확인하였다.

따라서, 본 연구에서는 각 국가 별 처방구성에 따른 보중익기탕 (BJT; KTM, JTM, CTM)의 항염증 및 항산화 효과를 비교 분석하여 한약제제간의 상이함을 밝히고, 이와 같은 결과를 바탕으로 한약제제의 균일화 및 품질향상을 위한 근거를 제시하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 한약재

본 연구에 사용된 다빈도 한약 처방인 보중익기탕 처방 구성 약재들은 (주)휴먼허브 (경북 경산, 한국)와 (주)동경종합상사 (서울, 한국)에서 각각 구입하였다.

2) 시약

Fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), Penicillin-streptomycin, phosphate buffered saline (PBS)는 Hyclone, USA제품, 세포배양 플레이트와 100mm 페트리 접시는 Nunc Inc, USA로부터 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 시약 중 E. coli lipopolysaccharide (LPS), Griess reagent, Ethanol, Chloroform은 Sigma, USA 제품, MTS 시약 및 Agarose는 Promega, USA 제품, TNF- α , IL-6 Enzyme Linked Immunosorbent assay (ELISA) kit를 R&D System, USA 제품을 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 처방 구성 및 추출 방법

본 연구에 사용한 각 국가 별 공정서에 따른 보중익기탕 (補中益氣湯, BJT)은 표 1과 같이 한국의 공정서에 표기된 보중익기탕 (BJT; KTM) 처방 약재를 각 구성 비율로 배합한 후 약탕기 (대용약탕기, 서울, 한국)로 10배의 정제수와 100°C에서 2시간 30분동안 추출한 후, Whatman filter paper (No. 4)로 여과하고 감압동결건조기를 사용하여 분말을 얻었다 (수율 21.87%).

비교군인 일본, 중국의 보중익기탕 (BJT ; JTM, CTM)은 각 국가 별 공정서에 따라 제조되어 시판되고 있는 한약제제를 구입하여 사용하였다.

Table 1. compositions of three kinds of Bojungikgitang (BJT ; KTM, JTM, CTM).

Herbal Name	Pharmacognistic name	Pharmacopoeia		
		KTM	JTM	CTM
黃芪	stragalus membranaceus Bunge	o	o	o
人蔘	Panax ginseng C. A. Meyer	o	o	o
白朮	Atractylodes japonica Koidzumi	o	-	-
	Atractylodes macrocephalla Koidzumi (Compositae)	-	-	o
蒼朮	Atractylodes chinensis Koidzumi (Compositae)	-	o	-
甘藷	Glycyrrhiza uralensis Fischer	o	o	o
當歸	Angelica gigas Nakai	o	o	o
陳皮	Citrus unshiu Markovich	o	o	o
升麻	Cimicifuga heracleifolia Komarov	o	o	o
柴胡	Bupleurum chinense DC	o	o	o
生薑	Zingiber officinale Roscoe	-	o	-
大棗	Zizyphus jujuba Miller var. nemis Rehder	-	o	-

- 1) Korean traditional medicine (KTM) : Korean Pharmacopoeia (KP)
- 2) Kampo medicine/Japanese traditional medicine (JTM) : Japanese Pharmacopoeia (JP)
- 3) Traditional chinese medicine (CTM) : China Pharmacopoeia (CP)

2) 세포배양

마우스의 대식세포주인 RAW 264,7 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하였다. 세포 배양을 위해 항생제 및 항균제인 1% Penicillin-streptomycin, 10% FBS를 첨가한 DMEM 배지를 배양액으로 하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

3) 세포독성평가

각 국가 별 보중익기탕 (BJT; KTM, JTM, CTM)의 RAW 264.7 세포에 대한 독성정도를 알아보기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethylphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS)assay를 수행하였다. 먼저, RAW 264.7 세포 (5X10³ cell/96well)에 KTM, JTM, CTM을 200, 500, 1000 µg/mL 농도별로 처리하여 24시간 배양 후, 20 µL의 MTS 시약을 첨가하여 1시간 동안 반응하고, 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 정도는 시료를 처리하지 않은 대조군 CON과 약물 처리군의 비율로 계산하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = 100 \times \frac{\text{(treated sample)}}{\text{(Non-treated sample (CON))}}$$

4) Nitric oxide (NO) 생성량 측정

각 국가 별 보중익기탕 (BJT; KTM, JTM, CTM)의 염증 억제효과를 확인하기 위해 세포배양액 내 Nitric oxide (NO)의 양을 측정하였다. RAW264,7 세포 (5X10⁴ cell/12well)에 각 국가 별 보중익기탕 (BJT; KTM, JTM, CTM)을 각각 5, 50, 500 µg/mL 농도로 처리하거나, 각 국가 별 보중익기탕 (BJT; KTM, JTM, CTM)을 500 µg/mL로 2시간 전처리를 하였다. 이 후 LPS (1 µg/mL)를 처리한 후 24시간 배양하고 세포배양액에서 griess assay 방법으로 NO의 농도를 측정하였다. 즉, 세포배양액 100 µL에 동량의 Griess reagent (Sigma, USA)를 넣고 교반기에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader (Tecan Infinite M200)를 이용, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 배양액 내 NO의 농도는 sodium nitrite의 standard curve와 비교해 계산하였다.

5) 효소 결합면역측정법 (ELISA)에 따른 사이토카인 측정 먼저 RAW264,7 세포 (5X10⁴ cell/ 12well)에 각 국가 별 보중익기탕 (BJT; KTM, JTM, CTM)을 각각 5, 50, 500 µg/ mL 농도로 처리하거나, 각 국가 별 보중익기탕 (BJT; KTM, JTM, CTM)을 500 µg/ mL로 2시간 전처리를 하였다. 이 후 LPS (1 µg/mL)를 처리하여 24시간 배양한 후 세포배양액으로부터 TNF-α 와 IL-6의 농도를 ELISA kit (R&D System, USA)를 이용하여 측정하였다. 각 사이토카인의 농도는 TNF-α 와 IL-6의 standard curve와 비교해 계산하였다.

6) 종합효소 연쇄반응법 (RT-PCR)에 따른 사이토카인 측정

각 국가 별 보중익기탕 (BJT; KTM, JTM, CTM)을 500 µg/mL 농도로 2시간 전 처리하여 4시간 배양한 RAW 264.7 세포를 수거한 후 TRI-zol (Takara, Japan)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 total RNA는 1 µg로 정량하여 oligo- dT, DEPC와 함께 70°C에서 5분간 반응시킨 후 바로 ice에서 반응을 중지시킨다. 여기에 dNTP's, RT buffer 와 reverse transcriptase을 첨가한 완충 반응액 (Promega, USA)을 넣어 45°C에서 약 60분간 반응시킨 후 72°C에서 10분간 처리하여 cDNA를 합성하였다. 이 template DNA와 Taq polymerase 등이 포함된 반응 혼합액 (Promega, USA) 과 각각의 cytokine primer인 GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C (forward), ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG G (reverse); TNF-α , CCG GAG AGG AGA CTT CAC AG (forward), GGA AAT TGG GGT AGG AAG GA (reverse); IL-6, TAG ACT TCG AGC AGG AGA TG (forward), TTG ATC TTC ATG GTG CTA GG (reverse); β -actin를 혼합하여 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분씩으로 TNF-α 와 β -actin는 25 cycle, IL-6 유전자는 약 35 cycle의 PCR을 수행하였다.

7) 1, 1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DP PH) 라디칼 소거능 측정

Shahidi DPPH 방법²²⁾을 변형하여 각 국가 별 보중익기탕 (BJT; KTM, JTM, CTM)을 0.1, 0.5, 1 mg/mL의 농도로 100 µL를 96 well plate에 분주하였다. 실험 직전에 제조한 0.01 mM DPPH 용액을 가하여 25°C에서 30 분간 반응시킨 후, 516 nm에서 흡광도를 측정하여 소거능을 다음 공식에 의하여 산출하였다. 대조군은 시료를 첨가하지 않은 물로 하였다. 각 시료에 대한 DPPH 라디칼 소거능 억제강도는 양성 대조군으로 Butylated hydroxyanisole (BHA) 0.1 mg/mL를 사용하여 비교하였다.

$$\text{Activity (\%)} = 100 \times \frac{\text{(treated sample)}}{\text{(Non-treated sample (CON))}}$$

8) 총 폴리페놀 함량 측정

각 국가 별 보중익기탕 (BJT; KTM, JTM, CTM)을 1 mg/mL의 농도로 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu reagent가 추출물의 폴리 페놀성 화합물에 의해 환원된 결과 몰리브덴 청색으로 발색하는 것을 원리로 하였다²³⁾. 총 폴리

페놀 함량은 표준물질로 gallic acid (Sigma, USA)를 이용하여 검량선을 작성하여 나타내었다.

9) 총 플라보노이드 함량 측정

각 국가 별 보중익기탕 (BJT; KTM, JTM, CTM)을 1 mg/mL의 농도에 함유된 총 플라보노이드 함량은 Singleton VL 등²⁴⁾의 방법을 일부 변경하여 측정하였다. 표준물질로 quercetin (Sigma, USA)를 이용하여 총 플라보노이드 함량 검량선을 작성하였다.

3. 통계분석

실험결과의 통계 처리는 SPSS package를 이용하였으며, 모든 측정값은 mean±SEM (n=3)로 표시하였고 분석에 대한 유의성은 one-way-ANOVA를 실시, 분석결과에 대한 p< 0.05의 수준에서 LSD 다중검정법으로 사후검정을 실시하여 각 처리구간의 평균치에 대한 유의성을 분석하였다.

결 과

1. 항염증 효과 비교

1) 세포독성평가

각 국가 별 보중익기탕 (BJT; KTM, JTM, CTM)의 세포 독성을 알아보기 위해 MTS assay를 수행하였다. 먼저, 세포에 염증을 유발하기 위해 처리된 LPS의 세포 독성을 확인한 결과, 각 국가 별 보중익기탕 (BJT; KTM, JTM, CTM) 모두 200, 500 µg/mL의 농도까지 RAW 264.7 세포에 대한 유의적인 독성이 나타나지 않았다. 하지만, 1000 µg/mL의 농도에서는 JTM에서 유의적인 세포 독성이 나타났다 (Fig. 1). 따라서 이후 실험에서는 독성이 나타나지 않는 범위의 농도에서 진행하였다.

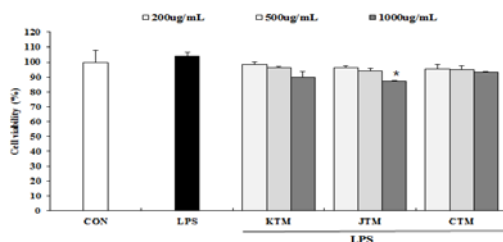


Fig 1. Effects of BJT (KTM, JTM, CTM) on cell viability in RAW 264.7 cells. Cell viability was determined using MTS assay. The values of independent experiments are expressed as means ± SEM(n=3). *P<0.05 vs. LPS.

2) Nitric oxide (NO) 생성 억제에 대한 효과

보중익기탕 (BJT)의 항염증 효과를 비교하기 위해 각 국가 별 보중익기탕 (BJT; KTM, JTM, CTM)을 5~500 µg/mL 농도로 2시간 전처리 후 LPS(1 µg/mL)를 24시간 처리하고 세포로부터 생성되는 NO의 농도를 Griess assay방법으로 측정하였다. 그 결과 KTM, JTM, CTM 모두 50 µg/mL과 500 µg/mL 농도에서 유의적인 NO 억제효과를 확인할 수 있었다. 또한 보중익기탕(BJT)의 NO 생성 저해활성을 500

µg/mL 농도에서 비교한 결과, JTM의 경우 39.66%, CTM은 26.94%, KTM 43.58% 억제활성을 나타냄으로써 KTM이 가장 효과가 우수한 것으로 나타났다 (Fig. 2).

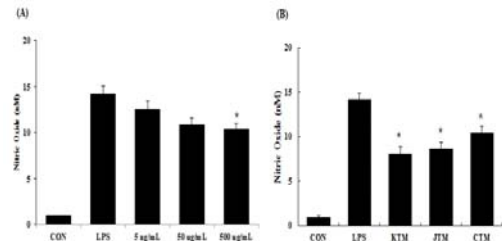


Fig 2. Effects of BJT (KTM, JTM, CTM) on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells. Cells were pre-treated with or without different concentrations of KTM, JTM and CTM for 2 hr, and then stimulated with LPS (1 µg/mL) for 24 hr. The culture supernatants were harvested and analyzed NO levels. (A) Cells were treated with KTM at concentrations of 5, 50, 500 µg/mL concentrations of BJT, (B) Cells were treated with 500 µg/mL of KTM, JTM or CTM. The values of independent experiments are expressed as means ± SEM (n=3). *P<0.05 vs. LPS.

3) TNF-α 및 IL-6 Protein 발현 억제에 대한 효과

각 국가 별 보중익기탕 (BJT; KTM, JTM, CTM)의 항염증 효능을 확인하기 위하여 대표적 염증성 사이토카인 TNF-α 및 IL-6의 분비를 세포배양액으로부터 ELISA 방법으로 측정하였다. 그 결과, TNF-α의 생성 분비는 모든 보중익기탕의 50, 500 µg/mL 농도에서 유의적인 감소 효과를 확인하였다. 또한 KTM, JTM, CTM의 효능을 비교한 결과, KTM은 89.54%, JTM은 93.62%, CTM은 84.27% 저해능으로 JTM이 가장 우수한 것으로 나타났다. 또한, TNF-α 외 중요한 전염증성 사이토카인인 IL-6의 생성 분비를 확인한 결과, 모든 보중익기탕의 50, 500 µg/mL 농도에서 IL-6의 분비가 감소하였으며, KTM, JTM, CTM 각각 42.74%, 33.58%, 10.05% 저해능으로 유의적인 효과를 보였다 (Fig. 3).

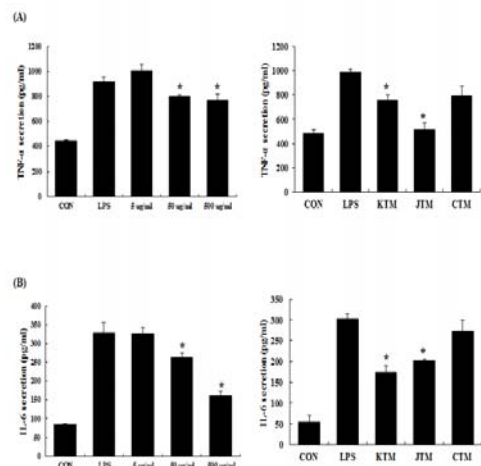


Fig 3. Effects of BJT (KTM, JTM, CTM) on LPS-induced TNF-α, IL-6 production in RAW 264.7 cells. Cells were pre-treated different concentrations of KTM, JTM and CTM for 2 hr, and then stimulated with LPS (1 µg/mL) for 24 hr. The culture supernatants were harvested and then measured of TNF-α (A) and IL-6 (B) protein levels in cells. Cells were treated with the indicated 5, 50, 500 µg/mL concentrations of BJT as well as treated with 500 µg/mL of KTM, JTM and CTM. The values of independent experiments are expressed as means ± SEM (n=3). *P<0.05 vs. LPS

4) TNF- α 및 IL-6 mRNA 발현 억제에 대한 효과

각 국가 별 보중익기탕 (BJT; KTM, JTM, CTM)의 항염증 효능을 확인하기 위하여 앞서 확인한 사이토카인의 분비 감소가 유전자 발현 억제에 의한 것인지 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, TNF- α 유전자 발현에서는 KTM이 가장 뛰어난 유전자 발현 억제효과를 보이는 것으로 확인하였고, IL-6 유전자 발현에서는 CTM이 가장 뛰어난 유전자 발현 억제효과를 보이는 것으로 확인하였다 (Fig. 4).

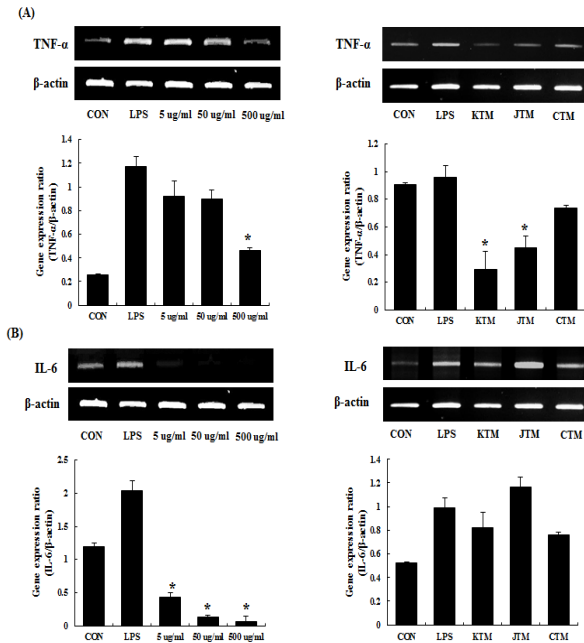


Fig 4. Effects of BJT (KTM, JTM, CTM) on LPS-induced TNF- α , IL-6 gene expression in RAW264.7 cells. Cells were pre-treated with or without the indicated concentrations of each samples for 2 hr and then stimulated with LPS (1 μ g/mL) for 4 hr. The culture supernatants were harvested and measured TNF- α . (A), IL-6 (B) mRNA levels. Cells were treated with the indicated 5, 50, 500 μ g/mL concentrations of BJT, and, cells were treated with 500 μ g/mL of KTM, JTM or CTM. The values of independent experiments are expressed as means \pm SEM (n=3). *P<0.05 vs. LPS.

2. 항산화 효과 비교

1) DPPH 자유 라디칼 소거능 비교

각 국가 별 보중익기탕 (BJT; KTM, JTM, CTM)의 항산화 효능을 확인하기 위해 DPPH free radical 소거능을 확인하였다. 결과, 모든 보중익기탕 (BJT)에서 농도의존적으로 DPPH radical 소거능이 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 100, 500 μ g/mL 농도에서는 각 보중익기탕 (BJT; KTM, JTM, CTM)의 유의적인 소거능의 차이를 나타내지 않았으며, 1000 μ g/mL의 농도에서는 KTM이 29.32%, JTM 20.60%, CTM 19.64%로 KTM의 자유기 소거능이 가장 우수한 것으로 나타났다. 또한 이는 강력한 항산화제로써 대조약물로 사용된 butylated hydroxyanisole (BHA)보다 높은 활성을 나타내었다 (Fig. 5).

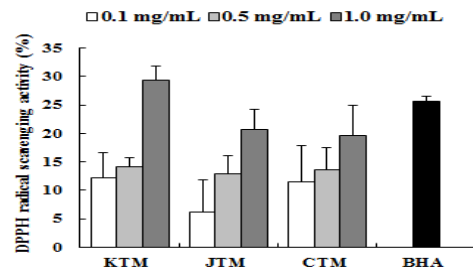


Fig 5. Effects of DPPH free radical scavenging activity in the BJT (KTM, JTM, CTM). The method of Liyana-Pathiana and Shahidi²²⁾ were used for the determination of scavenging activity of DPPH free radical. DPPH (1 mL, 0.135 mM) has prepared in mixed methanol with 1.0 mL of aqueous extract ranging from 0.1 to 1.0 mg/mL. The values of independent experiments are expressed as means \pm SEM (n=3).

2) 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

각 국가 별 보중익기탕 (BJT; KTM, JTM, CTM)내 항산화 물질의 함량을 확인하기 위하여 다양한 생리활성을 지닌 것으로 알려진 폴리페놀 화합물과 플라보노이드의 함량을 측정하였다. 그 결과, 표 3에서와 같이 KTM이 JTM, CTM에 비해 폴리페놀 화합물과 플라보노이드 함량이 가장 높은 것으로 나타났다 (Table 2).

Table 2. The total phenolic and total flavonoid contents in BJT (KTM, JTM, CTM).

Decoction	Total polyphenols (ug/mg)	Total flavonoids (ug/mg)
KTM	10.97 \pm 0.44	14.08 \pm 0.07
JTM	9.68 \pm 0.18	13.85 \pm 0.09
CTM	9.57 \pm 0.37	12.95 \pm 0.20

Total phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu reagent method²³⁾ with slight modification. The total flavonoid content was determined with the aluminum chloride (AlCl₃) method²⁴⁾ using quercetin as a standard. The values of independent experiments are expressed as means \pm SEM (n=3)

고찰

한약 사용국가의 각국 공정서에 수재된 생약 (한약)의 규격은 상이한 경우가 있으며, 주로 약재의 명칭, 생물학적 동질성, 사용부위, 물리화학적 규격이 상이하거나, 혹은 기원이 상이하여 함유성분의 조성 및 함량이 상이한 경우가 있다²⁾. 따라서 일부 생약 (한약)에 있어 각국의 효능이나, 안전성에 차이를 보이게 되어 최근 많은 연구를 통해 생약 (한약)을 사용하는 한국, 중국, 일본, 베트남 등에서는 각국의 동일한 생약 (한약)에 대한 유효성, 안전성에 대한 비교와 검토가 이루어지고 있다²⁻⁴⁾. 이에 본 연구에서 우리 나라를 비롯 동양에서 보익제(補益劑)로 알려져 있는 보중익기탕(補中益氣湯) 《脾胃論》을 이용하여 항염증, 항산화 효능을 비교함으로써 각 국가 별 생약 (한약)의 효능 차이를 분석하였다. 보중익기탕은 이미 여러 연구를 통해 항암효과²⁵⁾, 면역 및 항알러지 효과²⁶⁾, 항스트레스 효과²⁷⁾, 허약증 개선효과²⁸⁾의 보고가 이루어진바 있으며, 특히, LPS와 Interferon- γ 에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포에서 염증성 매개물 (NO, cytokine)의 생성을 억제한다는 보고가 된 바 있다²⁹⁾. 따라서 앞서 말한바

와 같이, 보중익기탕의 보익제의 효능을 바탕으로 본 연구는 각 국가 별 공정서에 따른 보중익기탕의 항염증 및 항산화 효과를 비교하고자 하였다. 그리고 각 국가 별 공정서에 따른 보중익기탕의 차이에 대한 항염증 및 항산화 효능에 대해서는 아직 알려진 바가 없어, 본 연구를 통해 각국 공정서에 따른 보중익기탕 효능을 비교하였다. 본 연구 결과를 토대로 국가 별 보중익기탕의 항염증 효능에 대한 차이점과 유사점을 확인함으로써 근거 중심 의학 (evidence - based medicine) 구축을 위한 근거를 제시하고자 하였다³⁰⁾.

우리 몸에 있는 대표적인 면역세포로 대식세포 및 단핵구들 수가 있는데 이는 외부에서 침입한 세균 유래의 특정 물질이나 체내 다른 면역세포에서 분비되는 사이토카인에 의해 활성화 된다. 특히 대식세포는 LPS와 같은 자극원에 대해 감염 초기 반응하며 숙주의 방어와 항상성 유지에 중요한 역할을 한다. 그러나 고농도의 LPS 자극은 RAW264.7 세포와 같은 대식세포에서 오히려 염증성 사이토카인 TNF- α , IL-6이나, 매개물질인 NO등의 분비를 촉진시킴으로써 숙주의 면역반응이 작동하면 염증 질환이 발생하게 된다³¹⁾. 염증반응에 있어 항산화작용 또한 밀접한 관련이 있는데, 일차적인 산화적 스트레스에 따른 산화물의 생성은 염증과 관련하여 NO나 각종 염증성 사이토카인의 합성과 분비를 유도하게 된다³²⁻³⁷⁾.

본 연구에서 각 국가 별 보중익기탕 (BJT; KTM, JTM, CTM)은 항염증 활성에 차이를 보임으로써, NO 분비 억제능과 TNF- α , IL-6의 합성과 분비 억제능에서 KTM이 가장 우수한 것으로 나타났으며, KTM \geq JTM>CTM의 순서대로 항염증 활성을 나타내었다.

또한, 각 국가 별 보중익기탕 (BJT; KTM, JTM, CTM)의 항산화 효능을 비교한 결과 KTM이 대표적 항산화 물질인 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 가장 높게 나타났고, 이와 연계하여 DPPH 자유 라디칼 소거능이 우수한 것으로 나타났다. 이러한 이화학적 성분의 변화는 항산화 효능과 밀접하게 연관되며^{22,23)}, 본 연구에서 각 국가 별 보중익기탕 (BJT; KTM, JTM, CTM)의 항산화 효능은 KTM>JTM>CTM의 순서로 효능을 나타내었다.

이상의 결과로부터 각 국가 별 보중익기탕 (BJT; KTM, JTM, CTM)은 모두 항염증, 항산화 효능을 나타내었으며, 효능 비교에서는 KTM이 가장 우수한 것으로 나타났다. 그러나 이에 따른 항염증 및 항산화 효능에서의 차이는 각 국가 별 공정서의 처방구성 생약 (한약)의 차이로 추출 및 백출의 차이에 따른 결과로 미루어 짐작할 수 있었다. 그러나 추출 및 백출의 항염증 효능은 아직 보고된 바 없으며, 향후 이들에 대한 항염증 및 항산화 연구를 수행할 필요가 있을 것으로 사료된다. 즉, 각 국가 별 공정서에 기재된 보중익기탕에 따른 성분 분석과 추출, 백출의 항염증 및 항산화 효능에 대한 연구가 추가적으로 이루어져야 할 것이며, 이를 통해 각 국가 별 공정서에 따른 보중익기탕의 안정성·유효성 차이의 이해와 구성약재의 차이에 따른 약효 차이 및 창효능에 대한 연출, 백출의 단일 생약 (한약)으로써 새로운 구도 추가적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 한국, 중국, 일본의 각 국가 별 공정서에 따른 보중익기탕 (BJT; KTM, JTM, CTM)의 효능을 비교하기 위해 항염증, 항산화 효능을 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. KTM, CTM, JTM의 보중익기탕은 모두 200, 500 μ g/mL 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다.
2. KTM, CTM, JTM은 농도 의존적으로 염증 물질인 NO의 생성을 억제하였으며, KTM>JTM>CTM 순으로 나타났다.
3. KTM, CTM, JTM은 농도에 의존적으로 염증성 사이토카인 TNF- α 의 합성과 분비를 억제하였으며, JTM>KTM>CTM 순으로 나타났다.
4. KTM, CTM, JTM은 농도에 의존적으로 염증성 사이토카인 TNF- α mRNA 발현을 억제하였으며, KTM>JTM>CTM 순으로 나타났다.
5. KTM, CTM, JTM은 농도에 의존적으로 염증성 사이토카인 IL-6의 분비를 억제하였으며, KTM>JTM>CTM 순으로 나타났다.
6. KTM, CTM, JTM은 농도에 의존적으로 염증성 사이토카인 IL-6 mRNA 발현을 억제하였으며, CTM>KTM>JTM 순으로 나타났다.
7. KTM, CTM, JTM을 DPPH radical 소거율로 항산화 효과를 측정된 결과, 1 mg/mL의 농도에서 KTM이 양성대조군과 비교하였을 때 비슷한 활성을 나타내었다.
8. KTM, CTM, JTM의 항산화 생리물질인 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 측정된 결과, KTM \geq JTM>CTM 순으로 나타났다.

따라서, 본 연구는 보중익기탕 (BJT)을 각국가 별 공정서에 수제된 제조 방법에 따라 효능 차이를 비교 분석함으로써, 한약제제의 균일화 및 품질향상을 위한 근거를 제시하고자 한다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 2013년 한의약산업육성을 위한 기반 구축 사업의 일환으로 수행된 한약제제 제형 현대화 사업의 일부로 이에 감사드립니다.

References

1. Shin HK, Lim BM. Research institutes on traditional medicine in east asian countries and

결론

- U.S.A. Korean J Orient Med, 2002 ; 8(2) : 67-74.
2. Shin SS, Kim DC, Kim, SJ, Jung DC, Ryu CR, Sung HJ. The Comparison Research on Oriental Medicinal Materials of Asian Nations Pharmacopoeias, J Assoc Neo Med, 2000 ; 5(2) : 267-76.
 3. Kim EJ, Park HJ, Kim HJ, Kim JH, Ann JY, Lee JH, Kim YK. A monitoring study of marker contents in the Hwagnyeonhaedok-tang ex preparations on the market. Korean J Orient Med Prescription, 2008 ; 16(1) : 95-107.
 4. Kim JH, Seo CS, Shin HK. The comparative study on decoctions of Ssanghwa-tang (Shuanghe-tang) extracted by different extraction conditions. Korean J Orient Med Prescription, 2010 ; 18(2) : 125-34.
 5. Korea Food & Drug Administration (KFDA). Research on Intake of Chinese Medicine by Korean. Hanyang University, 2006 : 91-4.
 6. Seo MJ, Lee KB, Park JH, Hong SH. The Current Trend of Research about Bojungikki-tang. Korean J Orient Med, 2010 ; 16(2) : 83-90.
 7. Kim JH, Lee JK, Shin HK. Analysis of studies on Bojungikgi-tang (*Buzhongyiqi-tang*) to establish the fundament for Evidence Based Medicine(EBM). Korean J Orient Med, 2011 ; 17(2) : 135-67.
 8. Ikeda S, Kaneko M, Kumazawa Y, Nishimura C. Protective activities of a Chinese medicine, Hochuekki-to, to impairment of hematopoietic organs and to microbial infection. Yakugaku Zasshi, 1990 ; 110 : 682-7.
 9. Ishikawa H, Manabe F, Zhongtao H, Yoshii S, Koiso K. The hormonal response to HCG stimulation in patients with male infertility before and after treatment with hochuekkito. Am J Chin Med, 1992 ; 20 : 157-65.
 10. Ito H, Shimura K. Studies on the antitumor activity of traditional Chinese medicines(1). Gan To Kagaku Ryoho, 1985 ; 12 : 2145-8.
 11. Koshikawa N, Imai T, Takahashi I, Yamauchi M, Sawada S, Kansaku A. Effects of Hochu-ekki-to, Yoku-kan-san and Saiko-ka-ryukotsu-borei-to on behavioral despair and acetic acid-induced writhing in mice. Meth Find Exp Clin Pharmacol, 1998 ; 20 : 47-51.
 12. Li XY, Takimoto H, Miura S, Yoshikai Y, Matsuzaki G, Nomoto K. Effect of a traditional Chinese medicine, bu-zhong-yi-qi-tang (Japanese name: Hochu-ekki-to) on the protection against Listeria monocytogenes infection in mice. Immunopharmacol Immunotoxicol, 1992 ; 14 : 383-402.
 13. Murakami Y. Clinical effect of hotyuekkito (*buzhongyiqitang*) on symptoms due to renal ptosis and stress incontinence. Hinyokika Kiyo, 1988 ; 34(10) : 1841-3.
 14. Cho JM, Sato N, Kikuchi K. Prophylactic anti-tumor effect of Hochu-ekki- to (TJ41) by enhancing natural killer cell activity. In Vivo, 1991 ; 5(4) : 389-91.
 15. Harada M, Seta K, Ito O, Tamada K, Li T, Terao H, Takenoyama M, Kimura G, Nomoto K. Concomitant immunity against tumor development is enhanced by the oral administration of a kampo medicine, Hochu-ekki-to (TJ-41: Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang). Immunopharmacol Immunotoxicol, 1995 ; 17(4) : 687-703.
 16. Kao ST, Yang SL, Hsieh CC, Yang MD, Wang TF, Lin JG. Immunomodulation of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang on in vitro granulocyte colony-stimulating-factor and tumor necrosis factor-alpha production by peripheral blood mononuclear cells. Immunopharmacol Immunotoxicol 2000 ; 22 : 711-20.
 17. Kao ST, Yeh CC, Hsieh CC, Yang MD, Lee MR, Liu HS, Lin JG. The Chinese medicine Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang inhibited proliferation of hepatoma cell lines by inducing apoptosis via G0/G1 arrest. Life Sci, 2001 ; 69(13) : 1485-96.
 18. Park JY, Yi HS, Park SD. The latest trend of research and clinical usage about Bojungikki-Tang in Japan -searching medical science articles published from 2003 to 2008-. Korean J Orient Med Prescription, 2008 ; 16(2) : 11-29.
 19. Cho W, Nam JW, Kang HJ, Windono T, Seo EK, Lee KT. Zedoarondiol isolated from the rhizoma of Curcuma heyneana is involved in the inhibition of iNOS, COX-2 and pro-inflammatory cytokines via the downregulation of NF- κ B pathway In LPS-stimulated murine macrophages. Int Immunopharmacol, 2009 ; 9(9) : 1049-57.
 20. Aniya Y, Naito A. Oxidative stress- induced activation of microsomal glutathione S-transferase in isolated rat liver. Biochem Pharmacol, 1993 ; 45(1) : 37-42.
 21. Kim CJ, Seo BS. Pothological physiology (I). 5th ed, Sin-Il sangsa, 2006 : 238-9
 22. Liyana-Pathirana CM, Shahidi F. Antioxidant activity of commercial soft and hard wheat (*Triticum aestivium* L) as affected by gastric pH conditions. J Agric Food Chem, 2005 ; 53(7) : 2433-40.
 23. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic, 1965 ; 16(3) : 144-58 .
 24. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem, 1999 ; 64(4) : 555-9.

25. Kim SJ, Kim LC, Kim SH. The Effects of Bojungikgitang & Soeumin-bojungikgitang on the Antitumor Activity against S-180 and the Reduction of Side Effects Induced by Cyclophosphamide. *Korean J Orient Physiol Pathol*, 1993 ; 18(1) : 119-36.
26. Ishimitsu R, Nishimura H, Kawauchi H, Kawakita T, Yoshikai Y. Dichotomous effect of a traditional Japanese medicine, bu-zhong-yi-qi-tang on allergic asthma in mice. *Int Immunopharmacol*, 2001 ; 1(5) : 857-65.
27. Kim JH, Lee TH. Effect of Bojungikgitang on Starvation Stress in Mice. *Korean J Orient Med Prescription*, 2006 ; 14(1) : 133-40.
28. Song QH, Kobayashi T, Hosoi T, Cyong JC. Effects of traditional Chinese medicines on murine bone metabolism in a microgravity environment. *Am J Chin* 2003 ; 31(5) : 739-49.
29. Jang SI, Kim HJ, Kim YJ, Pae HO. Bojungikgitang Inhibits LPS Plus Interferon- γ -induced Inflammatory Mediators in RAW 264.7 Macrophages. *Korean J Orient Med prescription*, 2003 ; 11(1) : 115-28.
30. Park JE, Oh DS, Shin SH, Choi JY, Koo CM, Kim AR, Jung SY, Han KJ, Choi SM. Analysis of Recent Trends in Clinical Research Publications on Acupuncture and Moxibustion Studies. *Korean J Orient med*, 2007 ; 13(2) : 101-12.
31. Kim MY, Son IP, Kim SY, Song YS, Chang HK, Yoo SJ, Baek SY, Kang HH, Kim BJ. Anti-inflammatory Effect of Green Tea Cell Water in Activated RAW 264.7 cells with Lipopolysaccharide. *Korean J Asthma Allergy Clin Immunol*, 2012 ; 32(2) : 115-21.
32. Kim HH, Park GH, Park KS, Lee JY, An BJ. Anti-oxidant and Anti-inflammation Activity of Fractions from *Aster glehni* Fr. Schm. *Korean J Microbiol Biotechnol*, 2010 ; 38(4) : 434-41.
33. Yoshizawa S, Horiuchi T, Yoshida T, Okuda T. Antitumor promoting activity of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of Tannin in green tea. *Phytother Res*, 1987 ; 1(1) : 44-7.
34. Blois MS. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 1958 ; 181(4617) : 1199-200.
35. Kim SI, Sim KH, Ju SY, Han YS. A Study of Antioxidative and Hypoglycemic Activities of Omija (*Schizandra chinensis* Baillon) Extract under Variable Extract Conditions. *Korean J Food Nutr*, 2009 ; 22(1) : 41-7.
36. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 1999 ; 26(9-10) : 1231-7.
37. Posadas I, Terencio MC, Guillén I, Ferrándiz ML, Coloma J, Payá M, Alcaraz MJ. Co-regulation between cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time course of murine inflammation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2000 ; 361(1) : 98-106.