

청열소독음(淸熱消毒飲)과 구성약재의 암세포 독성, 항균 및 항산화 효과

안봉전^{**}, 이진태, 이창언, 손준호, 이진영, 박태순, 이인철, 송미애, 천순주, 지선영¹

대구한의대학교 화장품약리학과, ¹: 대구한의대학교 한의학과

Cytotoxicity, Antibacterial and Antioxidant Activities of the Prescription Cheongyeolsodokum and Its Constituent Herbs

Bong-Jeun An^{**}, Jin-Tae Lee, Chang-Eon Lee, Jun-Ho Son, Jin-Young Lee, Tae-Soon Park, In-Cheol Lee, Mi-Ae Song, Soon-Ju Cheon, Seon-Young Jee¹

Dept. of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, ¹: Dept. of Oriental Medicine, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this research was physiological activities, cytotoxicity, and antibacterial activities of the Cheongyeolsodokum and its constituent herbs.

Methods : Physiological activities, cytotoxicity, and antibacterial activities were examined through the Cheongyeolsodokum and its constituent herbs.

Results : In the physiological activities, the electron donating ability(EDA) of the water and ethanol extracts from the Cheongyeolsodokum were over 60% and 80% at 100 ppm, respectively. The EDA of the water and ethanol extract from the Cheongyeolsodokum ingredients were gradually increased as well.

Water and ethanol extracts from the Cheongyeolsodokum and its constituent herbs inhibited xanthine oxidase activity, they showed superoxide dismutase(SOD)-like activity. The Cheongyeolsodokum and its constituent herbs inhibited cancer cell growth in a dose-dependant manner. Also, the clear zones against *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis* were clear shown at 2.5 and 5 mg/disc. Its constituent herbs showed the clear zone against various bacteria such as *Candida albicans*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, and *S. mutans* were shown at 0.5 and 1mg/disc.

Conclusions : We observed physiological activities, cytotoxicity, and antibacterial activities of the Cheongyeolsodokum and its constituent herbs. The results also indicated that water extract and ethanol extract of Cheongyeolsodokum and its constituent herbs can be used as a natural ingredient in food or cosmetic industry.

Key words : Cheongyeolsodokum, antioxidant, cytotoxicity, antibacterial activity.

서론

淸熱消毒飲은 《東醫寶鑑》¹⁾에 기재된 처방으로 癰疽陽證, 腫痛, 發寒熱, 作渴 등의 치료에 사용되어져 왔다. 모낭주위 조직 깊숙이 발생하는 화농성 염증질환과 관계있는 癰疽는 榮衛가 不調하고 氣血이 凝滯되고 經絡이 막혀서 형성되는 것으로 임상적으로 털을 중심으로 단단하고 통증이 심한 홍색 결절이 나타나며, 서양의학에서는 미생물, 물리화학적 요인, 순환장애 등에 의해 발생하는 것으로 보고 있다²⁾. 癰疽에 대한 연구로는 癰疽의 기전과 淸熱消毒飲 등 복합처방에 대한 실험적 연구가 진행된 바 있다³⁻⁹⁾. 이 癰疽의 치료처방인 淸熱消毒飲의 구성약제는 抗菌, 抗病毒, 解毒, 疏髯 등의 효능이 있는 금은화, 연교, 황련, 淸熱瀉火의 작용으로 實熱證에 효능이 있는 치자, 營分과 血分の 熱邪를 淸解하는 효능이 있는 적작약, 생지황, 인체의 氣血陰陽의 부족을 보충하여 장부의 기능을 개선시키는 효능이 있는 감초, 血虛한 증후를 개선시키거나 없애는 작용을 하는 당귀, 혈액순환을 촉진하고 瘀滯를 풀어주는 작용을 하는 천궁으로 癰疽陽證,^{1,10)}으로 인한 浮腫, 發熱, 疼痛, 發赤 상태를 치료하여 癰疽로 인한 각종 증상에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 淸熱消毒飲에 대한 연구로는 김 등⁸⁾과 이⁹⁾의 진통, 항혈전효과 및 소염효과에 대한 연구가 보고 되어 있으나, 淸熱消毒飲 및 구성약제에 대해서는 임상적 연구나 효소학적 측면의 생리활성기능 및 항암·항균효과에 대해서는 많은 연구가 진행되어 있지 않은 실정이다. 이에 본 연구에서는 淸熱消毒飲과 그 구성약제를 이용하여 항산화활성 및 암세포독성·항균효과를 살펴보고 식품 및 화장품 산업에의 천연소재로 개발하기 위한 기초자료를 확립하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 추출방법

본 실험에 사용된 淸熱消毒飲은 《東醫寶鑑》¹⁾에 기록된 내용에 준하였으며, 시료로 사용된 약재들은 대구한의대학교 부속 대구한방병원 약제과에서 구입하여 물로 세척하여 음건 후 사용하였다. 실험에 사용한 약재는 이의 구성비에 따라 양질의 것을 사용하였는데 시료의 학명은 다음과 같다(Table 1). 시료의 추출은 열수 추출물의 경우, 淸熱消毒飲 및 구성약제

인 금은화, 적작약, 생지황, 천궁, 당귀, 황련, 치자, 연교, 감초 각각에 대하여 증류수 10배의 양을 가하여 85℃에서 3시간 환류냉각 추출하여 여액과 침전물을 분리하여 3회 반복 추출하였으며, 시료의 에탄올 추출물은 70% ethanol 10배의 양을 가하여 실온에서 24시간 침지하여 여액과 침전물을 분리하여 위와 같은 방법으로 3회 반복 추출하였다. 각 추출물을 원심분리 및 여과, 농축하여 동결건조 후 냉장실에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

Table 1. Composition of Chunyulsodokeum

韓藥名	Scientific names	Weight (g)
金銀花	<i>Lonicera japonica</i> Thunb.	7.500
赤芍藥	<i>Paeonia lactiflora</i>	5.625
生地黄	<i>Rehmannia glutinosa</i> (Gaertn) Libosch	5.625
川芎	<i>Cnidium officinale</i> Makino	5.625
當歸	<i>Angelica gigas</i> N.	3.750
黃連	<i>Coptis chinensis</i>	3.750
梔子	<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis.	3.750
連翹	<i>Forsythia Viridissima</i> Lindl	3.750
甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	3.750
Total		43.125

2. 시약 및 기기

암세포 증식에 미치는 영향에 대한 실험의 세포주는 피부암세포인 B16F10과 G361과 유선암세포인 MDA-MB-231 및 폐암세포인 A549를 Korean Cell Line Bank(KCLB)로부터 구입하여 사용하였고, 시약은 RPMI 1640 medium (Gibco BRL Co., USA)과 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium), fetal bovine serum(Gibco BRL Co., USA), penicillin/streptomycin(Gibco BRL Co., USA)를 사용하였으며, MTT(Sigma Chemical Co. Ltd., USA), trypsin 250(Difco, USA), trypan blue stain 0.4%(Gibco BRL Co., USA)와 haemocytometer(Marienfeld, Germany)를 사용하였다. 항균력 검색실험에서 사용한 공식 균주는 피부 상재균으로서 *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917 및 *Escherichia coli* KCTC 1039를 계대배양하여 사용하였으며, 구강내 세균으로서 *Streptococcus mutans* KCTC 3065 및 *Candida albicans* KCTC 7965를 계대배양하여 사용하였다. 전 배양 및 본 배

양을 위한 액체 배지는 nutrient broth(NB), tryptic soy broth(TSB), brain heart infusion(BHI) 및 YM broth(YMB)와 고체 배지는 nutrient agar(NA), tryptic soy agar(TSA), brain heart infusion agar(BHIA) 및 YM agar(YMA)를 Difco Lab.(Sparks, MD, USA)에서 구입하여 사용 하였다. 항산화능 검증 실험에 사용된 시약인 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), pyrogallol, xanthine, xanthine oxidase등은 sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

3. 실험방법

1) 항암 효과 측정

① 세포배양 : 본 실험에 이용한 세포 B16F10 (melanoma), G361(melanoma), MDA-MA-231(breast cancer), A549(lung cancer)의 각 세포의 배양은 10% fetal bovine serum(FBS)과 100 unit/ml의 penicillin/streptomycin을 1%를 첨가한 RPMI 1640 배지 및 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

② 적정 접종 세포수 결정 : 항암효과 측정을 위한 지수기의 적정 세포 수 측정은 96 well plate에 5×10⁴ cells/well이 되게 180 μl 분주한 후 세포밀도를 1/2로 희석하면서 접종한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4일간 배양한 후 배양액을 제거하고, 각 well당 dimethyl sulfoxide(DMSO) : ethanol(1 : 1) 용액 150 μl를 가하여 30분간 교반한 뒤 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

③ MTT (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-y)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay에 의한 항암 효과 측정 : 추출물의 암세포주에 대한 증식억제효과는 carmichael의 방법에 따라 MTT assay를 실시하였다. 즉, 암세포주를 96 well plate에 1×10⁴ cell/well이 되게 180 μl 분주하고 시료를 농도별로 조제하여 20 μl 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양하였고, 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/ml 농도로 제조한 MTT 용액 20 μl를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO : ethanol(1 : 1) 150 μl를 가하여 30분간 교반한 뒤 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하여 암세포의 성장억제효과를 측정하였다.

2) 항균 효과 측정

① 균배양 : 항균력 검색실험에서 전 배양 및 본 배

양을 위한 액체 배지는 *Streptococcus mutans* 및 *Candida albicans*는 각각 brain heart infusion(BHI) 및 YM broth(YMB)를 사용 하였으며, 고체 배지는 brain heart infusion agar(BHIA) 및 YM agar(YMA)를 사용 하였다. *Escherichia coli* 및 *Staphylococcus epidermidis*의 액체 배지로서 nutrient broth(NB)를 사용하였으며, 고체 배지는 nutrient agar(NA)를 사용하였다. *Staphylococcus aureus*의 액체 배지로서 tryptic soy broth(TSB)를 사용하였으며, 고체 배지는 tryptic soy agar(TSA)를 사용하여 배양하였다. 모든 균주는 BOD incubator에서 37°C로 배양하였다.

② 생육 저해환(clear zone) 측정 : 추출물의 항균력 측정은 paper disc법으로 측정하였다. 즉, 평판 배지에 배양된 각 균주를 1백금이 취해서 액체 배지 10 ml에서 18~24시간 배양하여 활성화시킨 후 다시 액체 배지 10 ml에 균액을 0.1 ml 접종하여 3~6시간 본 배양한 후 평판배지 1개당 균액을 약 10⁷ cells되게 접종하여 멸균 면봉으로 균일하게 도말하였다. 멸균된 filter paper disc(8 mm, Tokyo, Japan)를 고체 평판배지에 올려놓은 다음 0.05 ml/disc가 되도록 시료를 농도별로 흡수시켜 35°C에서 18~24시간 배양하여 disc주위의 clear zone(mm)의 직경을 측정하였다.

3) 항산화 효과 측정

① 전자공여능 측정(DPPH radical 소거능) : 추출물의 전자공여능(electron donating ability : EDA)은 Blois¹²⁾의 방법을 변형하여 실시하였다. 각 시료용액 2.0 ml에 0.2 mM의 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 1.0 ml 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 실험구와 대조구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

② Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정 : SOD 유사활성은 Marklund¹³⁾의 방법에 따라 실시하였다. 각 시료용액 0.2 ml에 Tris-HCl의 완충용액(50 mM Tris + 10 mM EDTA, pH 8.5) 2.6 ml와 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml 가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1.0 N HCl 0.1 ml를 가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 측정하였다. SOD 유사활성은 시료용액의 실험구와 대조구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

③ Xanthine oxidase 저해활성 측정 : Xanthine oxidase 저해활성 측정은 Stripe & Corte¹⁴⁾의 방법에 따라 반응구는 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 0.6 ml에 xanthine(2 mM)을 녹인 기질액 0.2 ml에 시료용액 0.1 ml와 xanthine oxidase(40 mU/ml)

0.1 ml를 가하고 37°C에서 5분간 반응시킨 후 1N HCl 1.0 ml를 가하여 반응을 종료시킨 다음 반응액 중에 생성된 uric acid를 흡광도 292 nm에서 측정하였다. Xanthine oxidase 저해활성은 시료용액의 실험구와 대조구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

④ 통계처리: 결과 통계처리는 SPSS 10.0 for windows program을 사용하였으며, 유의차 검증은 분산분석(ANOVA: analysis of variance)을 한 후 $\alpha = 0.05$ 수준에서 Duncan의 다중검증법(DMRT: Duncan's multiple range test)에 따라 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 항암 효과 확인

淸熱消毒飲 및 구성약재의 암세포에 대한 세포증식 억제율은 Fig. 1~5와 같이 나타내었다. 암세포 모두 시료 농도가 증가함에 따라 세포증식억제율이 증가하였는데, 이는 Kim 등¹⁵⁾이 보고한 팔손이 용매별 추출물의 항암 활성에서 모든 시료가 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타낸 것과 일치하는 것이다. 淸熱消毒飲의 경우 100 ppm에서 열수 추출물 및 에탄올 추출물 모두 30% 이하의 낮은 증식억제효과가 나타났으나, 1000 ppm에서 폐암세포인 A549를 제외한 G361, B16F10, MDA의 열수 추출물 및 에탄올 추출물의 세포증식억제율은 1000 ppm에서 70% 이상의 성장 저해가 나타났다. 특히 B16F10, MDA에 대하여 열수 추출물의 경우 1000 ppm에서 각각 88.2%, 93.1%의 증식억제효과가 나타났으며 에탄올 추출물의 경우 1000 ppm에서 각각 89.8%, 86.5%의 증식억제효과가 나타났다(Fig. 1). 이는 Han 등¹⁶⁾이 보고한 전통 매주에서 분리한 단독균으로 제조한 매주 추출물의 혈액암세포에 대한 세포증식억제율을 보았을 때 21종의 추출물 중에서 가장 높은 세포증식억제율이 58%인 점과 비교할 때 淸熱消毒飲의 세포증식억제율이 더 우수한 것으로 나타났다. 또한 淸熱消毒飲의 구성약재인 적작약의 열수 추출물의 경우 1000 ppm에서 B16F10, MDA에 대하여 각각 85.2%, 90.4%의 증식억제효과가 나타났으며, 에탄올 추출물의 경우 1000 ppm에서 B16F10, MDA, A549에 대하여 90% 이상의 높은 증식억제효과가 나타났다(Fig. 2). 특히 황련의 열수 추출물의 경우 1000 ppm에서 암세포 모두 90% 이상의 높은 증식억제효과가 나타났고, 에탄올 추출물의 경우도 열수 추출물보다는 미흡하지만 비교적 높은 증식억제효과가

나타났다(Fig. 3). 또한 연교의 열수, 에탄올 추출물 및 감초의 열수 추출물의 경우 1000 ppm에서 80% 이상의 높은 증식억제효과가 나타났다(Fig. 4, 5). 이는 Min 등¹⁷⁾이 보고한 다나무 추출물 분획물에서 aqueous, hexane, butanol, chloroform의 세포 증식억제효과는 1000 ppm에서 62.7, 58.7, 52.6, 40.1%과 비교하여 淸熱消毒飲의 구성약재의 세포 증식억제효과가 더 우수한 것으로 판단된다.

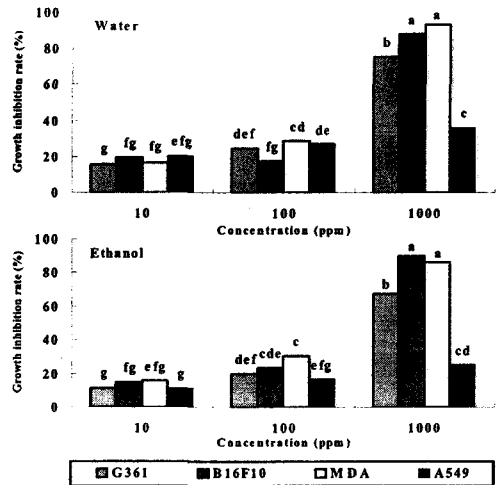


Fig. 1. Growth inhibition rate of Cheongyeol-sodokum against cancer cell. Values are means of 5 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

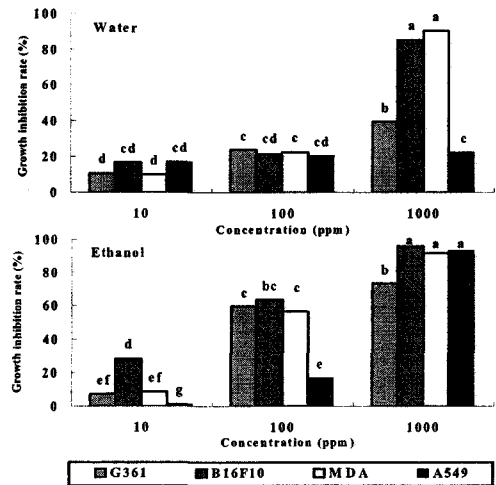


Fig. 2. Growth inhibition rate of *Paeonia lactiflora* against cancer cell. Values are means of 5 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

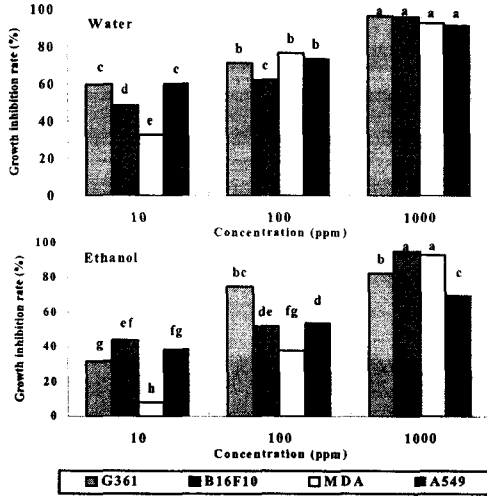


Fig. 3. Growth inhibition rate of *Coptis chinensis* against cancer cell. Values are means of 5 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

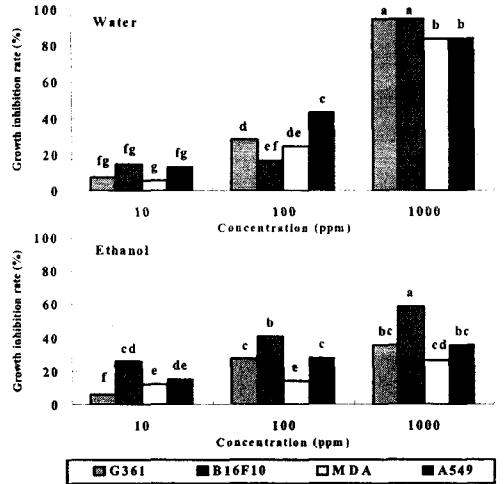


Fig. 5. Growth inhibition rate of *Glycyrrhiza uralensis* Fischer against cancer cell. Values are means of replicates and those with different alphabet letters a significantly different at $p < 0.05$.

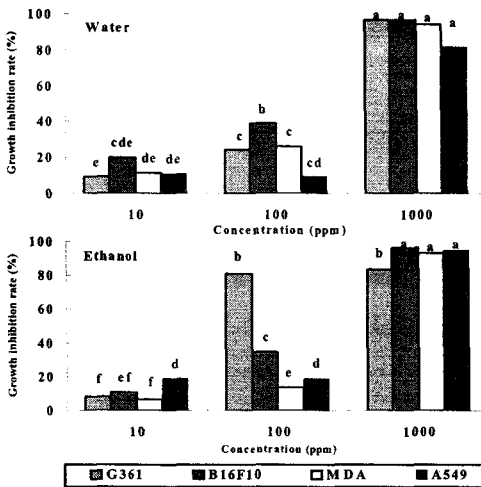


Fig. 4. Growth inhibition rate of *Forsythia Viridissima* Lindl. against cancer cell. Values are means of 5 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

2. 항균 효과 확인

淸熱消毒飲의 복합처방의 경우 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* 및 *Streptococcus mutans*에 대한 항균효과는 0.5 mg/disc의 농도에서 항균력을 나타내지 않았으나, 2.5, 5 mg/disc에서는 항균력이 매우 높게 나타났다. 특히 *S. aureus*의 경우

2.5 mg/disc에서 淸熱消毒飲의 열수, 에탄올추출물 : 각 13.5, 14.5 mm의 항균활성을 나타냈고, 5 mg/disc에서 29.5, 30.0 mm로 매우 높은 항균활성을 나타냈는데 (Table 2), 이는 Do 등¹⁸⁾이 보고한 32종의 약재 추출물의 6종의 미생물에 대한 항균활성검증서 가져(*Terminalia chebula*)를 제외한 생약재들 : 대해 *S. aureus*의 항균활성이 열수, 에탄올 추출물 : 서 20mm 내외를 나타낸 것과 비교할 때 높은 수 : 이다. 淸熱消毒飲의 구성약재에 대한 항균력을 살 : 보면 우선 *Candida albicans*의 경우 황련을 제외 : 모든 약재에서 항균력이 나타나지 않았으나, 황련 : 에탄올 추출물의 경우 1 mg/disc에서 17 mm로 가 : 큰 저해환을 관찰할 수 있었고, 에탄올 추출물이 : 수 추출물에 비하여 항균력이 높게 나타났다(Tab : 3). *E. coli*의 경우 모든 약재에서 항균력이 나타나 : 않았으며, *S. aureus*의 경우, 황련, 적작약의 열수 : 추출물 및 황련, 감초, 치자 에탄올 추출물에서 항균 : 이 나타났으며, 특히 황련의 에탄올 추출물이 : mg/disc에서 32 mm로 매우 높은 저해환을 나타내 : 다(Table 4). 또한 *S. epidermidis*의 경우, 적작약, : 련, 연교의 열수 추출물 및 적작약, 황련, 연교, 감 : 의 에탄올 추출물에서 항균력을 나타내었으며, 특 : 연교의 에탄올 추출물이 1 mg/disc에서 30 mm로 : 장 큰 저해환을 나타내었다(Table 5). *S. mutans* : 경우, 적작약, 황련의 열수 추출물 및 적작약, 황 : 감초의 에탄올 추출물에서 항균력이 나타났으며,

련의 에탄올 추출물이 1 mg/disc에서 직경 28 mm로 가장 높은 항균활성을 나타내었다(Table 6). 본 실험에서 淸熱消毒飲 및 구성약재의 항균활성 결과 에탄올 추출물이 열수 추출물에 비해 좋은 활성을 나타내었는데 이는 20여종의 생약재를 물과 에탄올을 사용하여 추출하고 항균활성을 실험한 결과 에탄올 추출물이 물 추출물에 비해 높은 활성을 나타낸 Park 등¹⁵⁾의 결과와 일치하며, 특히 淸熱消毒飲의 구성약재 중 황련이 모든 균주에 대해 항균효과를 나타낸 것으로 보아 천연항균제로서 응용효과 및 안전성면에서 이용가능성이 클 것이라 판단된다.

Table 2. Inhibition zone of Chungyulsodokeum on microorganism

Strains	Concentration (mg/disc)					
	0.5		2.5		5	
	water	ethanol	water	ethanol	water	ethanol
<i>Staphylococcus aureus</i>	- ^b	-	13.5 ^a	14.5	29.5	30
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	9	10.5	11	12.5
<i>Stareptococcus mutans</i>	-	-	-	-	11	12.5

^a: Inhibition zone in diameter(mm), ^b: No inhibition

Table 3. Inhibition zone of medicinal plants on *Candida albicans*

Samples	Concentration (mg/disc)					
	0.25		0.5		1	
	water	ethanol	water	ethanol	water	ethanol
<i>Lonicera japonica</i> Thunb.	- ^b	-	-	-	-	-
<i>Paeonia lactiflora</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Rehmannia glutinosa</i> (Gaertn) Libosch	-	-	-	-	-	-
<i>Cnidium officinale</i> Makino	-	-	-	-	-	-
<i>Angelica gigas</i> Nakai	-	-	-	-	-	-
<i>Coptis chinensis</i>	9 ^a	11	9.7	15	12	17
<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis	-	-	-	-	-	-
<i>Forsythia Viridissima</i> Lindl.	-	-	-	-	-	-
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	-	-	-	-	-	-

^a: Inhibition zone in diameter(mm), ^b: No inhibition

Table 4. Inhibition zone of medicinal plants on *Staphylococcus aureus*

Samples	Concentration (mg/disc)					
	0.25		0.5		1	
	water	ethanol	water	ethanol	water	ethanol
<i>Lonicera japonica</i> Thunb.	- ^b	-	-	-	-	-
<i>Paeonia lactiflora</i>	11 ^a	-	12	-	20	-
<i>Rehmannia glutinosa</i> (Gaertn) Libosch	-	-	-	-	-	-
<i>Cnidium officinale</i> Makino	-	-	-	-	-	-
<i>Angelica gigas</i> Nakai	-	-	-	-	-	-
<i>Coptis chinensis</i>	14	22	15	26	18	32
<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis	-	-	-	10	-	11
<i>Forsythia Viridissima</i> Lindl.	-	-	-	-	-	-
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	-	-	-	12	-	18

^a: Inhibition zone in diameter(mm), ^b: No inhibition

Table 5. Inhibition zone of medicinal plants on *Staphylococcus epidermidis*

Samples	Concentration (mg/disc)					
	0.25		0.5		1	
	water	ethanol	water	ethanol	water	ethanol
<i>Lonicera japonica</i> Thunb.	- ^b	-	-	-	-	-
<i>Paeonia lactiflora</i>	15 ^a	-	17	-	21	12
<i>Rehmannia glutinosa</i> (Gaertn) Libosch	-	-	-	-	-	-
<i>Cnidium officinale</i> Makino	-	-	-	-	-	-
<i>Angelica gigas</i> Nakai	-	-	-	-	-	-
<i>Coptis chinensis</i>	12	14	13	17	15	22
<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis	-	-	-	-	-	-
<i>Forsythia Viridissima</i> Lindl.	18	- ^b	21	20	25	30
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	-	11	-	14	-	16

^a: Inhibition zone in diameter(mm), ^b: No inhibition

Table 6. Inhibition zone of medicinal plants on *Streptococcus mutans*

Samples	Concentration (mg/disc)					
	0.25		0.5		1	
	water	ethanol	water	ethanol	water	ethanol
<i>Lonicera japonica</i> Thunb.	- ^b	-	-	-	-	-
<i>Paeonia lactiflora</i>	10 ^a	10	12	10.5	15	11
<i>Rehmannia glutinosa</i> (Gaertn) Libosch	-	-	-	-	-	-
<i>Cnidium officinale</i> Makino	-	-	-	-	-	-
<i>Angelica gigas</i> Nakai	-	-	-	-	-	-
<i>Coptis chinensis</i>	-	15	9	20	12	28
<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis	-	-	-	-	-	-
<i>Forsythia Viridissima</i> Lindl.	-	-	-	-	-	-
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	-	-	-	13	-	15

^a: Inhibition zone in diameter(mm), ^b: No inhibition

3. 항산화효과 확인

1) 전자공여능 확인

淸熱消毒飲 및 구성약재의 열수 및 에탄올 추출물에 대한 DPPH radical 소거활성을 측정된 결과 淸熱消毒飲의 에탄올 추출물의 경우 100 ppm 이상의 농도에서 80% 이상의 전자공여능을 나타냈다. 특히 淸熱消毒飲의 구성약재인 금은화, 적작약, 황련, 연교, 치자의 에탄올 추출물의 경우 1000 ppm에서 50~70%의 전자공여능을 나타내는 열수추출물에 비하여 90% 이상의 높은 전자공여능을 나타냈다(Fig. 6~12). 본 연구에서 淸熱消毒飲 및 구성약재의 전자공여능은 추출물의 농도가 증가할수록 전자공여능이 증가하는 경향을 나타냈는데, 이는 Song 등²⁰⁾이 보고한 쥘레영 지머섯 추출물의 DPPH radical 소거활성이 농도 의존적인 경향을 나타내는 것과 유사한 결과를 나타냈으며, 또한 같은 농도에서 열수 추출물보다 에탄올 추출물의 경우 더 높은 전자공여능을 나타낸 Lee 등²¹⁾의 보고와 일치하는 결과를 나타내었다. 이러한 결과로 보아 淸熱消毒飲 및 구성약재의 열수 및 에탄올 추출물이 항산화 효과가 있음을 알 수 있었다.

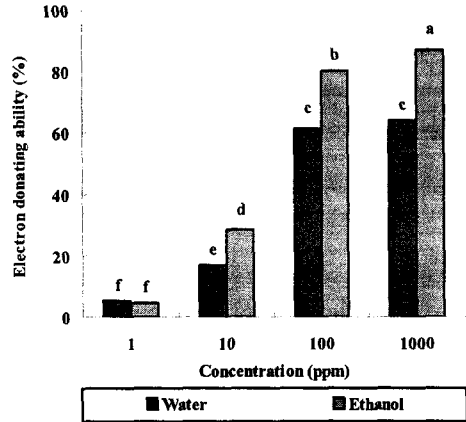


Fig. 6. Electron donating ability of Cheongyeolsodokum. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

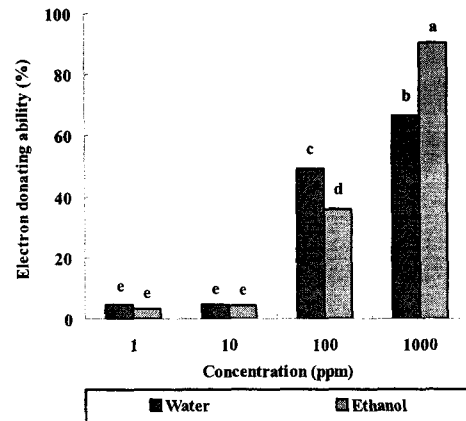


Fig. 7. Electron donating ability of *Lonicera japonica* Thunb. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

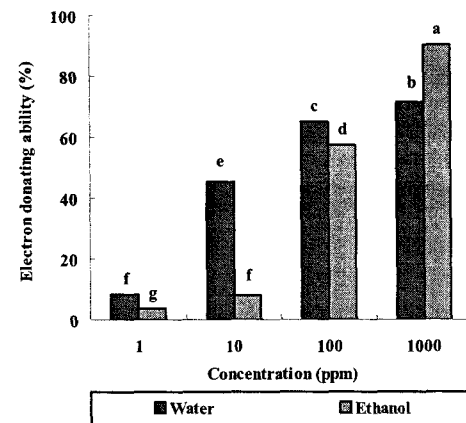


Fig. 8. Electron donating ability of *Paeonia lactiflora*. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

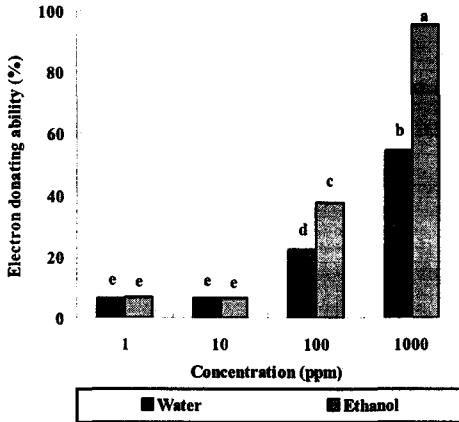


Fig. 9. Electron donating ability of *Coptis chinensis*. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

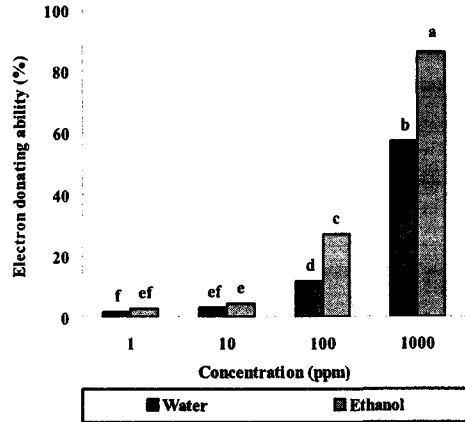


Fig. 12. Electron donating ability of *Glycyrrhiza uralensis* Fischer. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

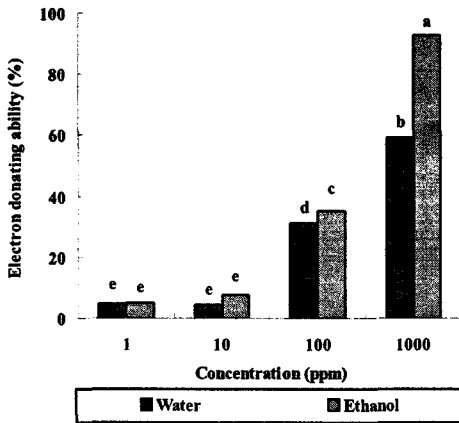


Fig. 10. Electron donating ability of *Gardenia jasminoides* Ellis. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

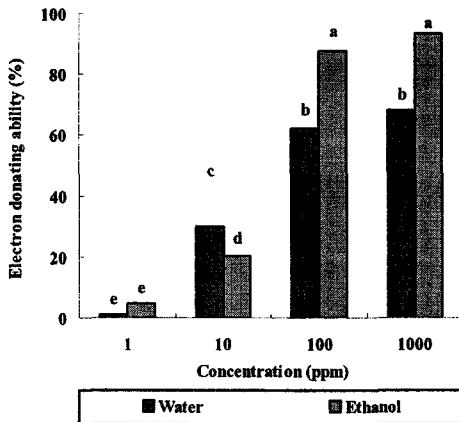


Fig. 11. Electron donating ability of *Forsythia Viridissima* Lindl. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

2) SOD 유사활성 확인

清熱消毒飲 및 구성약재의 농도별 SOD 유사활성은 앞서 실험한 전자공여능과 비교할 때 낮은 활성을 보이지만 농도가 증가할수록 유의적인 증가를 나타냈고, 거의 모든 추출물들이 열수 추출물보다 에탄올 추출물에서 비교적 높은 활성이 나타냈다. 清熱消毒飲의 SOD 유사활성의 경우 700 ppm에서 10% 정도의 낮은 유사활성을 나타내었지만 구성약재인 황련, 당귀의 경우 40% 이상의 유사활성을 나타내었고, 연교의 경우 75%의 비교적 높은 유사활성을 나타내었다(Fig. 13, 14). 이는 Hong 등²³⁾의 과실, 과채류의 착즙의 SOD 유사활성에서 사과 착즙액의 경우 14.6%, 케일농축액의 경우 26.7%, 키위 착즙액의 경우 27.6%, 무 착즙액의 경우 24.1%의 활성에 비하여 비교적 높은 SOD 유사활성을 나타낸 것이다.

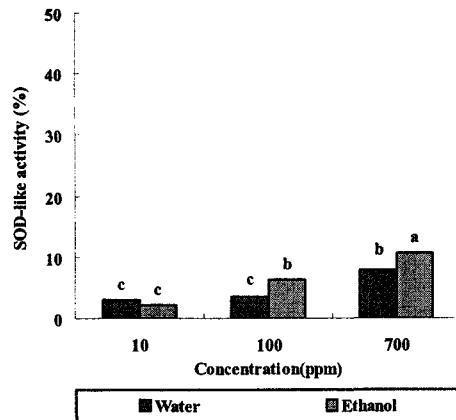


Fig. 13. SOD-like activity of Cheongyeosodokum. Values are

means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

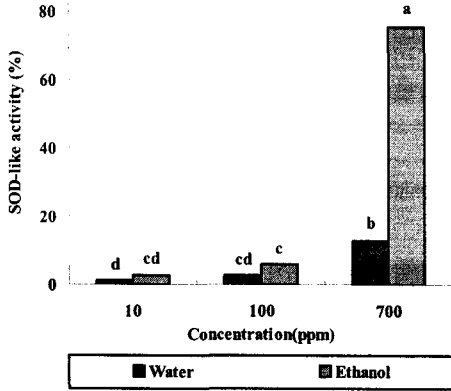


Fig. 14. SOD-like activity of *Forsythia Viridissima* Lindl. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

3) Xanthine oxidase 저해활성 확인

淸熱消毒飲 및 구성약재의 xanthine oxidase 저해활성을 측정된 결과 淸熱消毒飲 열수, 에탄올 추출물의 경우 모든 농도에서 10% 이하의 낮은 효과를 나타냈으며, 淸熱消毒飲의 구성약재의 열수, 에탄올 추출물에서도 전 농도에 걸쳐 30% 이하의 비교적 낮은 저해효과를 나타내었다. 그러나 적작약의 열수 추출물의 경우 1000 ppm에서 52.1%로 淸熱消毒飲 및 다른 구성약재와 비교해 볼 때 비교적 높은 저해효과를 나타내었다(Fig. 15, 16).

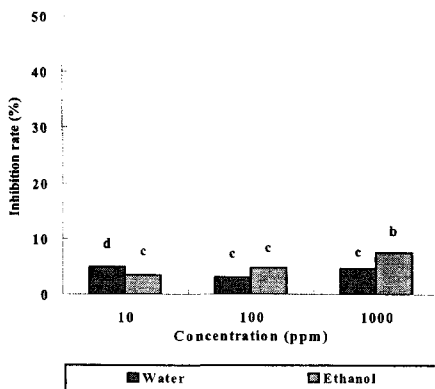


Fig. 15. Inhibition rate of Cheongyeolsodokum on xanthine oxidase. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

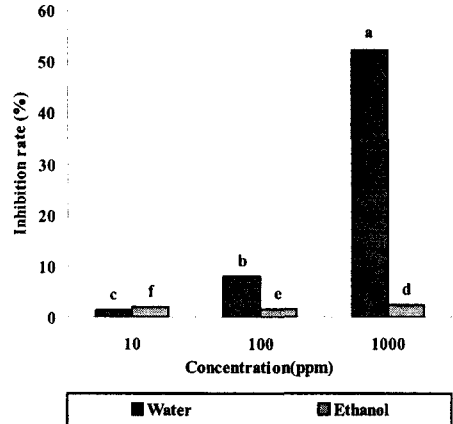


Fig. 16. Inhibition rate of *Paeonia lactiflora* on xanthine oxidase. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

결론

淸熱消毒飲 및 구성약재의 암세포 독성, 항균 및 항산화 효과에 관한 연구를 수행한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 淸熱消毒飲에 대한 전자공여능을 살펴본 결과, 100 ppm 이상의 시료농도에서 60%이상의 전자공여능을 나타내었으며 에탄올 추출물의 경우 100 ppm 이상의 시료농도에서 80% 이상의 비교적 높은 전자공여능을 나타내었다. 淸熱消毒飲의 처방성분들의 전자공여능도 열수, 에탄올 추출물 모두 시료의 농도가 증가함에 따라 유의적으로 증가하였다.
2. 淸熱消毒飲의 SOD 유사활성의 경우 700 ppm에서 10% 정도의 낮은 유사활성을 나타내었지만, 구성약재인 황련, 당귀의 경우 40% 이상의 유사활성을 나타내었고, 연교의 경우 75%의 비교적 높은 유사활성을 나타내었다.
3. Xanthine oxidase 저해활성을 관찰한 결과 淸熱消毒飲의 열수, 에탄올 추출물의 경우 모든 농도에서 10% 이하의 낮은 효과를 나타냈으나, 구성약재인 적작약의 열수 추출물의 경우 1000 ppm에서 52.1%로 淸熱消毒飲 및 다른 구성약재와 비교해 볼 때 비교적 높은 저해효과를 나타내었다.
4. MTT assay에 의한 淸熱消毒飲 및 구성약재의 암세포 독성을 측정된 결과, 淸熱消毒飲의 경우 1000 ppm에서 폐암세포인 A549를 제외한 G361, B16F10, MDA의 열수 추출물 및 에탄올 추출물의

세포증식억제율은 1000 ppm에서 70% 이상의 암세포 성장 저해효과가 나타났다. 특히 B16F10, MDA에 대하여 열수 추출물 경우 1000 ppm에서 각각 88.2%, 93.1%, 에탄올 추출물의 경우 89.8%, 86.5%의 증식억제효과가 나타났다.

5. *S. aureus*, *S. epidermidis* 균주에 대한 clear zone 형성을 관찰한 결과 추출물 2.5, 5 mg/disc의 농도에서 clear zone 형성을 관찰할 수 있었으며, 淸熱消毒飲의 구성약재들의 *Candida albicans*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*에 대한 clear zone 형성을 관찰한 결과 추출물 0.5, 1.0 mg/disc의 농도에서 clear zone 형성을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과로 보아 淸熱消毒飲 및 구성약재의 우수한 항산화 효과, 암세포독성 및 항균효과가 입증된 淸熱消毒飲 및 구성약재는 식품 및 화장품의 응용소재로서 활용가능성이 높을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지역산업 중점기술 개발사업(10017426-2005-12)의 지원으로 수행 되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 남산당. 1980: 533-537.
- 지선영. 동의피부과학. 서울: 일증사. 1996: 44.
- 강호건, 최병태, 김영희, 강호성, 김한도, 고우신. 癰疽에 상용되는 托裏消毒飲의 항염증효과. 대한한의학회지. 2000; 21(1): 45-52.
- 채병윤. 癰疽에 응용되는 仙方活命飲의 消炎, 鎮痛, 下熱작용에 관한 연구. 경희대논문집. 1980; 3: 67-90.
- 고우신, 최해훈, 임규상. <靈樞, 癰疽> 중 癰疽의 기전에 대한 考察. 대한외관과학회지. 1993; 6(1): 89-98.
- 박세원. 삼중 癰疽處方의 동물복수암 세포에 대한 항암작용연구. 대한한의약학회지. 1996; 4(1): 27-51.
- 임윤경, 남상수, 이재동, 최도영, 안병철, 박동석 외. 癰疽灸法에 대한 문헌적 고찰. 대한침구학회지. 1996; 13(2): 160-176.
- 김호민, 황덕찬, 임규상. 淸熱消毒飲이 實驗的 炎症 및 血栓症에 미치는 영향. 동의병리학회지. 1995; 9(2): 267-293.
- 이기남. 淸熱消毒飲이 實驗動物의 鎮痛, 消炎에 미치는 영향. 대한외관과학회지. 1990; 3(1): 17-24.
- 李挺. 編註 醫學入門(Ⅲ). 서울: 대성문화사. 1981: 217, 218, 225, 355.
- Charmichael J, Degraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Michell JB. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay. assissment of chemosensitivity testing. Cancer Res. 1987; 47: 936-942.
- Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 1958; 26: 1198-1202.
- Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Bioche. 1974; 47: 468-474.
- Stirpe F, Corte ED. The Regulation of rat liver xanthine oxidase. J. Biol. Chem. 1969; 244: 3855-3861.
- Kim DH & Kim JH Screening of Anticancer and Immune Activities by the Extracts of Fatsia japonica Decne. et Planch. Korean J. Medicinal Crop Sci. 2005; 13(3): 87-92.
- Han J, Kim HJ, Lee SS, Lee IS. Inhibitive effects of meju extracts made with a single inoculum og the fungi isolated from the traditional meju on the human leukemia cell line. The Korean J of Mycology. 1997; 27(4): 312-317.
- Min KJ, Choung SH, Koo SJ. Studies on the anticancer effect of *Broussonetia Kazinoki* extracts. Korean J. Soc. Food Sci. 1999; 15(3): 231-237.
- Do JR, Kim KJ, Jo JH, Kim YM, Kim BS, Kim HK, Lim SD, Lee SW. Antimicrobial, Antihypertensive and Anticancer Activities of Medicinal Herbs. Korean J. Food Sci. Technol. 2005; 37(2): 206-213.
- Park UY, Chang DS, Cho HR. Antimicrobial effect of medicinal herb. J. Korean Soc. Food Nutr. 1992; 21: 91-96.
- Song JH, Lee HS, Hwang JK, Chung TY,

- Hong SR, Park KM. Physiological activities of *Phellinus ribis* extracts. Korean J. Food Sci. Technol. 2003 ; 35(4) : 690-695.
21. Lee SE, Kim Ys. Antioxidant activity of *Ulmus davidiana* var. *japonica* N. and *Hemipteleae davidii* P. Korean J. Medicinal Crop Sci. 2004 ; 12(4) : 321-327.
22. Hong HD, Kang NK, Kim SS. Superoxide dismutase-like activity of apple juice mixed with some fruits and vegetables. Korean J. Food Sci. Technol. 1998 ; 30 : 1484-1487.