

修治 한약재가 사람의 간세포 WRL68와 원숭이의 신장세포 Vero에 미치는 영향

주영승^{*}, 김호경^{**}, 고병섭^{**}

^{*}우석대학교 한의과대학, ^{**}한국한의학연구원

Cytotoxic activity of processing the traditional drug on monkey kidney cell (Vero) and human liver cell (WRL68)

Young-sung Ju^{*}, Ho-Kyoung Kim^{**}, Byoung-Seob Ko^{**}

^{*}Woosuk oriental medical college

^{**}Korea Institute of Oriental Medicine

Abstract

The cytotoxic activities of *Pinellia ternata*, *Aconitum carmichaeli*, *Arisaema amurense*, *Aconitum kusnezoffii* and *Scutellaria baicalensis* on monkey kidney cell (Vero) and human liver cell (WRL68) were evaluated by Sulforhodamine B Protein (SRB) and Tetrazolium-based (MTT) colorimetric assay methods.

The results were as fellows :

1. The *Pinellia ternata* and *Arisaema amurense* did not show the cytotoxic activities at any concentration without processing or natural drugs.
2. The extracts of *Aconitum carmichaeli*, *Aconitum kusnezoffii* and *Scutellaria baicalensis* showed cytotoxic activities. However, the cytotoxic activities of processing drugs were less effective than the natural drugs.
3. The cytotoxic activities on monkey kidney cell (Vero) and human liver cell (WRL68) of *Aconitum carmichaeli* was determined by MTT assay. The Kyungpo(京炮) of *Aconitum carmichaeli* were showed less concentrate than that of the Dangpo(唐炮). The IC₅₀ value on monkey kidney cell (Vero) and human liver cell (WRL68) of Kyungpo was 937 ± 29 and $731 \pm 31 \mu\text{g}/\text{ml}$, respectively.

4. The cytotoxicity on monkey kidney cell (Vero) and human liver cell (WRL68) of *Scutellaria baicalensis* showed strong activities without processing or natural drugs.

【Key word】 monkey kidney cell (Vero), human liver cell(WRL68), SRB assay, MTT assay

이 논문은 2000학년도 우석대학교 학술연구비 지원을 받았음

I. 緒 論

한약의 처방은 단일 혹은 다수의 한약재를 자연적인 상태 또는 修治하여 사용하는데, 한약재의 修治는 과학적인 증명과 이론적 뒷받침은 없으나 약물의 독성을 저하시켜 인체 내에서 일어날 수 있는 해독을 막고 유효성분의 약효 발현에 도움을 주어 치료효과를 높이는 역할을 가지고 있는 수 천년에 걸쳐 전수되어진 경험적 방법이다.

한약의 修治는 포구(炮炙), 포제(炮製), 수제(修製), 수사(修事) 등으로 불려왔으며, 우리나라의 修治기술은 중국의 영향을 받아 우리의 실정에 맞게 발전되어 왔는데, 고려시대에는 상당한 수준에 이른 것으로 알려졌으며 이를 기초로 하여 조선시대에 편찬한 “*鄉藥集成方*”의 “*諸品藥石炮製法度*”에 203종의 한약재에 대해 修治기술을 정리하였다¹⁾.

한약의 修治에 대한 연구는 아직 미미한 수준이지만 천연물화학 혹은 생리활성 방법으로 일부 연구되었다. Hikino등²⁾은 일본附子の 열처리에서 수분함량을 보고하였는데, 물의 함량의 증가할수록 ester의 가수분해가 잘 일어나 함유하고 있는 alkaloid가 변화하여 aconitine 및 mesaconitine의 함량이 4분의 1로 줄어들고 독성이 적은 benzoylaconitine과 benzoylmesaconitine이 4배이상 증가하여 독성이 현저하게 감소하였다고 보고하고 있다. Noguchi³⁾등은 甘草에 의해 黃連의 berberine 독성을 감소하는 사실을 밝혔다. 즉, 甘草와 黃連을 함유하는 탕액은 berberine

glycyrrhizinate가 형성되어 여과시 제거되기 때문에 탕액의 苦味가 감소되고 향균성 약가의 소실을 발견하였다. 또한, 酸棗仁을 열처리함으로써 약효가 상승된다는 경험적인 사실을 과학적으로 입증하는 보고도 되어 있는데⁴⁾, 이러한 연구들은 대부분 저분자 유기화합물을 중심으로 이루어지고 있다.

근래에 들어 세포배양기술이 발달함에 따라 많은 종류의 배양세포계에 특정 물질을 투여하여 이들의 작용을 세포수준에서 규명하려는 연구가 활발히 진행되고 있고, 이 방법들은 기존의 동물실험이 가지고 있는 결점을 보완하고 문제점들을 해결할 수 있는 것으로 세포수준에서의 연구에 대한 중요성이 한층 요구되고 있다. 한약재의 특성 물질에 대한 상호작용을 *in vitro*계에서 분석할 수 있는 새로운 연구방법이 확립은 한약재의 약효나 독성에 대한 정보를 보다 간편하고 신속하게 이용할 수 있다.

이중 한약재에 대한 독성연구를 통한 올바른 정보의 제공은 의료의 질적인 향상에 있어서 중요한 요소이다. 한약재의 독성에 대한 연구는 주로 동물실험(*in vivo*)을 통한 급만성연구가 주종을 이루어 왔으며, 한약재에 대한 독성검사의 결점을 보완하고 *in vitro*계에서 독성을 예측할 수 있는 연구방법이 확립된다면, 기존의 급만성 독성 검사가 가지고 있는 문제점들을 해결하는데 많은 도움을 줄 것이다.

본 연구에서는 독성의 문제가 있다고 논의되고 있는 半夏, 天南星, 草烏를 修治하여 원숭이의 신장세포(Vero)와 사람의 간세포(WRL68)에 미치는 세포독성을 비교 조사하였고, 일반처방에 다빈도로 사용하고 있는 黃

쪽 그리고 修治하여 시판하고 있는 附子(京炮附子와 唐炮附子)에 대해서도 세포독성을 조사하였기에 보고하는 바이다.

II. 研究方法

1. 재료 · 수처 · 시료

표1. 실험재료 한약재

Korean name of traditional herb	Scientific name	Natural medicine name	Place of production
Banha (半夏)	<i>Pinellia ternata</i> Breitenbach	Pinelliae Tuber	Cheju & Cheongseon, Korea
			China
Cheonnamseong(天南星)	<i>Arisaema amurense</i> Maximowicz	Arisaematis Rhizoma	Cheongyang, Korea
			China
Choo (草烏)	<i>Aconitum ciliare</i> Decaisne	Aconiti ciliare Tuber	Youngcheon, Korea
	<i>Aconitum kusnezoffii</i> Reichb		China
Whangkeum (黄芩)	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	Scutellariae Radix	Pongwha, Korea
			China
Buja(附子)	<i>Aconitum carmichaeli</i> Debx	Radix Aconiti Lateralis Preparata	China

2) 한약재의 修治

한약재의 修治는 鄉藥集成方과 中藥大辭典 등 문헌적 조사를 통해 얻은 방법을 이용하여 다음과 같이 재현하였다. 修治에 사용한 물은

1) 실험재료

실험에 사용한 한약재는 산지에서 직접 채집 또는 의뢰하여 수집하였고, 중국산은 경동 한약재 시장에서 구입하였고 한국한의학연구원에서 감정하였다.

3차증류수를 사용하였고, 술은 서울탁주연합제조장에서 만든 알콜분 6도의 서울장수막걸리를 사용하였다. 附子는 경동시장에서 京炮附子와 唐炮附子를 구입하여 사용하였다.

표2. 한약재 修治

韓藥名	修治種類	修 治 法	參 考 文 獻
Pinellia ternata (半夏)	靑半夏	■淨選: 半夏를 체로 쳐서 찌거기와 잡질을 제거하고 크기에 따라 분류한다.	1) 俞孝通外, 鄉藥集成方 (1431), 永林社 2) 許浚, 東醫寶鑑(1616), 南山堂 3) 黃度淵, 方藥合編(1885), 南山堂 4) 申佶求, 申氏本草學 (1973), 壽文社 5) 金在佶, 原色天然藥物大事典 (1984), 南山堂
		■浸漂: 깨끗한 半夏를 용기안에 넣고 맑은 물을 半夏보다 15cm정도 높게 부어 7-10일간 담그되 매일 2-3회 물을 갈아준다.	
		■礬水浸: 물에 담가 띄운 半夏를 용기안에 넣고 일정량의 백반분을 뿌린다음(1층은 半夏 다음 백반분을 뿌리고 半夏를 놓고 백반분을 뿌리고) 맑은물을 부어 잠기게 한 다음에 1일이 지나 다시 물을 갈아주되 3일간 浸泡한 후에 꺼내서 맑은물에 1일간 더 침포한다.	
		■煮製: 백반에 침포했던 半夏를 약 달이는 솥안에 넣고 맑은 물을 부은 다음 센불로 가열하면서 삶되 쉬지않고 계속저으면서 2-3시간 지나서 半夏를 쪼개어 볼 때 내부에 흰색이 없으면 꺼내어 그늘에서 60% 정도 건조시킨후 얇게 썰어서 햇볕에 건조시킨다.	
	薑半夏	■淨選: 靑半夏와 同一 ■浸漂: 靑半夏와 同一 ■礬水浸: 靑半夏와 同一	6) 金在佶, 臨床韓方藥物療法(1987), 南山堂 7) 江蘇新醫學院, 中藥大事典(1978), 上海人民出版社 8) 上海市衛生局, 中藥飲片炮製規範 (1980), 上海科學技術出版社
		■薑汁 煮製: 생강편 일정량을 煎湯하여 생강 찌거기는 버리고 백반을 가입한다음 다시 침표한 半夏를 넣고 共煮하되 半夏를 쪼개어 보아 속에 흰색이 없으면 꺼내어 그늘에서 60%정도 건조시켜 1.5mm 두께의 얇은 조각으로 썰어서 햇볕이나 불로 건조시킨다.	
法半夏	法半夏	■淨選: 靑半夏와 同一 ■浸漂: 靑半夏와 同一	9) 金世元外, 中藥炮製學(1988), 江蘇科學技術出版社 10) 中國衛生部藥典委員會, 中國藥典(1990), 人民衛生出版社
		■甘草 石灰 水浸: 일정량의 감초를 잘게 썰어서 전탕하여 여과한 감초액에 생석회 덩이를 가하고 계속저으면서 녹인후 상층액을 취하고 생석회 찌거기를 제거한다. 다시 잘 배합된 약액을 항아리 안에 넣고 여기다가 침표를 끝낸 半夏를 넣고 다시 침표하되 매일 2-3차 저어주며 4-5일이 경과되면 약재가 황색으로 변하고 쪼개어 보면 백심이 없을때에 꺼낸다. 그늘에서 건조시키며 사용할 때에 부셔서 사용 (半夏 10kg -감초 1.6kg 생석회 2kg)	
Arisaema amurense (天南星)	第1法	■精選: 원약재를 취하여 잡질을 제거하고 크기에 따라 나눈다.	上同
		■浸漂: 깨끗한 天南星에 맑은 물을 부어 15-20일간 물에 담가 뜨게하되 매일 2-3차 맑은 물로 바꾸어 주고 수일이 지나 거품이 생기게 되면 백반분을 가하여 (100:2)1일간 더 침표한후 다시 물을 갈아주되 아린 맛이 없을 정도가 되면 꺼낸다.	
		■煮製: 天南星을 일정량의 백반분과 맑은 물을 함께 솥안에 넣고 삶되 수분이 내부까지 스며들어 흰색이 없어지면 불을 끄고 찬물을 조금 솥안에 부은 다음 꺼낸다. ■切片과 乾燥: 삶은 天南星을 그늘에서 60% 정도 건조시킨다음 내외의 습도가 갈아질 때 2mm 정도의 두께로 썰어서 햇볕에 건조시킨다. (天南星 10kg 백반 1.25-2.5kg 생강 2.5kg)	

生藥名	修治種類	修治法	參考文獻
<i>Arisaema amurense</i> (天南星)	第2法	<ul style="list-style-type: none"> ■精選: 第1法과 同一 ■浸漂: 第1法과 同一 ■煮製: 天南星을 일정량의 백반분과 생강편 그리고 맑은 물을 함께 솥안에 넣고 삶되 수분이 내부까지 스며들어 백심이 없어지면 불을 끄고 찬물을 조금 솥안에 부은 다음 꺼낸다. ■切片과 乾燥: 第1法과 同一 (天南星 10kg - 백반 1.25kg) 	上同
<i>Aconitum ciliale</i> (草烏)	第1法	깨끗한 草烏를 취하여 크기에 따라 분리하여 맑은 물에 담구어서 내부까지 수분이 스며들게 되면 꺼내어 솥안에 넣고, 4-6시간 쪄서, 그 중 큰 것을 골라 쪄개어 볼 때 백심이 없고, 혀를 약간 마비하는 감이 있을 때 꺼내어 60% 정도 음지에서 건조시킨 다음, 밀폐하여 두었다가, 2mm 정도의 두께로 썰어서 건조한다.	上同
	第2法	깨끗한 草烏를 맑은 물에 담구어 매일 2-3회 물을 갈아주고, 15일 정도 되어서 큰 것을 갈라보아 건심이 없으면, 꺼내어 노두를 제거한다. 일정량의 감초와 흑두를 전당한 액에 깨끗한 草烏를 혼합하여 솥안에 넣고, 센불로 가열하여 삶되, 3-4시간이 지나 草烏의 흰색 심지가 없어지고 혀를 대어보아 麻辣感이 없으면 꺼내어 음지에서 50%정도 건조시켜서 밀폐하여 24시간 정도 두었다가 내외의 습도가 같아지면 꺼내서 2mm 정도의 두께로 절편하여 시원한 그늘에서 1차 건조하여 60% 정도 건조시에 햇볕에 건조한다. 草烏 10kg에 감초 500g, 흑두 1kg이 소요된다.	
<i>Scutellaria baicalensis</i> (黃芩)	黃芩	원약재를 취하여 잡질을 제거하고 깨끗이 씻은후 크기에 따라 분류해서 끓는물에 10분정도 삶은후 8-12시간 밀폐시켜 내부까지 수분이 흡수되어 전체가 유연해지면 1-2mm의 박편으로 썰어서 햇볕에 건조시킨다.	上同
	酒黃芩	깨끗한 黃芩편에 일정량의 약주를 골고루 섞어서 2시간 정도 밀폐시켜 두었다가 술이 내부까지 흡수되었을 때 솥안에 넣고 약한불로 가열하며 炒하되 약간 건조가 덜되었을 때 꺼내서 시원한 그늘에서 건조시킨다.	
	黃芩炭	깨끗한 黃芩편을 솥안에 넣고 센불로 가열하면서 저어주며 炒하되 표면이 集黑色의 정도로 변하고 존성이 유지되어 있을 때 물을 조금 뿌려서 불꽃이 일어나는 것을 막고 꺼내어 시원한 그늘에서 건조시킨다.	

3) 시료 제조

修治 前과 後의 한약재 각각 50g에 3차 증류수 500 ml을 넣어 2시간 30분동안 끓인 후, 가제를 이용하여 1차 여과하고 8000×g에서 15분간 원심분리한 후 2차 여과하여 evaporator로 농축시킨후 freezing dryer를 사용하여 동결건조시켰다. 동결 건조 시킨 한약탕제를 powder 상태로 만들어 0.5% DMSO에 ml당 50 mg농도로 녹인 후 여과(0.45 μm)하여 냉장실에 보관하면서 검액으로 사용하였다.

2. 세포독성 실험

1) 기기 및 시약

실험에 사용한 시약은 RPMI 1640 (Gibco), Fetal bovin serum (FBS, Gibco), trypsin-EDTA(Gibco), Gentamycin(Gibco), Phosphate buffered saline(PBS, Sigma), Trichloroacetic acid(TCA), Acetic acid (Aldrich), Trizma base(sigma), Sulforhodamin B(SRB, Sigma S-9012) Dimethyl sulfoxide (DMSO, Aldrich), Sodium bicarbonate (Aldrich), 3-(4, 5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl terazolium bromide(MTT, Sigma), 사용기구는 Culture flask(Falcon), 96-Well plate(Falcon), Disposable pipette (Falcon), ELIZA-Reader(Spectra), CO₂ incubator(Fisher Scientific), inverted microscope는 Axiovert100(Zeiss) 등을 사용하였다.

2) 세포주 및 세포배양

본 실험에서 사용한 사람의 간세포(WRL68)

는 강원대학교 생명공학센터로부터 분양받아 사용하였고, 원숭이의 신장세포(vero)는 한국 세포주 은행(KCLB)으로부터 분양받아 사용하였다.

세포의 증식을 위해서는 조직배양용 플라스크 25cm²에 0.2% sodium bicarbonate, 5% fetal bovine serum 과 gentamicin (50mg/ml)을 첨가한 RPMI medium 1640을 넣어 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 세포단층(monolayer)이 될 때까지 배양하였다. 세포를 계대배양하기 위해서는 조직배양용 플라스크 75cm²에 배양한 세포를 phosphate buffered saline (PBS, PH 7.4)으로 세척한 다음 최종 농도가 0.05% 되게 트립신을 넣어 세포를 플라스크 바닥으로부터 분리시켜 조직배양용 플라스크(75 cm²)에 1 : 4로 분주하여 5% RPMI 1640을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에 배양하였다.

3) SRB(Sulforhodamine B Protein) Assay

SRB검색법은 Alley등⁵⁾과 Skehan⁶⁾등의 방법을 약간 변형하여 사용하였다.

가. 단일 세포 부유액의 준비

사람의 간세포(WRL68) 및 원숭이의 신장세포(vero)를 3분간 trypsin 처리하여 세포를 플라스크 바닥으로부터 떼어낸후 배양용 배지용액(culture media, RPMI 1640에 5% FBS첨가)으로 중화시켜 멸균 피펫을 통한 반복흡입으로 단일세포 부유액을 얻었다. 이 부유액을 100 g, 5min 정도로 원심하여 세포를 침전시킨 후 적당한 양의 배지용액에 다시 부유시켰다. 이 부유액을 PBS(phosphate buffered saline)로 10배 희석하여 혈구 계산판으로 세포밀도(number of cells/ml)를 측

정하였다.

나. 세포 접종, 검체투여 및 배양

예비실험에서 결정된 적정수의 세포 7×10^3 개가 포함된 $100 \mu\text{l}$ 의 배지를 96well plate 의 각 well에 첨가하며 한 칼럼에는 세포 부유액 대신 배지만을 가해 흡광도 측정시 blank로 사용하였다. Plate를 37°C , 5% CO_2 배양기에서 24시간 배양한 다음 검색의 대상이 되는 한약탕제 용액을 PBS로 계단 희석하여 원하는 농도의 5배 용액($5 \times \text{concentrate}$)으로 만들어 8가지 dose 농도로서 각 well에 첨가하였다. 8개의 dose로 각 well에 첨가되어진 약물의 최종농도는 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 63, $32 \mu\text{g/ml}$ 이었다. 그리고 Plate의 마지막 칼럼에는 검체대신 PBS만을 $25 \mu\text{l}$ 첨가하여 100% 생존군으로 삼았다. 검체 투여가 끝난 plate를 37°C , 5% CO_2 존재하에서 48시간 더 배양하였다.

라. 생존 세포의 고정 (Fixation of viable cells)

배양이 종료된 후 $50 \mu\text{l}$ 의 차가운 50% TCA (trichloroacetic acid) 용액을 천천히 가해주었다. TCA가 바닥에 가라앉도록 잠시 기다린 후 조심스럽게 냉장고로 옮겨 1시간 동안 충분히 고정시켰다. 고정이 끝난 후에는 증류수로 5회 이상 세척하여 잘 건조시켰다.

마. SRB 염색 및 흡광도 측정

건조된 plate에 1% acetic acid 에 녹인 0.1% SRB (Sulforhodamine B, Sigma S-9012) 용액 $100 \mu\text{l}$ 를 가한 후 상온에서 30 분이상 두어 충분히 염색시킨 다음 1% acetic acid로 5회 세척하여 공기중에서 건조시켰다. 완전히 건조된 후 $100 \mu\text{l}$ 의 10 mM unbuffered Tris(pH 10.5) 용액을 각 well

에 가해 세포 단백질에 부착된 SRB dye를 잘 녹여내어 균일하게 만든 다음 96-well plate 용 광도계 (ELISA reader)로 564 nm 파장에서 OD를 측정하였다.

2) MTT검색법 (Tetrazolium-based colorimetric assay)

가. 단일 세포 부유액 (single cell suspension)의 준비

사람의 간세포(WRL68) 및 원숭이의 신장세포(vero)를 3분간 trypsin 처리하여 세포를 플라스크 바닥으로부터 떼어낸후 배양용 배지 용액(culture media, RPMI 1640에 5% FBS첨가)으로 중화시켜 멸균 피펫을 통한 반복흡입으로 단일세포 부유액을 얻었다. 이 부유액을 100 g, 5min 정도로 원심하여 세포를 침전시킨 후 적당한 양의 배지용액에 다시 부유시켰다. 이 부유액을 PBS(phosphate buffered saline)로 10배 희석하여 혈구계산판으로 세포밀도(number of cells/ml)를 측정하였다.

나. 예비실험 (적정 접종세포수의 결정)

본 실험에 앞서 각 well에 첨가할 사람의 간세포(WRL68) 및 원숭이의 신장세포(vero)의 적정 접종 세포수(optimal seeding density)를 결정하였다. 한 well당 7×10^3 개의 범위에서 몇가지 세포밀도로 96-well plate 에 접종하고 항암제나 검체대신 PBS만을 가해주어 4일간 배양한후 아래에 SRB 검색법의 과정을 시행하였다. 실험종료시 흡광도(OD)를 측정하여 가장 적당한 세포밀도를 결정한 후 이후의 실험에 이용하였다.

다. 세포 접종, 검체투여 및 배양

예비실험에서 결정된 적정수의 세포가 포함

된 100 μl 의 배지를 96well plate의 각 well에 첨가하며 한 칼럼에는 세포 부유액 대신 배지만을 가해 흡광도 측정시 blank로 사용하였다. Plate를 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 다음 검색의 대상이 되는 한약 탕제 용액을 PBS로 계단 희석하여 원하는 농도의 5배 용액(5× concentrate)으로 만들어 8가지 dose 농도로서 각 well에 첨가하였다. 8개의 dose로 각 well에 첨가되어진 약물의 최종농도는 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 63, 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. 그리고 Plate의 마지막 칼럼에는 검체대신 PBS만을 25 μl 첨가하여 100% 생존군으로 삼았다. 검체 투여가 끝난 plate를 37°C, 5% CO₂ 존재하에서 48시간 더 배양하였다.

라. 생존세포 측정

4일간 배양한후 현미경으로 관찰하여 각 well에서의 세포상태를 관찰하여 체크하고 plate의 각 well에 0.1 mg (50 μl of 2mg/ml)의 MTT를 가해주고 다시 37°C에서 4시간 더 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 배양종료시 각 well에 배지를 제거하고 100 μl 의 solubilization solution(DMSO)을 첨가하여 기형성된 짙은 청색의 결정체인 formazan을 완전히 녹인후에 ELIZA plate reader (Molecular devices)로 흡광도 (test wavelength 540nm, reference wavelength 690nm)를 측정하였다. 이 흡광도는 MTT가 세포에 의해 환원된 양을 나타내며, 따라서 각 well에 존재하는 생존세포수를 의미한다.

마. 결과 분석

시험군에서 각 well로부터 한 칼럼의 평균 OD540값을 구하여 대조군(100%생존군)의 평균 OD540값에 대한 백분율을 산출하였다.

Ⅲ. 結 果

독성의 문제가 있다고 논의되고 있는 半夏, 天南星, 草烏 그리고 다빈도로 사용되고 있는 黃芩을 修治하여 修治 前과 後의 정상세포에 미치는 영향을 원숭이의 신장세포(Vero)와 사람의 간세포(WRL68)을 이용하여 SRB법과 MTT법으로 조사하였다. 그리고 附子是 修治된 상태로 유통되고 있어 시판하고 있는 京炮附子和 唐炮附子を 구입하여 세포독성을 조사하였다.

修治전 한약재들에 대한 SRB법과 MTT법으로 조사한 결과는 Table 1과 2로 정리하였다. 결과는 3회 반복한 실험을 평균하여 계산하였고 ND는 4000mg/ml 이상의 농도를 가지고 있어 細胞毒性的의 영향은 받지 않고 있다고 판단하였다. 半夏와 天南星은 SRB법과 MTT법에 의해 修治 전에 전혀 독성이 발현되지 않았다. 草烏는 국내산과 중국산에서 SRB법의 결과는 Vero 세포에서 IC50이 각각 2789±43 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 1422±83 $\mu\text{g}/\text{ml}$, WRL68 세포에서 IC50은 각각 2135±13 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1288±28 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다.

Table 1. IC₅₀ values of traditional herbs for monkey kidney cell (Vero) and human liver cell(WRL68) by SRB assay.

Scientific name Place of production	Place of production	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
		Vero	WRL68
<i>Pinellia ternata</i> (半夏)	Cheju, Korea	ND	ND
	Cheongseon, Korea	ND	ND
	China	ND	ND
<i>Arisaema amurense</i> (天南星)	Cheongyang, Korea	ND	ND
	China	ND	ND
<i>Aconitum ciliare</i> (草烏)	Youngcheon, Korea	2789 \pm 43	2135 \pm 13
	China	1422 \pm 83	1288 \pm 28
<i>Scutellaria baicalensis</i> (黄芩)	Pongwha, Korea	122 \pm 02	205 \pm 03
	China	122 \pm 03	135 \pm 05
<i>Aconitum carmichaeli</i> (附子)	China(唐炮)	ND	ND
	Korea(京炮,)	ND	ND

Note. SRB assay : Sulforhodamine B assay, IC₅₀ : 50% inhibition of cell growth, IC₅₀ values were calculated from PCS program. ND : not determined, IC₅₀ > 4mg/ml. Means \pm standard deviation of triplicate experiments.

Table 2. IC₅₀ values of Korean herbs for monkey kidney cell (Vero) and human liver cell(WRL68) by MTT assay.

Scientific name Place of production	Place of production	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
		Vero	WRL68
<i>Pinellia ternata</i> (半夏)	Cheju, Korea	ND	ND
	Cheongseon, Korea	ND	ND
	China	ND	ND
<i>Arisaema amurense</i> (天南星)	Cheongyang, Korea	ND	ND
	China	ND	ND
<i>Aconitum ciliare</i> (草烏)	Youngcheon, Korea	2625 \pm 13	2723 \pm 26
	China	1465 \pm 75	1538 \pm 11
<i>Scutellaria baicalensis</i> (黄芩)	Pongwha, Korea	220 \pm 10	243 \pm 16
	China	195 \pm 5	214 \pm 14
<i>Aconitum carmichaeli</i> (附子)	China(唐炮)	1293 \pm 85	1184 \pm 97
	China(京炮,)	937 \pm 29	731 \pm 31

Note. MTT assay : Tetrazolium-based colorimetric assay, IC₅₀ : 50% inhibition of cell growth, IC₅₀ values were calculated from PCS program. ND : not determined, IC₅₀ > 4mg/ml. Means \pm standard deviation of triplicate experiments.

MTT법의 결과는 국내산과 중국산의 IC50 값이 Vero 세포에서 각각 $2625 \pm 13 \mu\text{g}/\text{ml}$ 와 $1465 \pm 75 \mu\text{g}/\text{ml}$, WRL68 세포에서 각각 $2723 \pm 26 \mu\text{g}/\text{ml}$, $1538 \pm 11 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. 중국산이 국내산보다 강한 세포독성을 나타냈다. 黃芩은 국내산과 중국산 모두 세포독성이 발현되었다. 국내산 黃芩은 SRB법에서 Vero세포에 대한 IC50값이 $122 \pm 2 \mu\text{g}/\text{ml}$, WRL68세포에서 IC50값은 $205 \pm 3 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. 또한 MTT법은 각 세포에서 각각 220 ± 10 과 $243 \pm 16 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 IC50값이 산출되었다. 중국산 黃芩의 경우 SRB법을 이용한 결과는 Vero세포에서 IC50값이 $122 \pm 3 \mu\text{g}/\text{ml}$, WRL68세포에서 IC50값은 $135 \pm 3 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이었고, MTT법을 이용한 결과는 각 세포에서 각각 $195 \pm 5 \mu\text{g}/\text{ml}$, $214 \pm 14 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 IC50값이 산출되었다. 黃芩은 다른 생약재에 비하여 간과 신장세포에서 강한 독성을 나타냄을 알 수 있었다. 그리고, 修治하여 시판하고 있는 京炮附子和 唐炮附子에 대한 세포독성은 SRB법에서는 세포독성이 발현되지 않았지만, MTT법에서는 唐炮附子の 경우 Vero세포에서는 1293 ± 85 , WRL68에서는 $1184 \pm 97 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 IC50값이 산출되어졌고, 京炮附子の 경우는 각각의 세포에서 937 ± 29 , $731 \pm 31 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 세포독성이 나타났다.

修治 후 한약재들에 대한 SRB법과 MTT법으로 조사한 결과는 Table 3과 4로 정리하였다. 半夏와 天南星은 SRB법과 MTT법에 의해 전혀 독성이 발현되지 않았다. 특히, 草烏는 修

治前인 경우 SRB법과 MTT법에 의해 세포독성이 발현되었으나 修治後에는 Vero세포와 WRL68 세포에서 세포독성이 나타내지 않아, 修治後에는 독성이 약화됨을 알 수 있었다.

黃芩을 酒製法으로 修治하여 SRB법으로 실험했을 때 국내의 봉화산 黃芩은 酒製時 Vero에서 IC50값은 $160 \pm 5 \mu\text{g}/\text{ml}$, WRL68에서 $188 \pm 7 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이었고, 炭製한 경우 값은 각각 460 ± 26 , $390 \pm 18 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. 중국산은 酒製한 경우 Vero에서 IC50값은 $257 \pm 17 \mu\text{g}/\text{ml}$, WRL68에서 $320 \pm 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. 그리고 炭製한 경우 값은 각각 220 ± 10 , $280 \pm 9 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. MTT법을 이용하여 Vero와 WRL68에서 세포독성 실험한 결과, 국내산은 酒製한 경우 IC50값은 각각 240 ± 5 , $245 \pm 22 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이었고 炭製한 경우 값은 각각 332 ± 18 , $365 \pm 16 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. 中國産의 경우는 酒製한 경우 Vero에서 IC50값은 $289 \pm 11 \mu\text{g}/\text{ml}$, WRL68에서 IC50값은 $270 \pm 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이었고 炭製한 경우 값은 각각 257 ± 13 , $290 \pm 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다.

草烏와 黃芩에 대한 修治前(대조군)과 修治後(시험군)의 결과를 t-test하여 유의성 여부를 검정한 결과, SRB법과 MTT법에서 중국산 草烏는 제1법과 제2법으로 修治하였을 때 모두 修治前에 비하여 독성이 유의적으로 약화되었고($p < 0.001$), 黃芩의 경우에도 역시 국내의 봉화산과 중국산 모두 修治前 보다 修治後에 독성이 유의적으로 감소되었는데, 특히 炭製法이 더욱 효과적임을 알 수 있었다.

Table 3. IC₅₀ values of processed herbs for monkey kidney cell (Vero) and human liver cell (WRL68) by SRB assay.

Scientific name of herb	Place of production	Methods of processing	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
			Vero	WRL68
<i>P. ternata</i> (半夏)	Cheju & Cheong-seon, Korea	Kang-banha	ND	ND
		Beob-banha		
	China	Cheong-banha		
<i>A. amurensis</i> (天南星)	Korea, China	The first method	ND	ND
		The second method		
<i>A. ciliare</i> (草烏)	Korea, China	The first method	ND***	ND***
		The second method		
<i>S. baicalensis</i> (黄芩)	Pong-wha, Korea	Ju-whangkeum	160 \pm 05**	188 \pm 07
		Whangkeum-tan	460 \pm 26***	390 \pm 18***
	China	Ju-whangkeum	257 \pm 17***	320 \pm 10***
		Whangkeum-tan	220 \pm 10**	280 \pm 09***

Note. SRB assay : Sulforhodamine B assay, IC₅₀ : 50% inhibition of cell growth, IC₅₀ values were calculated from PCS program. ND : not determined, IC₅₀ > 4mg/ml. Means \pm standard deviation of triplicate experiments. **: p<0.01, ***: p<0.001

Table 4. IC₅₀ values of Korean processed herbs for monkey kidney cell (Vero) and human liver cell (WRL68) by MTT assay.

Scientific name of herb	Place of production	Methods of processing	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
			Vero	WRL68
<i>P. ternata</i> (半夏)	Cheju & Cheong-seon, Korea	Kang-banha	ND	ND
		Beob-banha		
	China	Cheong-banha		
<i>A. amurensis</i> (天南星)	Korea, China	The first method	ND	ND
		The second method		
<i>A. ciliare</i> (草烏)	Korea, China	The first method	ND***	ND***
		The second method		
<i>S. baicalensis</i> (黄芩)	Pong-wha, Korea	Ju-whangkeum	240 \pm 5*	245 \pm 22
		Whangkeum-tan	332 \pm 18***	365 \pm 16***
	China	Ju-whangkeum	289 \pm 11***	270 \pm 10**
		Whangkeum-tan	257 \pm 13**	290 \pm 10**

Note. MTT assay : Tetrazolium-based colorimetric assay, IC₅₀ : 50% inhibition of cell growth, IC₅₀ values were calculated from PCS program. ND : not determined, IC₅₀ > 4mg/ml. Means \pm standard deviation of triplicate experiments. **: p<0.01, ***: p<0.001

IV. 考 察

한약의 修治기술은 인류가 불을 이용하게 된 후부터 발전하였다. 炮製의 방법은 크게 火製, 水製, 水火共製의 세가지로 대별할 수 있으며, 한약의 修治는 과학적인 증명과 이론적 뒷받침은 없으나 수천년에 걸쳐 전수되어진 선조들의 실제적 경험적인 방법이다. 한약재를 修治하는 목적은 첫째 약물의 독성과 부작용을 없애거나 줄여주며, 둘째 치료효과를 증강시켜 주고, 셋째 약성을 완화 시키며 약의 歸經을 바꾸어 주고, 넷째 약의 조제나 제제에 편리하며 다섯째 약물의 순도를 증강시켜 준다⁷⁻⁹⁾.

한약의 修治는 오랜 역사를 가지고 발전하여 왔으며 옛부터 炮炙, 炮製, 修治, 修製, 修事 등으로 불려왔으며 조선말기에 본초강목의 영향으로 修治라는 용어로 통용되어 현재도 널리 쓰이고 있다. 우리나라의 炮製기술은 고려시대 부터 상당한 수준에 이른 것으로 알려졌으며 이를 기초로 하여 조선시대의 “*鄉藥集成方*”의 향약본초편의 “*諸品藥石炮製法度*”에 203종의 한약재에 대해 修治 기술을 수록하고 있다.

한약재에 대한 독성연구를 통한 올바른 정보의 제공은 의료의 질적인 향상에 있어서 중요한 요소이다. 세포배양과 생리활성측정 기술이 급속히 발전되어 독성작용을 효과적으로 분석하려는 방법들이 최근 많이 개발되고 있는 것에 힘입어 한약재의 독성을 *in vitro*계에서 검사할 수 있는 새로운 검사법에 대한 중요성이 한층 요구되고 있다. 한약재의 독성에 대한 연구는 주로 동물실험(*in vivo*)을 통한 급만성 연구인데, 동물실험은 많은 시간과 인력이 필요로 하는 결점을 가지고 있어 이러한 결점을 보완하고 *in vitro*계에서 독성을 예측할수 있는 검사법이 확립된다면, 기존의 급만성 독성 검사가 가지고 있는 문제점들을 해결하는데 많은 도움을 줄 것이다.

본 연구에서 원숭이의 신장세포(Vero)와 사람의 간세포(WRL68)를 이용하여 한약재의 修治前과 後를 SRB법과 MTT법으로 정상세포에 대한 독성을 비교 조사 하였는데, 한약재의 품목에 따라 세포독성의 검사는 효과적이라는 사실이 예견되었고, 修治 한약재의 경우 선조들이 지혜가 실용적이고 경험적인 사실임이 입증되는 결과를 얻을수 있었다.

半夏는 大毒하여 生品은 外用에만 쓰고 修治 후에는 毒性이 저하되어 藥性이 緩和되므로 內服할 수 있다고 알려져 있다. 그리고 修治法에는 靑半夏, 薑半夏, 法半夏 등이 있으며, 靑半夏는 燥濕化痰 작용이 증가되고 薑半夏는 降逆鎮嘔작용이 증가되고, 法半夏는 和胃調脾 작용이 증가되고 祛濕祛痰한다⁸⁾고 하였다.半夏의 修治에 있어서 공통적인 浸漂과정으로 맑은 물을半夏보다 15cm정도 높게 부어 7-10일 간 담그되 매일 2-3회 물을 갈아주는데, 일주일 정도 물을 갈아주면 하얀거품과 좋지 않은 냄새가 발생하므로 환기가 잘되는 장소에서 修治하는 것이 좋다. 天南星은 生品일 때 辛溫燥烈하여 外用에 주로 이용되지만 修治 후에는 독성이 줄어들고 燥濕化痰작용이 증강된다⁹⁾. 天南星 修治 중 1法과 2法에 있어서 2-3주일 정도 물에 담그는 과정이 있는데 이때 고약한 악취가 나므로 통풍이 잘되는 서늘한 장소에서 작업하는 것이 좋다고 하였다.半夏와 天南星은 Vero와 WRL68에 대해 SRB법과 MTT법에 의한 세포 독성이 修治前과 後에 발현되지 않았다.半夏와 天南星은 Araceae(天南星과)로 동일과에 속하는 약재이며,半夏는 鎮吐, 鎮咳祛痰, 胃液分泌抑制, 血液下降作用 등이 보고되고 있으며¹⁰⁾, 天南星은 祛痰, 鎮靜, 抗癌變作用 등이 보고되고 있다¹¹⁾. 특히 Hinoki들은 生半夏, 法半夏, 薑半夏에 대한 진토작용실험에서 生半夏와 修治半夏 모두에서 42~84%의 구토억제작용을 확인하였다¹⁰⁾. 이들 약재의 약리성분이나 대사에 관한 연구는 미미한 편으로 아직 확실히 알려지지 않고 있다. 장은 사염화탄

소(CCl₄)에 의한 간손상 마우스를 작제하여 半夏의 간독성에 대한 효과를 연구한 결과 간에 전혀 영향을 주지 않는다고 보고하였다¹²⁾. 半夏와 天南星이 Vero와 WRL68에 대한 세포독성이 발현되지 않은 것은 간과 신장에 관련된 약리대사와는 다른 경로로 작용되고 있음을 암시하고 있어 이에 대한 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

草烏와 附子是 Ranunculaceae(미나리아재비과)에 속하는데, 附子類 한약의 주성분으로 aconitine, mesaconitine, hypaconitine 등 맹독성의 aconitine계열 알칼로이드성분과 강심작용 성분으로 알려진 higenamine 등이 보고되고 있다¹³⁾. 이들 중 aconitine계열 알칼로이드들은 修治과정에서 가수분해, 에스테르교환반응, 산화등의 과정을 거쳐 저독성인 물질들로 변하거나 lipoaconitine계열의 친수성이 낮은 물질로 변화됨이 밝혀 졌다¹⁴⁾. 附子是 生品일 때 大毒하여 국내에서는 修治되어진 형태인 中國産 唐炮附子和 京炮附子が 시판되고 있다. 반면에 草烏는 국내에서 야생으로 채집되어 修治하지 않은 상태로 시판하고 있다. 草烏의 1법과 2법에 의한 修治과정에서 맑은 물에 침포중 탁하고 진한 갈색물이 많이 나왔고 修治후 질감이 연해졌다. 본 연구 결과에서 국내산 草烏가 중국산보다 Vero와 WRL68에 대해 SRB법과 MTT법에 의한 세포 독성이 낮게 나타났는데, 이는 원식물의 종류, 산지, 채집시기 등에 의해 품질의 량적 혹은 질적 변화가 현저하게 나타나기 때문에 독성에도 영향을 주고 있다고 추측된다. 附子의 경우 세포독성은 SRB법에서는 세포독성이 발현되지 않았지만 MTT법에서는 세포독성이 나타내는데, 이는 세포독성을 분자레벨에서 측정할 때 생리활성의 방법을 신중히 선택하여야 한다는 것을 확인 시켜주는 결과이고, 京炮附子が 唐炮附子보다 Vero세포와 WRL68에서 낮은 농도로 세포독성이 나타난 결과는 시판하고 있는 附子를 사용할 때 주의할 요해야 하는 흥미로운 사실이다.

黃芩은 生用時에는 解熱, 瀉火力이 강하여 濕熱證등에 쓰이며, 酒製 후에는 寒性이 緩和되고, 血分에 들어가 술의 힘으로 升性의 능력이 있어 眼赤痛, 上部의 血熱出血, 上焦의 肺熱과 下肢의 濕熱을 治療하며 苦寒한 성능이 緩和된다⁸⁾. 黃芩炭은 解熱, 止血의 효능이 있어서 出血中에 자주 쓰이는 것으로 알려져 있다. 酒黃芩시 약주를 뿌려 담가둘 때 술이 내부까지 흡수되는 정도를 눈으로 구별하기가 어려웠고, 약한불로 가열하여 볶을 때 술의 점성으로 인하여 쉽게 타버리므로 주의해야 된다고 생각한다. 또한 黃芩炭에 있어서는 센불로 가열시에 술이 달궈져 불꽃이 일어나려 하는 것을 막기가 힘들었다. 黃芩은 修治前과 後에 간과 신장세포에서 강한 독성을 나타내고 있어 이에 대한 연구가 좀 더 진행되어야 한다고 생각한다. 黃芩의 대표적인 지표성분으로 baicalin, baicalein, wogonin 등이 있으며, 특히 baicalin은 모세혈관 투과성 항진작용이 보고되고 있는데¹⁵⁾, 이들의 개별 성분에 관해 원숭이의 신장세포(Vero)와 사람의 간세포(WRL68)에 대한 세포독성을 조사할 필요가 있다.

본 연구에서는 원숭이의 신장세포(Vero)와 사람의 간세포(WRL68)를 이용하여 修治前과 後를 SRB법과 MTT법으로 세포독성을 조사하였는데, 한약재의 세포독성 검사는 검사방법이 간편하고 짧은 시간에 많은 수의 시료를 처리할 수 있다는 장점을 가지고 있으나, 단점으로는 검사방법의 다양화와 세포의 선택 그리고 검사기술의 고난도라는 점을 들 수 있겠다. 이러한 단점을 보완한다면 동물을 이용한 독성 검사법의 보조 검사방법으로 활용함이 바람직하다.

한약재의 修治는 문헌상에 자세히 설명되지 않아서 재현하는데 어려움이 있었으며 앞으로 구체적이고 체계적인 修治방법을 마련을 위해 문헌상의 고찰뿐만 아니라 한의계에서 전통적으로 전해오는 경험적인 방법의 수집도 필요하다고 생각한다.

V. 結 論

본 연구에서 원숭이의 신장세포(Vero)와 사람의 간세포(WRL68)를 이용하여 半夏, 天南星, 草烏, 黃芩 그리고 附子(京炮附子, 唐炮附子)에 대해 修治前과 後를 SRB법과 MTT법으로 독성을 비교조사 하였는 바, 다음과 같이 결과를 얻을 수 있었다.

- 半夏와 天南星은 Vero와 WRL68에 대해 SRB법과 MTT법에 의한 세포 독성이 修治前과 後에 발현되지 않아, 간과 신장에 관련된 약리대사와는 다른 경로로 작용되고 있음을 암시하고 있다.
- 附子の 경우 세포독성은 SRB법에서는 세포독성이 발현되지 않았지만, MTT법에서는 세포독성이 나타는데, 이는 세포독성을 분자레벨에서 측정할 때 생리활성의 방법을 신중히 선택하여야 한다고 생각된다.
- 京炮附子가 唐炮附子보다 Vero세포와 WRL68에서 낮은 농도로 세포독성이 나타난 결과는 시판하고 있는 附子를 사용할 때 주의를 요해야 한다.
- 黃芩은 Vero세포와 WRL68에서 修治후 세포독성이 감소되었지만 修治前과 後에 강한 毒性을 나타내고 있어 이에 대한 연구가 좀 더 진행되어야 한다.

이상 한약재의 품목에 따라 세포독성의 검사는 효과적이라는 사실이 예견되었고, 수치한약재의 경우도 선조들이 지혜가 실용적이고 경험적인 사실임이 입증되는 결과를 얻을 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 한약재의 세포독성 검사는 독성 검사법의 보조 검사방법으로 활용할 수 있다고 본다. 또한, 본연구의 결과들은 한약재의 세포독성을 검사할 수 있는 키트의 개발에 기초자료로 활용할 수 있다.

참고문헌

1. 신민교, 박 경, 맹응재 공역, 俞孝通, 盧重禮, 朴允德編纂, 國譯鄉藥集成方(俞孝通, 盧重禮, 朴允德編纂, 1431년), 永林社, p1705~1726, 1989.
2. ヒキノヒロシ, 山田千鶴子, 中村和子, 佐藤博, 大泉康, 遠藤勝也, 附子の修治に伴うアルカロイド組成と急性毒性の變化; 藥學雜誌, 97(4), 359-386, 1977.
3. 안병준, 천연물화학에서 보는 동의학; 한·중 국제공동세미나 "전통동양의학연구 및 신동의약 개발", 서울대학교 천연물화학연구소, p166~190, 1995.
4. Rhee, J. K., Woo, K. J., Baek, B. K. and Ahn, B. Z., Screening of the wormicidal chinese raw drugs on Clonorchis sinensis; Am. J. chinese. Med., 10, 227-283, 1981.
5. Alley, M. C., Scudiro, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. I., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H. and Boyd, M. R., Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay; Cancer Res., 48, 589, 1988.
6. Skehan, P., Strong, R., Scudiero D. A., Monks, A., McMahon, J., Vistica, A.D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenny, S. and Boyd, M. R., New colorimetric cytotoxicity assay for Anticancer-Drug Screening; J. Natl. Cancer Inst., 82, 1107, 1990.
7. 김완희, 양기상, 김길환, 홍무창, 한의학원론, 정보사, p427~430, 1982.
8. 김재길, 임상응용 한약포제학, 약업신문사, p20~30, p275~278, 1992.

9. 신민교, 임상본초학, 영림사, p744~747, 1997
10. 柴田承二, 眞木俊夫, 半夏の化學: 現代東洋醫學, 9(2), 42~53, 1988.
11. 高木敬次郎, 木村正康, 原田正敏, 大塚恭男, 和漢藥物學, 南山堂, p176~177, 1983.
12. Chang, I.-M. Plants with liver-protective activities: Pharmacology and toxicology of Aucubin, in Advances chinese Medicinal Material Research, p269-285, World Scientific Pub. Co., Singapore, 1985
13. ヒキノヒロシ, 附子の生理活性: 現代東洋醫學, 2(3), 44~49, 1981.
14. 윤혜숙, 부자성분의 작용에 관한 검토: 한·중 국제공동세미나 "전통동양의학연구 및 신동약 개발" 서울대학교 천연물화학연구소, p143~153, 1995.
15. 江田昭英, 黃芩の藥理: 現代東洋醫學, 8(4), 44~49, 1987.