

靑黛와 生地黃의 항염 및 항산화 효과에 대한 실험적 연구

서형식

상지대학교 한의과대학 안이비인후피부과

The Experimental Study on Anti-inflammation and Anti-oxidation of *Indigo Naturalis* and *Rehmanniae Radix*

Hyeong-Sik Seo

Objectives : This experiment study was performed to investigate the anti-inflammation and anti-oxidant effects of *Indigo Naturalis*(IN) and *Rehmanniae Radix*(RR) which were herbs for clearing heat.

Methods : Anti-inflammation and anti-oxidation effects of IN and RR that were measured by the inhibitory ability of Nitric oxide(NO) production and the scavenging for 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical.

Results : 1. IN and RR groups were not showed cell toxicity.

2. In the inhibitory ability of NO production, IN groups were better than RR groups, but there were no statistical significances among the groups.

3. In the scavenging for DPPH radical, IN groups were better than RR groups, but there were no statistical significances among the groups.

Conclusions : These results showed that the IN group was better than the RR group in treating skin eruptions, especially those such as erythema, purple spot, papule, pustules which appear in acute inflammation.

Key word : *Indigo Naturalis*, *Rehmanniae Radix*, Anti-inflammation, anti-oxidation, NO, DPPH.

Ⅰ. 緒 論

최근 스트레스의 증가와 여러 가지 유해 물질들에 의해서 민감성 피부의 비율이 증가하고, 자연 친화적인 한방 성분을 원료로 하는 제품들을 선호하는 경향이 증가함에 따라 韓藥을 원료 성분으로

교신저자 : 서형식, 상지대학교 부속한방병원 안이비인후피부과
(Tel: 033-741-9266, E-mail: aran99@sangji.ac.kr)

• 접수 2008/11/04 • 수정 2008/11/25 • 채택 2008/12/04

※이 논문은 2007년도 상지대학교 교내 연구비 지원에 의한 것임.

하는 제품의 개발이 이루어지고 있다. 그러나 대부분 피부보습 및 피부탄력과 같은 미용적 측면이 강조된 제품의 개발이 주를 이루는 있으며, 염증성 피부질환을 치료하는 제품의 개발은 부족한 상태이다.

靑黛는 淸熱解毒藥으로 淸熱解毒, 涼血散腫의 효능이 있어 濕疹, 口瘡, 瘡癤을 治하고, 生地黃은 淸熱涼血藥으로 淸熱生津, 涼血止血의 효능이 있어 濕疹, 蕁麻疹을 治하여¹⁾ 靑黛와 生地黃은 血熱로 인한 염증질환에 응용할 수 있는 韓藥이다.

피부질환은 여러 가지의 자각 증상과 더불어 피부의 표면에 발진의 양상으로 표현되며, 紅斑, 紫斑, 丘疹, 膿疱, 膨疹, 鱗屑, 結痂, 皸裂, 抓痕 등이 血熱로 인해 유발²⁾되는 발진이며, 이러한 발진은 다양한 피부질환의 염증에서 보이는 소견이다. 靑黛와 관련된 연구로는 항염 효과³⁾에 대한 연구가 있었고, 生地黃과 관련된 연구로는 접촉성피부염⁴⁾, 항염^{5,6)}, 당뇨^{7,8)}, 암⁹⁾에 대한 연구가 있어 주로 항염에 관해 이루어졌으며, 항산화와 함께 진행된 연구는 없었다. 활성산소는 면역활동 등 생명에 필수적인 역할¹⁰⁾을 하며, 각종 염증반응에 있어서도 관여¹¹⁾되므로 항염과 함께 항산화에 대한 연구를 살펴보는 것이 염증성 피부질환에 응용할 수 있는 韓藥을 연구하는데 도움이 될 것으로 생각된다. 이에 저자는 염증성 피부질환을 진정시키기 위한 목적으로 靑黛와 生地黃에 대한 독성, 항염, 항산화효과에 대한 간략한 실험연구를 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 약 물

본 실험에 사용된 한약재는 靑黛 30 g, 生地黃

100 g 을 상지대학교부속한방병원에서 엄선하여 실험 사용하였다.

2) 균주 및 세포주

독성 및 항염에 사용된 Raw 264.7(Mouse Macrophage cell line) 세포주는 한림대학교 TIC에서 분양 받아 사용하였다.

3) 시약 및 기기

실험에 사용한 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-gel)- 2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT), N^G-methyl-L-arginine acetate salt(L-NMMA), Lipopolysaccharide(LPS) 시약들은 Sigma(USA)에서 구입하여 사용하였으며, ELISA reader(Perkin-Elmer, Foster City, CA) 등의 기기를 실험에 사용하였다.

2. 方法

1) 시료조제

靑黛 30 g은 분말을, 生地黃 100 g은 분쇄기를 이용하여 분말로 만들고 2차 증류수 1 l 와 혼합하여 약탕기로 100℃에서 150분 동안 추출하고 회전 감압농축기를 이용 완전 농축하여 각각 30 mM NaOH 용매제를 이용하여 20 mg/ml의 농도로 solution을 만들고 0.45 μm의 주사기 필터로 여과한 후 시험 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 균주 및 세포 배양

Raw 264.7 cell을 10% FBS(fetal bovine serum), penicillin(100 units/ml), streptomycin(100 units/ml)이 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지로 5% CO₂, 37℃에서 배양하였으며, 배지는 3~4일 간격으로 교체하고 배양 용기에 90%이상 자라게 되면 계대 배양하여 실험에 사용하였다¹²⁾.

3) 세포 독성 측정

96 well plate 에 1×10^4 cells/well의 농도로 Raw 264.7 cell을 접종하여 24 시간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, 각 시료의 농도가 20, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 후 MTT 시약을 각 well에 첨가하고, 4시간 동안 항온기에서 반응시킨 후, MTT 시약이 함유된 배지를 제거하였다. 각 well에 100 μl acid iso-propanol(0.04N HCl in iso- propanol)을 첨가하여 30분간 교반하여 주고, ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광값을 측정하였다¹³⁾.

4) 항염 효능 측정

96 well plate에 5×10^4 cells/well의 농도로 Raw 264.7 세포를 접종한 후 24시간 배양하였다. 배양 후 시료의 최종 농도가 각각 20, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도가 되도록 세포에 처리하고 염증 반응 유도 인자인 LPS를 100 mg/ml 의 농도로 처리하였다. 24시간 배양 후 배지를 이용하여 Nitric oxide(NO)의 생성 정도를 측정하였다¹⁴⁾. 96 well plate에 세포배양액 50 μl 와 Griess 시약 50 μl 를 혼합하여 10분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광값을 측정하였다. 양성 대조군으로는 NO 생성 억제제인 L-NMMA를 50 μM 이 되도록 시험 시료와 같은 방법으로 처리하여 시험 시료의 NO 생성 저해능을 비교하였다.

5) 항산화 효능 측정

DPPH의 환원성을 이용하여 시료의 DPPH 라디칼 소거효과를 측정하였다. DPPH를 메탄올에 용해시켜 0.1 mM DPPH 용액 1 ml에 시료를 각 농도별로 제조하여 1 ml씩 넣어주고 잘 혼합하여 준 후, 실온에서 10분간 반응시킨 뒤 565 nm에서 흡광값을 측정하였다¹⁵⁾.

6) 통계분석

모든 실험 결과는 평균 \pm 표준편차로 표기 하였고 통계적 유의성은 one-way ANOVA로 하였으며 p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

III. 實驗結果

1. 세포 독성 평가

세포 독성에 대해 실험한 결과, 20, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 청대 및 생지황 추출물은 독성을 나타내지 않았다.

Table 1. The Cytotoxic Effect of *Indigo Naturalis* and *Rehmanniae Radix* Extract on Macrophage Raw 264.7 Cells by MTT Assay

Group	세포생존율(%)	D
control	99.3 \pm 0.9	a
IN 20 $\mu\text{g/ml}$	98.7 \pm 6.3	a
IN 50 $\mu\text{g/ml}$	99.6 \pm 2.5	a
IN 100 $\mu\text{g/ml}$	85.6 \pm 7.7	a
RR 20 $\mu\text{g/ml}$	101.6 \pm 2.6	a
RR 50 $\mu\text{g/ml}$	92.3 \pm 13.7	a
RR 100 $\mu\text{g/ml}$	88.9 \pm 23.6	a

Statistical significances were tested by oneway ANOVA among groups.(p<0.05)

D: The same letters indicate non-significant difference between groups based on Duncan's multiple comparison test.

IN; *Indigo Naturalis*

RR; *Rehmanniae Radix*

2. 항염 효능 평가

항염효능에 대해 실험한 결과, 청대 추출물은 20 $\mu\text{g/ml}$ 에서 6.1 \pm 3.1%, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 10.0 \pm 7.1%, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 14.1 \pm 2.3%의 NO 생성 저

해능을 나타냈으며, 생지황 추출물은 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $5.4 \pm 0.7\%$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 $6.6 \pm 2.5\%$ 의 NO 생성 저해능을 나타내 청대 추출물이 생지황 추출물보다 높게 나타났다.

Table 2. Inhibitory Effects of *Indigo Naturalis* and *Rehmanniae Radix* Extract on NO Production in LPS-induced Macrophage Raw 264,7 Cells

Group	NO 생성 저해능(%)	D
NMMA 50 $\mu\text{g/ml}$	65.1 ± 10.5	b
IN 20 $\mu\text{g/ml}$	6.1 ± 3.1	a
IN 50 $\mu\text{g/ml}$	10.0 ± 7.1	a
IN 100 $\mu\text{g/ml}$	14.1 ± 2.3	a
RR 20 $\mu\text{g/ml}$	-	a
RR 50 $\mu\text{g/ml}$	5.4 ± 0.7	a
RR 100 $\mu\text{g/ml}$	6.6 ± 2.5	a

Statistical significances were tested by oneway ANOVA among groups.(p < 0.001)

NO: Nitric oxide

LPS: Lipopolysaccharide

D: The same letters indicate non-significant difference between groups based on Duncan's multiple comparison test.

NMMA: NG-methyl-L-arginineacetatesalt

-: No inhibition

IN; *Indigo Naturalis*

RR; *Rehmanniae Radix*

3. 항산화능 평가

항산화능에 대한 실험 결과, 청대는 20 $\mu\text{g/ml}$ 에서 $42.1 \pm 0.7\%$, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $49.2 \pm 0.0\%$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 $62.9 \pm 6.0\%$ 의 DPPH 라디칼 소거능을 나타냈고, 생지황은 20 $\mu\text{g/ml}$ 에서 $21.6 \pm 14.1\%$, 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 $26.4 \pm 8.6\%$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 $31.5 \pm 4.1\%$ 의 DPPH 라디칼 소거능을 나타내 청대추출물이 생지황 추출물보다 높게 나타났다.

Table 3. Scavenging Effects of *Sulfur* Extract on DPPH Radical

Group	DPPH 라디칼 소거능 (%)	D
Quercetin 10 $\mu\text{g/ml}$	79.4 ± 4.2	e
IN 20 $\mu\text{g/ml}$	42.1 ± 0.72	b,c
IN 50 $\mu\text{g/ml}$	49.2 ± 0.0	c,d
IN 100 $\mu\text{g/ml}$	62.9 ± 6.0	d
RR 20 $\mu\text{g/ml}$	1.6 ± 14.1	a
RR 50 $\mu\text{g/ml}$	26.4 ± 8.6	a,b
RR 100 $\mu\text{g/ml}$	31.5 ± 4.1	a,b,c

Statistical significances were tested by oneway ANOVA among groups.(p < 0.01)

DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

D: The same letters indicate non-significant difference between groups based on Duncan's multiple comparison test.

IN; *Indigo Naturalis*

RR; *Rehmanniae Radix*

Ⅳ. 考 察

천연물을 이용하여 인간의 윤택한 삶을 누리고 자 하는 노력은 오래전부터 다양한 방법으로 시도 되었으며, 최근 스트레스의 증가와 여러 가지 유해 물질들에 의해서 민감성 피부의 비율이 증가하고, 자연 친화적인 한방 성분을 원료로 하는 제품들을 선호하는 경향이 증가함에 따라 韓藥을 원료 성분으로 하는 제품의 개발이 이루어지고 있다. 과거에는 피부 보호 효과가 높은 성분을 이용하여 화장품에 첨가하는 정도로 사용하였지만, 최근에는 가공, 분리, 정제, 분석기술과 생리활성 평가 검증 기술을 접목하여 효능, 효과를 증대하며 피부에 안전한 화장품 원료의 개발이 빠른 속도로 진행되고 있다¹⁶⁾. 이로 인해 사회 전반적으로 건강과 젊음을 추구하는 well-being 문화의 확산이 이루어지면서 자연 친화적인 한방과의 접목을 다각도로 진행시키고 있다.

靑黛는 爵床科에 속한 마람의 잎이나 莖葉을 가공하여 얻은 분말이나 덩어리를 건조한 것으로 淸熱解毒, 涼血散腫의 효능이 있어 熱毒과 血熱로 인한 濕疹, 口瘡, 瘡癤에 外用 또는 內服을 통하여 治하고, 生地黃은 玄參科에 속한 다년생 초본인 지황의 신선한 뿌리로 淸熱生津, 涼血止血의 효능이 있어 血熱로 인한 濕疹, 蕁麻疹에 內服을 통하여 治한다¹⁾. 따라서 靑黛와 生地黃은 淸熱涼血의 효능이 있어 血熱로 인한 염증성 질환에 응용할 수 있는 韓藥이다.

피부질환은 여러 가지의 자각 증상과 더불어 피부의 표면에 발진의 양상으로 표현된다. 발진은 斑點, 丘疹, 結節, 腫瘍, 膨疹, 水疱, 膿疱의 원발진과 鱗屑, 擦傷, 龜裂, 痂皮, 糜爛, 潰瘍, 癩痕, 苔癬化的 속발진으로 구분¹⁷⁾되며, 이중 紅斑, 紫斑, 丘疹, 膿疱, 膨疹, 鱗屑, 結痂, 皸裂, 抓痕 등이 血熱로 인해 유발²⁾되는 발진에 해당된다. 血熱로 인하여 발생하는 발진은 다양한 염증성 피부질환에서 흔히 관찰되어진다.

활성산소는 세포구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA 등에 대하여 비가역적인 파괴 작용을 함으로써 노화는 물론 암을 비롯하여 뇌질환, 심장질환, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 자가면역질환 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다¹⁸⁾.

활성산소와 관련해서 피부과 영역에서 살펴볼 때 피부표면에 상처가 나면 세포의 막이 공기에 노출되고 어떤 자극으로 인하여 산소가 활성산소로 변화하고, 불포화지방산과 결합해서 과산화지질이 만들어지면 조직이나 세포에 해롭게 작용하면서 상처 자리와 궤양면을 폐색시켜 치유를 방해함으로써 상처가 빨리 낫지 못하고 지속적으로 오래가게 된다. 또한 활성산소는 체내의 불포화지방산과 결합하여 과산화지질을 형성하면 보습을 막고 있는 피부 최상층부의 각층을 이루는 피부의 보습 기능을 빼앗아 보습 기능이 저하되어 피부염을 더

욱 악화시키게 된다¹⁹⁾.

靑黛와 관련된 연구로는 항염 효과³⁾에 대한 연구가 있었고, 生地黃과 관련된 연구로는 접촉성피부염⁴⁾, 항염^{5,6)}, 당뇨^{7,8)}, 암⁹⁾에 대한 연구가 있었다. 靑黛와 生地黃에 관한 연구는 주로 항염에 관해 이루어졌으며, 항산화와 함께 진행된 연구는 없었다. 활성산소는 면역활동 등 생명에 필수적인 역할¹⁰⁾을 하며, 각종 염증반응에 있어서도 관여¹¹⁾되므로 항염과 함께 항산화에 대한 연구를 살펴보는 것이 염증성 질환에 응용할 수 있는 韓藥을 연구하는데 필요하리라 생각된다. 이에 저자는 靑黛와 生地黃에 대한 세포 독성, NO 생성 저해능을 통한 항염효과, DPPH 라디칼 소거능을 통한 항산화 효과를 측정하였다.

세포 독성에 대해 실험한 결과, 20, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 청대 및 생지황 추출물은 독성을 나타내지 않았다.

항염효능에 대해 실험한 결과, 청대 추출물은 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $6.1 \pm 3.1\%$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 $10.0 \pm 7.1\%$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $14.1 \pm 2.3\%$ 의 NO 생성 저해능을 나타냈으며, 생지황 추출물은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 $5.4 \pm 0.7\%$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $6.6 \pm 2.5\%$ 의 NO 생성 저해능을 나타내 청대 추출물이 생지황 추출물보다 높게 나타났다. 실험군의 NO 생성 저해능은 대조군의 $65.1 \pm 10.5\%$ 에 비해 상당히 낮게 나타났으며 실험군간의 유의한 차이는 없었다.

항산화능에 대한 실험 결과, 청대는 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $42.1 \pm 0.7\%$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 $49.2 \pm 0.0\%$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $62.9 \pm 6.0\%$ 의 DPPH 라디칼 소거능을 나타냈고, 생지황은 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $21.6 \pm 14.1\%$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $26.4 \pm 8.6\%$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $31.5 \pm 4.1\%$ 의 DPPH 라디칼 소거능을 나타내 청대추출물이 생지황 추출물보다 높게 나타났다. 실험군의 DPPH 라디칼 소거능은 대조군의 $79.4 \pm 4.2\%$ 에 비해 낮게 나타났으며 실험군간의 유의한 차이는 없었다.

전체적으로 청대 추출물이 생지황 추출물보다 항염 및 항산화능에서 나은 결과를 보여 血熱로 인한 염증성 피부질환에 다소 효과적일 것이라 생각되며, 청대 추출물의 농도에 따른 연구가 추가적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

V. 結 論

靑黛 및 生地黃 추출물의 세포 독성, NO 생성 저해능을 통한 항염효과, DPPH 라디칼 소거능을 통한 항산화효과를 측정하는 실험을 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 靑黛 및 生地黃 추출물의 20, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 세포 독성은 없었다.
2. 靑黛 추출물이 生地黃 추출물보다 NO 생성 저해능은 높았으나 실험군간 유의한 차이는 없었다.
3. 靑黛 추출물이 生地黃 추출물보다 DPPH 라디칼 소거능은 높았으나 실험군간 유의한 차이는 없었다.

參考文獻

1. 顏正華. 中藥學. 北京:人民衛生出版社. 1991; 153-4,173.
2. 李林. 實用中醫皮膚病學. 香港:海峰出版社. 1994; 29-33.
3. 유진곤, 최관호, 김용국, 강성구, 정순영, 정재호, 서형식. 구창의 외용약으로 다용되는 황백, 청대, 백반 및 오배자의 항염작용에 대한 연구. 한방안이비인후피부과학회지. 2005;18(1): 183-98.
4. 신광식, 손정숙, 김동은. 생지황(生地黃) 추출물(抽出物)이 DNCB로 유발(誘發)된 생쥐의

Allergy성(性) 접촉피부염(接觸皮膚炎)에 미치는 영향(影響). 대한한의학박제학회지. 2000;8 (1):257-79.

5. 김성범, 김경준. 생지황(生地黃)이 혈관신생, 세포생존 및 염증관련 단백질발현에 미치는 영향. 한방안이비인후피부과학회지. 2006;19 (3):22-33.
6. 채병숙, 신태용. 사이토카인 생산에 미치는 생지황메탄올추출물의 효과. 약학회지. 2006; 50(3):184-90.
7. 김정상, 나창수. 생지황(Rehmanniae Radix)과 배의 Phenolic Compound가 Streptozotocin 으로 유발된 고혈당 생쥐에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지. 2004;33(1):66-71.
8. 김정상. 생지황(Rhemanniae Radix)이 Streptozotocin 으로 유발된 고혈당 생쥐에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지. 2004;33(7):1133-8.
9. 김주연, 조옥현, 최창민. 생지황(生地黃)이 자궁경부암세포(子宮經部癌細胞)(HeLa cell)에 미치는 영향(影響). 대한한방부인과학회지. 2006; 19(1):69-80.
10. Thirry, A.M., Tassin, J.P., Blane, G. and Glowinski, J. Selective activation of the mesocortical DA system by stress. Nature 1976;263:242-4.
11. CAne A., Breton M., Koumanov K., Bereziat G. and Colard O. Oxidant-induced arachidonic acid release and impairment of fatty acid acylation in vascular smooth muscle cells. Am. J. Physiol. 1998;274(4 Pt 1):C1040-6.
12. Nam-Kyoung Kim, Jae-Hyung Jung, Shinwook choi, Chang-soon Yoon, Studies on the antioxidative effect of the BuckWheat (Fagopyrum esculentum Moench) extract and its Protective Role against Cadmium-

- mediated stress, J. Soc. Cosmet. Scientists Korea, 2005;31(2):197-206.
13. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application of proliferation and cytotoxicity, J. Immunol. Methods, 1983;65:55.
 14. S. M. Han, K. G. Lee, J. H. Yeo, H. Y. Kweon, and K. K. Park, Anti-inflammatory effect of the venom from asian honeybees(*Apis cerana* L.) on inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α in Raw 264.7 cell line, Korean J. Apiculture, 2004;19:89.
 15. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, Nature, 1958;181:1199.
 16. 엄정녀, 김주덕. 한방 화장품 구매 행동에 관한 실증적 연구. J. Soc. Cosmet. Scientists Korea, 2004;30(1):93-102.
 17. 대한피부과학회. 피부과학. 서울:여문각. 1994; 41-4.
 18. 조현열 외.五味子藥針液의 NO, DPPH 消去 및 IL-4에 대한 抑制 效果. 대한경락경혈학회지. 2003;20(1):45-55.
 19. 니와 유키에. 활성산소를 다스리면 무병장수할 수 있다. 서울. 문예출판사. 2001:140-1, 152-4.