

## 국내산 건지황과 숙지황의 생리활성 비교

안상욱\*·김영길\*·김민희\*·이현용\*·성낙술\*\*

### Comparison of Biological Activities on *Rehmannia Radix* and *R. Radix Preparata* produced in Korea

Sang Wook Ahn\* , Young Gil Kim\* , Min Hae Kim\* ,  
Hyeon Yong Lee\* and Nak Sul Seong\*\*

**ABSTRACT** : We investigated the biological activities on ethanol extracts of *R. glutinosa* and *R. glutinosa* Preparata. The result of anti-mutagenicity suggested that the ethanol extract of *R. glutinosa* Preparata showed stronger activity than that of *R. glutinosa* ethanol extract. All of the ethanol extracts showed over 50% growth inhibition of several cancer cell lines. Especially, 61% of the cell growth of Hep3B was inhibited by adding 1g/l of ethanol extract of *R. glutinosa* Preparata. In hypoglycemic activities and controlling blood pressure, 63.69% of  $\alpha$ -glucosidase and 56.58% of ACE activities were inhibited by adding 1g/l of ethanol extract of *R. glutinosa* Preparata. In general, the ethanol extract of *R. glutinosa* Preparata showed higher biological activities than those of *R. glutinosa*.

**Key words** : *R. Radix*, Antimutagenicity, Hypoglycemic activity, ACE

## 서 언

지황 (*Rehmannia glutinosa* Liboschitz) 은 현삼과에 속하는 다년생초로서, 뿌리를 채취하여 근엽과 잔뿌리를 제거하여 깨끗이 씻은 것을 생지황 또는 선지황 (*R. Radix crude*) 이라 하고 생지황을 양건한 것을 건지황 (*R. Radix*), 황주, 백주 또는 사인주로 구증구폭한 것을 숙지황 (*R. Radix Preparata*) 이라고 하며 약효를 달리하여 사용하고 있다 (Chung, 1989). 건지황은 보약, 지혈약, 이뇨약,

당뇨병, 고혈압병 등에 쓰이고 숙지황은 보약, 빈혈, 위황병, 산후쇠약, 뇌빈혈등에 쓰인다(최태섭, 1990). Jeong & Kim(1990)은 지황류가 streptozotocin 유발 고혈당 흰쥐에 미치는 항당뇨 효과를 연구하였는데 숙지황이 혈당강하작용이 가장 높았고 다음이 생지황, 건지황 순이었다고 보고하였다. 한편, Park(1993)은 실험적 신성 고혈압 백서의 신장기능에 지황수침액이 미치는 영향을 연구한 결과, 신장에 포함되어 있는 단백질 분해효소의 하나로 고혈압의 원인인 혈장 renin의 활성을 상당히 감소시킴으로써 혈압저하를 가져왔다고 보

\* 강원대학교 식품공학과 (Division of Food and Biotechnology, Kangwon National University, Chunchon, 200 - 701, Korea)

\*\* 농촌진흥청 작물시험장 (Crop Experiment Station, Rural Development Administration, Suwon, 441 - 100, Korea)

< '99. 9. 3 접수 >

고하였다. 지황에 관한 화학적인 성분들의 규명에 관한 것으로서 Tomoda et al. (1971)은 수용성 지황 추출물의 성분분석으로 15개의 아미노산, phosphoric acid, 5가지의 monosaccharides와 oligosaccharides를 확인하였다고 보고하였으며 Oshio & Inouye(1981)는 iridoid glycoside인 catalpol, leonuride, aucubin, mellitoside와 rehmannioside A, B, C, D를 단리, 구조를 규명하고 그 중 rehmannioside C, D가 혈당강하 작용이 있다고 보고하였다.

본 논문에서는 국내산 건지황과 숙지황에 대한 생리활성 탐색 및 비교를 위해  $\alpha$ -glucosidase를 이용한 혈당강하실험, ACE를 이용한 혈압저하실험, 항돌연변이원성 및 암세포 억제활성 실험을 하였다. 이러한 연구를 바탕으로 식품 및 기타 약재로서의 활용도를 높여 국내산 지황의 수요를 증진시키는 데 기여하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시료의 조제

본 실험에 사용한 건지황(*R. Radix*)과 숙지황(*R. Radix Preparata*)은 농촌진흥청 작물시험장에서 받았으며, 검체를 세절하여 추출 flask에 넣고 그 중량에 대한 10배의 95.6% (v/v) 에탄올을 넣어 50-60°C에서 12시간 동안 2회 반복 추출하였다. 얻어진 각각의 추출물들은 감압여과장치로 여과, 농축하여 동결건조한 것을 시료로 사용하였다.

### 돌연변이 유발 억제효과 실험

실험에 사용된 균주는 *Bacillus subtilis* PB 1652 rec<sup>-</sup>와 PB 1791 rec<sup>-</sup>으로써 spore agar plate를 만들어 돌연변이 물질인 MNNG(100 $\mu$ g/paper disk)와 각 추출물(50, 100 $\mu$ g/paper disk)을 혼합하여 투여하였다. 형성된 inhibition zone을 비교하여 각 추출물이 돌연변이원 물질인 MNNG의 돌연변이원성을 얼마나 억제하는지를 측정하였고 대조구는 MNNG만 처리한 것으로 하였다(Maria et al., 1995).

### 암세포의 성장저해 및 세포독성 실험

본 실험에 이용된 세포주는 ATCC로부터 구입하

여 본 실험실에서 배양해 온 것을 사용하였는데 암세포주로는 인간 유래의 간암세포(Hep3B), 폐암세포(A549)를, 정상세포로는 간세포(WRL68)를 사용하였다. 모든 세포들은 Fisher & Sartorelli(1964)법에 의하여 배양하였고 암세포의 생육저해율은 세포 단백질을 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법인 SRB assay(Doll & Peto, 1981)를 이용하였으며 세포독성 측정은 살아있는 세포의 미토콘드리아내 dehydrogenase가 노란 수용성 물질인 MTT에 의해 생성시키는 파란색 formazan을 측정하는 MTT방법을 이용하였다(Michael et al., 1988).

### 혈당강하 및 ACE활성 저해 실험

혈당강하실험은  $\alpha$ -glucosidase(Sigma Co.)를 10mM PIPES buffer에 용해시킨 10 $\mu$ l 효소액, 20mM maltose 40 $\mu$ l, 각 농도의 추출물 10 $\mu$ l를 혼합해서 37°C에서 20분간 반응시킨 후 1ml DNS시약을 첨가하고 100°C에서 10분간 열처리한 후에 550nm에서 흡광도를 측정하여 효소활성 저해율을 계산하였다(Wenling et al., 1996). 한편, 고혈압 조절기능을 확인하기 위해 ACE kit(Sigma Co.)를 이용하여 효소저해 정도를 측정하였는데 1.0ml의 ACE Reagent solution에 ACE Calibrator, 시료를 각각 0.1ml 반응시켜 340nm에서 흡광도를 측정, 비교함으로써 억제활성을 보았다(Maguire & Price, 1985).

## 결과 및 고찰

건지황과 숙지황의 에탄올 추출물의 돌연변이 유발 억제효과 검토를 위해 우선적으로 paper disk당 추출물을 100 $\mu$ g씩 접종하여 돌연변이 유발성을 검토하였는데 전혀 돌연변이원성이 나타나지 않았다. Table 1에 건지황과 숙지황의 에탄올 추출물의 돌연변이 유발 억제효과를 실험한 결과를 나타내었다. 건지황과 숙지황 모두 돌연변이 억제효과를 나타내었는데 전체적으로 숙지황 에탄올 추출물이 높은 억제를 보여주었다. 이는 숙지황 추출물에 MNNG와 균주의 DNA와 RNA와의 결합을 억제하는 물질이 건지황보다 다소 많이 함유되어 있

Table 1. Anti-mutagenicity test of Bacillus rec-assay in adding the ethanol extracts from *R. Radix* and *R. Radix* Preparata.

Samples	Amount tested ( $\mu\text{g}/\text{disk}$ ) + MNNG 10 $\mu\text{g}$	Inhibition halo diameter (cm)		Difference zone (cm)	Difference ratio (sample/MNNG)
		rec <sup>+</sup>	rec		
<i>R. Radix</i>	50	1.1	2.65	1.55	0.939
Ethanol extracts	100	1.15	2.60	1.45	0.879
<i>R. Radix</i> Preparata	50	1.15	2.70	1.55	0.939
Ethanol extracts	100	1.1	2.60	1.40	0.848
MNNG	10	1.0	2.65	1.65	1

다는 것을 추측할 수가 있다. 한편, 이러한 항돌연변이성은 항암성과 높은 상관관계가 있기 때문에 (Ramel et al., 1991) 항돌연변이원성이 있는 경우는 암세포 억제에 효과가 있을 것으로 예측된다.

이 같은 예측을 확인하기 위해 암세포에 대한 생육억제활성 결과는 Fig. 1과 2로써 숙지황 추출물이 간암세포 (Hep3B), 폐암세포 (A549)의 성장 억제가 다소 높게 나타났다. Fig. 1의 간암세포 억제를 살펴보면 숙지황 1g/l 농도에서 최고 61%의 억제율을 보인 반면 건지황은 같은 농도에서 57.8%의 억제율을 보였다. 또한 Fig. 2의 폐암세포 억제율에서도 건지황은 최고 농도인 1g/l에서

52.7%의 억제율을 보였고 숙지황은 같은 농도에서 56.3%의 암세포 억제율을 보였다. 전반적으로 건지황과 숙지황 에탄올 추출물은 폐암세포보다 간암세포의 성장에 억제가 증가됨을 알 수 있었다. 한편, 정상 간세포인 WRL68을 이용한 세포독성 (Fig. 3)은 거의 비슷하여 차이가 미미한 것으로 나타났는데 건지황 1g/l 농도에서 32.6%의 가장 높은 독성을 보였다.

한편, Fig. 1과 2에 암세포의 생육 저해 (%)에 대한 정상세포의 세포독성 (%)을 나타내는 selectivity (꺼은선 그래프)를 같이 살펴보았는데 selectivity의 수치가 1.5이상일 때 암세포에 대한

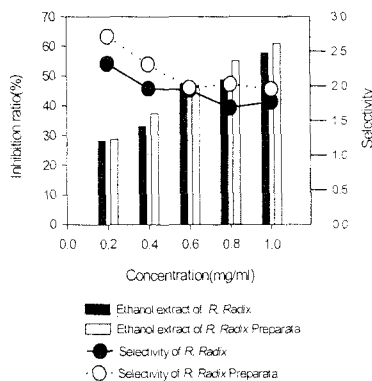


Fig. 1. Inhibition effect of the ethanol extract from *R. Radix* and *R. Radix* Preparata on the growth of Hep3B (Human hepatocellular carcinoma) and selectivity of Hep3B to WRL68.

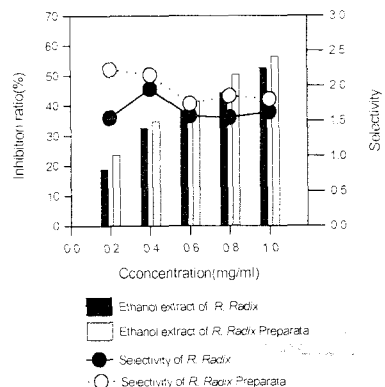


Fig. 2. Inhibition effect of the ethanol extract from *R. Radix* and *R. Radix* Preparata and the on the growth of A549 (Lung carcinoma, human) and selectivity of A549 to WRL68.

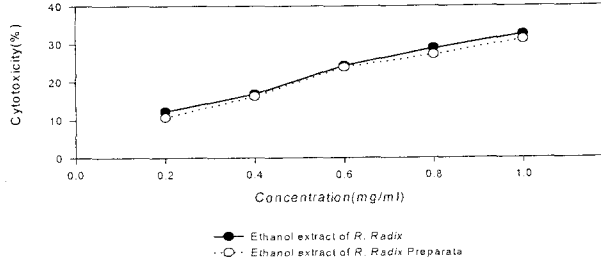


Fig. 3. Cytotoxicity of the ethanol extract from *R. Radix* and *R. Radix Preparata* on WRL68 (Human embryo, liver).

선택성이 있어 생육을 억제한다고 볼 수 있다고 한다 (Lee, 1999). 건지황과 숙지황 에탄올 추출물은 모든 농도에서 selectivity가 1.5 이상을 보여 암세포에 대한 선택성이 있는 것으로 나타났다. 혈당강화 기능검색을 위한 기질로서 maltose와 지황 추출물을 첨가하여 추출물에 의한 효소 활성 억제율을 검색한 결과 (Fig. 4)에서 숙지황 추출물은 1g/l에서 63.69%의 억제율을 보였고 건지황은 같은 농도에서 61.42%의 억제효과를 나타내었다. 이와 같은 실험을 3회 반복한 결과, 전반적으로 큰 차이는 아니지만 숙지황이 건지황보다 약간 높은 억제활성을 보여주었다.

Fig. 5는 고혈압이 발생하는 기작에서 혈압상승의 가장 중요한 요인인 angiotensin converting enzyme (ACE)에 대한 지황의 저해활성을 나타낸

것이다. 그림에서 보는바와 같이 건지황과 숙지황 에탄올 추출물은 각각 1g/l 농도에서 55.24%, 56.58%의 억제효과를 나타내고 있다. 현대사회가 점차 고령화 사회가 되면서 고혈압과 당뇨병 등의 질환이 점차 증가하고 있는 추세에 있어서 지황의 ACE저해활성은 좋은 결과라고 생각된다.

본 실험에서는 한방에서 보약으로 사용되어온 지황이 돌연변이원, 발암원에 대한 억제작용뿐 아니라 인간 유래의 암세포에 대한 생육저해 작용이 있음을 알았고 또한 혈당상승에 관여하는  $\alpha$ -glucosidase의 활성 억제작용 및 고혈압에 중요한 작용을 하는 ACE활성 저해작용을 가짐도 밝혔다. 건지황에 비해 숙지황 에탄올 추출물이 조금 우수한 생리활성을 보여 주었는데 앞으로 동물실험을 통한 생리활성 검증이 필요하겠고 생리활성 물질

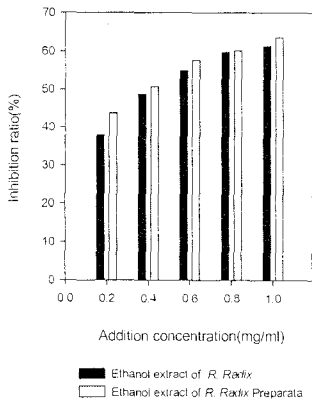


Fig. 4. Hypoglycemic effect in adding the ethanol extract of *R. Radix* and *R. Radix Preparata*.

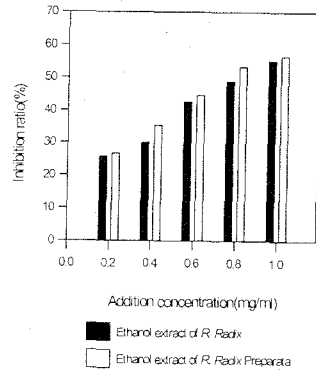


Fig. 5. Inhibition effect of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) in adding the ethanol extract of *R. Radix* and *R. Radix Preparata*.

의 순수분리를 통하여 기능성 식품 또는 신약 물질 개발으로서의 가치가 있을거라고 본다.

## 적 요

건지황과 숙지황의 에탄올 추출물에 대해 생리활성 실험을 하였는데 돌연변이 유발 억제실험에서는 MNNG의 돌연변이원성을 평가한 결과, 숙지황이 높은 억제활성을 나타내었다. 암세포 성장저해에서 건지황과 숙지황 모두 1 g/l의 농도에서 50%이상의 억제율을 보였고 특히, 숙지황은 1 g/l에서 간암세포(Hep3B)의 성장을 61%까지 억제하였다. 또한 혈당강하 및 혈압조절(ACE활성저해)에서도 숙지황이 건지황보다 우수한 생리활성을 나타내 최고 농도(1 g/l)에서 각각 63.69%, 56.58%의 억제율을 보였다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 특정연구사업의 지원으로 수행된 것으로 이에 심심한 사의를 표합니다.

## LITERATURE CITED

- Chung, H. J. 1989. Studies on variation of constituents and enzyme activities of *Rehmannia Radix* by Processing. Department of Pharmacy Graduate School of Sookmyung Woman's University. p. 1.
- Doll, R. and R. Peto. 1981. The causes of Cancer : Quantitative estimates of avoidable risks of Cancer in the United States today. J. Natl. Cancer Inst. 66(6) : 1192.
- Fisher, G. A. and A. G. Sartorelli. 1964. Development maintenance and assay of drug resistance. Meth. in Med. Res. 10 : 247-252.
- Jeong, H. J. and I. H. Kim. 1990. Comparative Studies on the Antidiabetic Activities of *Rehmannia Radices*. Chung-Ang J. Pharm. Sci. 4 : 22-31.
- Lee, J. N. 1999. Studies on screening of anticancer and immuno-regulating functions from single cell protein, photosynthetic microalga, *Spirulina platensis*. Department of food science and technology Graduate school of Kangwon National University. p. 33.
- Maguire, G. A. and C. P. Price. 1985. A continuous monitoring spectrophotometric method for the measurement of angiotensin converting enzyme in human serum. Ann. Clin. Biochem. 22 : 204.
- Maria, L. C., P. Giuseppe, P. Massimo and T. Marco. 1995. Studies on the Insecticidal Activities of Some New N-Benzol-N'-Arylureas. Pestic. Sci. 45 : 227-236.
- Michael, C. A., A. S. Domnic and M. Ahne. 1988. Feasibility of drug Screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. Cancer Res. 48 : 589-601.
- Oshio, H. and Inouye, H. 1981. Iridoid Glycosides of *Rehmannia glutinosa*. Phytochemistry. 21(1) : 133-138.
- Park, J. B. 1993. Effects of *Rehmannia Radix* Aquacupuncture at the Meridian Point BL 23 on the Renal Function in Two-Kidney One Goldblatt-Hypertensive Rats. Department of Oriental Medicine, Graduate School of Wonkang University. p. 2.
- Ramel C., U. K. Alekperov and B. N. Ames., T. Kada and L. W. Wattenberg. 1991. Inhibitions of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis. Mut. Res. 260 : 131.
- Seiko, Y., S. Kazumaxa and F. Gunki. 1996. Isolation from  $\alpha$ -Zein of Thermolysin peptides with Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activity. Biosci. Biotech. Biochem. 60(4) : 661-663.
- Tomoda, M., M. Tanka and N. Kondo. 1971. Water-soluble constituents of *Rehmanniae Radix*. II. on the constituents of Roots of *Rehmannia glutinosa* var. *purpurea*. Chem. Pharm. Bull. 19(11) : 2411-2413.
- Wenling, D., J. Tina and B. Mikael, S. Troels and R. S. Michael. 1996. Evaluation of Isofagomine and Its Derivatives as Potent Glycosidase inhibitors.

Biochemistry 35 : 2788-2795.

Yoshikawa, M., Y. Fukuda and T. Taniyama and I. Kitagawa. 1996. Chemical Studies on Crude Drug Processing IX. On the Constituents of *Rehmanniae*

*Radix*. Chem. Pharm. Bull. 44(1) : 41-47.

최태섭. 1990. 한국의 보약. 도서출판 열린책들. p 183.