

원저

顛倒散의 항산화 효과에 관한 실험적 연구

• 최관호 · 서형식

The Experimental Study of Jeondo-san on Antioxidant Effects

Kwan-Ho Choi · Hyeong-Sik Seo

ABSTRACT

- Objectives** This study was carried out to investigate the antioxidant effects of Jeondo-san(JDS).
- Methods** The antioxidant effects of JDS were measured by the scavenging for 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) radical, the formation of intracellular glutathione(GSH), the inhibition for reactive oxygen species(ROS).
- Results**
1. All concentrations of JDS showed antioxidant effect by decreasing the DPPH radicals.
 2. All concentrations of JDS did not effect on the formation of intracellular GSH in HaCaT cell.
 3. All Concentrations of JDS inhibited the production of ROS in the HaCaT cell stimulated with H₂O₂.
- Conclusion** The present date suggest that JDS has effects on the stage of inflammation.

key words Jeondo-san, Antioxidant effects, DPPH, GSH, ROS

1. 緒論

최근 연구가 활발하게 이루어지는 항산화제는 생체 내에서 산화성 스트레스로 인하여 생성되는 산화물질의 불균화 및 산화억제 기능을 위해 방어하는 물질 또는 효소를 말한다¹⁾.

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 있다²⁾.

피부과 영역에서 살펴볼 때 피부의 상처에서 피부조직의 항산화능이 낮으면 상처가 늦게 아물고, 항산화의 유도

능이 높은 환자는 상처의 흉터가 적은부분으로 빨리 아문다고 되어 있으며, 난치성인 아토피 피부질환의 환자에서는 항산화의 유도능이 건강인에 비해 매우 낮다고 연구가 되어 있다³⁾.

이처럼 피부과 영역에서의 활성산소를 억제하는 항산화에 대한 연구는 상처의 회복 및 난치성 질환의 치료에 매우 가치가 있는 연구의 한 방향이 될 수 있을 것으로 생각된다.

뮌의 《醫宗金鑑》에 수록된 顛倒散은 大黃과 硫黃, 2가지의 약물로 구성되어 淸熱解毒 淸血祛瘀의 효능을 나타내고 있어서 酒皰癬 및 肺風分刺를 치료하는 외용약으로 사용되는 良方으로 소개되고 있고⁴⁾, 顛倒散 도포에 따른 임상적 연구⁵⁾와 顛倒散이 여드름 유발균과 염증에 미치는 실

험적 연구⁶⁾가 있다.

이에 저자는 여드름 질환에 사용되는 顛倒散의 항산화 효과를 알아보기로 DPPH radical 소거능, Intracellular GSH 합성, 세포내 ROS 생성 저해능을 측정하였다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 약물

본 실험에 사용된 한약재는 《醫宗金鑑》에 수록된 顛倒散(JDS)의 처방에 따른 구성약물로 상지대부속한방병원 약제과에서 엄선하여 구입한 후 실험에 사용하였다(Table 1).

(Table 1) Prescription of Jeondo-san.

韓藥名	生藥名	重量(g)
大黃	Rhei Radix et Rhizoma	12.5
硫黃	Sulfur	12.5
Total amount		25

2) 균주 및 세포주

항산화에 사용된 HaCaT(Human Keratinocyte cell line) 세포주는 강원대학교 생화학과 김병철 교수로부터 분양받아 사용하였다.

3) 시약 및 기기

실험에 사용한 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), Griess reagent, Dimethyl sulfoxide(DMSO), Lipopolysaccharide(LPS)는 Sigma(USA)에서 구입하였으며 Fetal Bovine Serum(FBS), Penicillin-Streptomycin, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)/High glucose는 Hyclone(USA)에서 구입하였다. 기기로는 ELISA reader(Perkin-Elmer, Singapore)와 Multi-photon Confocal Laser Scanning Microscope system(Carl Zeiss Jena GmbH, Germany)을 사용하여 실험하였다.

2. 方法

1) 시료조제

JDS 25g을 분쇄기를 이용하여 분말로 만들고 2차 증류수 1ℓ 와 혼합하여 약탕기로 100℃에서 150분 동안 전탕한 후 추출하여 여과지(ADVANTEC 5C)로 여과하고 여과액을 회전감압농축기를 이용하여 완전 농축하였다. JDS를 microtube에 담은 후 100% DMSO를 이용하여 20mg/ml의 농도로 만들어 실험에 사용하였다.

2) 균주 및 세포 배양

HaCaT(Human Keratinocyte cell line) cell을 10% FBS, penicillin(100units/ml), streptomycin(100units/ml)이 첨가된 DMEM 배지로 5% CO₂, 37℃에서 배양하였으며, 배지는 3~4일 간격으로 교체하고 배양용기에 90%이상 자라게 되면 계대 배양하여 실험에 사용하였다⁷⁾.

3) 항산화 효능 측정

(1) DPPH Radical 소거능 측정

DPPH의 환원성을 이용하여 YUGHS의 DPPH Radical 소거효과를 측정하였다. DPPH를 메탄올에 용해시켜 0.1mM DPPH 용액 1ml에 YUGHS를 각 농도별로 제조하여 1ml씩 넣어주고 잘 혼합하여 준 후, 실온에서 10분 동안 반응시킨 뒤 565nm에서 흡광도를 측정하였다⁸⁾.

(2) Intracellular GSH content 측정

HaCaT 세포를 6 well plate에 1×10^5 cells/ml의 농도가 되도록 접종한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 혈청이 포함되지 않은 배지를 이용하여 YUGHS의 최종농도가 10 μ g/ml, 20 μ g/ml, 50 μ g/ml가 되도록 처리하였다. 12시간 동안 배양 후 1% Triton X-100이 포함되어 있는 PBS 완충용액을 300 μ l 넣고 scrapping한 후 30분 정도 얼음에서 세포를 용해시키고 10000 rpm, 5 min, 4℃ 동안 원심 분리 후 상층액을 이용하여 실험에 사용하였다. 96well plate에 10mM EDTA 가 포함되어 있는 0.1 M 인산 완충 용액 160 μ l, 4.8mM NADPH 10 μ l, 6 units/ml GSH reductase 5 μ l, 3.78mM 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB) 5 μ l, 시험시료 20 μ l를 넣어 총 200 μ l가 되도록 한 후 25℃에서 10분 동안 반응시켰다. 반응 후 ELISA reader를 이용하여 412nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 세포내 ROS 생성 저해능 측정

HaCaT 세포를 1×10^6 cells/ml의 농도로 96 well plate에 $100 \mu\text{l}$ 씩 접종한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 무혈청 배지를 이용하여 YUGHS의 최종 농도가 $10 \mu\text{g/ml}$, $20 \mu\text{g/ml}$, $50 \mu\text{g/ml}$ 가 되도록 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 PBS $100 \mu\text{l}$ 를 넣은 후 세척하였다. 이 과정을 3회 반복하여 수행하였다. DMSO에 녹아 있는 DCFHDA를 $20 \mu\text{M}$ (in PBS)로 희석하여 $100 \mu\text{l}$ 넣은 후 20분 동안 배양하였다. PBS $100 \mu\text{l}$ 를 넣은 후 세척하였다(3~5번 반복). H_2O_2 $100 \mu\text{M}$ (in PBS) $100 \mu\text{l}$ 를 넣은 후 ELISA를 이용하여 10분 간격으로 형광의 세기를 측정하였다($485\text{nm}/535 \text{nm}$).

4) 통계분석

모든 실험 결과는 평균±표준편차로 표기하였고 통계적 유의성은 one-way anova로 하였으며, p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

III. 實驗結果

1. 항산화 효능 평가

1) DPPH radical 소거 효능 평가

DPPH의 환원성을 이용하여 JDS의 DPPH radical 소거 효능을 측정한 결과 $20 \mu\text{g/ml}$ 농도에서는 $41.1 \pm 0.9\%$, $50 \mu\text{g/ml}$ 농도에서는 $70.3 \pm 0.3\%$, $100 \mu\text{g/ml}$ 농도에서는 $71.7 \pm 0.5\%$ 의 소거 효능을 보였으며, 유의성이 있었다(Table 2)

(Table 2) Effects of Jeondo-san on DPPH Radical Scavenging Activity

Group	DPPH radical scavenging activity(%)
Control	0 ± 2.3
$20 \mu\text{g/ml}$ Quercetin	$62.5 \pm 4.7^*$
$20 \mu\text{g/ml}$ JDS	$41.2 \pm 0.9^*$
$50 \mu\text{g/ml}$ JDS	$70.3 \pm 0.3^*$
$100 \mu\text{g/ml}$ JDS	$71.7 \pm 0.5^*$

*: Statistically significant value compared with control (p<0.05)
JDS: Jeondo-san

2) Intracellular GSH content 평가

JDS를 처리한 HaCaT 세포로부터 생성되는 Intracellular GSH의 함량을 측정하는 실험을 한 결과, 모든 농도에서 GSH 합성 촉진 효능이 없는 것으로 나타났다(Table 3).

(Table 3) The Effects of Jeondo-san on Intracellular GSH Content in HaCaT Cell

Group	Relativities of GSH content (%)
Control	100.0 ± 3.4
$10 \mu\text{g/ml}$ JDS	-
$20 \mu\text{g/ml}$ JDS	-
$50 \mu\text{g/ml}$ JDS	-

*: Statistically significant value compared with control (p<0.05)
JDS: Jeondo-san
- : No Inhibition

3) 세포내 ROS 생성 저해 효능 평가

JDS가 H_2O_2 로 자극된 HaCaT 세포에서의 ROS 생성을 저해하는 효능을 측정하는 실험을 한 결과, JDS는 $20 \mu\text{g/ml}$ 농도에서는 $36.5 \pm 1.9\%$, $50 \mu\text{g/ml}$ 농도에서는 $46.2 \pm 3.9\%$, $100 \mu\text{g/ml}$ 농도에서는 $53.0 \pm 2.3\%$ 의 생성 저해 효능이 있었으며, 유의성이 있었다(Table 4).

(Table 4) Inhibitory Effects of Jeondo-san on ROS Production in HaCaT cell stimulated with H_2O_2

Group	Inhibition Rate(%)
$\text{H}_2\text{O}_2(100 \mu\text{M})$	0
$\text{H}_2\text{O}_2+10 \mu\text{g/ml}$ Quercetin	$57.2 \pm 0.6^*$
$\text{H}_2\text{O}_2+10 \mu\text{g/ml}$ JDS	$36.5 \pm 1.9^*$
$\text{H}_2\text{O}_2+20 \mu\text{g/ml}$ JDS	$46.2 \pm 3.9^*$
$\text{H}_2\text{O}_2+50 \mu\text{g/ml}$ JDS	$53.0 \pm 2.3^*$

*: Statistically significant value compared with H_2O_2 (p<0.05)
JDS: Jeondo-san
- : No inhibition

IV. 考察

산소를 소비하고 사는 모든 생물체 내의 프리라디칼의 독성은 기정사실화됐으며, 이를 방어하는 유일한 것으로 항산화제가 알려져 있고, 생물의 노화나 질병으로부터 자신을 보호하기 위한 수단으로 발달⁴⁾하였으며, 산소를 호흡하는 생물 내에서 독성물질은 산화성 물질인 활성산소종⁵⁾으로 세포구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA 등에 대하여 비가역적인 파괴작용을 함으로써 노화는 물론 암을 비롯하여 뇌질환, 심장질환, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 자가면역질환 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다⁶⁾.

활성산소는 산소와 약간 다른 활성형의 산소로서 어떤 물질이나 아주 반응하기 쉬운 물질이며, 세균이나 곰팡이 또는 이물질에 반응 결합하여 이것을 파괴하고 살균하는 역할을 하는 물질을 말한다. 즉 활성산소는 세균을 제거하는데 효과적인 작용을 한다고 할 수 있다. 그러나 거의 모든 질병에서 볼 수 있는 발열, 통증, 부기 등의 염증반응은 국소에 과잉 유출된 활성산소가 주범으로 작용하여 나타난 증상이며, 염증 반응을 가볍게 하기 위해서는 활성산소를 효과적으로 제거하는 것이 바람직하다⁷⁾.

이처럼 활성산소는 염증작용에 있어 필수적으로 나타나는 현상이기는 하나 지나치면 인체에 해가 되는 작용을 하게 된다. 활성산소가 인체를 공격하는 방법은 3가지의 경우로 나타나는데 세포 손상이 크지 않은 딱 한번의 공격만 하고 마는 경우, 세포 손상이 꽤 큰 편인 free radical의 반응으로 또 다른 free radical이 만들어지고 이것이 또 다시 다른 물질을 공격하여 새로운 free radical을 만드는 식의 연쇄반응의 경우, 파괴력이 가장 큰 동시다발성의 공격방식으로 세포기능이나 세포구조를 완전히 파괴시키는 경우이다⁸⁾. 또한 활성산소는 지질과 반응해서 과산화지질을 형성하고 이것이 생체에 커다란 해독을 미친다⁹⁾. 따라서 과잉 형성되는 경우 이를 효과적으로 제거하는 것이 2차적인 손상을 막는 방법이 된다.

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. 난치성 질환인 아토피에 있어서도 활성산소가 아토피성 피부염 환자

의 피부 또는 체내의 불포화지방산과 결합하여 과산화지질을 형성하면 보습을 받고 있는 피부 최상층부의 각층을 이루는 피부의 보습 기능을 빼앗아 보습 기능이 저하되어 피부염을 더욱 악화시키게 된다. 또한 상처의 회복이 지연되거나 중증 아토피 환자에 있어 SOD의 유도능이 건강인에 비해 매우 낮다고 보고되어 있다¹⁰⁾.

한의학적으로도 항산화능에 있어 효과적인 처방을 연구하고 이를 임상적으로 활용한다면 향후 피부외과적 질환을 치료하는데 큰 도움이 될 수 있을 것이다. 이처럼 피부외과 영역에서의 활성산소를 억제하는 항산화에 대한 연구는 상처의 회복 및 난치성 질환인 아토피의 치료에 매우 가치가 있는 연구의 한 방향이 될 수 있을 것으로 생각된다.

뮷⁴⁾의 《醫宗金鑑》에 수록된 顛倒散은 大黃과 硫黃, 2가지의 약물로 구성되어 清熱解毒 清血祛瘀의 효능을 나타내고 있어서 酒皰癬 및 肺風分刺을 치료하는 외용약으로 사용되는 良方으로 소개되고 있고¹¹⁾, 顛倒散 도포가 여드름에 미치는 임상적 연구¹²⁾와 顛倒散이 여드름 유발균과 염증에 미치는 영향¹³⁾에 대한 연구들이 있다.

이에 저자는 여드름 질환에 사용되는 顛倒散의 항산화 효과를 알아보고자 DPPH radical 소거능, Intracellular GSH 합성, 세포내 ROS 생성 저해능을 측정하였다.

DPPH는 안정한 유리기로 cysteine, glutathione 과 같은 아미노산과 ascorbic acid, aromatic amine 등에 환원되어 탈색되므로 항산화물질의 항산화능 측정에 많이 이용되고 있다¹⁴⁾. DPPH의 환원성을 이용하여 顛倒散의 DPPH 라디칼 소거 효과를 측정한 결과 농도 의존적인 소거 효과가 있는 것으로 나타났다(Table 2).

GSH (*γ*-glutamylcysteinylglycine)는 체내에서 생성되는 강력하고 다양한 작용을 하는 항산화물질로서 항산화작용과 함께 해독작용, 면역체계를 강화시키는 작용을 한다. 이는 아미노산으로 구성되어 있는데 glycine, glutamate, cysteine으로 구성된 단백질의 일종이다. 구체적인 역할은 산화 스트레스 반응에서 GSSG를 산화시키며 O₂⁻ 라디칼과 OH 라디칼, O₂를 제거하는 것이다¹⁵⁾. 顛倒散을 처리한 HaCaT 세포로부터 생성되는 Intracellular GSH의 함량을 측정하는 실험을 한 결과 모든 농도에서 GSH 합성 촉진 효능은 없는 것으로 나타났다(Table 3).

대표적인 활성산소종(ROS)은 ¹O₂(singlet oxygen), OH (hydroxyl radical), O₂⁻ (superoxide radical), H₂O₂ (hydrogen peroxide), NO(nitric oxide) 등이 있으며 이

리한 활성산소종을 억제하는 항산화 효소로는 SOD(superoxide dismutase), CAT(catalase), GPX (glutathion peroxidase) 등이 있고 이 외에도 tocopherol(Vit.E), ascorvate(Vit.C), carotenoid (Provitamin A) 등의 많은 종류의 저분자 항산화 물질이 있으며 최근에는 BHT, BHA, Troxol C 등의 합성 항산화제도 많이 개발되어 의약품과 식품분야 등에서 이용되고 있다¹⁰⁾. 顛倒散이 H₂O₂로 자극된 HaCaT 세포에서의 ROS 생성을 저해하는 효능을 측정하는 실험을 한 결과 농도 의존적인 생성 저해 효능이 있는 것으로 나타났다(Table 4).

顛倒散의 항산화 효능을 평가하기 위한 실험결과를 종합해 보면 Intracellular GSH 합성 촉진 효능은 없었으나 DPPH radical 소거 효능과 세포내 ROS 생성 저해 효능은 모두 농도 의존적인 저해 효능을 보여 항산화 효능이 있는 것으로 생각된다.

이상의 결과를 바탕으로 顛倒散의 염증억제 효과에 대한 추가 연구가 필요하리라 생각되며, 이를 통해 여드름의 외용약으로 활용하는 계기가 되었으면 한다.

V. 結論

顛倒散의 항산화효과를 관찰하기 위하여 DPPH radical 소거능, Intracellular GSH 함량, 세포내 ROS 생성 저해능을 측정하는 실험을 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 顛倒散의 DPPH radical 소거 효능을 측정한 결과, 유의성 있는 소거 효능이 나타났다.
2. 顛倒散을 처리한 HaCaT 세포로부터 생성되는 Intracellular GSH의 함량을 측정하는 실험을 한 결과, 모든 농도에서 GSH 합성 촉진 효능이 없는 것으로 나타났다.
3. 顛倒散이 H₂O₂로 자극된 HaCaT 세포에서의 ROS 생성을 저해하는 효능을 측정하는 실험을 한 결과, 유의성 있는 생성 저해 효능이 나타났다.

參考文獻

1. 김영근. 항산화제. 서울:여문각. 2004:3,4
2. 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.
3. 니와 유키에. 활성산소를 다스리면 무병장수할 수 있다. 서울. 문예출판사. 2001:140-1, 152-4.
4. 吳謙. 醫宗金鑑. 台北:大中國圖書公司. 1984:125.
5. 홍석훈. 전도산 도포가 여드름에 미치는 임상적 연구. 대한한의학회지. 2005;26(3):74-79.
6. 최관호, 서형식. 전도산이 여드름 유발균과 염증에 미치는 영향. 한방안이비인후피부과학회지. 2007;20(2):89-101.
7. 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.
8. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, Nature, 1958;181:1199.
9. 이영진. 몸 안의 활성산소를 제거하라. 서울. KBS문화사업단. 1998:27-8.
10. 신말순 외. 장기간의 지구성 혼련이 쥐의 혈중 항산화 효소, GSH 및 지질 과산화에 미치는 영향. 운동과학. 1998;7(2):185-94.
11. 高受延. 감귤 과피에서 flavonoids 성분의 HPLC 분석 및 항산화 효과. 濟州大學校 大學院(碩士). 2005.