



대황 추출물의 항위염 작용과 유효성분에 관한 연구

황인영 · 정춘식*

덕성여자대학교 약학대학

A Study on the Antigastritic Effects of *Rheum* Species Extracts and Their Active Components

In Young Hwang and Choon Sik Jeong*

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

(Received August 20, 2013/Revised September 4, 2013/Accepted September 30, 2013)

ABSTRACT - *Rheum tanguticum* has long been used in oriental medicine as antipyretics, analgesics, anti-inflammation, aperient, hypertension medicine and medicine for skin disease. This study has investigated the effectiveness of defense for gastritis making use of *Rheum tanguticum* and its similar plants, *Rumex crispus*, *Rheum officinale*, *Rheum palmatum* and *Rheum undulatum*. Chrysophanol, chrysophanol-8-O-glc, Desoxyrhaponticin desoxyrhapontigenin, emodin, isorhaponticin, 2-methoxy-4-hydroxyanthraquinone-5-O-glc, physcion, piracetannol-3'-O-glc, resveratrol, rhaponticin and rhapontigenin are used as the components of *Rheum tanguticum*. In HCl-ethanol-induced gastritis in rat, the most effective extract was 70 percent ethanol which is of *Rheum tanguticum*, showing the inhibition of 91.8 percent to the gastric lesions. 70% ethanol extract of *Rheum palmatum* and *Rumex crispus* shown inhibition of 75.6 percent and 73.2 percent, respectively. This effectiveness is considered as acid-neutralizing capacity, anti-*H.pylori* and anti-oxidant activity. 70% ethanol extract of *Rheum tanguticum* and its component, piracetannol-3'-O-glc exhibited higher free radical scavenging activity than others. These results suggest that *Rheum* species extracts and their active components could be utilized for the treatment of gastritis. Furthermore, these results are expected to contribute the standardization with objectivity and reliability for *Rheum* species, medicinal herbs. In addition, it can contribute to the prevention of indiscriminate distribution of imitation, and the rising rate of dependence on imports of medicinal herbs, and mixing prevention of low-quality goods.

Key words : *Rheum tanguticum*, gastritis, anti-oxidant, *H.pylori*

대황은 한방에서 해열소염진통제, 사하약, 고헌압용약, 피부질환용약으로 처방에 배합되어 사용되어 왔다. 대황은 일반적으로 *Rheum*속 중 *Palmata*절의 약용종인 錦紋系 4종을 기본종으로 하여 이들의 중간 잡종까지를 지정하고 있고 종대황은 *Rhapontica* 절의 비약용종인 土大黃系 중 *R. undulatum* L.을 지정하고 있다¹⁾. 대한약전에서는 현재 *Rheum tanguticum*(당고특대황), *Rheum palmatum*(장엽대황), *Rheum officinalis*(약용대황)를 모두 대황으로 한다²⁾. 본 연구에서는 당고특대황을 기본생약으로 하여 그 비교생약으로 양제근(*Rumex crispus*), 약용대황, 장엽대황 및 종대황(*Rheum undulatum*)을 이용하였다. 당고특대황의 성분으로는 chrysophanol, chrysophanol-8-O-glc, desoxyrhaponticin

desoxyrhapontigenin, emodin, isorhaponticin, 2-methoxy-4-hydroxyanthraquinone-5-O-glc, physcion, piracetannol-3'-O-glc, resveratrol, rhaponticin 및 rhapontigenin을 사용하였다. 현재 대황은 지표성분의 규격이 한국, 일본과 중국이 다르고, 유통시장에서 당고특대황과 종대황이 혼재되어 있으며 다양한 기원식물이 혼재되어 수입되고 있다. 따라서 당고특대황, 양제근, 약용대황, 장엽대황 및 종대황 추출물들의 위염에 대한 효능을 현대 약리학적으로 비교, 분석해보고 이를 통하여 지표성분의 확인과 제시를 통해 오랜 세월 한약재로 사용되어 온 대황의 기원이 다른 유사품 및 불량약재의 무분별한 유통, 정확한 기원의 약제에 대한 기준설정, 높아지는 한약 재수입 의존도에 따른 위품, 저질품의 혼입 방지와 객관적, 신뢰성 있는 표준규격 설정에 기여할 것으로 생각된다.

이를 위하여 대표적인 공격인자인 과다한 위산에 대한 중화능을 알아보는 실험으로 제산력시험을 실시하였고, 위

*Correspondence to: Choon Sik Jeong, College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea
Tel: 82-2-901-8382, Fax: 82-2-901-8386
E-mail: choonsik@duksung.ac.kr

염, 위궤양 및 위암의 원인 인자로 잘 알려진 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)에 대한 colonization 억제 활성을 알아보았다. 또한 강한 반응성으로 인접한 세포 성분들을 무차별하게 공격하여 위점막에 손상을 가할 수 있는 free radical의 소거 작용을 알아보기 위한 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 시험법 및 위암세포주인 AGS 및 SNU638 세포를 사용한 MTT assay를 실시하였다.

실험 재료 및 방법

재료

당고특대황과 비교생약으로 사용한 양제근, 약용대황, 장엽대황 및 종대황의 물 및 70% 에탄올 추출물과 당고특대황의 성분인 chrysophanol, chrysophanol-8-O-glc, desoxyrhaponticin desoxyrhapontigenin, emodin, isorhaponticin, 2-methoxy-4-hydroxyanthraquinone-5-O-glc, physcion, piracetannol-3'-O-glc, resveratrol, rhaponticin 및 rhapontigenin은 식품의약품안전처 생약연구과 주관 한약재평가기술과학화 연구사업단과 충남대학교 약학대학 김영호 교수님께 제공받아 사용하였다.

시약 및 기기

Fetal bovine serum (FBS), RPMI medium 1640, bacto agar, brucella broth는 Gibco (Rockville, MD, USA)제품을, MTT agent, penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA, scimetidine, ampicillin은 Sigma (St. Louis, MO, USA)제품을, hydrochloride, ethanol, methanol은 Duksan (Gyeonggi-Do, Korea) 제품을 구입하여 사용했으며 기타 시약 및 추출 용매는 분석용 일급시약을 사용하였다. 기기는 inverted microscope (Olympus), pH meter (IQ), CO₂ incubator (Forma scientific), centrifuge 5810R (Eppendorf), high speed centrifuge RT-6000 (Sorvall), AnaeroPackCampylo (Mitsubishi) 및 UV spectrophotometer UVM340 (ASIS) 등을 사용하였다.

실험동물

샘타고 (주) 에서 분양 받은 체중 180 g 내외의 Sprague-Dawley 계 웅성 흰쥐를 22±2°C 에서 2 주간 사육하여 적응시킨 뒤 실험에 사용하였으며 동물실 내의 명암은 12 시간씩 자동조절 시켰고 고형사료 (삼양사료) 및 물은 충분히 공급하였다.

위암세포주 및 균주

AGS, SNU638 cells 은 Korean Cell Line Bank (KCLB) 에서 구입하였고, 배양액은 RPMI medium 1640에 10% FBS, 100 units/mL penicillin 및 100 µg/mL streptomycin을 혼합하여 사용하였다. 세포배양액은 5% CO₂ 로 조정된 배양기 내에서 37°C 로 배양하였으며 배양된 세포는 1%

trypsin-EDTA에 부유시킨 후 사용하였다. *H. pylori*는 Korean Collection for Type Culture (KCTC)에서 구입하였다.

HCl-ethanol 에 의한 흰 쥐 위염

위염에 대한 보호 효과를 알아보기 위하여 체중 180 g 내외의 수컷 흰쥐를 사용하여 24시간 절식시킨 후, 검체를 경구 투여하고 30분 뒤에 HCl-ethanol (60% ethanol 에 150 mM HCl 을 함유) 1 mL를 경구 투여후 절식, 절수 하에 1 시간 방치한 뒤 ether 로 치사시켜 위를 적출하였다. 적출한 위를 2% formalin 수용액으로 10분간 침적하여 위 내외를 가볍게 고정된 다음 대만부를 절개하여 선위부에 발생한 손상의 길이(mm)를 현미경(×10) 하에서 측정하여 gastric lesion index로 하였다³⁾.

$$\text{*Inhibition(\%)} = (\text{Control lesion index} - \text{Sample lesion index}) / \text{Control lesion index} \times 100$$

제산력 시험법

제산력 시험법은 위산과 반응하여 제산작용을 나타내는 제제의 제산력을 구하는 시험법으로, 대한약전에 명시된 제산력 시험법을 조금 변형하여 실험하였다. 먼저 1 mg/100 µL 농도로 0.1 N HCl에 검체를 혼합 후 100 µL 또는 50 µL를 취하여 37°C의 shaking incubator에서 1시간 반응시키고 남은 산을 0.1N NaOH로 적정 하였다. 지시약은 methyl orange, 양성대조약물로 hydrotalcite를 사용하였다.

*Helicobacter pylori*군에 대한 항균활성

위염 및 위궤양, 위암의 원인인자로 잘 알려진 *H. pylori*의 생장 억제효과를 확인하기 위하여 Bae의 방법 및 Kim의 방법^{4,5)}을 조금 변형하여 실험하였다. 먼저 7 mL의 brucella agar 배지 및 7%의 horse serum이 담긴 petri dish에 해당 농도로 녹인 1 mL의 검체를 주입 하였다. 여기에 5 × 10⁵ CFU의 *H. pylori*를 분주하고 37°C에서 (AnaeroPak Campylo : 85% N₂, 10% CO₂ and 5% O₂) 3 일간 배양하였다. 양성대조군으로써 ampicillin을 사용하였다.

DPPH 시험법

*In vitro*에서의 직접적인 free radical scavenging 효과를 측정하고자 DPPH radical 제거 활성을 측정하였다. 즉 시료를 각각의 농도가 되도록 조제하고 400 µL씩 튜브에 취한다. 여기에 1.5 × 10⁻⁴M DPPH/ methanol 용액 100 µL를 가한 다음 잘 혼합하고 실온에서 30분간 방치한 후 520 nm에서 흡광도를 측정한다. 항산화 효과는 DPPH radical을 50% 제거하는 농도(IC₅₀)로 표시하고, 양성대조약물로 L-ascorbic acid를 사용한다⁶⁾.

$$\text{*Inhibition(\%)} = (\text{Absorbance}_{\text{control}} - \text{Absorbance}_{\text{sample}}) / \text{Absorbance}_{\text{control}} \times 100$$

MTT assay

MTT assay 는 생존 암세포의 탈수소 효소 작용을 이용하여, 항암물질에 의해 암세포가 사멸 또는 증식 억제되는 정도를 결정하는 실험법이다. Cell suspension 용액을 96 well 에 똑같이 나누는 후, 배지 100 μ L 를 넣고, CO₂ incubator (37°C, 5% CO₂) 에서 24시간 보관하였다. 24시간 후 배지를 갈아주고, 미리 결정한 농도의 약물을 넣었다. 24시간 후 MTT 시약 100 μ L 를 넣었다. 4시간 후 보라색 결정이 바닥에서 떨어지지 않게 조심스레 용액을 제거하여 DMSO 로 녹인 후 96 well plate에 옮겨 흡광도를 측정하였다⁷⁾.

$$\text{*Inhibition(\%)} = \frac{(\text{Absorbance}_{\text{control}} - \text{Absorbance}_{\text{sample}}) / \text{Absorbance}_{\text{control}} \times 100}$$

통계처리

모든 실험결과는 평균치와 표준오차를 계산하고, 각 군간의 차이는 Student' *t*-test를 사용하여 $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

HCl-ethanol에 의한 흰 쥐 위염

에탄올의 경구투여는 위장점막 방어 체계를 손상시켜 위장점막의 necrosis와 apoptosis를 가속화 시킨다. 따라서 *in vivo* 에서의 에탄올 유발, 위 손상 모델은 급성 위염의 pathogenesis로 신뢰할 수 있는 도구로 간주되고 있으므로 동물모델을 사용하여 HCl-ethanol로 유발된 위염에 대한 효과를 알아보려고 실험한 결과, 대조군의 경우 위 손상 지수가 112.8 ± 17.0 mm인 것에 비하여 물 및 70% 에탄올 추출물 500 mg/kg 투여시 당고특대황은 각각 61.4 ± 28.6 mm(45.6%), 9.2 ± 5.3 mm(91.8%)로, 양제근은 각각 64.0 ± 21.2 mm(43.3%), 30.3 ± 18.8 mm(73.2%)로, 약용대황은 각각 52.1 ± 25.8 mm(53.8%), 57.0 ± 19.6 mm(49.5%)로, 장엽대황은 각각 39.5 ± 17.3 mm(65.0%), 27.5 ± 15.0 mm(75.6%)로, 그리고 종대황은 각각 32.7 ± 24.3 mm(71.0%), 58.0 ± 25.4 mm (48.6%)로 억제하였다. 양성대조군으로 사용한 hydrocortisone은 100 mg/kg 투여시 63.1 ± 10.5 mm(44.1%)로 위 손상지수를 억제하였으며 cimetidine은 59.2 ± 8.3 mm (47.5%)로 억제하였다. 실험에 사용한 당고특대황과 비교 생약들 중 당고특대황의 70% 에탄올 추출물 투여시 91.8%로 가장 높은 위손상 억제를 보였다(Table 1).

제산력 시험법

과다한 산은 위손상에 있어 대표적인 공격인자로 작용한다. 제산제는 위산의 중화 작용으로 위염과 위궤양의 치료에 있어 위 내의 산성 조절 및 신속한 통증완화 작용을 한다⁸⁾. 제산력 시험법은 0.1N HCl을 사용하여 인공적인

Table 1. Effect of *Rheum tanguticum*, *Rumex crispus*, *Rheum officinale*, *Rheum palmatum* and *Rheum undulatum* on HCl-ethanol-induced gastritis in rats

Treatment	Extraction	Dose (mg/kg)	Lesion index (mm)	Inhibition (%)
Control	-	-	112.8 ± 17.0	-
<i>Rheum tanguticum</i>	Water	500	$61.4 \pm 28.6^*$	45.6
	70% Ethanol	500	$9.2 \pm 5.3^{***}$	91.8
<i>Rumex crispus</i>	Water	500	$64.0 \pm 21.2^{**}$	43.3
	70% Ethanol	500	$30.3 \pm 18.8^{***}$	73.2
<i>Rheum officinale</i>	Water	500	$52.1 \pm 25.8^{**}$	53.8
	70% Ethanol	500	$57.0 \pm 19.6^{**}$	49.5
<i>Rheum palmatum</i>	Water	500	$39.5 \pm 17.3^{***}$	65.0
	70% Ethanol	500	$27.5 \pm 15.0^{***}$	75.6
<i>Rheum undulatum</i>	Water	500	$32.7 \pm 24.3^{***}$	71.0
	70% Ethanol	500	$58.0 \pm 25.4^{**}$	48.6
Hydrocortisone	-	100	$63.1 \pm 10.5^{**}$	44.1
Cimetidine	-	150	$59.2 \pm 8.3^{**}$	47.5

The value represents the mean \pm S.D. Significantly difference, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to the control.

Table 2. Acid-neutralizing capacity of *Rheum tanguticum*, *Rumex crispus*, *Rheum officinale*, *Rheum palmatum* and *Rheum undulatum*

Material	Extraction	NaOH consumption Volume (μ L)	Inhibition (%)
Control	-	105.7 ± 2.1	-
<i>Rheum tanguticum</i>	Water	$90.7 \pm 2.1^{**}$	14.2
	70% Ethanol	$89.0 \pm 3.0^{**}$	15.8
<i>Rumex crispus</i>	Water	$88.9 \pm 1.5^{**}$	16.0
	70% Ethanol	$97.6 \pm 1.1^{**}$	7.7
<i>Rheum officinale</i>	Water	$87.0 \pm 0.6^{**}$	17.8
	70% Ethanol	$94.5 \pm 1.2^{**}$	10.7
<i>Rheum palmatum</i>	Water	$91.4 \pm 0.6^{**}$	13.6
	70% Ethanol	$95.1 \pm 1.5^*$	10.1
<i>Rheum undulatum</i>	Water	$87.0 \pm 0.6^{**}$	17.8
	70% Ethanol	$95.7 \pm 1.0^{**}$	9.5
Hydrocortisone	-	$56.4 \pm 2.0^{***}$	47.0

The value represents the mean \pm S.D. Significantly difference, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to the control.

위액을 제조하고 검체가 위산과 반응하여 어느 정도의 제산작용을 나타내는지 확인하는 시험법으로 추출물의 대조군은 0.1N NaOH로 적정시 105.7 ± 2.1 μ L가 소요되었다. 복합성분으로 구성된 추출물은 성분들과 비교하였을 때 제산력이 더 우수한 것으로 확인 되었다. 물 추출물과 70% 에탄올 추출물은 당고특대황이 각각 90.7 ± 2.1 μ L(14.2%), 89.0 ± 3.0 μ L(15.8%)로, 양제근은 각각 88.9 ± 1.5 μ L(16.0%), 97.6 ± 1.1 μ L(7.7%)로, 약용대황은 각각 87.0 ± 0.6 μ L(17.8%), 94.5 ± 1.2 μ L(10.7%)로, 장엽대황은 각각 91.4 ± 0.6 μ L(13.6%), 95.1 ± 1.5 μ L(10.1%)로, 그리고 종대황은 각각 87.0 ± 0.6 μ L(17.8%), 95.7 ± 1.0 μ L(9.5%)로 중화작용을 보였다(Table 2). 추출물을 이용한 경우 제산제인 hydrocortisone에 비하여

Table 3. Acid-neutralizing capacity of *Rheum tanguticum* constituents

Material	NaOH consumption volume (μL)	Inhibition (%)
Control	56.3 ± 0.6	-
Chrysophanol	50.0 ± 1.0***	11.2
Chrysophanol-8-O-glc	48.0 ± 1.0***	14.8
Desoxyrhaponticin	50.0 ± 1.0***	11.2
Desoxyrhapontigenin	49.0 ± 1.7**	13.0
Emodin	52.3 ± 1.5*	7.1
Isorhaponticin	46.0 ± 1.0***	18.3
2-Methoxy-4-hydroxyanthraquinone-5-O-glc	51.0 ± 1.0***	9.5
Physcion	45.7 ± 1.5**	18.9
Piracetannol-3'-O-glc	48.0 ± 0.0***	14.8
Resveratrol	52.3 ± 0.6***	7.1
Rhaponticin	50.0 ± 1.0***	11.2
Rhapontigenin	45.3 ± 0.6***	19.5
Hydrotalcite	28.2 ± 0.1**	49.9

The value represents the mean ± S.D. Significantly difference, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 compared to the control.

높은 제산작용을 기대하기는 어렵지만 복합성분으로 구성된 생약 추출물이 약 10% 이상의 제산력을 발휘하는 경우 효과가 있는 것으로 간주할 수 있다. 대황의 유효성분으로는 chrysophanol, chrysophanol-8-O-glc, desoxyrhaponticin, desoxyrhapontigenin, emodin, isorhaponticin, 2-methoxy-4-hydroxyanthraquinone-5-O-glc, physcion, piracetannol-3'-O-glc, resveratrol, rhapsonticin 및 rhapontigenin 은 각각 11.2%, 14.8%, 11.2%, 13.0%, 7.1%, 18.3%, 9.5%, 18.9%, 14.8%, 7.1%, 11.2% 및 19.5%로 억제되었음을 확인하였다. 실험에 사용한 유효성분들 역시 양성대조군으로 사용한 hydrotalcite (49.9%)보다는 제산작용이 약하였지만 과량 혹은 장기간 복용하면 효과가 있을 것으로 생각된다(Table 3).

Helicobacter pylori균에 대한 항균활성

현재까지 *H. pylori*는 소화성궤양, 위암 및 변연부 B세포 림프종 발생에 있어 중요한 원인 인자로 밝혀졌고, 기능성 소화불량증, 위의 과형성 용종, 철결핍성 빈혈 등 기타 질환과의 연관성들이 제시되고 있다⁹⁾. *H. pylori*가 호중구를 끌어 들이는 데는 몇몇 유전자가 관련되어 있으며 이중 pic A, B유전자는 cytotoxin-associated gene A (CagA)와 결합하여 단백질을 형성하고 상피세포는 IL-8을 방출하고 이것이 호중구를 끌어들이는다¹⁰⁾. 호중구를 끌어들이는 또 다른 단백질은 *H. pylori*-Neutrophil Activating Protein (HP-NAP)임이 보고된 바 있다. *H. pylori*가 위염을 일으킬 때 상피세포에서 IL-8을 생성해내고 이것이 호중구와 특히 T세포에 대한 강력한 주활성인자와 활성화 시그날이 된다. 그러므로 활성화된 보체 및 leukotriene 등이 생성되어 호중구를 더 많이 끌어들이는다. CD11b/CD18은 호중구

Table 4. Colonization inhibiting activity of *Rheum tanguticum*, *Rumex crispus*, *Rheum officinale*, *Rheum palmatum* and *Rheum undulatum* on *H.pylori*

Material	Extraction	Dose (μg/mL)	Colonization
Control	-	-	++++
<i>Rheum tanguticum</i>	Water	10	+++
		50	+++
		100	+++
	70% Ethanol	10	++
		50	++
		100	+
<i>Rumex crispus</i>	Water	10	++
		50	++
		100	++
	70% Ethanol	10	++
		50	++
		100	++
<i>Rheum officinale</i>	Water	10	++
		50	++
		100	++
	70% Ethanol	10	+
		50	+
		100	+
<i>Rheum palmatum</i>	Water	10	+++
		50	++
		100	+
	70% Ethanol	10	++
		50	+
		100	+
<i>Rheum undulatum</i>	Water	10	+++
		50	+++
		100	++
	70% Ethanol	10	+++
		50	+++
		100	++
Ampicillin		10	-

-: none,+: 1-60 colonies, ++: 61-80 colonies, +++: 81-100 colonies, ++++: > 100 colonies

에 의해 발현되는 cytokine으로 oxidative burst를 증가시키고 활성산소라디칼을 다량 방출하게 되어 위점막 손상을 주는 기전으로 간주되고 있다¹¹⁾. 따라서 *H. pylori*로 인한 염증성 반응은 조직내 호중구, 식균세포, 림프구의 침윤을 볼 수 있고 염증매개물질인 cytokine을 분비해 낸다고 할 수 있다. *H. pylori* 감염시 gastrin의 분비 자극을 통해 산의 분비가 증가하고 감염 제거시 gastrin이 빠른 시간 내에 정상화된다고 보고되었다¹²⁾. 이에 따라 *H. pylori*에 대한 colonization 억제 활성을 알아본 결과, 대조군에 비하여(++++) 당고특대황의 70% 에탄올 추출물 100 μg/mL 와 약용대황 70% 에탄올 추출물 50 μg/mL 및 100 μg/mL, 장엽대황 물 추출물 100 μg/mL과 70% 에탄올 추출물 50 μg/mL 및 100 μg/mL에서 *H. pylori*에 대한 항균작용(+)

Table 5. Colonization inhibiting activity of *Rheum tanguticum* constituents on *H.pylori*

Material	Dose (μM)	Colonization
Control	-	++++
	10	+++
Chrysophanol	50	++++
	100	++++
	10	++++
Chrysophanol-8-O-glc	50	+++
	100	++++
	10	+++
Desoxyrhaponticin	50	++
	100	++
	10	++++
Desoxyrhapontigenin	50	++
	100	+++
	10	+++
Emodin	50	+++
	100	++
	10	++++
Isorhaponticin	50	++++
	100	++++
	10	++++
2-Methoxy-4-hydroxyanthraquinone-5-O-glc	50	+++
	100	+++
	10	++++
Physcion	50	+++
	100	+
	10	++
Piracetannol-3'-O-glc	50	++
	100	++
	10	++++
Resveratrol	50	++++
	100	++++
	10	++
Rhaponticin	50	+
	100	+
	10	++
Rhapontigenin	50	++
	100	++
Ampicillin ^a	10	-

^amg/mL

-. none, +: 1-60 colonies, ++: 61-80 colonies, +++: 81-100 colonies, ++++: > 100 colonies

을 확인할 수 있었다(Table 4). 유효성분들 중 physcion 100 μM과 rhaponticin 50 μM 및 100 μM에서는 실험에 사용한 성분 들 중 비교적 우수한 colonization 억제작용(+)을 나타내었다(Table 5).

DPPH 소거 활성 검색법

Free radical이란 unpaired electron을 포함하는 화학종으로 대체로 강한 반응성을 나타낸다. 이들은 많은 효소 촉

Table 6. Free radical scavenging activity of *Rheum tanguticum*, *Rumex crispus*, *Rheum officinale*, *Rheum palmatum* and *Rheum undulatum*

Material	Extraction	IC ₅₀ (μg/mL)
<i>Rheum tanguticum</i>	Water	25.9
	70% Ethanol	5.8
<i>Rumex crispus</i>	Water	24.7
	70% Ethanol	24.8
<i>Rheum officinale</i>	Water	26.2
	70% Ethanol	26.7
<i>Rheum palmatum</i>	Water	29.5
	70% Ethanol	18.7
<i>Rheum undulatum</i>	Water	32.5
	70% Ethanol	22.8
L-Ascorbic acid		6.5

Table 7. Free radical scavenging activity of *Rheum tanguticum* constituents

Material	IC ₅₀ (μM)
Chrysophanol	> 160
Chrysophanol-8-O-glc	> 160
Desoxyrhaponticin	> 160
Desoxyrhapontigenin	> 160
Isorhaponticin	129.5
Emodin	> 160
2-Methoxy-4-hydroxyanthraquinone-5-O-glc	> 160
Physcion	> 160
Piracetannol-3'-O-glc	94.1
Resveratrol	80.1
Rhaponticin	104.6
Rhapontigenin	> 160
L-Ascorbic acid	6.5

매 반응의 중간물질로 중요한 역할을 하고 있는데, 강한 반응성 때문에 인접한 세포 성분들을 무차별하게 공격하여 위점막에 손상을 가한다. Oxygen radical로는 superoxide (O²⁻), hydroxyl (·OH), hydroperoxide (HO₂·), alkoxy (RO·), peroxy (ROO·) radical 등이 있다. 그 외 radical은 아니지만 반응성이 강한 산소 종으로 과산화수소(H₂O₂)와 singlet oxygen이 있다^{13,14,15}. Proton-radical scavenger에 의하여 탈색되는 원리를 이용한 DPPH radical 소거 활성 검색법은 항산화 활성을 육안으로 쉽게 관찰할 수 있는 검색법이다. 비교적 안정된 전자공여기를 가지고 있는 수용성 물질인 DPPH는 515 nm~520 nm부근에서 최대 흡광도를 나타내며, 항산화 활성이 있는 물질과 반응하면 전자를 내어주어 라디칼이 소멸되고 보라색이 탈색(노란색)되는 원리를 이용하였다¹⁶. 그 결과, 물 및 70% 에탄올 추출물에서 IC₅₀은 당고특대황이 각각 25.9 μg/mL, 5.8 μg/mL, 양제근이 각각 24.7 μg/mL, 24.8 μg/mL, 장엽대황이 각각 29.5 μg/mL, 18.7 μg/mL, 그리고 중대황이 각각 32.5 μg/mL, 22.8 μg/mL로 나타났다. 특히 당고특대황의 70% 에탄올

추출물은 양성대조군으로 사용한 L-ascorbic acid ($IC_{50} = 6.5 \mu\text{g/mL}$)와 유사하게 우수한 free radical 소거능을 나타내었다(Table 6). 유효성분으로는 isorhaponticin, piracetannol-3'-O-glc, resveratrol 및 rhaponticin에서 IC_{50} 이 각각 129.5 μM , 94.1 μM , 80.1 μM 및 104.6 μM 로 확인되었다(Table 7). DPPH radical 소거 활성은 유효성분들 보다 복합적인 성분으로 구성된 추출물들에서 비교적 높게 나타났다.

MTT assay

대황 추출물 및 유효성분에서 소화성장애, 위암 및 변연부 B세포 림프종 발생에 있어 중요한 원인 인자인 *H. pylori*의 억제활성이 확인되어 위암에 대한 효과를 확인하고자 MTT assay를 실시하였다. 새로운 항암제 개발을 위한 효능검색에서 tetrazolium-based colorimetric 검색법은 많은 시료를 간단하고 빠르면서도 객관성 높게 판독할 수 있어 세포독성 및 세포증식 검색법으로 널리 사용되고 있다. 또한 MTT assay는 항암제의 감수성에 대한 1차 선별 검사의 목적으로 많이 사용되지만, 성장인자에 대한 세포의 감수성 실험 등에도 대단히 유용하게 사용될 수 있다. MTT assay의 원리는 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan 으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하여 formazan crystal로 침전되는 정도를 흡광도로 측정할 수 있다. 즉, 미토콘드리아의 탈수소 효소가 MTT를 환원시키며 생성한 청색~자색 formazan을 DMSO로 녹여 흡광도를 측정하는 것으로 위암세포주인 AGS 및 SNU638 세포를 이용하여 실험한 결과, 양제근 70% 에탄올 추출물에서 IC_{50} 이 148.8 $\mu\text{g/mL}$ 로, 약용대황의 물 추출물에서 IC_{50} 이 127.4 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 그 밖의 추출물들은 IC_{50} 이 200 $\mu\text{g/mL}$ 이상으로 나타남을 확인하였다(Table 8). Chrysophanol-8-O-glc, desoxyrhaponticin, isorhaponticin, physcion, piracetannol-3'-O-

Table 9. Cell viability *Rheum tanguticum* constituents in SNU 638 and AGS cells

Material	$IC_{50}(\mu\text{M})$	
	SNU 638	AGS
Chrysophanol	108.9	> 200
Chrysophanol-8-O-glc	107.6	92.6
Desoxyrhaponticin	90.1	96.4
Desoxyrhapontigenin	78.1	> 200
Emodin	> 200	> 200
Isorhaponticin	98.7	173.4
2-methoxy-4-hydroxyanthraquinone-5-O-glc	> 200	> 200
Physcion	100.4	131.1
Piracetannol-3'-O-glc	95.4	94.4
Resveratrol	137.2	> 200
Rhaponticin	95.2	167.9
Rhapontigenin	152.0	> 200

glc 및 rhaponticin은 IC_{50} 이 각각 92.6 μM , 96.4 μM , 173.4 μM , 131.1 μM , 94.4 μM , 167.9 μM 로 나타났다(Table 9).

본 연구를 통하여 대황 추출물 및 유효성분의 위염 치료제 개발로의 잠재성을 확인하였다. 또한 지표성분의 규격이 한국, 일본과 중국이 다르고, 유통시장에서 당고특대황과 중대황이 혼재되어 있으며 다양한 기원식물이 혼재되어 수입되고 있는 대황의 효능을 현대 약리학적으로 비교, 분석하는 과정을 통해 한약재의 표준화, 과학화 및 위염에 대한 지표성분 검색에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구는 2012년 덕성여자대학교의 지원으로 수행된 것으로 연구비 지원에 깊이 감사드립니다.

요 약

현재 대황은 지표성분의 규격이 한국, 일본과 중국이 다르고, 유통시장에서 대황과 중대황이 혼재되어 있으며 다양한 기원식물이 혼재되어 수입되고 있다. 따라서 대황의 효능을 현대 약리학적으로 해석하는 과정을 통해 약재의 표준화, 과학화 및 위염에 대한 지표성분 검색에 기여할 수 있을 것으로 사료되어 *Rheum tanguticum*(당고특대황)과 그 비교생약으로 *Rumex crispus*(양제근), *Rheum officinale*(약용대황), *Rheum palmatum*(장엽대황) 및 *Rheum undulatum*(중대황)의 물 및 70% 에탄올 추출물을 비교하였다. 그 결과, 흰 쥐를 이용한 위염 모델에서 양제근 70% 에탄올 추출물(73.2%)와 중대황 물 추출물(71%)이 각각 70% 이상으로 우수한 위손상 억제활성을 보여주었지만, 당고특대황의 70% 에탄올 추출물 투여시 91.8%로 실험군 중 가장 우수한 위염 억제 효과를 확인할 수 있었다. 공격인자로써의 산

Table 8. Cell viability of *Rheum tanguticum*, *Rumex crispus*, *Rheum officinale*, *Rheum palmatum* and *Rheum undulatum* in SNU 638 and AGS cells

Material	Extraction	$IC_{50}(\mu\text{g/mL})$	
		SNU 638	AGS
Control	-	-	-
<i>Rheum tanguticum</i>	Water	> 200	> 200
	70% Ethanol	> 200	> 200
<i>Rumex crispus</i>	Water	> 200	> 200
	70% Ethanol	> 200	148.8
<i>Rheum officinale</i>	Water	> 200	127.4
	70% Ethanol	> 200	> 200
<i>Rheum palmatum</i>	Water	> 200	> 200
	70% Ethanol	40.6	> 200
<i>Rheum undulatum</i>	Water	> 200	> 200
	70% Ethanol	113.5	> 200

을 중화시킬 수 있는 능력을 알아보기 위한 제산력 시험법으로는 당고특대황 물 추출물과 70% 에탄올 추출물이 각각 약 14.2%, 약 15.8%로 억제함을 알 수 있었다. 이 결과로 보아 양성대조군으로 사용한 hydrotalcite(49.9%)보다는 제산작용이 약하였지만 과량 혹은 장기간 복용하면 효과가 있을 것으로 생각된다. 소화성궤양, 위암 및 변연부 B 세포 림프종 발생에 있어 중요한 원인 인자로 밝혀졌고, 기능성 소화불량증, 위의 과형성 용종, 철결핍성 빈혈 등 기타 질환과의 연관성들이 제시되고 있는 *H. pylori*에 대한 colonization 억제 활성을 확인한 결과 당고특대황의 70% 에탄올 추출물 100 µg/mL에서 *H. pylori*에 대한 항균 작용(+)을 확인할 수 있었다. DPPH 용액을 이용하여 free radical의 소거능을 IC₅₀으로 나타낸 결과, 당고특대황은 물 및 70% 에탄올 추출물에서 IC₅₀이 25.9 µg/mL, 5.8 µg/mL로 양성대조군으로 사용한 L-ascorbic acid (IC₅₀=6.5 µg/mL)와 유사한 free radical 소거능을 나타내었다. 이 결과로 당고특대황의 70% 에탄올 추출물이 흰 쥐 위염모델의 위손상을 가장 우수하게 억제하였으며 항산화 활성 또한 가장 우수한 것으로 확인되었다. 당고특대황의 성분인 chrysophanol, chrysophanol-8-O-glc, desoxyrhaponticin desoxyrhapontigenin, emodin, isorhaponticin, 2-methoxy-4-hydroxyanthraquinone-5-O-glc, physcion, piracetannol-3'-O-glc, resveratrol, rhaponticin 및 rhapontigenin을 이용하여 실험한 결과로는 효성분들 중 physcion 100 µM과 rhaponticin 50 µM 및 100 µM에서는 실험에 사용한 성분들 중 비교적 우수한 colonization 억제작용(+)을 나타내었고, DPPH radical 소거 활성은 isorhaponticin, piracetannol-3'-O-glc, resveratrol 및 rhaponticin에서 IC₅₀이 각각 129.5 µM, 94.1 µM 80.1 µM 및 104.6 µM로 확인되었다.

실험결과를 토대로 항위염 효과가 있는 우수한 약용식물로서 천연물 의약품개발 가능성을 확인하였고 나아가 한약재의 효능을 과학적으로 검증하고 한약재 표준화에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. 생약학교재편찬위원회: 생약학. 동명사, 경기, pp. 142 (2006).
2. 한국약학대학협의회 약전분과회: 대한약전해설서. 신일북스, 서울, pp. 1114 (2008).
3. Mizui, T. and Dodeuchi, M.: Effect of polyamines on acidified EtOH induced gastric lesion in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* **33**, 939-945 (1983).
4. Bae, E.A., Han, M.J., Baek, N.I. and Kim, D. H.: In vitro anti

- Helicobacter pylori activity of panaxtriol isolated from ginseng. *Arch. Pharm. Res.* **24**, 297-299 (2001).
5. Kim, J.M., Shin, J.E., Han, M.J., Baek, N.I. and Kim, D.H.: Inhibitory Effect of Ginseng Polyacetylenes on Infection and Vacuolation of Helicobacter pylori. *Nat. prod. sci.* **9**, 158-160 (2003).
6. Uchiyama, M., Suzuki, Y. and Fukuzawa, K.: Biochemical studies of physiological function of tocopherolactone. *Yakugaku Zasshi* **88**, 678-683 (1968).
7. Choi, C.H., Cha, Y.J., An, C.S., Kim, K.J., Kim, K.C., Moon, S.P., Lee, Z.H. and Min, Y.D.: Molecular mechanisms of heptaplatin effective against cisplatin-resistant cancer cell lines: less involvement of metallothionein. *Cancer Cell Int.* **4**, 6-17 (2004).
8. Hollander, D., Tarnawski, A. and Cummings, D.: Cytoprotective action of antacids against alcohol induced gastric mucosal injury. Morphological ultrastructural and functional time sequence analysis. *Gastroenterol.* **86**, 1114(Abstr.) (1984).
9. Sipponen, P., Kosunen, T.U., Valle, J., Riihela, M., Seppala, K.: Helicobacter pylori infection and chronic gastritis in gastric cancer. *J. Clin. Pathol.* **45**, 319-323 (1992).
10. Kim, B.J., Jung, H.J., Hwang, J.N., Kang, S.H., Oh, S.J. and Seo, Y.R.: Overview on Molecular Toxicological Aspects of Helicobacter pylori Virulence Factor, Cytotoxin-associated Antigen A (CagA). *Toxicol. Res.* **20**, 179-185 (2004).
11. Entman, M.L., Youker, K. and Shoji, T.: Neutrophil induced oxidative injury of cardiac myocytes. A compartmented system requiring CD11b/CK 18-ICAM-1 adherence. *J. Clin. Invest.* **90**, 1335-1345 (1992).
12. Chittajallu, R.S., Ardill, J.E.S. and McColl, K.E.L.: The degree of hypergastrinemia induced by Helicobacter pylori is the same in duodenal ulcer patients and asymptomatic volunteers. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **4**, 49-53 (1992).
13. Long, L.H., Evans, P.J. and Halliwell, B.: Hydrogen peroxide in human urine: implications for antioxidant defense and redox regulation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**, 605-609 (1999).
14. Nishimiki, M., Rao, N.A., Appaji, N. and Yagi, K.: The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced henazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, 849-854 (1972).
15. Subhashinee, S., Wijeratne, K., Susan, L. and Vicky, S.: Hydrogen Peroxide Induced Oxidative Stress Damage and Antioxidant Enzyme Response in Caco-2 Human Colon Cells, *J. Agric. Food Chem.* **53**, 8768-8774 (2005).
16. Yen, G.C. and Chen, H.Y.: Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 27-32 (1995).