

Antioxidant, Antimicrobial and Anticancer Properties of Seven Traditional Herb-combined Remedies

Moon Hee Lee^{1,2†}, Jae-wang Lee^{3†}, Cheol Park³, Min Ho Han¹, Su Hyun Hong^{1*} and Yung Hyun Choi^{1,2*}

¹Department of Biochemistry, Dongeui University College of Korean Medicine, Busan 614-052, Korea

²Anti-Aging Research Center & Blue-Bio Industry RIC, Dongeui University, Busan 614-714, Korea

³Bom Oriental Medical Clinic, Busan 617-838, Korea

⁴Department of Molecular biology, Dongeui University College of Nature Science and Human Ecology, Dongeui University, Busan 614-714, Korea

Received January 8, 2015 / Revised January 20, 2015 / Accepted March 4, 2015

In this study, we investigated the antioxidant activities and compared other physiological properties including anti-cancer and antimicrobial effects of several traditional Korean herb-combined remedies such as Gilgyung-tang (GGT), Daihwangmokdan-tang (DHMDT), Sagan-tang (SGT), Socheonryong-tang (SCRT), Sihocheonggan-tang (SHCGT), Sipyukmiyuki-eum (SYMYKE) and Hwangheuk-san (HHS), which were recorded in "Dong-eui-bo-gam" for "Ongjeo". Total phenolic contents of the herb medicines were in a rich order of GGT < SYMYKE < SCRT < SHCGT < DHMDT < SGT < HHS. Among them, HHS appeared highest in superoxide dismutase-like activity, ferric reducing antioxidant power, scavenging of 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl, and 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) cationic radical activity. Interestingly, there was a positive relationship between their total phenolic contents and their antioxidant activities. Although all of them showed anti-proliferative activities in human colon cancer HCT-116 cells, HHS was seven times higher than GGT. Antimicrobial activities against *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori* were revealed only on SGT, SCRT, SYMYKE and HHS. Taken together, these findings reveal the potential use of traditional Korean herbal formulas as functional ingredients in antioxidant and physiological materials.

Key words : Anticancer activity, antimicrobial activity, antioxidant activity, traditional herb-combined remedies

서론

활성산소종(reactive oxygen species: ROS)와 활성질소종(reactive nitrogen species: RNS)은 정상적인 세포내의 대사활동에 의한 생성물이지만, 과도한 발생은 세포의 산화적 스트레스를 유발해 세포질, 단백질 및 DNA 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다[4, 45]. 산화환원 조절 장애로 발생한 이러한 산화적 스트레스는 암, 당뇨병, 알츠하이머 치매, 면역 질환, 신경계 장애 및 노화와 같은 다양한 병리적인 상황을 초래하게 된다[9, 10]. 이에 따라 부작용이 없이 안전하고 효과적인 항산화제를 개발하여 질병을 예방하거나 치료에 이용하려는

연구가 활발하게 진행되고 있다.

그동안 동의보감(東醫寶鑑, Dong-eui-bo-gam)에 기록된 다양한 처방들의 항산화능에 대한 연구가 이루어져왔으나, 그들의 활용도 측면에 근거한 항산화 효능의 비교는 이루어진 바 없다. 또한 그러한 항산화 활성을 기본으로 한 다양한 생리활성의 체계적인 비교 연구 또한 찾아보기 힘든 실정이다. 동의보감의 잡병편(雜病篇)에 기재되어 있는 내장옹(內臟癰)은 발생하는 부위 및 증상에 따라 폐옹(肺癰)·간옹(肝癰)·신옹(腎癰)·위완옹(胃脘癰)·장옹(腸癰)과 복옹(腹癰) 등 5가지로 구분된다[16].

따라서 본 연구에서는 동의보감의 내장옹(內臟癰) 처방을 위하여 사용되어 온 7가지 한방처방[길경탕(桔梗湯, Gilgyung-tang, GGT), 대황목단탕(大黃牧丹湯, Daihwangmokdan-tang, DHMDT), 사간탕(射干湯, Sagan-tang, SGT), 소청룡탕(小青龍湯, Socheonryong-tang, SCRT), 시호청간탕(柴胡淸肝湯, Sihocheonggan-tang, SHCGT), 십육미류기음(十六味流氣飲, Sipyukmiyuki-eum, SYMYKE), 황흑산(黃黑散, Hwangheuk-san, HHS)]을 선택하여 그들의 항산화능을 비교 조사하였으며, 이를 바탕으로 다양한 생리활성 효능을 비교하였다. 이를 위하여 이들 7가지의 한약복합처방에 대한 총 페놀함량, 환원력, superoxide dismutase (SOD) 유사활성(SOD-like activity),

[†] Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.ac.kr (Yung Hyun Choi)

Tel : +82-51-850-8664, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : hongsh@deu.ac.kr (Su Hyun Hong)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ferric reducing antioxidant power (FRAP) 활성능, 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)와 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) cationic (ABTS^{•+})라디칼 소거능 및 과산화수소(hydrogen peroxide, H₂O₂)산화손상에 의한 genomic DNA (gDNA)의 손상 억제능과 같은 여러 항산화 실험을 통하여 이들의 항산화능을 평가하였으며, 또한, 이들 용제에 대한 각 한약재 처방전의 주요 성분인 마황, 길경, 시호, 인삼 등이 항암[18, 38, 27]뿐만 아니라 항염증[52, 21]과 항균 활성[37, 39, 20]이 보고된바 있어 이들을 함유하고 있는 한약재 처방전 추출물에 대한 함염증, 항암 및 항균 효과를 비교하여 한약복합처방 추출물의 생리활성 소재로서의 개발 가능성 비교 검토해 보았다. 상기 7가지 처방은 각 용제에서 사용된 처방 중 대표적인 처방으로 폐옹에서 소청룡탕 및 길경탕, 간옹에서 시호청간탕, 신옹에서 십육미류기음, 위완옹에서 사간탕, 장옹과 복옹에서 대황목단탕 및 황흑산이 해당된다.

재료 및 방법

시료

7가지의 한약복합처방(길경탕, 대황목단탕, 사간탕, 소청룡탕, 시호청간탕, 십육미류기음, 황흑산)은 (주)대한생약(Busan, Korea)에서 각 처방구성의 형태로 구입하였으며 이들의 구성 한약재는 Table 1에 나타내었다. 각 시료는 열수 추출하였으며, 농축 후 동결건조하여 사용 전까지는 -20℃에서 보관하였다.

총 페놀 함량

각 한약복합처방에 대한 총 페놀함량은 Folin-Ciocalteu 방법[36]에 의해 측정되었으며, gallic acid를 표준물질로 사용하

였다. 250 ul의 시료에 50% Folin-Ciocalteu 시약 250 ul을 혼합한 후, 500 ul의 Na₂CO₃용액과 물 4 ml를 첨가하여 암실에서 25분간 반응시켰다. 그 후 1,638× g에서 10분간 원심 분리하여 상층액만을 취해 spectrophotometer (DU730, Beckman Coulter, Brea, California)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid는 0-10 mg/ml 농도 범위의 검량선을 작성하였으며, 총 페놀 함량은 mg gallic acid equivalents (GAE)/g of sample dry weight (DW)으로 나타내었다.

ABTS^{•+} 소거능

각 시료 추출물의 총 항산화를 평가하기 위하여 ABTS^{•+} (2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) 소거능을 측정하였으며 이는 Roberta et al. [34]의 실험방법에 따라 시행하였다. 결과는 trolox의 검량선을 이용하여 mg trolox/g of sample dry weight (DW)로 나타내었다. ABTS^{•+}은 시료 20 ul와 ABTS^{•+} 반응액(A734 nm= 0.700±0.020) 2 ml를 혼합하여 실온상태에서 5분간 반응시킨 후 spectrophotometer (DU730, Beckman Coulter, Brea, California)를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

FRAP (Ferric reducing antioxidant power)활성 측정

이 방법은 산성 pH 영역에서 ferric tripyridyltriazine (Fe³⁺-TPTZ)복합체가 환원성 물질에 의해 정색의 ferrous tripyridyltriazine (Fe²⁺-TPTZ)으로 환원되어 593 nm의 흡광도가 증가하는 원리를 이용한 것으로 대부분의 항산화제가 환원력을 가지고 있다는 점에 착안하여 고안된 실험방법이다[2]. FRAP 시약은 10 mmol/l TPTZ 용액(in 40 mmol/l) 2.5 ml, 20 mmol/l FeCl₃·6H₂O용액 2.5 ml과 0.3 mol/lacetic acid (pH

Table 1. The composition of traditional herb-combined remedies

Traditional herb-combined remedies	Composition
Gilgyung Tang (桔梗湯)	<i>Platycodon grandiflorum</i> (Jacq.) A. DC., <i>Fritillaria thunbergii</i> , <i>Angelica gigas</i> , <i>Trichosanthes kirilowii</i> Maxim., <i>Coix lacryma-jobi</i> var. <i>ma-yuen</i> , <i>Citrus aurantium</i> , <i>Morus alba</i> , <i>Ledebouriella seseloides</i> , <i>Astragalus membranaceus</i> , <i>Prunus armeniaca</i> , <i>Lilium lancifolium</i> , <i>Glycyrrhiza inflata</i> Bat., <i>Zingiber officinale</i>
aehwangmokdan Tang (大黃牧丹湯)	<i>Rheum palmatum</i> , <i>Mirabiite</i> , <i>Paeonia szechuanica</i> Fang., <i>Prunus persica</i> , <i>Trichosanthes kirilowii</i> Maxim.
SaganTang (射干湯)	<i>Paeonia lbouata</i> , <i>Belamcanda chinensis</i> (L.) DC., <i>Gardenia jasminoides</i> , <i>Poria cocos</i> , <i>Cimicifuga heracleifolia</i> , <i>Artractylodes japonica</i>
Socheonryong Tang (小青龍湯)	<i>Ephedra sinica</i> , <i>paeonia japonica</i> , <i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill, <i>Pinellia ternata</i> Breitenbach, <i>Asiasarum heterotropoides</i> , <i>Zingiber officinale</i> Rosc., <i>Cinnamomum cassia</i> , <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.
Sihocheonggan Tang (柴胡清肝湯)	<i>Bupleurum falcatum</i> , <i>Gardenia jasminoides</i> , <i>Scutellaria baicalensis</i> , <i>Panax ginseng</i> , <i>Cnidium officinale</i> , <i>Citrus unshiu</i> , <i>Forsythia viridissima</i> , <i>Platycodon grandiflorum</i> (Jacq.) A. DC., <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.
Sipyukmiryukieum (十六味流氣散)	<i>Panax ginseng</i> , <i>Angelica gigas</i> , <i>Astragalus membranaceus</i> , <i>Platycodon grandiflorum</i> (Jacq.) A. DC., <i>Ledebouriella seseloides</i> , <i>Saussurea lappa</i> , <i>Citrus aurantium</i> , <i>Cinnamomum cassia</i> , <i>Paeonia albiflora</i> , <i>Areca catechu</i> , <i>Angelica dahurica</i> , <i>Magnolia obovata</i> , <i>Perilla frutescens</i> , <i>Lindera strichnifolia</i> , <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.
Hawngheuksan (黃黑散)	<i>Rheum palmatum</i> , <i>Psoralia corylifolia</i> , <i>Arctium lappa</i> , <i>Pharbitis nil</i> Chois.

3.6) 25 ml를 혼합하여 37°C에서 준비한다. 시료의 환원력을 측정하기 위해 FRAP 용액 1.5 ml, 물 100 μ l와 각 시료 추출물 100 μ l를 혼합한 후 실온에서 4분간 반응시킨 후 593 nm에서 측정하였다. 양성 대조군인 trolox를 사용하였으며 이에 대한 검량선(0~800 mM의 농도 범위)을 작성하여 μ M trolox/g of sample dry weight (DW)로 결과를 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거능은 Blois의 방법[3]에 따라 시행하였으며 이는 간단하고 편리하게 항산화능을 측정하는 방법 중에 하나로 많이 이용되고 있는 방법이다. DPPH 라디칼 소거능은 시료 100 μ l에 0.4 mM DPPH 용액 150 μ l를 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 ELISA reader (Versa max, Molecular Devices, CA, USA)의 518 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 L-ascorbic acid를 이용하였으며, 음성 대조군으로는 0.4 mM DPPH 용액 대신 메탄올을 이용하였다.

SOD 유사활성

SOD 활성은 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화를 측정하는 Markland의 방법[33]에 따라 수행되었다. 50 mM Tris-HCl buffer 2.8 ml과 15 mM pyrogallol 용액 0.1 ml을 혼합한 후 5°C에서 5분간 반응시켰다. 그 후 시료 0.1 ml을 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시키고 반응 정지를 위하여 1 M HCl 0.1 ml을 첨가한 후, spectrophotometer (Versa max, Molecular Devices, CA, USA)의 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군은 L-ascorbic acid를 이용하였으며, 음성 대조군으로는 tris-HCl buffer 대신 증류수를 이용하였다.

Genomic DNA (gDNA) 분리

Genomic DNA 분리는 AquaPure Genomic DNA isolation Kit (BIO-Rad, CA, USA)를 이용하여 HT-1080의 세포로부터 추출하였다. 세포를 T-75 flask에 1×10^6 cells/ml로 세포를 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양 후 세포를 모은 후 genomic DNA lysis 용매를 이용하여 세포를 용해한 후 protein precipitation 용매 100 μ l를 첨가하였다. 그 후 반응액을 20초 동안 빠르게 vortex한 후 15,000 \times g에서 3분 동안 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 새로운 튜브에 모으고 100% isopropanol 300 μ l를 첨가하였다. 혼합물은 1분 동안 150,000 \times g에서 원심분리하고 상층액을 제거한 후 건조시켰다. 완전히 건조 후 70% ethanol 300 μ l를 첨가하여 DNA pellet을 세척하고, 다시 15,000 \times g에서 1분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 15분 동안 튜브를 완전히 건조시켰다. DNA pellet은 DNA hydration 용액에 용해시키고 5분~1시간 동안 65°C에서 반응시킨 후, DNA 순도를 spectrophotometer (DU730, Beckman Coulter, Brea, California) 260/280nm에서 측정하였다. 그 후 분리된 DNA의 농도는 1% agarose gel 전기

영동으로 측정하였다.

Radical에 의한 DNA 손상 측정

H₂O₂에 의한 DNA 산화는 Milne 등의 방법[35]에 따라 실험하였다. 실험을 하기 전에 gDNA의 양은 여러 농도의 gDNA를 전기영동하여 적정 농도를 설정한 후 FeSO₄와 H₂O₂의 최종 농도는 각각 200 μ M과 2 mM이 되게 하여 같은 양을 첨가하며, gDNA 반응액은 물과 10 mM EDTA 4 μ l를 혼합하여 최종 부피가 40 μ l가 되게 각 반응액의 부피를 설정하였다. 각 반응액의 부피 설정 후 gDNA, 시료, FeSO₄, H₂O₂와 물을 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨다. 그 후 산화 반응을 정지시키기 위하여 10 mM EDTA 4 μ l를 첨가하고, 1% agarose gel에 100 V로 30분간 전기영동하였다. 겔은 1 mg/ml ethidium bromide으로 염색하고 AlphaEase® gel image analysis software (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA)을 이용하여 측정하였다.

세포 배양과 세포증식 억제 평가

세포증식 억제 평가를 위한 인간 대장암 세포주인 HCT116 세포, gDNA 손상을 측정하기 위해서 인간 섬유육종 세포인 HT1080 세포 및 NO 측정을 위한 마우스 대식세포인 Raw 264.7 세포는 각각 100 mm 배양플라스크(SPL, Pocheon-Si, Korea)에 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. HCT116 세포와 HT1080 세포는 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin이 함유된 high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Welgene, Daegu, Korea)를 이용하여 배양하였으며, 마우스 대식세포는 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Welgene, Daegu, Korea) 이용하여 배양하였다. 각 세포의 세포독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay 방법 [15]에 따라 실험하였다. 6-well에 적정량의 세포를 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 후 각 시료를 실험 농도별로 처리한 후 24~72시간 동안 배양하였다. 그 후 0.2 ml의 MTT solution (1 mg/ml)을 첨가하여 2시간 동안 배양한 후 dimethyl sulfoxide (DMSO) 2 ml를 첨가하여 formazan crystals을 녹여 ELISA reader (Versa max, Molecular Devices, CA, USA) 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. gDNA 손상 측정과 NO 생성을 위한 HT-1080 세포와 Raw 264.7 세포는 시료의 세포독성이 없는 범위에서 실험을 시행하였다.

항염증 활성

RAW 264.7 세포(1.5×10^5 cells/ml)를 6-well plate에 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 10% FBS가 함유된 DMEM 배지로 24시간 배양한 후 새로운 배지로 교체한 후 시료 처리하기 1시간 전에 NO 생성을 유도하기 위하여

lipopolysaccharide (LPS, final concentration: 100 ug/ml)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 상등액에 축적된 nitrite의 양을 측정하기 위하여 nitric oxide detection kit (Griess reagent, Promega, Wisconsin, USA)를 이용하였다. 배지 100 ul와 Griess 시약 (1% sulfanilamide와 0.1% naphthylethylenediamine) 100 ul를 혼합하여 실온에서 15분간 방치한 후, ELISA reader (Versa max, Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 nitrite의 정량은 NaNO₂의 검량선을 작성하여 구하였다.

미생물과 배양

항균활성을 평가하기 위한 미생물 *Escherichia coli* (*E. coli*, KCTC 1039)과 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*, KCTC 5335)은 한국생명공학연구원 생물자원센터(BRC)의 KCTC 유전자은행(KCTC)으로부터 구입하였다. 미생물은 Table 2의 상태로 배양하였다.

항균활성

항균활성은 disk diffusion 방법[2]에 따라 실험하였다. 미생물을 McFarland No 0.5로 희석된 각각의 세균 현탁액을 멸균된 면봉을 사용하여 준비된 agar plate 위에 균일하게 도말하였다. 시료 추출물을 각 실험 농도 별로 흡습 시킨 멸균 paper disk (Advantec, 6 mm, Tokyo, Japan)를 건조 후, 실험균이 도말된 agar plate 위에 올려놓고 각 실험균의 배양조건에 따라 배양한 후 균이 증식하지 못한 clear zone의 직경을 caliper로 측정하여 항균 정도를 비교하였다.

최소저해농도 측정

Minimum inhibition concentration (MIC) 측정은 broth-dilution method를 사용하여 실험하였다[19]. 각각의 균주는 농도를 nutrient broth 배지를 넣어 OD_{600nm} = 0.2~0.3로 조절한 후에 실험에 사용하였다. 96-well plate (SPL, Pocheon-Si, Korea)에 nutrient broth 120 ul에 균액 50 ul, 한약재 처방전 추출물 희석액 50 ul을 차례대로 첨가하여 한약재 처방전 추출물의 최종 농도가 20 mg/ml이 되도록 맞추어 UV-spectrophotometer (Versa max, Molecular Devices, CA, USA)를 이용해 흡광도 값을 측정하면서 48~144시간 동안 각 실험균의 배양조건에 따라 배양하였다. 한약재 처방전 추출물의 최종 농도를 0~20 mg/ml 농도로 희석하여 농도별로 *E. coli*와 *H. pylori* 균에 대한 생육곡선을 나타내어 한약재 처방전 추출물이 균의 성장을 저해하는 정도를 확인하였으며 실험 균에 따

라 6, 9, 24~144시간까지 생육 곡선 상에서 균의 생장(turbidity)이 검출되지 않는 최소 농도를 MIC로 설정하였다.

통계처리

각각의 평가 분석은 3반복 이상으로 하였으며 시료로부터 얻어진 실험 결과들의 유의성을 검정하기 위하여 분산분석을 실시한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range tests를 실시 하였다. 이때 사용한 모든 통계분석은 SPSS 17.0 (IBM SPSS Inc, New York, USA) 통계 프로그램을 이용하여 처리하였다.

결과 및 고찰

페놀 함량 측정

페놀의 함량은 색, 맛, 향과 또한 건강에 유익한 영양을 주는 영양성분들의 양과 질에 기여하며, 이들은 ROS에 의한 세포 수준이나 DNA 등의 손상을 억제하기 위한 방어 매커니즘을 제공한다고 알려져 있다[46]. 따라서, 7가지의 한약복합처방 추출물의 총 페놀 함량을 조사하였다. Table 3에 나타난 바와 같이, 7가지의 한약복합처방 추출물의 총 페놀 함량은 50.351±3.122~1905.650±10.587 mg GAE/g DW의 범위로 나타났으며, 이들 중 황후산은 가장 낮은 함량을 나타낸 길경탕에 비하여 38배 이상의 높은 총 페놀함량을 나타내었다. 총 페놀함량은 황후산 > 사간탕 > 시호청간탕 > 대황목단탕 > 소청룡탕 > 십육미류기음 > 길경탕과 같은 순서에 따라 함량이 높게 나타났다.

FRAP 활성 측정

시료의 환원력은 전자공여를 통한 라디칼의 소거능과 관련이 높은 것으로 알려져 있으므로[12], 산화반응의 촉매제로 작용하는 금속이온을 환원시키는 효력을 측정하는 방법인 FRAP 법을 이용하여 7가지의 한약복합처방 추출물의 환원력을 측정하였다. 추출물 중 가장 높은 환원력(EC₅₀)을 보인 처방은 황후산(1.905±0.059 uM Trolox/g)이었으며, 길경탕(0.052±0.012 uM Trolox/g)은 가장 낮은 값을 나타내었다. 이는 총 페놀 함량의 결과와 유사한 결과를 나타내었으며, 시료 중에 함유된 페놀 화합물의 함량이 높을수록 환원력이 높다는 기존의 연구와도 일치하는 결과를 나타내었다[32].

DPPH 라디칼 소거능 측정

다음으로, 전자공여능을 통해 항산화 능력을 알아보는 방법으로 DPPH 라디칼 소거능 측정을 시행하였다. 각 시료의

Table 2. The microorganisms and culture condition

Microorganisms	Medium	Condition of incubation	Cultivation date
<i>E.coli</i>	Nutrient broth	Anaerobic	2 day
<i>H. pylori</i>	Columbia agar with 5% horse serum	Microaerophilic	6 day

Table 3. Total phenol content (mg GAE/g), FRAP values (uM Trolox/g) DPPH, ABTS radical scavenging effect (mg/ml) and SOD-like effect (mg/ml) of traditional herb-combined remedies

	GGT	DHMDT	SGT	SCRT	SHCGT	SYMYKE	HHS	L-ascorbic acid ⁴⁾
mg GAE ^{1)/} g	50.351± 3.122 ^{f3)}	534.434± 10.627 ^c	862.747± 1.157 ^b	230.996± 4.561	495.032± 5.318 ^d	67.607± 1.715 ^e	1905.650± 10.587 ^a	-
uM Trolox ^{2)/} g	0.052± 0.012 ^e	0.534± 0.035 ^c	0.862± 0.026 ^b	0.230± 0.041 ^d	0.495± 0.053 ^c	0.067± 0.016 ^e	1.905± 0.059 ^a	-
DPPH	0.454± 0.013 ^d	0.236± 0.032	0.081± 0.011 ^b	0.196± 0.021 ^c	0.128± 0.094 ^{bc}	0.174± 0.0541 ^c	0.002± 0.001 ^a	0.016± 0.271 ^a
ABTS ^{••}	0.398± 0.104 ^e	0.283± 0.033 ^c	0.039± 0.013 ^a	0.367± 0.068 ^d	0.111± 0.091 ^b	0.125± 0.032 ^b	0.034± 0.024 ^a	39.254± 4.534 ^a
SOD-like	1.277± 0.623 ^{cd}	1.355± 0.231 ^d	0.834± 0.082 ^c	0.485± 0.021 ^a	0.497± 0.010 ^a	0.896± 0.321 ^c	0.550± 0.080 ^b	53.478± 2.147 ^a

¹⁾GAE: gallic acid equivalents, ²⁾ uM Trolox/g: uM trolox equivalent antioxidant capacity per g of samples, ³⁾ Values are the mean ± SD of triple determinations, ⁴⁾L-ascorbic acid: positive control, ug/ml. The same letters in same line showed significant differences among 7 samples at *p*<0.05 statistical level.

DPPH 라디칼 소거능(EC₅₀)은 0.002±0.001~0.454±0.013 mg/ml로 나타났으며, 황흑산은 가장 낮은 농도에서 DPPH 라디칼 소거능을 보였으며, 길경탕은 가장 높은 농도에서 DPPH 라디칼 소거능을 보였다. 황흑산은 양성 대조군인 L-ascorbic acid의 EC₅₀값과 유사한 결과를 나타내어, 뛰어난 DPPH 라디칼 소거능이 있음을 알 수 있었다(Table 3). 또한, DPPH 라디칼 소거능 역시 페놀의 함량과 높은 상관관계를 가지는 것으로 보임을 알 수 있었다.

ABTS^{••} 소거능 측정

ABTS^{••} 소거능 측정은 시료 내의 항산화 물질에 의해 ABTS^{••} free radical의 양이온이 제거되면 라디칼 특유의 청록색이 탈색되는 것을 이용한 방법으로 DPPH 라디칼 소거능과 함께 항산화 활성을 스크리닝 하는데 많이 이용되고 있다. 게다가, ABTS^{••} 방법은 DPPH 방법보다 수소 공여 항산화제와 연쇄 절단형 항산화제 모두를 측정할 수 있으면서, 소수성과 친수성 모두에 적용이 가능하기 때문에 더 민감하게 항산화 능력을 알아볼 수 있는 방법으로 알려져 있다[6, 35, 47]. Table 3에 나타난 바와 같이, 각 한약복합처방의 추출물의 ABTS^{••} 소거능의 EC₅₀값은 0.034±0.024 mg/ml ~ 0.398±0.104 mg/ml로 다양하게 나타났으며, 모두 0.034 mg/ml 이상에서 활성을 보였다. 양성 대조군으로 사용한 L-ascorbic acid의 EC₅₀값은 39.254±4.534 µg/ml로 한약복합처방 추출물 중 황흑산과 사간탕의 ABTS^{••}소거능과 유사한 활성을 나타내었다. 이러한 결과 역시, 이들 시료에 많이 함유되어 있는 페놀에 의한 영향으로 생각된다.

Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정

SOD는 생체 내에서 superoxide (O₂⁻)를 H₂O₂와 O₂로 전환해줌으로써 독성으로부터 세포를 방어하는 역할을 하는 효소

이다. 이러한 SOD와 유사하게 O₂와 반응하여 갈색으로 변하는 물질인 pyrogallol의 자동산화 반응을 측정하여, SOD 유사활성을 알아보았다[44]. Table 3에서 볼 수 있듯이, 황흑산은 가장 낮은 EC₅₀값(550±0.080 mg/ml)을 나타내었으며, 반면에 대황목단탕이 가장 높은 EC₅₀값(1.355±0.231 mg/ml)을 나타내었다. SOD 유사활성은 페놀 함량이 가장 높은 황흑산이 가장 낮은 EC₅₀값을 보이기는 했으나, 3번째로 높은 페놀 함량을 보인 대황목단탕이 가장 낮은 활성을 보이는 것으로 나타나, 페놀 함량과의 상관성이 다른 항산화능보다는 낮은 것으로 나타났다.

DNA 손상 억제능 평가

산화적 스트레스에 의해 DNA 손상도 유발되므로, 7가지 한약복합처방의 DNA 손상에 대한 방어 능력을 인간 섬유육종암 세포로부터 gDNA를 추출하여, DNA 밴드의 밀도를 통하여 평가하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이, 7가지 한약복합처방 추출물은 낮은 농도에서부터 산화적 스트레스에 의해 손상된 DNA를 모두 보호하는 효과를 나타내었으며, 이는 시료에 포함되어있는 항산화제의 역할을 하는 화합물들이 ROS에 의한 세포 손상을 보호하는 세포간의 방어 매커니즘에 의한 영향이라는 앞선 다른 연구들과 유사한 결과임을 보였다 [34].

페놀함량과 항산화 활성 사이의 상관관계

한약복합처방의 추출물은 다양한 phytochemical이 함유되어있으며, 이들 화합물들이 여러 항산화 활성에 기여할 것으로 생각되어, 총페놀 함량과 항산화 활성(DPPH와 ABTS radical scavenging capacity과 SOD-like activity)사이의 피어슨 상관계수(Pearson's correlation coefficient, (*p*<0.05))를 산출하여 Table 4에 나타내었다. 피어슨 상관계수가 높은 값은 나타

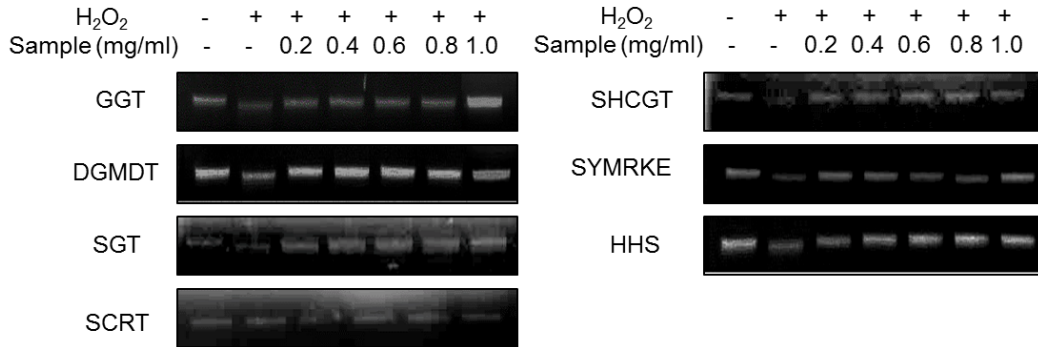


Fig. 1. Protective effects of traditional herb-combined remedies on genomic DNA oxidation in HT-1080 cells.

내는 것은 페놀성 화합물이 항산화 활성에 기여할 가능성이 크다는 것을 의미한다. 결과에 따르면, 한약복합처방 추출물 중 총페놀 함량이 높은 사간탕, 소청룡탕 및 황흑산이 총페놀 함량과 항산화 활성 간의 상관계수도 0.912-0.987의 범위의 높은 값을 나타내어, 항산화 활성이 그 유효 물질인 페놀성 화합물 함량에 의존적일 것으로 판단되었다. 이러한 결과는, 페놀성 화합물의 함량이 항산화 활성에 기인한다는 선행연구와도 일치하였다[22, 31, 40].

항염증 활성

항염증은 외부 자극에 의한 생체조직의 면역반응의 하나로 생체를 보호하기 위한 매커니즘의 하나로, tumor necrosis- α

(TNF- α) 및 여러 가지 cytokines을 분비함으로써 염증으로 인해 발생된 ROS 및 RNS를 제거하고 관련된 인체질환을 개선하는데 필수적이다. 그리하여, 본 연구에서는 항산화 활성을 나타내는 한약복합처방의 추출물을 마우스 대식세포인 Raw 264.7 세포를 이용하여, LPS 처리로 증가된 염증성 cytokine 및 NO와 같은 염증성 매개물질 발생을 저해하는 효능을 확인하고자 하였다. Fig. 2에 보여지듯이, LPS 처리군(37.945 \pm 1.867 μ M)에서 무처리군(2.061 \pm 0.323 μ M)에 비하여 18배 이상 증가한 NO의 농도는 한약복합처방 추출물의 처리에 의해 2.486 \pm 0.562-28.495 \pm 0.313 μ M로 나타나, LPS 처리군에 비하여 유의적으로 감소하였음을 알 수 있었다. 이들 중 시호청간탕의 NO 생성이 가장 효과적인 것으로 나타났다. 시호청간탕은 시호,

Table 4. The correlation coefficient between with total phenol and antioxidant activities of traditional herb-combined remedies

	GGT	DHMDT	SGT	SCRT	SHCGT	SYMYKE	HHS
DPPH*	0.478*	0.788	0.967*	0.514*	0.978*	0.651*	0.987*
ABTS**	0.411*	0.557*	0.964*	0.668*	0.912*	0.883	0.974*
SOD-like	0.406*	0.519*	0.954*	0.825	0.933*	0.417*	0.974*

The * in same column showed significant differences among 7 traditional herb-combined remedies at $p < 0.05$ statistical level.

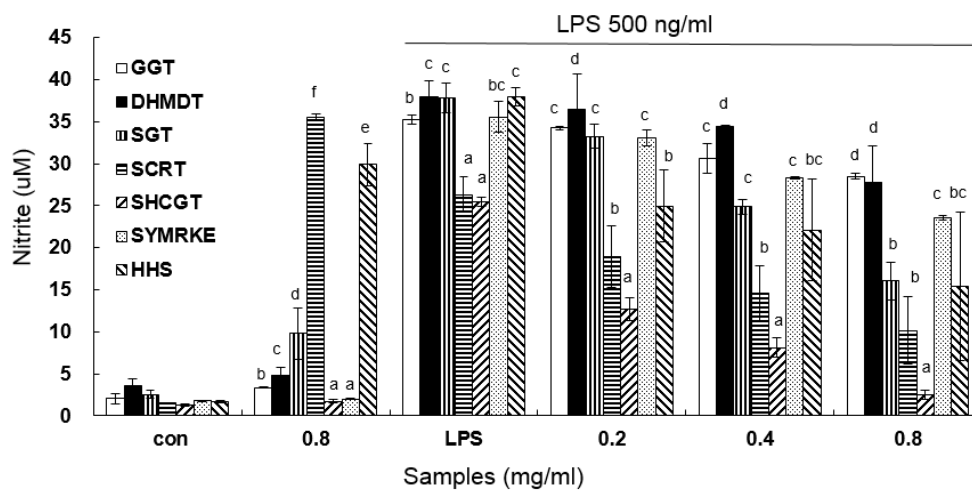


Fig. 2. Effect NO production of traditional herb-combined remedies on Raw 264.7 cells. *Data are expressed as mean \pm SD and μ M of nitrite concentration; * a-f significant differences among samples at same concentration ($p < 0.05$).

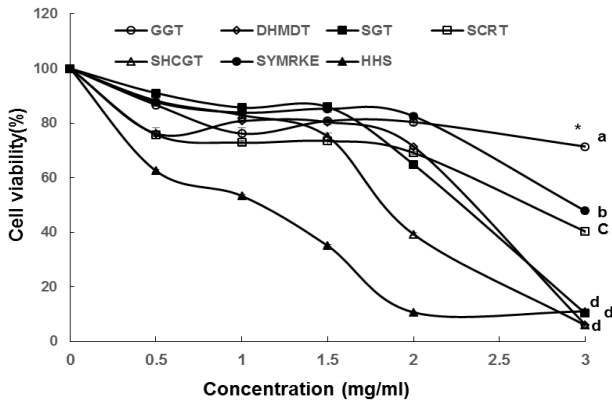


Fig. 3. Antiproliferation activity of traditional herb-combined remedies on HCT116 cells. Data are expressed as mean \pm SD and % of cell viability; * a-d significant differences among samples at 3 mg/ml concentration results ($p < 0.05$).

치자, 황금, 천궁, 인삼, 청피, 연교, 길경, 감초로 구성되어 있는 처방으로, 각각의 한약재가 모두 항염증 작용이 있다는 선행 연구 결과를 찾아볼 수 있다. 시호[5]나 황금[50]은 LPS로 유도된 대식세포의 Cytokine, 염증인자 생성을 유의하게 억제하여 항염증 효과가 있다는 연구 결과가 있고, 치자[30]나 감초[51]는 NO생성에 영향을 미쳐 항염증 효과가 있다는 연구 결과가 있으며, 천궁[29], 인삼[42], 청피[25], 연교[7]는 Cyclooxygenase-2 (COX-2)와 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현 정도를 억제하여 항염증 효과를 나타낸다는 연구 결과가 있다. 길경[24]도 부종억제를 통한 급성염증에 항염증 효과가 있다는 연구결과가 보고되었으며, 시호청간탕 역시 Han [13]의 논문에서 NO의 생성이 LPS 처리군에 비하여 현저하게 감소되는 결과를 보여, 한약복합처방 추출물이 여러 기전을 통해 항염증 작용을 하는 것임을 알 수 있었다.

항암효과

한약복합처방 추출물의 항암효과를 비교하고 암세포의 세포증식 억제 능력을 측정하기 위하여 위암세포주(AGS 세포), 간암세포주(Hep-3B 세포), 폐암세포주(A594세포 및 NCI-H460 세포)과 대장암 세포주(HCT-116 세포) 등의 여러 세포주를 이용하였다. 각 추출물을 처리하고 48시간 동안 배양한 후 MTT 실험법을 이용하여 세포증식 억제를 평가한 결과를

Fig. 3에 나타내었다. 세포의 종류에 따라 세포증식 억제 능력이 차이가 있긴 했지만, 홍미롭게도, 모든 세포주에서 EC₅₀이 가장 낮은 처방은 황흑산으로 나타났다. Xu 등[48]의 연구에서 페놀화합물이 종양괴사 인자를 활성화시켜 항암활성에 기인한다고 보고하였는데, 황흑산의 높은 페놀 함량이 다른 처방에 비해 우수한 항암 효과를 나타내는 데 기여한 것으로 보인다.

항균활성

본 연구에서는 대장균인 *E.coli*와 위암뿐 아니라 위염, 위십이지장 및 소화궤양의 원인균으로 알려진 *H. pylori*에 대한 한약재 처방전 추출물의 시간대별(6~144 hr) 최소저해농도(MIC)를 Table 5에 나타내었다. *E.coli*와 *H. pylori*에서는 사간탕, 소청룡탕, 십육미류기음 및 황흑산 추출물에 대해서는 2-10 mg/ml의 농도에 대해서 각 실험 관찰 시간대에서 MIC가 관찰되었으며 특히 소청룡탕과 황흑산 추출물은 6시간 이후로는 모든 균의 생장은 95% 이상 저해하는 것으로 나타났다(Data not shown). 그러나, 각 배양시간까지 균이 완전히 사멸하는($\geq 99\%$) minimum bactericidal concentration (MBC)는 관찰되지 않았다.

한편, 항균활성 측정 시 배지의 상태(broth와 agar)에 따른 균의 생육 상태나 시료의 확산정도가 다르며, broth dilution 방법에 의한 항균력 검증에는 시료가 지닌 고유의 색이 MIC를 결정하는 탁도에 영향을 미칠 수 있다. 따라서 항균 효과는 하나의 assay만으로 결정하기에 무리가 있어, 탁도(O.D.)에 영향을 미치지 않는 disk diffusion방법으로 항균력을 측정하여 항균활성을 확인하였다. 본 연구에 사용한 한약복합처방 추출물 10 mg/ml의 농도에서 사간탕, 소청룡탕, 십육미류기음 및 황흑산이 0.5 mm와 1 mm의 clear zone을 형성하였다(Table 6). 이들 시료들 간의 항균활성의 차이는 추출물에 함유된 물질간의 상호작용과 균에 대한 특이적 항균활성에 의한 것으로 판단되며 인삼, 마황 및 대황이 주 성분인 추출물에서 항균활성을 보여준 것은 이들 추출물에 우수한 항균활성을 가지고 있는 것으로 알려진[26, 28, 49], 사포닌성분, 안트라퀴논계 화합물과 스틸벤계 화합물인 페놀성 화합물에 의한 영향이라 생각되어진다.

이상으로, 본 연구에서는 동의보감에 기재되어 있는 내장용에 쓰여진 한약복합처방에 대해 다양한 항산화 실험방법과

Table 5. Minimum inhibitory concentration (MIC) of traditional herb-combined remedies

	GGT	DHMDT	SGT	SCRT	SHCGT	SYMYKE	HHS
<i>E. Coli</i>	¹)-/-/-/-	-/-/-/-	10/10/10	6/6/6	-/-/-/-	10/10/10	4/4/4
<i>H. Pylori</i>	-/-/-/-/-/-/-/-	-/-/-/-/-/-/-/-	²)/ ³)/ ⁴)/ ⁵)/ ⁶)/ ⁷)/ ⁸)/ ⁹)	4/4/4/4/4/4/4/4/4	-/-/-/-/-/-/-/-	6/6/6/6/6/6/6/6/6	2/2/2/2/2/2/2/2/2

Minimum inhibitory concentration (MIC) as mg/ml of extract of traditional herb-combined remedies.

¹)Non inhibitory, ²)6 hr, ³)9 hr, ⁴)24 hr, ⁵)48 hr, ⁶)72 hr, ⁷)96 hr, ⁸)120 hr and ⁹)144 hr

Table 6. Antimicrobial activity of traditional herb-combined remedies on microorganisms

	GGT	DHMDT	SGT	SCRT	SHCGT	SYMYKE	HHS
<i>E. Coli</i>	-	-	0.8	0.8	-	0.6	1
<i>H. Pylori</i>	-	-	0.5	1	-	0.6	1

The antimicrobial assay carry out the concentration of traditional herb-combined remedies at 10 mg/ml. The results expressed clear zone size (cm).

생리활성 실험방법을 통하여 한약재 추출물이 각 항산화 활성, 항염증, 항암 및 항균 활성을 조사하여 보았다. 이들 한약 복합처방 추출물의 생리활성 차이의 원인을 규명해보기 위해 총페놀함량을 평가하여 여러 항산화 활성과의 관계를 알아본 결과, 이들 한약복합처방 추출물의 항산화활성은 추출물이 함유하고 있는 페놀성 화합물의 함량과 높은 상관관계를 나타내는 것을 알 수 있었다. 특히, 한약복합처방 추출물 중 장용과 복용에 대한 처방전인 황흑산이 가장 많은 페놀함유량을 나타내었으며, 여러 항산화 활성, 항암 및 항균 활성에서 가장 우수한 생리활성을 보여주었다. 이상의 결과를 종합해 보면, 응저에 대한 한약복합처방 추출물 다양한 생리활성을 가지고 있음을 확인 할 수 있었으며, 이를 기반으로 한 한약복합처방에 대한 다양한 연구의 기초자료로 활용할 수 있는 근거자료가 될 수 있을 것이라고 생각한다. 또한, 앞으로 이번 연구를 통해 한약복합처방 추출물에 함유된 항산화와 생리활성을 나타내는 물질 및 활성 매커니즘에 대한 연구를 수행할 계획이다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단의 기초과학연구 프로그램 지원 사업(No. 2012046358 & 2013R1A1A2065537)으로 수행된 연구 결과이며 이에 감사드립니다.

References

- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C and Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* **45**, 493-496.
- Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70-76.
- Blios, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1158-1200.
- Cataldi, A. 2010. Cell responses to oxidative stressors. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 1387-1395.
- Choi, S. W., Kan, H., Sin, B. S, Kim, S. H. Choi, S. H. and Ahn, K. S. 2009. Effect of *bupleuri radix* on inflammatory cytokine secretion to HMC and mouse immune cells. *Kor. J. Ori. Med. Physiol. Pathol.* **23**, 150-157.
- Choi, Y., Kim, M., Shin, J. J., Park, J. M. and Lee, J. 2003. The antioxidant activities of the some commercial teas. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **32**, 723-727.
- Chu, C. K., Jung, S. K., Jung, H. J. and Kim, J. J. 2010. Research on anti-inflammatory effects of *forsythiae fructus*. *Kor. J. Ori. Int. Med.* **31**, 242-253.
- Chung, S. H., Moon, Y. J., Kim, S. G., Kim, K. Y., Lee, K. T., Kim, H. K. and Whang, H. K. 2008. Isolation of flavonoids from *carthami flos* and their antioxidative activity. *Yakhak Hoeji* **52**, 241-251.
- Dröge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47-95.
- Emerit, J., Edeas, M. and Bricaire, F. 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed. Pharmacother.* **58**, 39-46.
- Fridovich, I. 1998. Oxygen toxicity, a radical explanation. *J. Exp. Biol.* **201**, 1203-1209
- Gordon, M. F. 1990. The mechanism of antioxidant action *in vitro*, pp. 1-18. In: Hudson, B. J. F. (ed.), *In Food Antioxidants*. Elsevier Applied Food Science publishers, London, UK.
- Han, I. S. 2013. Anti-inflammatory effect of sihocheonggan-tang extraction. Master dissertation, Sangji University, Seoul, Korea.
- Han, J. H. and Lee, S. Y. 2011. Comparing medical efficacy of Socheongyong-tang with lactic acid bacteria fermented Socheongyong-tang. *Kor. J. Ori. Med. Physiol. Pathol.* **5**, 246-256.
- Hansen, M. B., Nielsen, S. E. and Berg, K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* **119**, 203-210.
- Heo, J. Donguibogam, 1999. pp. 1433-1439. In: Kim, K. J. (ed.), *Beopinmunhwasa publishers*, Seoul, Korea.
- Hollman, P. C. H. 2001. Evidence for health effects of plant phenols: local or systemic effects? *J. Sci. Food Agric.* **81**, 842 - 852.
- Hong, S. H., Park, C., Han, M. H., Kim, H. J., Lee, M. H. and Choi, Y. H. 2014. Effects of *Platycodon grandiflorum* on the induction of autophagy and apoptosis in HCT-116 human colon cancer cells. *J. Life Sci.* **24**, 1244-1251.
- Jang, M., Seo, J., Lee, J. H. and Kim, G. H. 2010. Antibacterial activities of essential oil from *Zanthoxylum schinifolium* against foodborne pathogens. *Kor. J. Food Cook Sci.* **26**, 206-213.
- Kim, B. J. 2000. Antimicrobial activities of the extracts of *Platycodon glandiflorum* A. De. Candolle on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Kor. J. Soc. Food Sci.* **16**, 379-384.
- Kim, C. J., Cho, S. K., Choi, C. S. and Choi, Y. S. 1990. Hepatoprotective activities of traditional Korean Herbal prescriptions. *Kor. J. Pharmacogn.* **21**, 223-224.

22. Kim, D. O., Jeong, S. W. and Lee, C. Y. 2003. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.* **81**, 321-326.
23. Kim, H. W., Lim, C. Y., Kim, B. Y. and Cho, S. I. 2014. So-Cheong-Ryong-Tang, a herbal medicine, modulates inflammatory cell infiltration and prevents airway remodeling via regulation of interleukin-17 and GM-CSF in allergic asthma in mice. *Pharmacogn. Mag.* **10**, 506-511.
24. Kim, S. Y., Lee, E. B. and Jeong, E. J. 2009. Anti-Inflammatory action of the fractions of *Platycodi radix*. *Kor. J. Food Nutr.* **22**, 618-624.
25. Kim, Y. K., Ha, H. K., Lee, J. H. and Kim, C. S. 2002. COX-2 inhibition and anti-inflammatory effects of traditional herbal medicine. *Kor. J. Ori. Med.* **8**, 65-74.
26. Lee, I. S., Choi, M. C. and Moon, H. Y. 2000. Effect of *Platycodon grandiflorum* A. DC extract on the bronchus diseases bacteria. *Kor. J. Biotech. Bioeng.* **15**, 162-166.
27. Lee, J. Y., Lee, J. M., Lee, C. H., Cho, J. H., Jang, J. B. and Lee, K. S. 2010. Antitumor and immunomodulatory activities of *Platycodon grandiflorum*. *J. Ori. Med. Gynecol.* **23**, 10-19.
28. Li, Z., Li, L. J., Sun Y. and Li, J. 2007. Identification of natural compounds with anti-hepatitis B virus activity from *Rheum palmatum* L. ethanol extract. *Chemotherapy* **53**, 320-326.
29. Lim, H. R. and Shin, S. W. 2010. Effects of the essential oil components from *Ligusticum chuanxiong* on proinflammatory mediators of Raw 264.7 macrophage cells. *Nat. Prod. Sci.* **16**, 259-264.
30. Lim, Y., Park, K. R., Lee, D. U., Kim, Y. S. and Kim, H. P. 2008. Effects of the constituents of gardenia fructus on prostaglandin and NO production. *Biomolecules Therapeutics* **16**, 82-86.
31. Liu, L., Sun, Y., Laura, T., Liang, X., Ye, H. and Zeng, X. 2009. Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of kudingcha made from *Ilex kudingcha* C. J. Tseng. *Food Chem.* **112**, 35-41.
32. Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Soobrattee, A. M. and Aruoma, O. I. 2005. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin and flavonoid components in extracts of *Acacia fistula*. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5042-5047.
33. Markland, S. and Markland, G. 1974. Involvement of superoxide radical in the autoxidation of pyrogallol and convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**, 469-472.
34. Mello, L. D., Hernandez, S., Marrazza, G., Mascini, M. and Kubota, L. T. 2006. Investigations of the antioxidant properties of plant extracts using a DNA-electrochemical biosensor. *Biosens Bioelectron* **21**, 1374-1382.
35. Milne, L., Nicotera, P., Orrenius, S. and Burkitt, M. 1993. Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation: Prooxidant and antioxidant properties of glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* **304**, 102-109.
36. Mo, J. H., Lee, S. E., Wee, J. H., Lee, J. E., Rhee, C. S., Lee, C. H. and Kim, D. Y. 2013. Anti-allergic effects of So-Cheong-Ryong-Tang, a traditional Korean herbal medicine, in an allergic rhinitis mouse model. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **270**, 923-30.
37. Paik, S. B., Kyung, S. H., Kim, J. J. and Oh, Y. S. 1996. Effect of bioactive substance extracted from *Rheum undulatum* on control of cucumber powdery mildew. *Kor. J. Plant Pathol.* **12**, 85-90.
38. Park, K. H., Kim, S. Y. and Chae, H. J. 2007. Selection of oriental medicinal plants for screening of anticancer agents. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **22**, 139-145.
39. Park, U. Y., Chang, D. S. and Cho, H. R. 1992. Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **21**, 91-96.
40. Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G. and Swatsitang, P. and Glover, W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* **66**, 401-436.
41. Roberta, R., Nicoletta, P., Anna, P., Ananth, P., Min., Y. and Catherine, R. E. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *J. Free Rad. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.
42. Ryu, J. H., Jang, J. H., Lee, S. Y., Lee, H. J. and Han, Y. N. 1998. Inhibitors of nitric oxide synthesis from ginseng in activated macrophages. *J. Ginseng Res.* **22**, 181-187.
43. Singleton, V. L. and Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic - phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**, 144-158.
44. Shung, S. H., Moon, Y. J., Kim, S. G., Kim, K. Y., Lee, K. T., Kim, H. K. and Whang, Y. K. 2008. Isolation of flavonoids from *Carthami Flos* and their antioxidative activity. *Yakhak Hoeji* **52**, 241-251.
45. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact* **10**, 1-40.
46. Vaya, J., Belinky, P. A. and Aviram, M. 1997. Antioxidant constituents from licorice roots: Isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation. *Free Radic. Biol. Med.* **23**, 302-313.
47. Wolfenden, B. S. and Willson, R. L. 1982. Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2, 2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.* **2**, 805-812.
48. Xu, Q., Mori, H., Sakamoto, O., Uesugi, Y. and Koda, A. 1989. Immunological mechanisms of antitumor activity of some kinds of crude drugs on tumor necrosis factor production. *Int. J. Immunopharmacol.* **11**, 607-613.
49. Yang, Z. C., Wang, B. C., Yang, X. S., Wang Q. and Ran, L. 2005. The synergistic activity of antibiotics combined with eight traditional Chinese medicines against two different strains of *Staphylococcus aureus*. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **25**, 79-81.
50. Yoon, S. B., Han, H. S. and Lee, Y. J. 2011. Effect of *scutellariae radix* extract on the proinflammatory mediators in Raw 264.7 cells induced by LPS. *Kor. J. Herbology* **26**, 75-81.
51. Yoon, T. S., Cheon, M. S., Kim, S. J., Lee A. Y., Moon, B. C., Chun, J. M., Choo, B. K. and Kim, H. K. 2010. Evaluation of solvent extraction on the anti-inflammatory efficacy of *Glycyrrhiza uralensis*. *Kor. J. Med. Crop. Sci.* **18**, 28-33.

52. Yoon, Y. H., Kim, S. B., Kang, O. H., Mun, S. H., Seo, Y. S., Yang, D. W., Kang, D. H., Wi, G., Lim, J. S., Kim, M. R., Kwak, N. W., Kong, R. and Kwon, D. Y. 2014. The study

of anti-inflammatory effect of Suryeon-hwan water extract in RAW 264.7 cells. *Kor. J. Herbology* **29**. 125-135.

초록 : 7가지 한약재 처방전에 대한 항산화·항균·항암활성에 대한 연구

이문희^{1,2†} · 이재왕^{3†} · 박 철³ · 한민호¹ · 홍수현^{1*} · 최영현^{1,2*}

(¹동의대학교 한의과대학 생화학교실, ²동의대학교 항노화연구소 및 블루바이오소재개발센터, ³동의대학교 자연과학대학 분자생물학과)

본 연구에서, 우리는 동의보감에서 응저에 대한 한약재 처방전인 길경탕(GGT), 대황목단탕(DHMDT), 사간탕(SGT), 소청룡탕(SCRT), 시호청간탕(SHCGT), 십육미류기음(SYMYKE) 과 황흑산(HHS)에 대한 항산화능과 항암과 항균활성에 대한 생리활성에 대한 연구를 수행하였다. 총 페놀 함량은 길경탕 < 십육미류기음 < 소청룡탕 < 시호청간탕 < 대황목단탕 < 사간탕 < 황흑산의 순서대로 함량이 풍부하였다. 이들 중 황흑산은 SOD 유사활성, 환원력과 DPPH 라디칼과 ABTS 라디칼의 소거능이 가장 뛰어났다. 홍미류계도, 이들 시료의 총페놀 함량과 그들의 항산화능과의 상관도는 높게 나타났다. 모든 시료에서 인간대장세포인 HCT-116에서 항암활성을 나타냈으며, 특히 황흑산은 가장 낮은 활성을 나타낸 길경탕보다도 7배 높은 항암활성을 보였다. 또한, 대장균인 *Escherichia coli*와 위염을 발생시키는 *Helicobacter pylori* 균에 대한 항균 활성을 시행한 결과 사간탕, 소청룡탕, 십육미류기음과 황흑산에서 항균활성이 보였다. 결과를 종합하여 볼 때, 한약재 처방전은 항산화와 생리활성물질의 소재로서의 가치가 있음을 알 수 있었다.