

인삼, 숙부자, 생강, 감초의 배합에 의한 세포독성 평가

Evaluation of Cytotoxicity by Extracting Ginseng, Processed Aconitum, Ginger, and Licorice

김동현

D. H. Kim
국립한국농수산대학
특용작물학과¹
kdh7681@naver.com

김연복

Y. B. Kim
국립한국농수산대학
특용작물학과¹
biotechnist@naver.com

구현정

H. J. Koo
국립한국농수산대학
특용작물학과¹
hjungkoo@korea.kr

백현진

H. J. Baek
국립한국농수산대학
특용작물학과¹
b7741199@naver.com

이수빈

S. B. Lee
전북대학교
생물공정공학과²
lb01071123@gmail.com

장광진 *

K. J. Chang
국립한국농수산대학
특용작물학과¹
chang@af.ac.kr

Abstract

Cytotoxicity was evaluated in A549 lung cancer cells and RAW264.7 macrophage cells with processed aconitum, ginseng, ginger and licorice extracts. The first experiment began to affect toxicity from 100 µg/ml concentrations in extracts mixed with processed aconitum and ginseng. Cytotoxicity began at 1000 µg/ml concentrations in the second experimental extract with additional ginger, both in the first and second groups affected greater cytotoxicity in lung cancer cells than in macrophage cells, and in the third experimental extract with additional ginger and licorice. In conclusion, when using aconitum, ginseng, ginger, and licorice work in combination, which resulted in less impact on macrophage cells toxicity and more cytotoxicity in certain lung cancer cells.

Key words : Lung-cancer activities. Extracting ginseng, Processed aconitum, Ginger and licorice.

*교신저자

1 Korea National College of Agriculture and Fisheries, 1515, Kongwipatjwi-ro, Deokjin-gu, Jeollabuk-do, 54874, Korea

2 Department of Bioprocess Engineering Jeonbuk National University

I. 서론

약용식물이 가지고 있는 약리작용을 약물 상호간의 효능이 비슷한 약물의 배합을 통해 약성을 증대화 시키는 배합방법을 한약학에서는 상수(相須)약이라고 하며 독성의 식물인 부자 약물이 가지고 있는 열성 및 독성반응을 다른 배합약재에 의해 감소되는 용어를 상외(相畏)약이라고 한다(김과 흥, 1983).

고 문헌인 세의득효방에 인삼과 부자의 2종의 약물로 구성된 처방을 삼부탕이라고 한다. 약물이 가지고 있는 효능 및 약리작용을 살펴보면 인삼은 대보원기, 보비익기, 생진, 영신익지 하며 신경계의 흥분 및 강심작용이 있고, 부자는 회양 구역, 보화조양, 온중지통 하는 효능(신, 1986) 연구보고 되었다.

따뜻한 성질의 생강과 약성을 조화시키는 감초의 배합도 부자의 부작용을 제거하는 역할을 하여 한약 포제학에서도 부자는 생약으로 활용함에 있어 선처리 포제 숙부자로 가공하는 방법을 통해 유통되고 있다(강 등, 2003).

인삼은 식물학적으로 오가과(Araliaceae) 인삼속(Panax)에 속한 다년생 반음지성 식물로서 우리나라, 중국, 동부시베리아, 북미 등에 자생하며, 한의학적으로 기허증에 사용하는 대표적인 보기약으로 문헌에 기술되어 있으며 동양의학을 중시하는 중국 및 우리나라의 한의학 의약서에 기재되어 면역력의 증강, 피로회복에 도움, 인체 각 계통의 생리 활성화 질병의 예방을 위해 단방 또는 복방 처방의 본초 약물로 활용되고 있다(남, 1996).

인삼의 생리활성 물질로는 사포닌, 폴리아세틸렌, 페놀성 화합물, 알칼로이드, 산성 다당체, 아미노산, 무기원소 및 아미노당 등이 존재한다(Namba, 1974).

부자(*Aconitum carmichaeli* Debeaux)는 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속한 여러해살이 초본식물인 오두(烏頭)의 자근(子根)을 가공한 것으로 부자는 예로부터 강심, 해열, 진정, 진통, 신진대사 촉진 및 기능향진 등의 목적으로 쓰여온 중요한 생약이며 인체의 손, 발, 복부 및 관

절이 차가운 증상 등의 병증에 사용한다(김, 2014).

부자는 가공수치(포제)를 통하여 생약으로 활용되고 있으며 중국의 의학서로 현존하는 가장 오래된 전문서적인 내경, 신농본초경은 지금으로부터 2천여 년이 넘는 유구한 역사를 가지고 전해 내려오고 있다.

생강(Ginger)은 생강과(*Zingiber officinale* Roscoe)에 속하는 다년생 초본식물로 특유의 매운맛과 방향성 향기를 지니고 있어 전 세계적으로 널리 애용되고 있으며 우리나라에도 식품과 음료 등에 많이 사용되고 있는 향신료 중의 하나이다(Sung 2010). 생강추출물에 관한 연구로 항위염, 항궤양 작용을 입증하였다(Yang, 1992). 생강의 항균성에 관하여 식중독 세균에 대한 증식저해작용도 보고되었다(Kim et al 2000).

감초는 콩과에 속하는 다년초로 중국감초(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch)유럽감초(*Glycyrrhiza glabra* Linne)또는 창과감초(*Glycyrrhiza inflata* Batal)의 뿌리 및 뿌리줄기가 생약으로 주로 이용된다(Kim et al 1995).

감초는 독성이 있는 약재성분을 완화시키고 여러 약용식물의 배합을 조화롭게 어우러지도록 도와준다. 동의보감에서도 감초는 5장 6부의 사기와 한열을 다스리며 인체 생리적 기능을 정상으로 되게 하며 모든 혈액을 소통시키며 근육과 뼈를 튼튼하게 하고 영양 상태를 좋게 한다고 기록되어 있다. 대표적인 약리작용은 해독 이담, 항궤양, 항염증, 진경, 진해, 간보호 등에 있어 한방에서 널리 애용되고 있다(Kim et al 1997).

본 연구는 고 문헌에 기록된 부자의 가공수치 포제법을 이용하여 만든 숙부자를 인삼과 생강 감초와 배합으로 폐암세포와 대식세포 독성에 관하여 연구를 하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구 실험에 사용된 원료 인삼(*Panax*

ginseng Meyer)은 농협중앙회 인삼검사소 1등급 백삼을 금산소재 인삼사에서 구입한 것을 사용하였고, 부자(*Aconitum carmichaeli* Debeaux)는 서울 경동시장 약업사에서 수(생)부자를 구입하여 사용하였다. 염기 처리된 수(생)부자 500 g을 2000 ml 증류수에 담근 후 증류수를 2시간 마다 교환 후 속심을 맛보아 짠맛이 없어질 때까지 증류수에 6시간 담가 소금기를 제거하고 건조 후 숙부자를 가공하기 위하여 부자, 감초, 흑두(10 : 5 : 10)비율로 3시간 동안 함께 삶아서 가공했다. 12시간 건조 후 다시 12시간 증숙하여 숙부자를 직접 가공하였으며 생강(*Zingiber officinale* Roscoe)과 감초(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch)는 한약재 시장에서 구매하여 추출 재료로 사용하였다.

2. 추출 농축액 제조 방법

총 3개의 추출액으로 먼저 인삼과 숙부자를 추출하였고 다음으로 인삼, 숙부자, 생강을 추출하고 마지막으로 인삼, 숙부자, 생강, 감초를 배합하여 추출하였다 (Table 1). 가압멸균 추출기 (auto clave)에 넣고 원료 대비 10배수의 증류수를 투입하여 온도 100°C에서 3시간 동안 2회 추출하였다. 원심분리기를 사용하여 5000 rpm 15분간 침전물을 제거하고, 상층액만 취하여, 추출액을 카트리지 필터(5 µm cartridge filter)로 여과하고 여과한 추출 시료를 감압농축기로 이동시켜 온도 60°C에서 감압(800~850 mm/Hg)하여 30 °Brix까지 농축하였다. 농축액과 증류수를 혼합 6 °Brix로 조정하고 각 50 ml을 제조하여 121°C에서 20분간 멸균 냉각시킨 후 사용하였다.

Table 1. Composition of Ginseng, Processed Aconitum, Ginger and Licorice

Commercial name	Scientific name	Amount
Ginseng	<i>Panax ginseng</i> Meyer	37.5g
Processed Aconitum	<i>Aconitum carmichaeli</i> Debeaux	18.75g
Ginger	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	7.5g
Licorice	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	7.5g

3. 세포 배양

실험에 사용한 RAW264.7 macrophage cell과 A549 lung cancer cell은 한국세포주은행 (KTCC, Seoul, Korea)에서 분양을 받아 사용하였다. RAW264.7 세포는 DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium)배지를 사용하고 A549 세포는 RPMI 1640 배지를 이용하였다. 각 배지에 FBS (Fetal bovine serum)를 10 %와 100 µg/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin을 첨가한 배양액을 이용하고 37°C, 5 % CO₂ incubator에서 배양하였다.

4. 처리방법

각 시료가 대식세포와 폐암세포의 독성에 미치는 영향을 조사하기 위해 각 인삼, 숙부자 추출액, 인삼, 숙부자, 생강 추출액, 인삼, 숙부자, 생강, 감초 혼합 추출액에 1, 10, 100, 1000 µg/ml 농도별로 접종한 후 48시간 동안 인큐베이터에 배양하였다. 각 시료별 대식세포와 폐암세포에 미치는 cell viability에 관한 영향을 MTT assay 방법으로 측정하여 세포 생존율로서 세포독성 여부를 실험하였다.

5. 세포독성 측정(MTT assay)분석

각 추출물의 시료에 대한 세포독성은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherland)로 측정하였다. 96 well plate에 well당 RAW264.7, A549 세포별로 접종하고 37°C, 5 % CO₂, 세포 배양기에서 24시간 배양 후, 각 시료 농도별로 다시 접종 처리하여 48시간 배양하였다. 5 mg/ml 의 MTT 시약을 사용하여 10 µl씩을 각 well에 분주하고 세포 배양기에서 4시간 정치 후, MTT 용액의 상등액을 제거하여 건조한 다음, DMSO (dimethyl sulfoxide)로 각 well에 100 µl씩 분주한 다음 세포배양기에서 15분 보관 후 세포 안에 MTT의 환원에 의해 형성된 formazan crystal이 보라색으로 발색 용해시킨 후, ELISA microplate reader (BioTec, USA)기기를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 분석하였다. 세포의 독성비율은 무첨가군의 세포와 시료추출물 처리한 군의 비율로 계산하였다.

6. 통계처리

각 실험 결과를 mean ± S.D.으로 표기하였고,

통계학적 분석은 SPSS program (SPSS version 12.0)의 ANOVA 분석과 각 군 간의 차이는 Student's t-test를 사용하여 p값이 0.05 미만일 경우에 통계학적인 유의성으로 확인 판정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 세포독성 측정(MTT assay)결과

MTT 시험법을 이용하여 RAW264.7 macrophage cell과 A549 lung cancer cell의 독성여부를 확인하였다 무 첨가군과 3개의 각 시료에 1, 10, 100, 1000 µg/ml의 농도에서 동일하게 처리한군의 흡광도를 조사한 결과 1번째 실험군 100 µg/ml 농도에서 세포독성이 시작되었고, 1000 µg/ml 농도에서 A549 폐암세포와 대식세포의 더 많은 영향을 주었다. 그 중 A549 폐암세포에서 세포독성이 대식세포 보다 더 많은 영향을 주었다(Fig. 1).

다음으로 2번째 실험군 인삼과 속부자 생강이 배합된 처리군에서 1000 µg/ml 농도에서 대식세포 보다 A549 폐암세포에서 더 많은 세포독성에 영향을 주었다(Fig. 2).

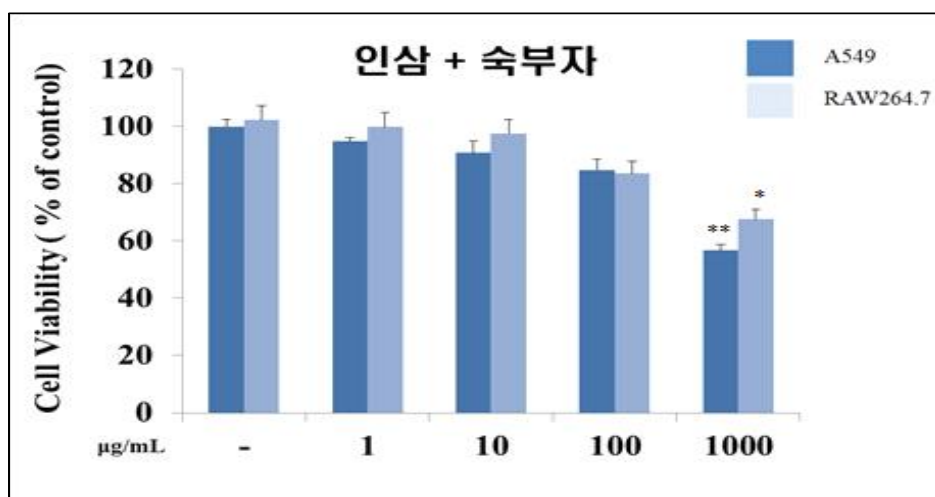


Fig. 1. Cytotoxicity evaluation of Ginseng extract and Processed Aconite extract in A549 cell and RAW264.7 cells. All results are representative of three independent experiments. * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$ vs control

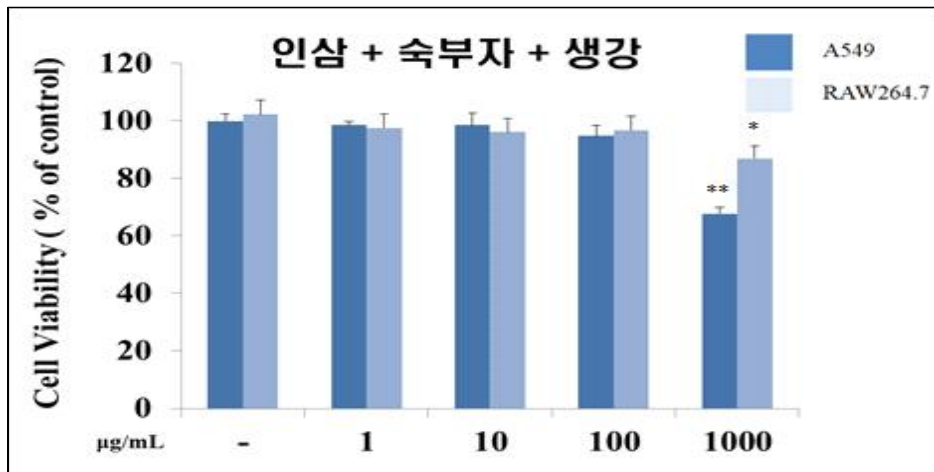


Fig. 2. Cytotoxicity evaluation of Ginseng extract, Processed Aconite extract and Ginger extract in A549 cell and RAW264.7 cells. All results are representative of three independent experiments. * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$ vs control.

다음으로 3번째 실험군 인삼과 숙부자 생강 감초와 배합된 처리군에서 1000 µg/ml 농도에서 대식세포 보다 A549 폐암세포에서 더 많은 세포

독성에 영향을 주었다. 2번째 실험군 보다는 대식세포에 적은 세포독성이 확인되었다.(Fig. 3).

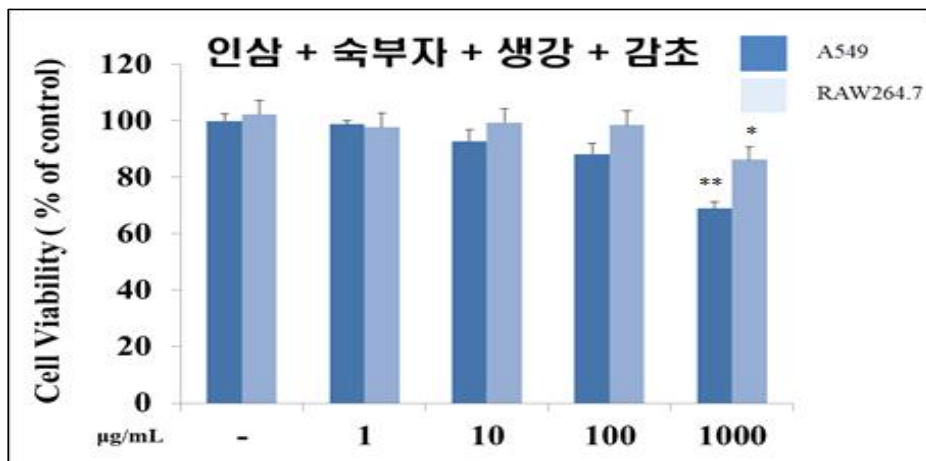


Fig. 3. Cytotoxicity evaluation of Ginseng extract, Processed Aconite extract, Ginger extract and Licorice extract in A549 cell and RAW264.7 cells. All results are representative of three independent experiments. * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$ vs control.

IV. 적요

고 문헌에 기록된 부자의 가공수치 포제법으로 숙부자로 가공하고 인삼, 생강, 감초의 배합으로 폐암세포와 대식세포 독성에 관하여 실험한 결과

1번째 실험군 인삼과 숙부자 처리군에서 100 µg/ml 농도에서 독성에 영향을 주기 시작하여 1000 µg/ml 농도에서 더 많은 영향을 주었다. 그 중 대식세포 보다는 A549 폐암세포에서 더 많은 세포독성에 영향을 주었다. 그리고 2번째 실험

험균에 추가로 생강이 배합된 처리군에서는 1000 µg/ml 농도부터 세포독성이 시작 되었으며 대식세포 보다는 A549 폐암세포에 세포독성에 더 많은 영향을 주었으며 마지막 3번째 실험군 생강과 감초가 추가된 실험군에서는 100 µg/ml 농도에서 A549 폐암세포에 독성이 시작 되었지만 대식세포에는 영향이 없었으며, 1000 µg/ml 농도부터 대식세포와 A549 폐암세포에 영향을 주었다. 결론적으로 독성이 강한 부자를 사용함에 있어서는 반드시 숙부자로 가공하여 활용 하여야 하며 인삼, 생강, 감초의 배합으로 정상세포인 대식세포 독성에는 적은 영향과 특정 폐암세포가 더 많은 세포독성이 있음을 확인할 수 있었다.

앞으로도 인삼, 생강, 감초의 복합추출물이 지속적인 연구를 통해 항암활성의 효능을 검증하고 추가적인 연구가 필요할 것이라 사료된다.

V. 참고문헌

1. 강병수, 서부일, 최호영. 2003. 한약포제와 임상응용. 영림사. p.147-151.
2. 김현제, 홍원식. 1983. 한의학사전. 정보사. p.280.
3. 남기열. 1996. 최신고려인삼. 천일인쇄사. p.56.
4. 김용현. 2014. 본초학. 한울. p.351-356.
5. 신민교. 1986. 원색임상본초학. 남선당. p.167, 263-264.
6. Kim M. L., Choi K. H., Park C. S., 2000. Growth inhibition of food-borne bacteria by juice and extract of Ginger and Garlic. J, East Asian Soc. Dietary Life. 10: 160-169.
7. Kim N. J., Jin Y. H., Hong N. D. 1995. Studies on the processing of crude drugs. Physico-chemical transformation of Glycyrrhizin in Glycyrrhizae Radix by processing. Kor J Pharmacogn. 26: 31-39.
8. Kim S. H., Jung K. K., Kang S. Y., Kim T. G., Kim C. O., Moon A., Ryu K., Lee S. D., Ryeu H. M. 1997. The effects of Jackyak-gamcho-tang on follicular maturation and estrogen production in the immature rat. Kor J Pharmacogn. 28: 104-111.
9. Namba, T., M. Yoshizaki, T. Tomimori, K. Kobashi, K. Matsui and J. Hase. 1974. Fundamental studies on the evaluation of the crude drugs. chemical and biochemical evaluation of ginseng and related crude drugs. Yakugaku Zasshi. 94: 252-258.
10. Sung K. C. 2010. A study on the pharmaceutical characteristics and analysis of natural ginger extract. J of the Korean Oil Chemists Soc. 27: 266-272.
11. Yang W. K., Jung K. W., Kim J. W., Lee E. B. 1992. Antigastric and antiulcerative action of the extract of Zingiberis Rhizoma. J Pharm Soc Korea. 36: 173-179.

논문접수일 : 2021년 4월 30일
논문수정일 : 2021년 6월 10일
게재확정일 : 2021년 6월 14일