

산수유 핵산 추출물의 항균효과 및 세포독성

천현자 · 최원형¹ · 이정호² · 양현옥³ · 백승화^{1*}

원광대학교 자연과학기술학부, 1: 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, 2: 제3의학과, 3: 원광보건대학 피부미용학과

Screening of Cytotoxicity and Antimicrobial Effects of Hexane Extracts from *Cornis fructus*

Hyun Ja Chun, Won Hyung Choi¹, Jeong Ho Lee², Hyun Ok Yang³, Seung Hwa Baek^{1*}

Division of Natural Science, 1: Department of Herbal Resources, 2: Third Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, 3: Department of Cosmetic, Wonkwang Health Science

Cornis fructus was extracted by successive extraction and then fractionated with hexane extract to get active fractions. This study was performed to determine the cytotoxic effect of hexane extract from *Cornis fructus* on NIH 3T3 fibroblasts and cancer cell lines using MTT assay. Hexane extract showed cytotoxic effect against A549, B16 melanoma and MDA-MB-231. Further fractionation with hexane extract was performed to obtain effective fraction, fraction 3 showed the cytotoxic effect against A549 and MDA-MB-231. In antimicrobial test of each fraction of hexane extract, fraction 5 showed antimicrobial activities against *P. putida* and *P. aeruginosa*.

Key words : *Corni fructus*, MTT assay, Cytotoxic effects, Antimicrobial activities

서 론

층층나무과 (Cornaceae)의 낙엽성 떨기나무인 산수유 (*Cornus officinalis*)는 약용수로 사용되고 있으며, 맛이 시고 성질은 약간 따뜻하다.¹⁾ 산수유종 생약재로 이용되는 부분은 열매 (*Corni fructus*)를 건조한 것으로 여기에서는 ursolic acid, 주석산, 사과산 외에 4개의 글루코사이드등이 함유되어 있다.²⁾ Ursolic acid는 항당뇨병 활성이 있는 지용성 물질이며, 4개의 글리코사이드는 morroniside, loganin, sweroside 및 methylmorroniside 이다.³⁾ 이러한 유효물질을 다량함유하는 산수유는 예부터 다뇨증, 요통, 이명, 폐결핵 등의 치료제로 사용되어 왔으며, 그 과실은 자양, 강장, 음위, 이조에 약효가 있고,⁴⁾ 간경화, 신경에 좋고, 이뇨작용, 혈압강하작용, 항암 및 항균작용이 있다고 한방자료에 기록되어 있다. 산수유에 대한 연구로는 산수유 열매의 화학성분,⁵⁾ 영양성분,⁶⁾ 산수유 종자의 항당뇨효과,⁷⁾ 세포의 항산화 방어작용,⁸⁾ 타이로시나제저해작용⁹⁾에 대하여 보고되었으며 항균 및 항암활성에 대한 연구도 보고되었으나 미비한 상태이다. 따라

서 본 연구에서는 다양한 균주 및 세포주에 대한 산수유 연속추출물 및 핵산 분획물의 항균 및 세포독성에 대한 특성을 조사하였기에 보고 드리는 바이다.

실험방법

1. 시료의 추출 및 분획

실험에 사용한 산수유는 원광대학교 한의과대학 한방병원에서 구입하여 잘게 자른 후 용매에 용해시켜 상온에서 연속추출법으로 각 추출물을 얻었다¹⁰⁾. 이중 *n*-hexane 추출물 (56.89 g)을 다시 EtOAc 250 ml에 녹인 후, silica gel (113 g)을 넣어 혼합시켜 균등하게 교반 시킨 후 용매를 감압·증류시켜 silica gel에 coating 시켰다. Coating된 *n*-hexane 추출물을 silica gel (560 g)에 충전된 column chromatography에 넣어 EtOAc와 MeOH로 용리시켰으며, 용리액을 TLC로 확인하고 이를 감압, 농축시켜 5개의 분획을 얻었다. 이 분획물을 TLC (0.25 mm, polygram sil N-HR/UV254, E. Merck)로 재확인하여 분획 1 (16 mg), 분획 2 (115 mg), 분획 3 (411 mg), 분획 4 (46.1 g), 분획 5 (109 mg)을 얻었다. 시료는 즉시 4℃ 냉장고에 저장하였다가 사용직전에 에틸 알콜로 1 : 1 (mg/ml)비율로 희석하여 실험에 사용하였으며

* 교신저자 : 백승화, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의학전문대학원

· E-mail : shbaek@wonkwang.ac.kr, Tel : 063-850-6225

· 접수 : 2003/02/10 · 수정 : 2003/03/05 · 채택 : 2003/04/01

사용된 시료는 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과에 보관되어 있다.

2. 세포주 배양

본 실험에 사용된 세포주는 암세포로 피부 흑색종 세포주인 B16 melanoma세포와 폐암 세포주인 A549세포, 흉부암 세포주인 MDA-MB-231세포 대장암 세포주인 SNU-C4 세포를 사용하였으며 정상세포로는 NIH 3T3 fibroblast 세포주를 서울대학교 세포주 은행에서 구입하여 계대 배양하면서 실험하였다. 세포배양은 CO₂세포 배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 10% fetal bovine serum (Gibco, USA)이 포함된 RPMI 1640 (Gibco, USA)배지를 사용하였고, 여기에 penicillin G (25 unit/ml), streptomycin (25 µg/ml)를 첨가하여 사용하였다 실험을 위하여 일차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin으로 처리하여, Turk형 혈구계산기를 이용하여 세포수가 2×10⁴ cells/ml가 되도록 세포 부유액을 만들었다.

3. 균주의 배양

본 실험에 사용된 균주는 gram 양성세균으로 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus mutans* JC2와 gram 음성세균으로 *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* KC 2421, *Pseudomonas putida* KCTC 8729를 국립보건원으로 부터 분양받아 사용하였으며 항균 대조약으로 ampicillin을 사용하였다. 세포배양에 사용된 배지는 세균의 경우 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, 는 Brain heart infusion(Difco, USA)을 사용하였고, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*는 nutrient broth (Difco, USA)를 사용하였으며, 배지에 균을 이식하여 37°C 배양기에서 24시간 배양하여 사용하였다.

4. MTT정량 분석법

암세포에 대한 세포독성능 측정은 3-(4,5-dimethylthazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide 검정법¹¹⁾에 의하여, 세포를 산수유 추출물로 처리한 배양액에서 48시간 배양한 후, 분석 당일 조제한 MTT (Sigma) 50 µg/ml가 포함된 배양액을 well당 1 ml씩 넣어 3시간 배양하였다. 배양후 배양액을 버리고, dimethylsulfoxide (DMSO)를 2 ml/well씩 넣어 5분간 실온방치하여 MTT formazan을 용해한 후, ELISA reader (Spectra MAX 250, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 항균력 측정

연속추출법으로 추출한 산수유 추출물에 대한 항균력 측정은 디스크 확산법¹²⁾을 이용하고, 핵산 분획물의 항균력은 액체배지 희석법을 이용하여¹³⁾ 세균을 37°C에서 24시간 배양하여 생육 저해환과 최소억제농도 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)¹⁴⁾를 측정하여 항균력을 조사하였으며 항균 대조약으로 ampicillin (Sigma)을 사용하였다.

6. 통계처리

모든 실험결과를 평균치와 표준오차를 계산하였고, 대조군과 실험군간의 차이는 Student's t-test를 사용하여, P-value가 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

1. 연속추출법에 의한 산수유 추출물의 항균활성

연속 추출법으로 추출한 산수유 추출물의 항균작용을 측정 한 결과는 Table 1과 같다. 산수유 추출물에 대하여 항균활성을 측정 한 결과 *S. mutans*에 대하여 30 mg/ml에서 메탄올추출물이 11 mm으로 가장 높은 활성이 나타났고, 물, 핵산, 클로로포름, 에틸에세테이트 순으로 항균활성이 감소하였다. *S. aureus*에서는 메탄올 추출물 (30 mg/ml)에서 12 mm 로 가장 높은 활성이 나타났으며, 물추출물에서는 50 mg/ml에서도 활성이 없었다. *P. putida*에서는 메탄올 추출물 (30 mg/ml)에서 13 mm로 가장 높은 항균활성이 나타났으며, 에틸에세테이트, 핵산, 클로로포름 순서로 항균활성이 감소하였다.일반적으로 산수유 연속추출물의 항균활성은 물추출물의 항균활성을 제외하고는 농도증가에 따라 높게 나타났으며, 추출용매의 극성이 증가할 수록 항균효과도 높게 나타났다.

Table 1. Antimicrobial activities of Corni fructus extracts

Concentration (mg/ml)	HCF		CCF		ECF		MCF		WCF	
	30	50	30	50	30	50	30	50	30	50
Microorganisms										
Gram positive bacteria										
<i>Streptococcus mutans</i>	8	13	7	8	7	9	11	12	9	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	10	7	10	7	11	12	12	-	-
Gram negative bacteria										
<i>Pseudomonas putida</i>	9	13	3	12	10	14	13	14	-	-

(Unit : mm), -: not active, Plant extracts : HCF: Hexane extract of Corni fructus, CCF: Chloroform extract of Corni fructus., ECF: Ethyl acetate extract of Corni fructus., MCF: Methanol extract of Corni fructus., WCF: Water extract of Corni fructus.,

2. 산수유 핵산 분획물의 항균활성

산수유 핵산 추출물을 분리, 분획한 분획물의 항균작용을 측정 한 결과는 Table 2과 같다

Table 2. Antimicrobial activities of fractions of Corni fructus hexane extract

Microorganisms	MIC (µg/ml)					
	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 4	Fr. 5	AP
<i>S. mutans</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	3.2
<i>S. aureus</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	3.2
<i>P. aeruginosa</i>	1000	>1000	>1000	1000	250	50
<i>P. putida</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	500	200

1 분획물에서는 *P. aeruginosa*에 대하여 최소억제농도 1000 µg/ml로 관찰되었으며, 2와 3 분획물에서는 항균효과가 거의 관찰되지 않았다. 4 분획물에서는 1 분획물에서의 마찬가지로 *P. aeruginosa*에 대하여 최소억제농도 1000 µg/ml로 관찰되었다. 5 분획물에서는 *P. aeruginosa*에 대하여 최소억제농도 500 µg/ml로 관찰되었으며, *P. putida*에 대하여는 최소억제농도 250 µg/ml로 관찰되었다. 이는

항균 대조약물인 ampicillin (AP)의 최소억제농도보다 모두 낮은 것으로 나타났다. 이상의 결과로부터 핵산 분획물의 항균활성은 5 분획물에서 다른 분획물들보다 높게 관찰되었으나 대조약물의 항균력보다 낮게 나타났다.

3. 산수유 핵산 추출물의 세포독성

연속 추출법으로 추출한 산수유 핵산 추출물을 처리한 후 정상세포와 암세포주들의 in vitro 세포 생존율을 MTT 정량분석법을 이용하여 측정하였다. Fig. 1에서 보는바와 같이 정상 세포인 NIH 3T3 섬유모세포에 대하여 처리농도가 증가해도 세포 생존율이 거의 감소되지 않아 세포독성을 거의 관찰할 수 없었다. 이와같이 정상세포인 NIH 3T3 섬유모세포에 추출물들을 350 µg/ml 농도까지 처리하여도 세포독성이 관찰되지 않았으므로 추출물에 의한 약물의 독성을 가지지 않는 것으로 사료된다. 암 세포주들에 대한 세포 생존율을 측정해본 결과 MDA-MB-231세포주와 B16 melanoma 세포주에서는 처리농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 서서히 감소함을 관찰할 수 있었으며, A549세포주에서도 처리농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 약간 감소하였다. 그러나 SNU-C4세포주의 경우에는 추출물의 처리농도가 증가해도 세포생존율의 변화가 거의 보이지 않았으며, SNU-C1 세포주의 경우에는 추출물의 농도가 증가됨에 따라 오히려 약간 증가하는 경향을 보였다. 따라서 MDA-MB-231세포주와 B16 melanoma 세포주에서 세포독성을 보이는 핵산 추출물의 생리활성을 보기 위하여 핵산 추출물을 분리, 분획한 후 분획 추출물을 분리하여 in vitro 세포 생존율을 측정하였다.

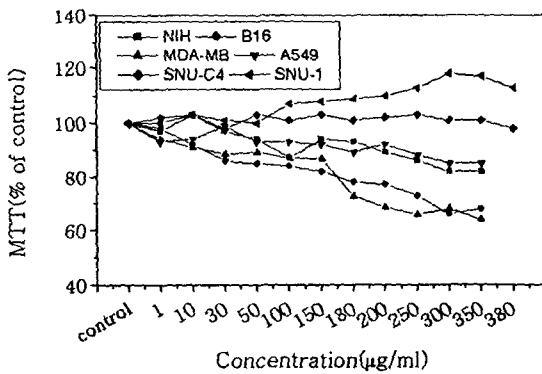


Fig. 1. Effect of Hexane extract from *Cornis fructus* on the viability of cell lines. The cells were cultured in the presence of various concentrations of *Cornis fructus* for 48 hrs. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as %control and data were mean ± S.E. of at least five determinations.

4. 핵산 분획 추출물이 세포주들의 생존율에 미치는 영향

MDA-MB-231세포주와 B16 melanoma 세포주에서 함암활성을 보이는 핵산 추출물의 생리활성을 보기 위하여 핵산 추출물을 분획한 후 분획 추출물을 분리하여 in vitro 세포 생존율을 측정하였다.

1) 핵산 분획 추출물이 NIH 3T3 섬유모세포의 생존율에 미치는

영향

산수유의 핵산 분획 추출물의 정상세포에 대한 세포독성을 검색하기 위하여 NIH 3T3 섬유모세포에 분획 추출물들을 농도별로 처리한 후 MTT 정량분석법을 이용하여 세포독성을 관찰하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 NIH 3T3 fibroblast세포에 대하여 모든 분획물에서 세포 생존율이 거의 감소하지 않아 세포독성을 거의 관찰할 수 없었다. 따라서 분획물에 의한 약물의 독성은 없는 것으로 사료된다.

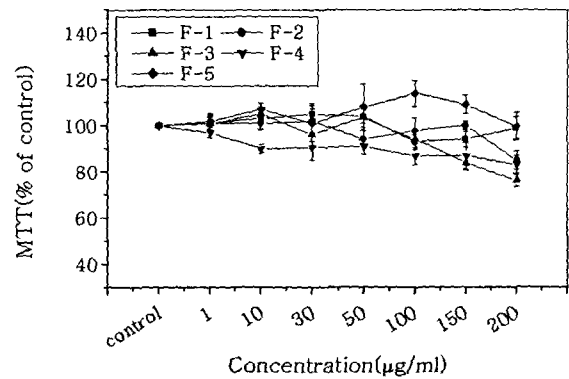


Fig. 2. Effects of hexane fractions from *Cornis fructus* on the viability of NIH 3T3 fibroblast cell line. The cells were cultured in the presence of various concentrations of *Cornis fructus* for 48 hrs. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as %control and data were mean ± S.E. of at least five determinations.

2) 핵산 분획 추출물이 A549세포의 생존율에 미치는 영향

산수유의 핵산 분획 추출물의 암세포에 대한 세포독성을 검색하기 위하여 인체 폐암세포인 A549세포에 분획 추출물들을 농도별로 처리한 후 MTT 정량분석법을 이용하여 세포독성을 관찰하였다.

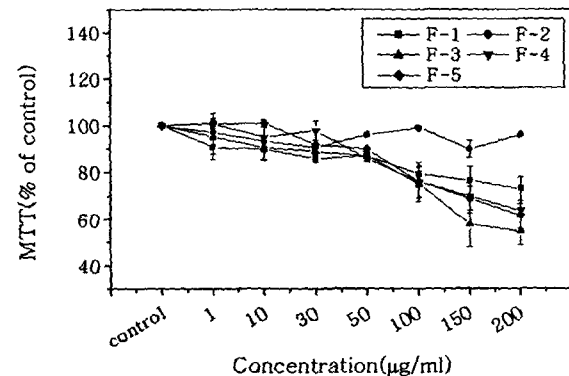


Fig. 3. Effects of hexane fractions from *Cornis fructus* on the viability of A549 lung carcinoma cell line. The cells were cultured in the presence of various concentrations of *Cornis fructus* for 48 hrs. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as %control and data were mean ± S.E. of at least five determinations.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 A549세포에 대하여 2 분획물에서

는 농도가 증가함에 따라 세포의 생존율의 변화를 관찰할 수 없었다. 그러나 다른 분획물들에서는 세포 생존율이 약간 감소하여 세포독성이 약간 있음을 관찰할 수 있었다. 특히 MDA-MB-231세포와 마찬가지로 3 분획물에서 가장 큰 세포독성을 관찰할 수 있었다. 따라서 핵산의 3 분획물에 A549세포의 세포독성 생리활성 물질이 소량 함유되어 있으리라 사료된다.

3) 핵산 분획 추출물이 MDA-MB-231세포의 생존율에 미치는 영향

산수유의 핵산 분획 추출물의 암세포에 대한 세포독성을 검색하기 위하여 인체 흉부암 세포인 MDA-MB-231세포에 분획 추출물들을 농도별로 처리한 후 MTT 정량분석법을 이용하여 세포독성을 관찰하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 MDA-MB-231세포에 대하여 1 분획물에서는 농도가 증가함에 따라 세포의 생존율이 약간 증가되는 경향을 관찰할 수 있었고 2와 5 분획물에서는 세포 생존율이 거의 감소하지 않아 세포독성을 거의 관찰할 수 없었다. 그러나 3과 4 분획물에서는 처리농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 감소되어 세포독성을 관찰할 수 있었다. 특히 3분획물에서 농도가 증가함에 따라 생존율이 현저히 감소하여 큰 세포독성을 관찰할 수 있었다. 따라서 핵산의 3 분획물에 MDA-MB-231세포의 세포독성 생리활성 물질이 함유되어 있으리라 사료된다.

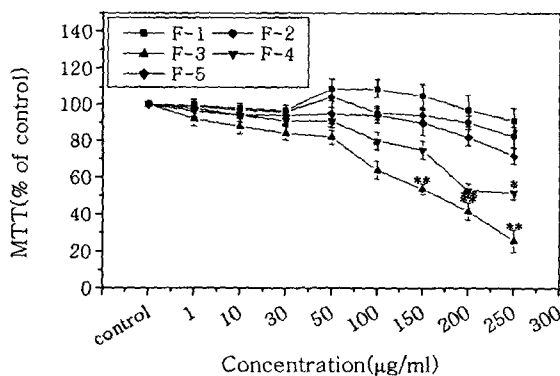


Fig. 4. Effects of hexane fractions from *Cornis fructus* on the viability of MDA-MB-231 breast cell line. The cells were cultured in the presence of various concentrations of *Cornis fructus* for 48 hrs. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as %control and data were mean \pm S.E. of at least five determinations.

4) 핵산 분획 추출물이 B16 melanoma세포의 생존율에 미치는 영향

산수유의 핵산 분획 추출물의 암세포에 대한 세포독성을 검색하기 위하여 흑색종피부암 세포인 B16 melanoma세포에 분획 추출물들을 농도별로 처리한 후 MTT 정량분석법을 이용하여 세포독성을 관찰하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 1과 2 분획물에서는 농도가 증가함에 따라 세포의 생존율의 변화를 관찰할 수 없었다. 다른 분획물들에서는 세포 생존율이 약간 감소하여 세포독성이 약간 있음을 관찰할 수 있었으나 세포독성은 미비하였다.

5) 핵산 분획 추출물이 SNU-C4세포의 생존율에 미치는 영향

산수유의 핵산 분획 추출물이 암세포에 대한 세포독성을 검색하기 위하여 대장암 세포인 SNU-C4세포에 분획 추출물들을 농도별로 처리한 후 MTT 정량분석법을 이용하여 세포독성을 관찰하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 SNU-C4세포에 대하여 2 분획물에서 농도가 증가함에 따라 세포의 생존율이 서서히 증가되는 경향을 관찰할 수 있었다. 그러나 다른 분획물들에서는 세포 생존율이 거의 감소하지 않아 세포독성을 거의 관찰할 수 없었다. 따라서 SNU-C4세포에 대한 분획물의 세포독성은 없는 것으로 사료된다.

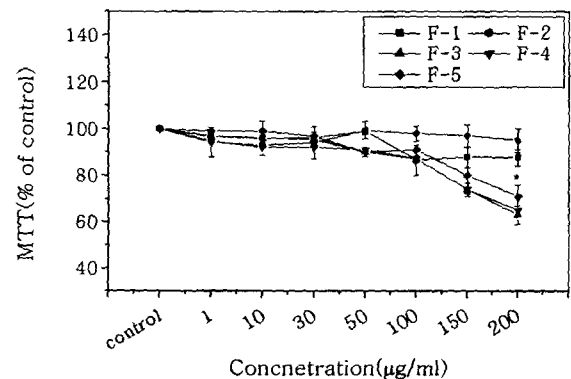


Fig. 5. Effects of hexane fractions from *Cornis fructus* on the viability of B16 melanoma cell line. The cells were cultured in the presence of various concentrations of *Cornis fructus* for 48 hrs. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as %control and data were mean \pm S.E. of at least five determinations.

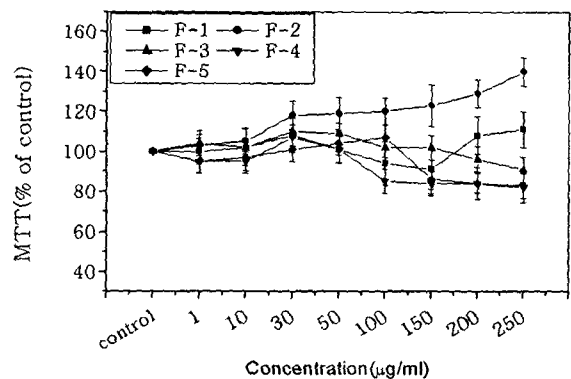


Fig. 6. Effects of hexane fractions from *Cornis fructus* on the viability of SNU-C4 colorectal cell line. The cells were cultured in the presence of various concentrations of *Cornis fructus* for 48 hrs. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as %control and data were mean \pm S.E. of at least five determinations.

결론

산수유 (*Cornis fructus*)의 열매로부터 연속추출법을 사용하여 추출된 추출물에 대한 항균작용과 세포생존을 검색하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 항균작용에서는 메탄올추출물과 핵산

추출물에서 좋은 항균작용을 보였으며 이중 메탄올 추출물이 더 좋은 항균작용을 보였다. 핵산 분획물에서는 5 분획물에서 가장 좋은 항균작용을 보였으나 그 정도는 미미하였다. 세포독성을 조사한 핵산 추출물에서는 MDA-MB-231, B16, A549세포에서 세포 독성을 보였다. 다시 핵산추출물을 분획하여 세포독성을 검색한 결과 분획 추출물중에 3 분획물이 암세포주들에 대하여 가장 큰 세포독성을 보였다 이는 핵산 추출물의 3 분획물중에 생리활성을 갖는 물질이 함유되어 있으리라 생각된다

감사의 글

본 연구는 두뇌한국 21사업지원과 원광보건대학 교내연구비에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 장상문, 최정, 김종완, 박병윤, 박선동 : 한국자원식물학, 학문출판사 1996.
2. Yang, T. H., Liu, S. H. and Sun, M. H. : Constituents of the fruits of *Cornus officinalis*. Taiwan Yao Hsueh Tsa Chih., 22, 1, 1973.
3. Toheu, E. and Chiro, T. H. : Constituents of *Cornus officinalis*. Yakugaku Zasshi, 93, 30-34,1973.
4. 김충섭, 박종희, 도상학 : 국내에 야생하는 특용식물자원의 이용을 위한 연구. 한국 과학기술연구소, BS E463(1), 1410-1416, 1979.
5. 이영철, 김영언, 이부용, 김철진 : 산수유 열매의 화학성분과 건조에 따른 과육분리 특성. 한국식품과학회지, 24, 447-450, 1992.
6. 정시련, 전환희, 박송영, 장순자 : 산수유 종자의 독성과 렉틴 성분. 한국생약학회지, 24, 177-182, 1993.
7. Farag, R. S. : Antimicrobial activity of some egyptian spice essential oils. J. Food Prot. 52, 665-669,1989.
8. Peng, Q., Wei, Z. and Lau, B. H. : *Corni fructus* enhances endothelial cell antioxidant defenses. General Pharmacology, 31(2), 221-225, 1989.
9. Fukushima, M. and Kimura, S. : Studies on cosmetic ingredients from crude drugs(I). Shoyakugaku Zasshi. 43(2), 142-147, 1989.
10. Yang, H. O., Choi, W. Y. Jeon, B. H., Baek. S. H. and Chun, H. J. : Water extract from *Cornis fructus* regulate melanogenesis in B16/F10 melanoma, Kor. J. Orien.l Physiol. Pathol. 16(4), 818-822, 2002.
11. Mosmann, T. : Rapid colorimetric assays for cellular growth and Survival; application of proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65, 55-63, 1983.
12. Gavidson, P. H. and Parish, M. E. : Methods for testing the efficacy of food antimicrobials, Food Technol., 43, 148-152, 1989.
13. Kuroyanagi, M., Arakawa, T., Hirayama, Y. and Hayashi, T. : Antimicrobial and antiandrogen flavonoids from *Sophora flavescens*. J. Nat. Prods. 62, 1595-1599, 1999.
14. 이건섭 : 진단병원미생물학, pp.589-601. 고려의학, 서울 1996.