

## 와송 다당체 및 올리고당류의 생리 활성

김기훈 · 김은영 · 김예운 · 백금옥 · 김한복<sup>1</sup> · 이동석\*

인제대학교 의생명공학대학 임상병리학과, 인제대학교 바이오헬스 소재 연구센터

<sup>1</sup>호서대학교 자연과학부 생명과학전공

와송으로부터 고온 고압의 열수 추출로 다당체 조추출물(OJPI)을 얻어 디스크 확산법, fluorescein diacetate (FDA)법 및 액체 배지 희석법을 통하여 세균과 진균에 대한 항균 활성을 조사하였다. 또한 Sephadex G-50을 통하여 다당체(FI)와 올리고당류(FII)를 분리하고, 이들의 항암 활성을 조사하였다. FI와 FII의 분자량은 각각 30~50 kDa과 1~3 kDa으로 추정되었다. OJPI의 항균 효과는 디스크 확산법에서 *Candida albicans*가  $20 \pm 4.9$  mm의 억제 대로 가장 높았으며, *Salmonella typhimurium*과 *Staphylococcus aureus*도 각각  $18 \pm 2.0$  mm와  $17 \pm 1.0$  mm의 억제 대로 비교적 높게 나타났다. 또한 *Escherichia coli*와 *Pseudomonas aeruginosa*에 대해서도 양성 대조군인 프로폴리스보다 높게 나타났으며, FDA법, 액체배지 희석법에서도 비슷한 양상을 나타냈다. OJPI과 FI, FII의 인체 암세포주와 Sarcoma 180 세포주에 대한 항암 활성을 측정해 본 결과, 이들은 모두 MTT assay와 형태 변화 관찰에서 강력한 암세포주 증식 억제 효과를 나타내었는데, 특히 폐암 세포주인 A549 세포와 자궁 경부암 세포주인 HeLa 세포, 위암 세포주인 AGS에서 현저한 효과를 보였다. 더 나아가 DNA 분절화를 통해 apoptosis 유발 여부를 확인해 본 결과, 대조군에 비해서 이들 물질을 처리한 실험군에서 apoptosis 발생을 뜻하는 DNA 분절화 현상이 뚜렷하게 나타났다. 요컨대, OJPI과 FI, FII는 광범위한 병원성 균주에 대하여 효과적인 항균 활성을 보였으며, 각종 암세포주에 대하여 현저한 항암 활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

**Key words** □ anticancer activity, antimicrobial activity, DNA fragmentation, oligosaccharides, *Orostachys japonicus*, polysaccharides

### 서 론

의학의 발달로 평균 수명이 증가되면서 건강에 대한 관심이 확대되고 있다. 오늘날 천연물로부터 부작용 및 독성이 적고 선택적인 생리 활성 효과를 나타내는 새로운 물질을 찾아내어 이를 인류의 건강 유지와 증진에 활용하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다(11, 14). 이런 가운데 몇몇 다당체들이 질병 예방학적인 생리 기능을 갖고 있다고 알려지면서 다당체의 중요성이 점차 인식되게 되었다(10, 18). 식물성 다당체는 수용성 다당체로서 소염제와 피부병 치료제, 식사 요법제, 면역 부활제 등으로 다양하게 이용되어 왔다. 최근에는 종양이나 알러지를 유발하지 않으며 물리, 화학적으로 안정하고 순수한 다당체를 담자균류를 비롯한 진균류, 효모류, 세균, 지의류, 해조류 및 고등식물 등에서 분리·정제하고 있다(7, 9).

와송(瓦松, *Orostachys japonicus*)은 바위솔이라 불리는 돌나물과(Crassulaceae)의 다년생 초본식물로서 한방에서 해열(解熱), 소종(消腫), 지혈(止血) 및 이습(利濕) 등에 사용되며 민간요법으로 암 치료에도 많이 이용되고 있다(1). 와송을 본초학적으로 문헌을 통하여 고찰하여 보면 당본초(唐本草)에는 구중(口中)의 건조(乾燥)와 통증(痛症)에 사용한다고 하며, 본초강목(本草綱目)에는 대장하혈(大腸下血)에 물로 추출하여 복용하고 모든 상처에 도포

하면 수렴 효과가 있다고 하며, 본초재신(本草再新)에는 백독(百毒)을 치료하고 종(腫)을 소실시키며, 분류초약성(分類草藥性)에는 치질의 종통출혈(腫痛出血)을 다스리는데 효과가 있다고 한다(2).

지금까지 분리, 보고된 와송의 성분으로는 friedelin, epifriedlanol, glutinone 및 glutiniol과 같은 triterpenoid류와  $\beta$ -sitosterol과 campesterol 등의 sterol계열 물질, fatty acid ester류, kaempferol과 quercetin과 같은 flavonoid류, 4-hydroxybenzoic acid와 3,4-dihydroxybenzoic acid, gallic acid 등의 aromatic acid 등이 있다(16, 17). 또한 중국산 자와송(自瓦松, *O. fimbriatus* Berger)에서 당의 성분으로 sedoheptulosan과 isopropylidene, sedoheptulose, flavonoid 성분으로 kaempferol-3-glucosyl-7-rhamnoside가 알려져 있다(3, 4).

따라서 본 연구에서는 천연물인 한국산 와송에서 다당체 및 올리고당류를 분리하여 세균 및 진균 등에 대한 광범위한 항균 활성과 각종 암세포주에 대한 항암 활성을 체계적으로 탐색해 보고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 와송으로부터 다당체 및 올리고당류 추출과 분자량 추정

한국산 와송의 마른 꽃과 줄기를 잘게 분쇄하여, 100 g을 고온, 가압의 물로 3시간 동안 2번 추출하여 여과한 후 약 10배로 농축하였다. 농축액에 에탄올이 85% 되도록 첨가하여 4°C에서

\*To whom correspondence should be addressed.

Tel: 82-55-320-3262, Fax: 82-55-334-3426

E-mail: mbdslee@inje.ac.kr

**Table 1.** List of indicator strains

Indicator strains	Culture temp. (°C)	Gram	Remarks
<i>Escherichia coli</i> DH 5 $\alpha$	37	-	Bacterium
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KCTC 2001	30	-	Bacterium
<i>Salmonella typhimurium</i> KCTC 2057	37	-	Bacterium
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCCM 11321	37	-	Bacterium
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1621	37	+	Bacterium
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14945	30	+	Bacterium
<i>Listeria monocytogenes</i> KCCM 40307	25	+	Bacterium
<i>Candida albicans</i> KCTC 1040	25		Yeast

24 시간 방치한 후 원심분리(2,300×g, 20 min, 4°C)하여 와송 다당체(OJP1)를 얻었다. Sephadex G-50으로 충전된 칼럼(2.5 cm × 50 cm, Sigma Chemical Co.)에 OJP1(100 mg/ml)을 2 ml 주입하여 3 ml/min 유속으로 2.5 ml 씩의 분획을 얻었다. 각각의 분획은 페놀-황산법(19)으로 총당량을 측정하였으며, dextran을 standard로 하여 OJP1으로부터 분리되어 나온 FI과 FII의 분자량을 추정하였다.

#### 사용 균주 및 암세포주

추출물의 항균 효과를 검토하기 위하여 본 실험에서는 인체에서 질병을 유발할 수 있는 그람 양성 세균 3종, 그람 음성 세균 4종 및 효모류 1종을 선정하여 사용하였다(Table 1). 항암 효능을 검토하기 위하여 A549 인체 폐암 세포(A549 human lung carcinoma cell), HeLa 인체 자궁 경부암 세포(HeLa human cervical carcinoma cell), AGS 인체 위암 세포(AGS human gastric carcinoma cell), SK-Hep-1 인체 간암 세포(SK-Hep-1 human hepatocellular carcinoma cell) 및 Sarcoma 180 마우스 육종세포를 한국세포주은행으로부터 분양 받아 배양하면서 실험에 사용하였다.

#### 디스크 확산법

디스크 확산법은 Kim과 Shin(12)의 방법을 약간 변형하여 수행하였다. 디스크 확산법에 의한 감수성 검사용 배지로는 Mueller Hinton 배지(DIFCO)를 사용하였다. 시험 균주를 전 배양한 후 이를 본 배양배지에 접종하여 균주를 배양하면서 대수 증식기(early exponential growth phase) 상태에 도달한 균을 이용하여 항균 활성을 측정하였다. 배양된 균주를 고체 배지에 접종하여 골고루 퍼지게 한 후 OJP1을 농도별로 디스크(8 mm)에 흡수시켜 배지 표면 위에 올려 놓았다. 48 시간 동안 배양한 후 항균력을 디스크 주위 투명대의 발생 유무 및 크기로 확인하였다. 배양 시에는 인체의 환경에 가깝게 맞추기 위하여 혐기적 조건을 유지하였다.

#### Fluorescein diacetate (FDA)법

FDA 측정은 Chand 등(6)의 방법을 변형하여 수행하였다. 대수 증식기의 시험균 175  $\mu$ l와 시료 20  $\mu$ l를 96 well microplate에 넣고 각 시험균의 적정 배양온도와 혐기성 배양 조건 하에서 40 분간 배양한 후 acetone에 용해한 0.2% FDA 5  $\mu$ l를 첨가하여

90 분간 배양을 계속하였다. 항균 효과를 확인하기 위하여 시험균이 생성하는 esterase에 의한 FDA 분해산물인 fluorescein 생성량은 흡광도 490 nm에서, 균생육도는 655 nm에서 microplate reader를 사용하여 측정하였다.

#### 액체배지 희석법

농도별 추출물을 함유한 Mueller Hinton broth (DIFCO)에 시험균 1%를 넣어 18시간 동안 적정 온도와 혐기성 조건 하에서 배양한 후 균의 증식(배지의 혼탁) 유무를 관찰하여 세균이 증식하지 않은 OJP1의 최소량을 최저 발육 억제 농도(MIC)로 정하였다.

#### 세포 배양

암세포주는 5,000 units/ml penicillin-5,000  $\mu$ g/ml streptomycin과 10%의 FBS (fetal bovine serum)가 함유된 RPMI 1640 (Gibco)을 사용하여 5% CO<sub>2</sub>가 공급되고 습도가 유지되는 37°C 배양기에서 배양하였다. 암세포의 배양 중에는 일주일에 2~3회 새 배지를 제공해주었으며, 6~7일마다 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.2)로 세포를 세척한 후 0.25% trypsin-1 mM EDTA로 부착된 세포를 분리하여 이를 다시 원심분리한 후, 배지를 첨가하고 피펫으로 골고루 분산시켜 계대배양을 시행하였다.

#### MTT assay

MTT assay는 주로 Roche사에서 구입한 Cell proliferation kit 1 (MTT)을 사용하여 다음과 같이 진행하였다. 배양 플라스크에 부착된 암세포의 경우는 0.25% trypsin-1 mM EDTA를 2~3 ml 첨가하여 떼어낸 후 RPMI 1640배지 5 ml을 넣어 200×g에서 5 분간 원심분리시켰다. 적정 세포수(5×10<sup>4</sup>~2×10<sup>5</sup> cells/ml)를 96 well plate에 100  $\mu$ l씩 첨가하고, 생리활성 검사를 위해 사용될 다당체 및 올리고당류는 PBS를 첨가하여 농도별로 희석한 후, 각 well당 10  $\mu$ l씩 첨가하고 대조군에는 PBS만 10  $\mu$ l 첨가하여 100% 생존군으로 하였다. 곧이어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48 시간과 72시간동안 배양시켰다. 배양 후 plate의 각 well에 5 mg/ml의 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)를 10  $\mu$ l씩 첨가해주고 다시 37°C에서 4 시간 더 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 배양 종료 후 생성된 formazan 결정을 녹이기 위하여 solubilization buffer를 100  $\mu$ l씩 첨가한 후

하룻밤 배양하고 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 흡광도는 MTT가 세포에 의해서 환원된 양을 나타내며, 각 well에 존재하는 생존 수와 비례한다.

**암세포주의 형태 변화 관찰**

암세포주의 형태 변화 관찰은 Chakrabarty 등(5)의 방법을 약간 수정하여 수행하였다. 외송의 OJP1이나 FI, FII가 암세포주의 세포 크기와 형태 변화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 도립 현미경으로 관찰하고 사진을 촬영하였다. 암세포주를 1×10<sup>6</sup> cells/ml 농도로 맞추어 24 well plate에 1 ml씩 분주한 후 각 well에 1 mg/ml 농도의 시료를 처리하고 대조군에는 PBS를 첨가하여 48시간 동안 세포의 형태 변화를 관찰하였다.

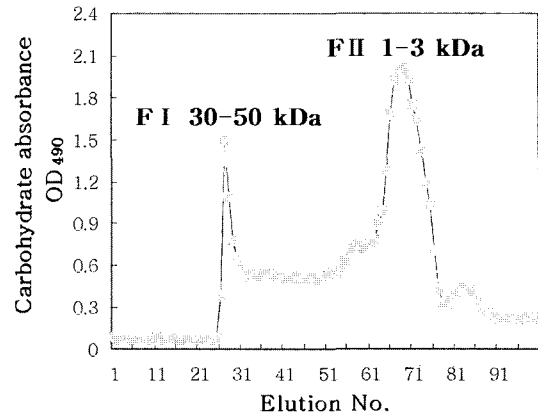
**Apoptotic DNA 분절 실험**

Apoptotic DNA 분절 실험은 Kono 등(13)의 방법을 약간 변형하여 수행하였다. 24 well plate에 암세포주를 1×10<sup>6</sup> cells/ml 되도록 준비하여 1 ml씩 분주한 후 각 well에 250 µg/ml 농도의 FI 이나 FII, OJP1을 처리하였고, 대조군에는 PBS를 첨가하였다. FI 이나 FII, OJP1을 처리한 암세포주를 회수한 다음 PBS로 1회 세척한 후 세포용해 완충액(0.1 M EDTA, 0.5% SDS, 0.1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl(pH 8.0))을 넣고, 0.5 µg/ml proteinase K를 넣은 후 50°C에서 4시간 반응하였다. 그 후 16,000×g로 5분간 원심 분리한 다음 상등액을 회수하여 phenol로 1회, phenol-chloroform-isoamyl alcohol(25:24:1(v:v:v))로 1회, chloroform으로 1회 처리하여 단백질을 제거하고, 회수한 상등액에 1/10 용량의 sodium acetate(pH 5.2)와 2배 용량의 ethanol을 넣고 -70°C에서 1시간 방치한 후 원심분리하였다. 그 후 70% ethanol로 1회 세척한 다음 RNase(10 µg/ml)가 함유된 TE buffer로 DNA를 녹여서 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 2% agarose gel에서 전기영동하였다.

**결 과**

**다당체 조추출물의 분리 및 정제**

외송의 마른 꽃과 줄기 100 g을 2 L의 증류수로 3 시간 동안



**Fig. 1.** Gel filtration chromatography of *O. japonicus* polysaccharides. Aliquot of polysaccharides dissolved in distilled water was applied to sephadex G-50 column chromatography. Fraction was collected and monitored by Phenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> method.

열수 추출하여 12% 수율로 다당체(OJP1)를 얻었다. OJP1을 10 배 농축하고 Sephadex G-50 겔 크로마토그래피를 이용하여 각 기 다른 분자량을 가진 소량의 분획(FI)과 다량의 분획(FII)을 분리하였다. 페놀-황산법으로 FI는 30~50 kDa으로, FII는 1~3 kDa으로 분자량을 추정하였으며, FI는 다당체로, FII는 올리고당류로 구분하였다. OJP1으로부터 분리한 FI과 FII는 각각 약 2%와 8%의 수율을 나타내었다(Fig. 1).

**항균 활성**

OJP1을 농도별로 세균 및 효모에 처리하여 항균 활성을 조사한 결과, 디스크 확산법에서는 칸디다증을 일으키는 효모인 *C. albicans*가 20±4.9 mm의 억제대로 가장 높은 활성을 나타내었고, 병원성 장내세균인 *S. typhimurium*과 화농성 세균인 *S. aureus*는 각각 18±2.0 mm와 17±1.0 mm의 억제대를 나타내었다. 또한 식품오염의 지표균인 *E. coli*와 녹농성 세균인 *P. aeruginosa*에 대해서는 양성 대조군인 프로폴리스(8, 15)보다 높은 항균 작용을 가지는 것으로 나타났으며(Table 2), FDA법, 액체배지 희석법

**Table 2.** Antimicrobial activities of *O. japonicus* polysaccharides (OJP1) in the disc diffusion method

Indicator strains	Inhibitory zone (mm) <sup>a</sup>						
	OJP1 (mg/ml)						Propolis (mg/ml)
	100	90	80	70	60	50	100
<i>S. aureus</i> KCTC 1621	17.0±1.0	13.0±2.0	12.0±0.5	12.0±2.0	12.0±2.0	11.0±1.0	15.5±1.3
<i>B. megaterium</i> ATCC 14945	15.0±1.0	11.0±1.0	10.0±2.0	9.0±1.0	(-) <sup>b</sup>	(-)	10.1±1.0
<i>L. monocytogenes</i> KCCM 40307	12.2±0.9	12.0±2.0	11.0±1.0	10.0±1.0	10.0±0.5	9.0±1.0	11.1±1.0
<i>E. coli</i> DH 5α	15.0±1.0	13.0±1.0	11.0±0.1	11.0±1.0	10.0±1.0	9.0±1.0	14.0±0.7
<i>K. pneumoniae</i> KCTC 2001	14.0±1.6	12.0±1.0	11.0±1.0	11.5±1.3	10.5±1.3	10.5±1.3	13.0±1.0
<i>S. typhimurium</i> KCTC 2057	18.0±2.0	15.0±1.0	14.0±0.6	13.0±1.0	13.0±0.9	12.0±1.0	13.0±1.0
<i>P. aeruginosa</i> KCCM 11321	13.0±1.0	12.0±0.7	11.0±0.7	9.0±1.0	9.0±1.0	8.5±0.2	11.0±1.0
<i>C. albicans</i> KCTC 1040	20.0±4.9	14.0±2.7	13.0±2.2	10.0±1.0	9.0±0.7	9.0±1.0	11.0±0.8

Bacteria and yeast were incubated in the anaerobic chamber at 37°C, 30°C or 25°C for 48 hr.

Superscript a: All values of means ± S.D., Superscript b: No inhibition

**Table 3.** Antimicrobial activities of the OJP1 in the fluorescein diacetate (FDA) method

Indicator strains	490 mm	655 mm
	C <sup>a</sup> - S <sup>b</sup>	C - S
<i>S. aureus</i> KCTC 1621	0.369	0.100
<i>B. megaterium</i> ATCC 14945	0.391	0.136
<i>L. monocytogenes</i> KCCM 40307	0.255	0.032
<i>E. coli</i> DH 5 $\alpha$	0.491	0.163
<i>K. pneumoniae</i> KCTC 2001	0.273	0.049
<i>S. typhimurium</i> KCTC 2057	0.400	0.181
<i>P. aeruginosa</i> KCCM 11321	0.450	0.133
<i>C. albicans</i> KCTC 1040	0.524	0.098

FDA method was performed as described in materials and methods. The OJP1 was dissolved in D.W. and 20  $\mu$ l (200  $\mu$ g) solution of the OJP1 or the D.W. as control was added. Superscript a : Control, Superscript b : Sample.

에서도 비슷한 양상을 나타냈다(Table 3, 4).

**와송 다당체와 올리고당류의 암세포주에 대한 증식 억제 효과**

OJP1이나 FI, FII가 인체 암세포주와 Sarcoma 180 세포주에 직접적인 살상작용을 할 수 있는지에 대하여 조사하기 위하여, OJP1이나 FI, FII를 50~1,000  $\mu$ g/ml의 농도별로 처리하여 각각 48시간, 72시간 배양한 후 MTT assay 방법으로 조사하였다. 대조군(100% 생존군)과 비교하였을 때, 이들은 모두 강력한 암세포주 증식 억제 효과를 나타내었으며(Fig. 2~6), 특히 폐암 세포주인 A549 세포와 자궁 경부암 세포주인 HeLa 세포, 위암 세포주인 AGS 세포에서 현저한 효과를 보였다.

**암세포주 형태 변화의 현미경 관찰**

OJP1이나 FI, FII가 인체 암세포주와 Sarcoma 180 세포주의 세포 크기와 형태 변화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 도립 현미경으로 세포를 관찰하였다. 모든 암세포주에 있어서 시료를 넣지 않은 대조군은 세포가 well plate 바닥에 부착되어 정상적

**Table 4.** Measurement of minimal inhibitory concentration (MIC) of the OJP1 against various strains grown in the anaerobic system through broth dilution method.

Indicator strains	MIC (mg/ml)
<i>S. aureus</i> KCTC 1621	5 <
<i>B. megaterium</i> ATCC 14945	20 ~10
<i>L. monocytogenes</i> KCCM 40307	10~ 5
<i>E. coli</i> DH 5 $\alpha$	5 <
<i>K. pneumoniae</i> KCTC 2001	5 <
<i>S. typhimurium</i> KCTC 2057	5 <
<i>P. aeruginosa</i> KCCM 11321	5 <
<i>C. albicans</i> KCTC 1040	5 <

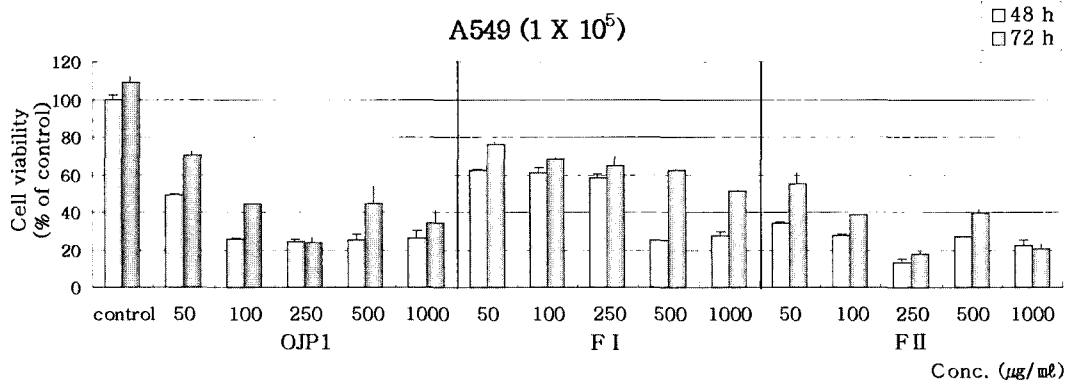
인 증식을 이루는 반면, 시료를 넣은 세포들은 서로 뭉치거나 세포의 모양이 다각형에서 원형으로 변하면서 대부분 바닥에서 이탈하여 사멸하는 모습을 보였다(Fig. 7, 8).

**Apoptotic DNA 분절 실험**

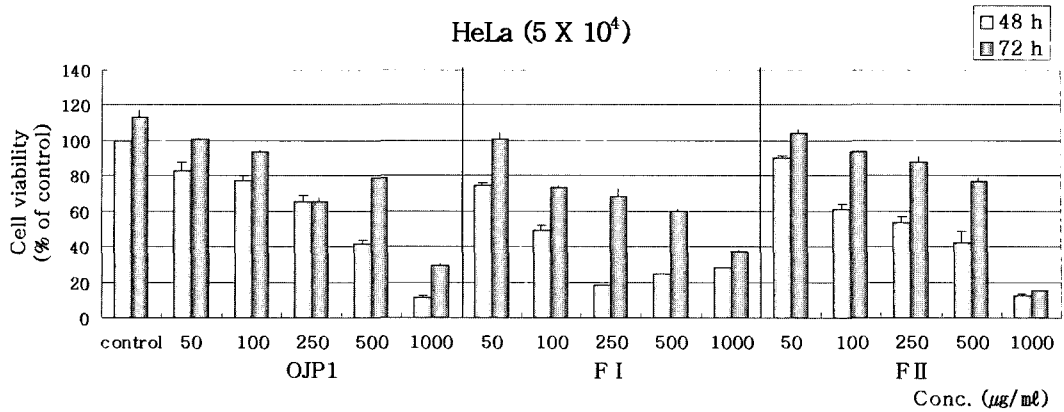
FI이나 FII, OJP1에 대한 인체 암세포주의 생존율 감소가 apoptosis를 통하여 발생하는지를 알아보기 위하여 genomic DNA의 분절화 여부를 조사하였다. FI과 FII를 각각 처리한 A549 인체 폐암 세포주에서는 처리 농도 250  $\mu$ g/ml 이상에서, 처리 시간 24시간 이후부터 공히 DNA 분절화가 시작되었으며, 처리 시간이 길어짐에 따라 명확한 분절화 현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 9). OJP1의 경우도 비슷한 양상을 보였다.

**고 찰**

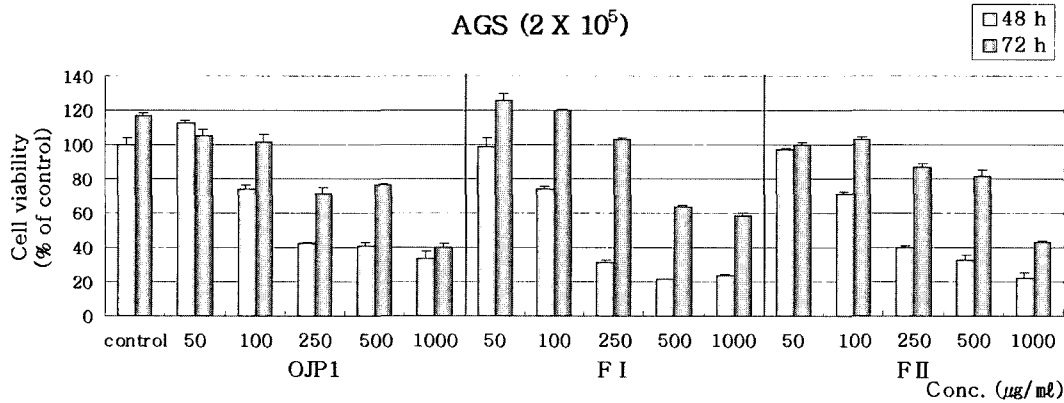
그 동안 천연물의 생리 활성에 대한 연구는 일반 성분이나 영양 성분을 주로 대상으로 하였기 때문에 다당체나 올리고당류는 중요하게 다루지 않았다. 그러나 최근 분리·분석 기술이 급격하게 발달함에 따라 물질의 미세구조까지 밝힐 수 있게 되었고, 몇몇 다당체들에 대한 질병 예방학적인 생리 기능이 밝혀지면서 그 중요성이 점차 인식되게 되었다(10, 18). 생리 활성을 가지는



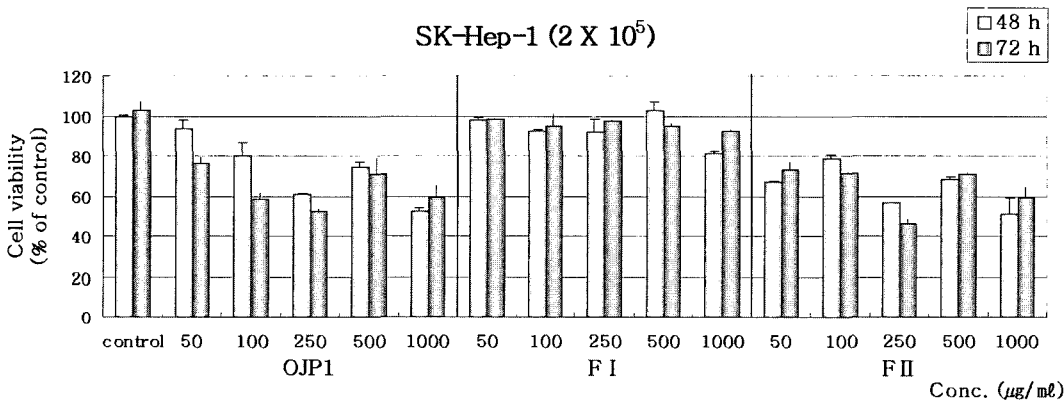
**Fig. 2.** Time- and dose-response effect of the OJP1, FI or FII on viability of A549 cells. Cells were cultured with different concentrations for 48 hr and 72 hr, and cell viability was determined by the MTT method.



**Fig. 3.** Time- and dose-response effect of the OJP1, FI or FII on viability of HeLa cells. Cells were cultured with different concentrations for 48 hr and 72 hr, and cell viability was determined by the MTT method.



**Fig. 4.** Time- and dose-response effect of the OJP1, FI or FII on viability of AGS cells. Cells were cultured with different concentrations for 48 hr and 72 hr, and cell viability was determined by the MTT method.



**Fig. 5.** Time- and dose-response effect of the OJP1, FI or FII on viability of SK-Hep-1 cells. Cells were cultured with different concentrations for 48 hr and 72 hr, and cell viability was determined by the MTT method.

다당체는 기능성 식품소재 및 의약품 개발 측면에서 그 이용가치가 높아지고 있으며(7, 9), 특히 생리 활성이 높은 올리고당류의 개발은 더욱 이용가치가 높아질 것으로 기대된다.

본 연구는 외송이 민간요법으로 습진 및 암 치료에 이용되고 있다는 점을 근거로 특히 외송의 다당체나 올리고당류의 생리

활성을 과학적·체계적으로 규명하기 위하여 외송으로부터 다당체 및 올리고당류 분획을 추출하고, 이들의 세균 및 진균 등에 대한 항균 활성과 다양한 암세포주에 대한 항암 활성을 확인하였다.

외송 OJP1에 대한 항균 활성을 검색한 결과 칸디다증을 일으

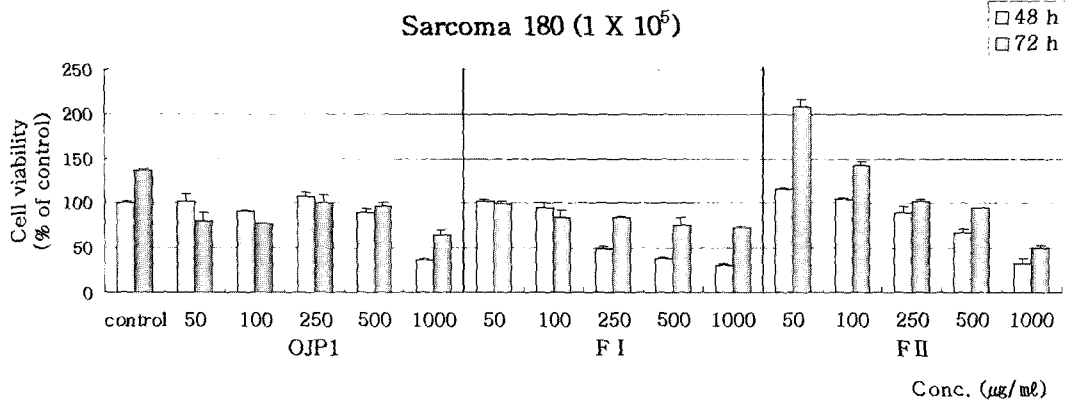


Fig. 6. Time- and dose-response effect of the OJP1, FI or FII on viability of Sarcoma 180 cells. Cells were cultured with different concentrations for 48 hr and 72 hr, and cell viability was determined by the MTT method.

키는 효모인 *C. albicans*가 20±4.9 mm의 억제대로 가장 높은 활성을 나타내었고, 병원성 장내세균인 *S. typhimurium*과 화농성 세균인 *S. aureus*도 각각 18±2.0 mm와 17±1.0 mm의 억제대를 나타내었다. 또한 식품 오염의 지표균인 *E. coli*와 녹농성 세균인 *P. aeruginosa*에서도 양성 대조균인 프로폴리스보다 높은 활성을 가지는 것으로 나타났으며, FDA법, 액체배지 희석법에서도 비슷한 양상으로 나타났기 때문에 외송 또는 OJP1을 효과적인 대체 항균 소재로 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

외송 OJP1과 이로부터 분리한 FI, FII의 항암효과를 검토하기 위하여 MTT assay와 현미경 관찰을 수행한 결과 MTT assay에서는 각종 인체 암세포주의 생존율이 OJP1과 FI, FII의 농도 및 처리 시간에 비례하여 현저히 감소하는 경향을 보였으며, 현미경

관찰 소견에서도 세포주들이 뚜렷이 변형되면서 부유하는 양상을 보임으로써 이들이 효과적인 항암 활성을 나타내고 있음을 알 수 있었다. 또한 항암 기작이 apoptosis와 어떠한 관계를 갖고 있는지를 알아보기 위하여 apoptosis에 의한 DNA 분절화 현상을 조사하였는데 그 결과 농도와 처리 시간에 따라 DNA 분절이 뚜렷이 관찰되어 FI이나 FII, OJP1에 의한 암세포 사멸이 apoptosis와 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다.

한편, 외송 OJP1으로부터 분리한 FI과 FII의 강력한 항암 활성 효과는 암세포주 뿐만 아니라 정상 세포에서도 apoptosis에 의한 DNA 분절화 현상이 나타날 가능성이 있기 때문에 안전성에 관한 연구가 추가적으로 수행되어야 할 것으로 판단된다. 앞으로 항균 및 항암 생리 활성을 보이는 OJP1, FI 및 FII의 명확

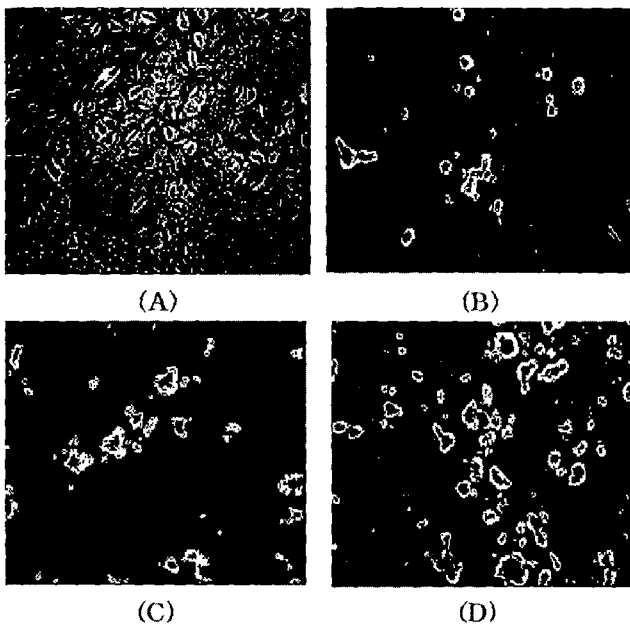


Fig. 7. Morphology of A549 cells exposed (48 hr) to control (A), 1 mg/ml of OJP1 (B), FI (C) or FII (D).

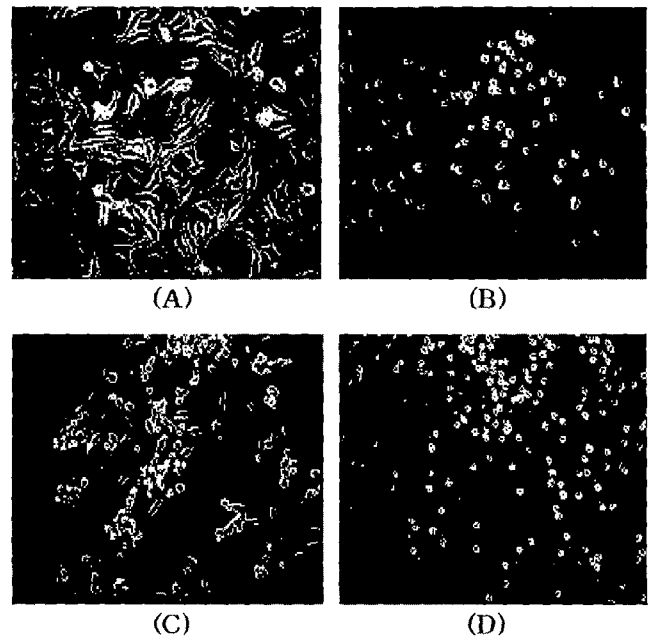
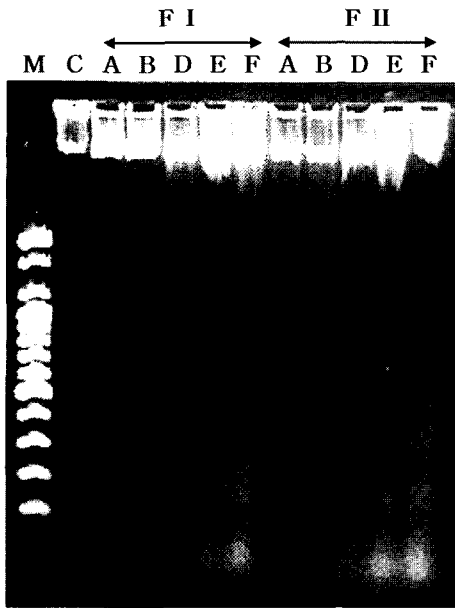


Fig. 8. Morphology of HeLa cells exposed (48 hr) to control (A), 1 mg/ml of OJP1 (B), FI (C) or FII (D).



**Fig. 9.** DNA fragmentation analysis showing induction of apoptosis A549 cells were treated with 250 µg/ml of FI or FII for different time intervals. Symbol: M, 100 bp DNA marker; C, untreated control; A, 6 hr; B, 12 hr; D, 24 hr; E, 48 hr; F, 72 hr.

한 구조 규명과 생리 활성에 대한 보다 면밀한 분자유전학적인 연구도 필요하다고 사료된다.

요컨대, 본 연구에서는 예로부터 민간요법으로 활용되어 왔던 한국산 외송으로부터 다당체 및 올리고당류를 효율적으로 추출·정제하였으며, 이들의 병원성 세균 및 효모에 대한 효과적인 항균 활성과 apoptosis에 의한 각종 암세포주에 대한 현저한 항암 활성을 확인할 수 있었다.

### 감사의 글

본 연구는 2001학년도 인제대학교 학술연구조성비 지원과 일부는 과학기술부·한국과학재단 지정 지역협력연구센터인 인제대학교 바이오헬스 소재 연구센터의 연구비 지원 및 경상남도 생명공학산업화 연구비 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. 金在佶. 1984. 原色天然藥物 大事典(上卷). 447. 南山堂. 서울.
2. 小學館. 1985. 小學館編;中藥大事典. 526. 上海科學技術

出版社. 上海.

3. 左春旭, 仲英, 姜岩青. 1988. 瓦松 中黃美化合物的 分離鑑定. 19, 148. 中草藥. 丁杏包.
4. 左春旭, 蔡玉英, 姜岩青. 1985. 瓦松有效成分的 研究. 16, 243. 中草藥. 丁杏包.
5. Chakrabarty, S., M. Roy, B. Hazra and R.K. Bhattacharya. 2002. Induction of apoptosis in human cancer cell lines by diospyrin, a plant-derived bisnaphthoquinonoid, and its synthetic derivatives. *Cancer Lett.* 188, 85-93.
6. Chand, S., I. Lusunzi, D.A. Veal, L.R. Williams and P. Karuso. 1994. Rapid screening of the antimicrobial activity of extracts and natural products. *J. Antibiot.* 47, 1295-1304.
7. Chang, R. 2002. Bioactive polysaccharides from traditional chinese medicine herbs as anticancer adjuvants. *J. Altern. Complement Med.* 8, 559-565.
8. Chee, H.Y. 2002. *In vitro* Evaluation of the antifungal activity of propolis extract on *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. *Mycology* 30, 93-95.
9. Chen, X.M. and G.Y. Tian. 2003. Structural elucidation and anti-tumor activity of a fructan from *Cyathula officinalis* Kuan. *Carbohydr. Res.* 338, 1235-1241.
10. Franz, G. 1989. Polysaccharides in pharmacy: current applications and future concepts. *Plant Med.* 55, 493-497.
11. Ha, Y.L. and W.P. Michael. 1991. Naturally-occurring novel anti-carcinogens: Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid (CLA) (in Korean). *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 20, 401-407.
12. Kim, H.S. and J.O. Shin. 1997. Isolation and antimicrobial activity of *Xanthium strumarium* L. extract. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, 183-188.
13. Kono, T., M. Watanabe, K. Koyama, T. Kishimoto, S. Fukushima, T. Sugimura and K. Wakabayashi. 1999. Cytotoxic activity of pterisin, from the cabbage butterfly, *Pieris rapae*, in various human cancer cell lines. *Cancer Lett.* 137, 75-81.
14. Lee, B.W. and D.H. Shin. 1991. Screening of natural antimicrobial plant extract on food spoilage microorganisms. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 23, 200-204.
15. Lee, S.W., H.J. Kim and S. Hwangbo. 2001. Studies on the chemical characteristics of korean propolis. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* 21, 383-388.
16. Park, H.J., H.S. Young, J.O. Kim, S.H. Lee and J.S. Choi. 1991. A study on the chemical constituents of *Orostachys japonicus* A. Berger. *Kor. J. Pharm.* 22, 78-84.
17. Park, H.J., S.C. Leem, M.S. Lee and H.S. Young. 1994. Triterpene and steroids from *Orostachys japonicus*. *Kor. J. Pharm.* 25, 20-23.
18. Roberfroid, M.B. 1977. Health benefits of non-digestible oligosaccharides. *Diet. Fiber Health Dis.* 22, 211-219.
19. Taylor, K.A.C.C. 1995. A modification of the phenol sulfuric acid method of total sugar determination. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 53, 207-214.

(Received August 23, 2004/Accepted October 4, 2004)

---

**ABSTRACT : Studies on Biological Activities of the Polysaccharides and Oligosaccharides of *Orostachys japonicus***

**Ki Hoon Kim, Eun Young Kim, Yea Oon Kim, Geum Ok Baek, Han Bok Kim<sup>1</sup> and Dong Seok Lee\*** (Department of Biomedical Laboratory Science and Biohealth Products Research Center, Inje University, Gimhae 621-749, Korea, <sup>1</sup>Department of Life Science, Hoseo University, Asan 336-795, Korea)

Polysaccharides were prepared from *Orostachys japonicus* by extraction with hot steam water (OJP1). The OJP1 fraction was further purified by Sephadex G-50 gel filtration chromatography to produce FI (polysaccharides) and FII (oligosaccharides) fraction. The average molecular masses of FI and FII fraction were determined to be 3050 kDa and 13 kDa, respectively. The antimicrobial activity of OJP1 was tested against 8 strains of bacteria and one strain of yeast by the disc diffusion method, fluorescein diacetate (FDA) method and broth dilution method. The OJP1 exhibited a very strong growth inhibition to *Candida albicans*. The OJP1 remarkably suppressed the growth of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. The OJP1 showed higher growth inhibition to *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* than propolis, positive control. When the anticancer activity of the OJP1, FI or FII was examined against human cancer cell lines and the Sarcoma 180 cells, these widely suppressed the proliferation of cell lines in the MTT assay and morphology study. Especially, they remarkably inhibited the growth of A549, HeLa and AGS cells. Also treatment of cancer cells with OJP1, FI or FII induced apoptotic cell death characterized by DNA fragmentation. The OJP1, FI or FII exhibiting various biological activities such as antimicrobial activity and anticancer activity is expected to be developed as new biohealth products.