

# 오배자의 항균활성 및 세포독성에 미치는 영향

김성진<sup>1</sup> · 양하영 · 이선구\*

상지대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 상지대학교 한의과대학 경혈학교실

## Antimicrobial Effect and Cytotoxicity of *Chinensis Galla*

Seong Jin Kim<sup>1</sup>, Ha Young Yang, Seon Goo Lee\*

Department of Oriental Pathology, 1: Department of Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine, Sangji University

*Chinensis galla* has been used as an multi-functional herb, such as anti-inflammatory, anti-virus, and antitumor agent. This study was performed to antimicrobial and cytotoxicity effect in vitro. The results were summarized as follows : *Chinensis galla* was antimicrobial effect on *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*. *Chinensis galla* was antimicrobial effect on *Kocuria rhizophila*, *Corynebacterium ammoniagenes*. The extracts of *Chinensis galla* exhibited cytotoxicity on human dermal fibroblast at 10  $\mu$ l but not at 5  $\mu$ l, and the same results was known under a microscope. Accordingly the results show *Chinensis galla* could antimicrobial effect but exhibited cytotoxicity on human dermal fibroblast at high concentration and it needs more research.

Key words : *chinensis galla*, skin flora, pitted keratolysis, antimicrobial, cytotoxicity

### 서 론

오배자는 漆樹科(욱나과 ; Anacardiaceae)에 속한 낙엽 소교목인 붉나무(*Rhus chinensis* MILL.)의 잎날개에 오배자진드기(*Melaphis chinensis* (BELL) BAKER)가 기생하여 만들어진 벌레집을 건조한 것으로, 벌레집의 외벽이 청색으로부터 황갈색으로 변할 때 채취하여, 끓는 물에 넣어 약간 삶거나, 겉 표면이 회색으로 될 때까지 썰서 내부에 蚜蟲이 죽으면 꺼내어 曬乾하여 쓴다<sup>1)</sup>.

오배자의 性味는 酸, 寒 無毒하며, 효능은 斂肺降火·澀腸止瀉·斂汗止血·澀精縮尿·消腫斂瘡하여 肺虛喘咳나 久痢·久瀉, 體虛多汗·痔血·便血·脫肛 및 出血, 遺精·遺尿·脫肛과 瘡癬腫毒·皮膚濕爛·脫肛不收·子宮下垂 등을 치료할 경우에 응용되고 있다<sup>2)</sup>.

*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*와 *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium ammoniagenes*은 병원성과 독소생산으로 피부의 염증을 유발시키는 세균이다<sup>3)</sup>.

소와각질용해증은 *Kocuria rhizophila*, *Corynebacterium ammoniagenes*에 의해 심한 발냄새와 함께 분화구 모양의 소와를 형성하는 질병이다<sup>4,5)</sup>.

피부염증의 치료에 사용하는 외용약물로는 Benzyl peroxide와 항생제의 국소도포요법이 있으나 사용시 피부가 건조해지고 각질이 일어나는 부작용을 수반할 수 있으므로<sup>6)</sup> 피부에 안전한 천연약물의 개발이 시급하다 하겠다.

오배자에 대한 최근연구로, 안<sup>7)</sup>이 천연항균물질을 통한 식품보존제연구에서 오배자의 폴리페놀 추출물이 *E.coli*와 *B. subtilis* 등 그람 음성, 양성 세균에 대해 우수한 항균효과가 있다고 하였고, 최 등<sup>8)</sup>은 오배자의 에탄올 추출물 및 열수 추출물이 魚病세균에 우수한 항균력을 보인다고 하였으며, 조 등<sup>9)</sup>은 오배자 추출물이 구강내 세균에 대한 항균효과 및 인공치태역제효과를 보인다고 하였다.

오배자의 항균작용을 볼 때, 피부질환에도 충분히 응용될 수 있을 것으로 사료되어 피부병을 유발하는 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*. 등 4종의 세균과 *Kocuria rhizophila*, *Corynebacterium ammoniagenes* 등 2종의 소와각질용해증 유발 세균에 대한 항균활성과 인체 피부세포에 대한 세포독성에 대하여 연구하여 그 결과를 보고하는 바이다.

\* 교신저자 : 이선구, 강원도 원주시 우산동 660번지 상지대학교 한의과대학

· E-mail : returnto@sangji.ac.kr, · Tel : 033-730-0664

· 접수 : 2009/03/21 · 수정 : 2009/04/01 · 채택 : 2009/04/10

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약물

본 실험에 사용한 오배자는 상지대학교 한의과대학 본초학교실의 검수를 거쳐 사용하였으며, 건조된 오배자 100 g을 증류수 1000 ml에 넣어 전탕 한 후 동결 건조하여 26.1 g(수득률 26.1%)을 얻었다. 실험에 앞서 필요한 농도로 조정하여 사용하였다.

#### 2) 사용균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 피부상재균과 소와각질융해증 유발균을 사용했다. 피부상재균은 *Bacillus subtilis* (KCCM 11316), *Staphylococcus aureus subsp. aureus* (KCCM 11335), *Staphylococcus epidermidis* (KCCM 35494), *Bacillus cereus* (KCCM 40935) 등 4종을 사용하였다. 소와각질융해증 유발균은 *Kocuria rhizophila* (KCCM 11236), *Corynebacterium ammoniagenes* (KCCM 1174) 등 2종을 사용하였다. 해당 균주는 모두 한국중균협회에서 분양 받아 고체배지에서 배양 후 실험하였다.

실험에 사용한 배지는 2종류를 사용하였다. Nutrient agar(Beef extract 3.0 g, Peptone 5.0 g, Agar 15.0 g, Distilled water 1000 ml)로는 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Kocuria rhizophila*, *Corynebacterium ammoniagenes* 를 배양하였다. Trypticase soy agar(Pancreatic digest of casein 17.0 g, Pancreatic digest of soybean meal 3.0 g, NaCl 5.0 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5 g, Glucose 2.5 g, Agar 15.0 g, Distilled water 1000 ml)로는 *Staphylococcus aureus subsp. aureus*를 배양하였다.

#### 3) 배양조건

삼우과학의 SW-029 배양기를 이용하여 disc diffusion법에 이용된 배지를 36.0±0.3℃에서 각 균주의 발생시간에 따라 배양하였다.

#### 4) 세포주 및 세포배양

세포독성에 사용한 세포는 Human dermal blast로서 Clonetics(San Diego, CA)에서 구입하여 사용하였다. 세포배양은 Human dermal Fibroblasts 세포를 10% fetal bovine serum(FBS)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM medium, Diffco, USA)에 penicillin/streptomycin(sigma) 100 µg/ml가 첨가된 배지에서 배양하였다.

### 2. Disc diffusion법을 이용한 항균실험

멸균된 petri dish를 이용하여 각 균주에 해당되는 배지에 각각의 균주를 100 µl씩 도말하고, 멸균된 paper disc(8 mm, Whatman, USA)를 균등하게 올려놓은 다음 각 농도별로 시료를 처리하였다. 이를 배양하면서 paper disc 주위의 억제대의 크기를 관찰하였다.

### 3. 피부세포에 대한 독성실험

Human dermal Fibroblasts를 5×10<sup>4</sup> cell/ml 씩 24 well tissue culture plate에 분주하여 세포를 12시간 이상 배양한 후, PBS로 세척하고 배지를 넣은 다음 200 mg/ml의 오배자 추출물 5

µl와 10 µl를 처리하였다. 그 후 CO<sub>2</sub> incubator(37℃, 5%)에서 24 시간 동안 배양한 후 1 mg/ml의 MTT 용액을 well 당 0.5 ml씩 넣고 37℃에서 3시간 배양을 하였다. 반응결과 형성된 formazan 결정을 0.5 ml isopropanol로 용해시킨 후 ELISA reader로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control 100%)과 비교한 실험군의 세포 생존율을 백분율로 나타내었다.

### 4. 현미경을 이용한 세포 형태 관찰

Human dermal Fibroblasts를 2×10<sup>5</sup> cell/ml 씩 60 mm culture dish에 분주하여 세포를 12시간 이상 배양을 한 후, PBS로 세척하고 200 mg/ml의 오배자 추출물 5 µl와 10 µl를 처리하였다. 실험조작 후 dish를 CO<sub>2</sub> incubator(37℃ 5%)에서 24시간 동안 배양한 후, 피부세포에 대한 독성과 형태 변화를 위상차 현미경으로 관찰하였다.

### 5. 통계분석

실험결과는 SPSS for windows release 5.0.2 (SPSS, Inc. USA)를 이용하여 independent-sample t-test로 검정하였다. 그 결과가 p<0.05 수준인 경우 유의성이 있다고 보았다.

## 결 과

### 1. 피부상재균에 대한 항균활성

오배자의 피부상재균에 대한 항균활성을 측정하고자 disk diffusion법을 사용하여, *Staphylococcus aureus subsp. aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* 등 4종의 세균에 대하여 200 mg/ml, 20 mg/ml, 2 mg/ml, 0.2 mg/ml의 농도별로 오배자 시료를 처리하였다. 그 결과 4종의 세균에 대하여 시료의 농도가 증가할수록 세균 증식 억제대가 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

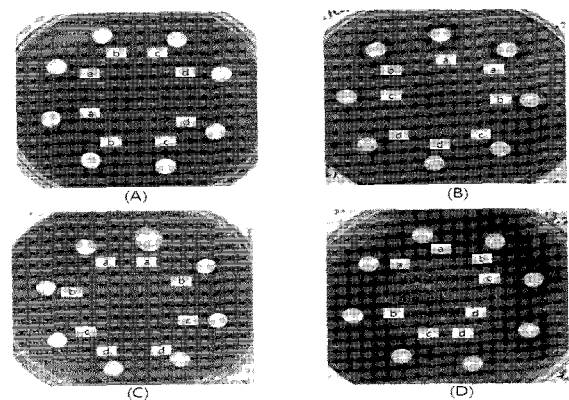


Fig. 1. Antimicrobial effect of *Chinensis galla* in skin flora. (A) : *Staphylococcus aureus subsp. aureus*, (B) : *Bacillus cereus*, (C) : *Bacillus subtilis*, (D) : *Staphylococcus epidermidis*. a : 200 mg/ml of *Chinensis galla* extract. b : 20 mg/ml of *Chinensis galla* extract. c : 2 mg/ml of *Chinensis galla* extract. d : 0.2 mg/ml of *Chinensis galla* extract

### 2. 소와각질융해증 유발균에 대한 항균활성

오배자의 항균활성을 *Kocuria rhizophila*, *Corynebacterium*

*ammoniaenes* 등 2종의 소와각질용해증 유발 세균에 대하여 200 mg/ml, 20 mg/ml, 2 mg/ml, 0.2 mg/ml의 농도별로 오배자 시료를 처리하였다. 그 결과 2종의 세균에 대한 활성을 200 mg/ml에서 확인 할 수 있었다(Fig. 2).

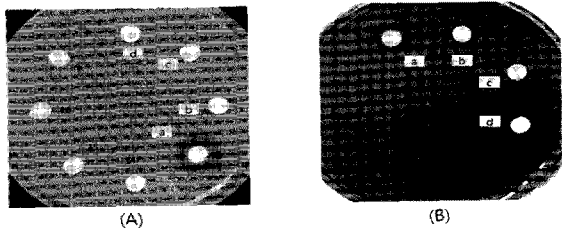


Fig. 2. Antimicrobial effect of *Chinensis galla* in causative organisms of pitted keratolysis. (A) : *Kocuria thiozophila*. (B) : *Corynebacterium ammoniaenes*. a : 200 mg/ml of *Chinensis galla* extract. b : 20 mg/ml of *Chinensis galla* extract. c : 2 mg/ml of *Chinensis galla* extract. d : 0.2 mg/ml of *Chinensis galla* extract.

3. 피부세포에 대한 세포독성

피부세포에 대한 오배자의 독성을 측정한 결과 오배자 200 mg/ml의 농도 5 µl를 처리한 군에서는 대조군에 비하여 95%이상 세포생존율로 나타났으며, 10 µl로 처리한 군에서는 80%이하의 세포생존율을 보여주었다(Fig. 3).

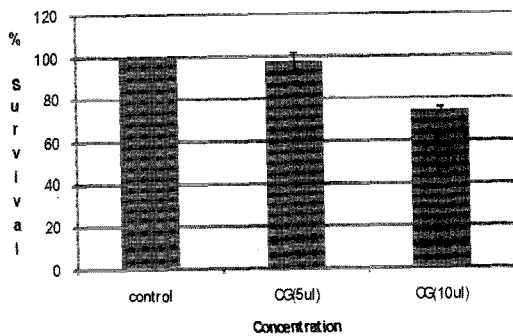


Fig. 3. Cell viability of human dermal fibroblasts treated with *Chinensis galla* extract to incubation for 24h. Data represent average ± SEM from three independent experiments with multiple estimations. Values not sharing a letter are different at p < 0.001. CG : *Chinensis galla*

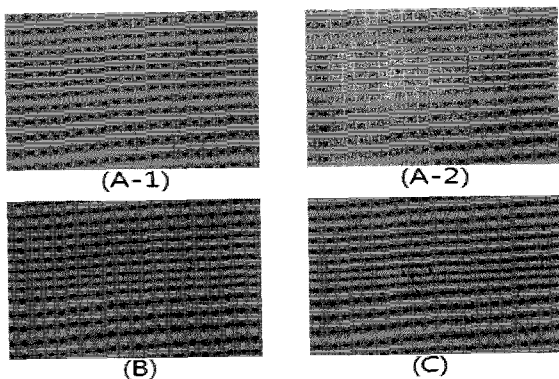


Fig. 4. Photograph of human dermal fibroblasts treated with *Chinensis galla* extract for 24h(X 200). A-1, A-2 : Control. B : treated with *Chinensis galla* extract (200mg/ml, 5 µl). C : treated with *Chinensis galla* extract (200 mg/ml, 10 µl)

4. 피부세포에 대한 현미경적 관찰

오배자 추출물을 200 mg/ml의 농도로 하여 5 µl와 10 µl를 피부세포에 처리하여 현미경(X200)으로 관찰한 결과, 대조군의 경우 세포들이 잘 부착하여 배양되고, 5 µl에서 대조군과 마찬가지로 세포의 형태가 유지되며 성장하였으나, 10 µl에서는 세포독성이 관찰되었다(Fig. 4).

고찰

오배자는 風濕으로 인하여 痰結, 咳嗽, 發汗, 口乾, 鼻出血 등 과 泄瀉, 痢疾, 五痔, 下血, 脫肛, 고름, 濕爛, 子腸墜下, 風癬癢癢 로 되어 상처가 아물지 않게 되며, 眼目을 침범하면 赤腫腎障이 생길 경우에 대하여 외용하여 風邪를 몰아내고 濕邪를 없애고 殺蟲할 수 있어 風癬이나 癬痒症에 사용된다<sup>10)</sup>.

*Staphylococcus aureus subsp. aureus*는 세균성 이질, 살모넬라 등과 함께 주로 식중독과 관련되어 있고<sup>11)</sup>, 드물게 피부질환에서도 원인균으로 작용하기도 하며, 특히 아토피 피부염의 병인에 있어서 *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*)의 역할에 대하여 많은 관심이 있어 왔으며 아토피 피부염 환자의 습진성 병변의 95% 이상에서 *S. aureus*가 집락을 형성한다고 보고되어 있다<sup>12,13)</sup>. 또한 임 등<sup>14)</sup>의 연구에서 소아 아토피 피부염 환자의 피부에서 *S. aureus* 집락의 정도가 아토피 피부염의 중증도에 따라 증가하며, *S. aureus*가 일부의 아토피 피부염 환자에서 질환의 악화에 관여한다고 하였다.

*Staphylococcus epidermidis*는 부스럼, 용종과 농양과 같은 많은 화농성 감염을 유발하는 세균이며, *Bacillus cereus*는 48종의 간균중 병원성 또는 잠재성 병원성을 보이는 부패성 토양균이며, *Bacillus subtilis*는 흔히 실험실 오염이나 결막염의 원인이 되기도 하는 세균이며, *Corynebacterium ammoniaenes*은 점막에 잘 기생하여 건강체로부터도 잘 검출되며 보통 병원성과 독소생산으로 피부의 염증을 유발시키는 세균이다<sup>9)</sup>.

본 실험의 경우 *Staphylococcus aureus subsp. aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* 등 4종의 세균에 대하여 항균활성을 측정한 결과 대부분 200 mg/ml, 20 mg/ml, 2 mg/ml에서 항균 억제대가 관찰되었다(Fig. 1).

소와각질용해증(pitted keratolysis)은 발바닥의 각질을 침범하는 표재성 세균 감염증으로 특징적인 분화구 모양의 소와(pit)를 형성하고 심한 악취를 동반한다<sup>4,5)</sup>. 1965년 Zaia 등<sup>15)</sup>이 *Corynebacterium species*가 원인 미생물임을 증명한 이래 *Micrococcus sedentarius*, *Dermatophilus congolensis* 등의 다른 균주들도 원인이 될 수 있음이 보고된 바 있다. *Corynebacterium* 종은 소와각질용해증 외에도 홍색음선(erythrasma)이나 액와 모발진균증 등의 다른 표재성 피부 감염증을 유발할 수 있는데, 1982년 Shelley<sup>16)</sup>는 홍색음선, 액와 모발진균증, 소와각질용해증의 세 가지 질환이 동반된 예를 보고하면서 이를 'corynebacterial triad'로 명명하기도 하였다. 소와각질용해증을 위시한 *corynebacterium* 감염증은 운동 선수나 군인 등의 특정 집단에서 호발하는 경향을 보이는데 국내에서는 군인을 대상으로 입대 후 소와 각질용

해증의 시기별 유병률을 조사한 연구<sup>17)</sup>가 있었다.

본 실험의 경우 *Kocuria rhizophila*, *Corynebacterium ammoniagenes* 등 2종의 세균에 대한 항균활성을 측정할 결과 200 mg/ml의 농도에서 항균 억제대가 관찰되었다(Fig. 2).

조 등<sup>9)</sup>은 오배자 추출물의 세포독성 실험에서 0.0002% 및 0.0004%에서는 음성대조군에 비해 세포생존율을 유의하게 증가시켰다고 보고했다. 본 실험의 경우 200 mg/ml의 농도에서 5 µl와 10 µl를 피부세포에 처리하여 세포독성을 본 결과 5 µl에서 95% 이상의 세포생존율을, 10 µl에서 80% 이하의 세포생존율을 보였다. 또한 현미경 관찰에서 대조군의 경우 세포들이 잘 부착되어 배양되었고, 오배자 5 µl 처리시 대조군과 비슷하게 성장하였으나, 10 µl의 경우 세포독성이 관찰되었다(Fig. 3 & 4).

따라서 피부세포에서 본 실험에 사용한 시료추출물의 농도는 추출물 200 mg/ml의 농도 10 µl이하에서 사용하고 세포독성을 일으키는 메카니즘은 향후 연구를 더 진행되어야 할 것이라 사료된다.

이상의 결과로 오배자의 항균활성을 확인하였으며, 높은 농도에서는 세포독성이 있는 것으로 보이므로 향후 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결 론

오배자의 항균활성과 세포독성을 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

오배자는 피부상재균인 *Staphylococcus aureus subsp. aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*에 대하여 2 mg/ml 이상의 농도에서 모두 항균활성을 나타내었다. 오배자는 소와각질융해증의 유발균인 *Kocuria rhizophila*, *Corynebacterium ammoniagenes*에 대하여 200 mg/ml의 농도에서 항균활성을 나타내었다. 오배자는 피부세포에 대하여 200 mg/ml 농도에서 5 µl에서는 세포독성이 없었으나 10 µl에서는 세포독성이 관찰되었고, 현미경 상에서도 같은 결과를 얻었다.

이상의 결과로 오배자의 항균활성을 확인하였으나 높은 농도에서는 세포독성이 있는 것으로 보이며, 향후 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 전국한의과대학 본초학 교수. 本草學. 영림사, pp 620-621, 1991.

2. 신민교. 原色臨床本草學. 영림출판사, pp 547-548, 1988.

3. 한국생물과학협회. 생물학사전. 아카데미서적, p 328, 1339, 1998.

4. Zaias, N. Pitted and ringed keratolysis. A review and update. J Am Acad Dermatol 7: 787-791, 1982.

5. Gill, K.A., Buckels, L.J. Pitted keratolysis. Arch Dermatol 98: 7-11, 1968.

6. 강원형. Atlas of skin disease. 한미의학, pp 205-207, 2006.

7. 안봉진. 오배자와 적포도과피 플레페놀 분획물의 항균성 및 Glucosyltransferase 저해효과. Korean J. Postharvest SCI. Technol 8(2):217-223, 2001.

8. 최혜승, 김찬숙, 장대식, 유영범, 김이청, 이주석. 오배자 추출물의 어병세균에 대한 항균효능. J. Fish Pathol. 18(3):239-245, 2005.

9. 조민정, 홍석진, 최충호, 정성숙. 오배자, 파고지 추출물 함유 치약이 치태형성 억제에 미치는 영향. J Korean Acad Dent Health 29(2):141-152, 2005.

10. 新文豐出版公司. 新編 中藥大辭典. 新文豐出版公司, pp 288-289, 1977.

11. 정재근, 김민지, 기혜영, 최미화, 서진종, 김선희, 박종태, 김명권, 김은선. 손 위생에 대한 식중독 원인균 실태조사. J. Fd Hyg. Safety 23(1):40-50, 2008.

12. Leung, D.Y.M. Atopic dermatitis : the skin as window into th pathogenesis of chronic allergic disease. J Allergy Clin Immunol 96: 301-318, 1995.

13. Nomura, I., Tanaka, K., Tomita, H., Katsunuma, T., Ohya, Y., Ikeda, N. et al. Evaluation of the staphylococcal exotoxins and their specific IgE in childhood atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol, 104: 441-446, 1999.

14. 임용순, 박천욱, 이철현, 송원근. 소아 아토피 피부염에서 포도상구균 외독소 및 혈청 특이 IgE에 관한 연구. 대한피부과학회지 40(6):607-615, 2002.

15. Zaias, N., Talpin, D., Rebell, G. Pitted keratolysis. Arch Dermatol. 92: 151-154, 1965.

16. Shelley, W.B., Shelley, E.D. Coexistent erythrasma, trichomycosis axillaris, and pitted keratolysis: an overlooked corynebacterial triad?. J Am Acad Dermatol, 7: 752-757, 1982.

17. Lee, J.H., Hyun, J.M. A study on the prevalence of pitted keratolysis. Korean J Mil Med, 17: 120-124, 1986.