

한국전통 생약의 약리작용과 활성물질에 관한 연구 (VII).

사매의 항암성 고분자물질

이인란 · 한승혜 · 한용남* · 정가진**

이화여자대학교 약학대학, *서울대학교 생약연구소, **서울대학교 자연과학대학

Studies on the Pharmacological Actions and Biologically Active Components of Korean Traditional Medicines(VII).

On the Anticancer Macromolecular Substances from *Duchesnea indica* Herba

Ihn Rhan Lee, Seung Hye Hahn, Yong Nam Han*, and Gajin Jeong

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-170,

*Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460,

**Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract—This study was conducted to further purify and characterize a polysaccharide fraction from whole parts of *Duchesnea indica* (Andr.) Focke, which was previously reported to show an antitumor activity by us. Mild acid-treatment of the fraction by 5% acetic acid yielded three subfractions (Fr. A,B and C) on a Sephadex G-25. Fr. A was composed of uronic acid, hexose, pentose and phenolic substance, Fr. C mainly phenolic substance, and Fr. B contained hexose. All three fractions exhibited colony stimulating factor activity.

Keywords—*Duchesnea indica* · antitumor activity colony · stimulating factor activity · polysaccharide

뱀딸기는 장미과에 속하는 다년생 포복초본으로, 꽃은 4~5월에 황색으로 피고, 열매는 붉은색으로 식용할 수 있으며, 줄기에는 긴 털이 있고, 열매가 익을 무렵에는 마디에서 뿌리가 내려 길게 뻗는다. 산지, 특히 반음지에서 군락을 이루며, 우리나라 전역에 야생하고 있다. 전초(全草)를 사매(蛇莓), 사과초(蛇果草), 정창초(疔瘡草), 용토주(龍吐珠), 사단과(蛇蛋果), 야양매(野楊梅)라 한다.

뱀딸기의 생약명은 사매(蛇莓)이며, 학명은 *Duchesnea indica*(Andr.) Focke, *D. coallichiana* (Seringe) Nakai, *D. chrysantha*(Zoll. et Morr.) Miq.로 표기된다.^{1,2)}

뱀딸기는 청혈(淸血), 해독(解毒), 소염(消炎), 지혈(止血), 항종양(抗腫瘍), 외과창상(外科瘡傷), 산결(散結), 통월경(痛月經), 소종(消腫), 진해(鎮咳) 작용이 있다고 하며¹⁻³⁾, 민간에서는 태열(胎熱), 치통(齒痛)에 사용되며⁴⁾, 임상적으로는 백후(白喉), 세균성 이질(細菌性痢疾)에 치유 효과를 나타낸다고 보고되었다.⁵⁾

최근에 뱀딸기의 hexane과 ether 추출물이 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* 및 *Aspergillus niger*에 대한 항균 효과를 보이며, 수용성과 Acetone 분획은 *S. aureus*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella dysenteriae*에 대한 현저한 항균성을 보인다는 보고⁶⁾와 수용성

분획이 Sarcoma 180 세포에 대해 항암 효과를 가진다는 보고가 있었다.⁷⁾

이런 보고들은 뱀딸기에 존재하는 어떤 성분, 혹은 성분들이 생체내에서 면역 조절물질로서 작용할 가능성을 제시하며, 특히 뱀딸기의 추출물이 항균성과 항종양성을 나타낸다는 보고는 뱀딸기에 있는 어떤 성분이 실제로 생체내에서 면역세포의 생성, 혹은 그 기능에 영향을 미칠 것이라는 추측을 가능케 한다.

본실험에서는 뱀딸기의 함유물질중 물추출물이 Sarcoma 180 세포에 항암성을 나타내며 또한 생쥐 골수세포에 대해 영향을 주는 고분자 물질 즉 tannin과 다당체 또는 단백질 이 어떠한 상태로 존재하는지와 단백질의 amino acid 조성을 연구하였다.

실 험

실험동물

생후 1~6주 된 ICR계 생쥐를 서울대학교 동물사육실로부터 분양받아 플라스틱 상자에 넣고 고행사료(삼양사료)와 수도물을 공급하여 사육하였다. 사육실의 온도는 섭씨 22~24도를 유지하였으며, 12시간을 주기로하여 명암을 조절하였다.

실험재료

경기도 일대에서 1989년 5월 채집한 蛇莓, 뱀딸기 (*Duchesnea indica* (Andr.) Focke, Rosaceae) 를 읍지에서 건조하여 분쇄한 것을 사용하였다.

사매에서 고분자물질의 추출

다당류성분의 추출—사매 2 kg에 5% EtOH 20 l을 넣고 냉방(8°)에서 72시간 방치한 후 적당한 크기의 column에 넣고 여과하여 그 여액을 냉방에서 5% EtOH 48시간 투석(M.W. 12,000) 하고 투석내액을 butanol로 추출분리하여 약 2,000 ml의 수층을 얻었다. 그 중 10 ml를 Sephadex G-25 column(superfine, 3.8×117 cm)에 걸어 5% EtOH로 용출시켜 각 tube당 15 ml씩 취하고, 이 분획들에 대하여 UV 270 nm에서의 흡광도를 측정하고 carbozole법에 의한 uronic acid 시험을 실시하였다.

사매 침체로부터 80% 에탄올 침전 분획—앞의 수층 40 ml에 무수 에탄올 160 ml를 넣어 원

심분리하여 얻어낸 침전을 물에 녹여 40 ml로 하였다.

그 에탄올 침전 분획 10 ml를 Sephadex G-25 column에 걸고 5% 에탄올로 용출하여 15 ml씩 취하고 이 분획에 대하여 UV 270 nm에서의 흡광도를 측정하고 uronic acid 측정을 실시하였다.

사매의 5% 초산 냉침—사매 100 g에 5% 초산 1 l를 넣고 냉방(8°)에서 72시간 방치한 뒤, 그의 여액을 냉방에서 5% 초산으로 48시간 투석하여 500 ml의 여액을 얻었다.

초산 냉침액 25 ml를 Sephadex G-25 컬럼에 걸어 5% 초산으로 용출하여 10 ml씩 분취한 뒤, UV 270 nm에서 흡광도를 측정하고, anthrone test, uronic acid test, orcinol 법에 의한 pentose test를 실시하였다.

에틸 아세테이트 및 부타놀 추출—사매 800 g을 메타놀로 4시간씩 3회 수욕상에서 추출한 후 농축액을 hexane, methanol 및 물로 분획하였다.

그중 수층을 클로로포름으로 처리하여 추출물(20 g)을 얻은 후, 다시 수층을 에틸아세테이트로 처리하여 에틸아세테이트 추출물(6.5 g)을 분리하고, 수층은 다시 부타놀로 처리하여 부타놀 추출물(16 g)을 얻었다.

당의 분석

Hexose—검체중 hexose 함량은 검체 0.5 ml에 anthrone 황산시액 3 ml를 가하고 빙수욕상에서 잘 섞은 후 anthrone 황산법⁸⁾으로 분석하였다.

Pentose—Pentose 함량은 검체 3 ml에 0.1% FeCl₃/c·HCl 3 ml와 1% orcinol/95% EtOH 0.3 ml를 넣어 섞은 후, orcinol 시험⁸⁾으로 pentose를 분석하였다.

Uronic acid—Uronic acid의 함량은 검체 1 ml에 sodium borate c·H₂SO₄시액 5 ml, carbazole 시액 0.2 ml를 써서 carbazole 법으로 분석하였다.⁸⁾

단백질의 분석

항암성(60%이상)을 나타내는 고분자물질중 단백질의 함량이 상당히 높은 것을 알게 되어⁷⁾ 그의 amino acid 조성을 알기 위하여 단백질 검체(고체) 0.02 g을 PICO TAG HPLC system 기기의 workstation(reaction vial)에서 먼저 건조시켰다. 거기에 6N HCl 200 μl를 넣고 110°에서

24시간 가수분해하고 재차 건조시켰고, 표준은 pierce H type으로 각 amino acid가 2.5 μmol/ml 함유된 용액을 10배 희석(0.251 mol/ml)한 것을 썼다.

가수분해 건조검체를 Sep-pak C₁₈ 처리하였다. 즉 Sep-pak C₁₈ 처리는 MeOH과 물로 활성화시킨 다음 0.1% trifluoroacetic acid(TFA)액 10 ml씩 두번, 0.1% TFA/MeOH (80 : 20) 10 ml를 통과시키고, 끝으로 0.1 TFA/MeOH (70 : 30) 액과 시료용액을 2 : 1로 혼합하여 (1/3로 희석) 통과시켰다. 통과된 시료와 표준은 각각 50 μl 취해 건조시키고 PITC 유도체 시약 20 μl를 넣어 20분간 방치하여 유도체를 만들어 건조하였다. 여기에 검체 희석액(disodium hydrogen phosphate 710 mg, Milli-Q water 1 l를 10% H₃PO₄로 pH 7.4로 만든액 950 ml에 CH₃CN 50 ml를 넣은 것) 250 μl를 넣은 것의 10 μl를 주입하여 단백질의 amino acid 조성을 분석하였다. 분석조건은 아래와 같다.

Mobile phase;

Eluent A: 20 g sodium acetate 3 hydrate }
 600 μl TEA } 1 l
 MILLI-Q-water }

with H₃PO₄ pH 6.4.

위 용액 940 ml + CH₃CN 60 ml → filter.

Eluent B: 60% CH₃CN

Sample diluent; Disodium hydrogen phosphate 710 mg
 Milli-Q water 1 l

with 10% H₃PO₄ pH 7.4.

위 용액 950 ml + CH₃CN 50 ml → filter.

Gradient table;

Time	Flow	% A	% B	Curve
0	1.0	100	0	*
10.0	1.0	54	46	5
10.5	1.0	0	100	6
11.0	1.5	0	100	6
14.0	1.5	0	100	6
14.5	1.5	100	0	6
20.5	1.5	100	0	6
21.0	1.0	100	0	6

Chromatographic condition;

Column: PICO-TAG column (3.9 mm × 15 cm, 4 μ); Temperature: 48°; Detection: uv 254 nm.

Colony stimulating factor assay

CSF assay는 Stanley 등의 방법⁹⁾을 변형하여 실시하였다. 배지는 EMEM(Flow Laboratories)를 사용하였으며, 우혈청은 최종농도가 10%가 되도록 하였으며, agar(Difco Laboratories)를 사용하여 최저농도가 0.3~0.4%가 되도록 하였다. 골수세포는 4~6주 된 ICR계 생쥐의 대퇴골에서 채취하여¹⁰⁾ 5분간 1,500 rpm에서 HBSS로 2번 세척한 후, 35 mm petri-dish(Falcon)에 5 × 10⁵ 세포가 들어가도록 하였다. 배지(EMEM), agar, 골수세포와 시료(10%)를 잘 혼합한 후, agar가 굳으면 CO₂ 배양기(5% CO₂, 37°)에서 7일간 배양하여 생긴 colony는 ×40의 배율에서 세포수가 25개 이상인 것으로 하여 수를 헤아렸다.¹¹⁾

실험 결과 및 고찰

1. 뱀딸기(蛇莓)의 고분자 물질

냉방(8°)에서 추출한 다당체 분획에서 Fig. 1에서와 같이 UV 270 nm 흡수와 uronic acid peak가 일치하는 하나의 peak가 얻어졌다. 그러나, 실온¹²⁾에서 추출 분획한 다당체 분획은 UV 흡수 및 uronic acid peak가 Fr. a와 Fr. b로 분리되

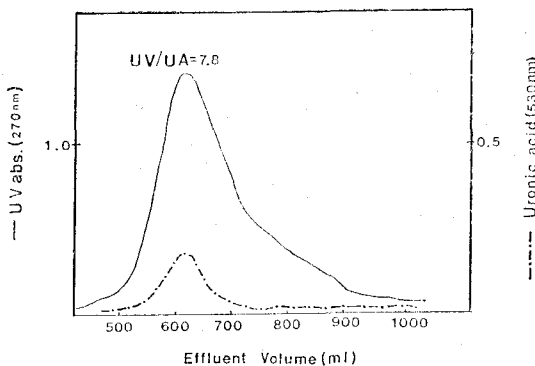


Fig. 1. Gel filtration of the polysaccharide fraction obtained at cold room, 8° from *D. indica* on Sephadex G-25.

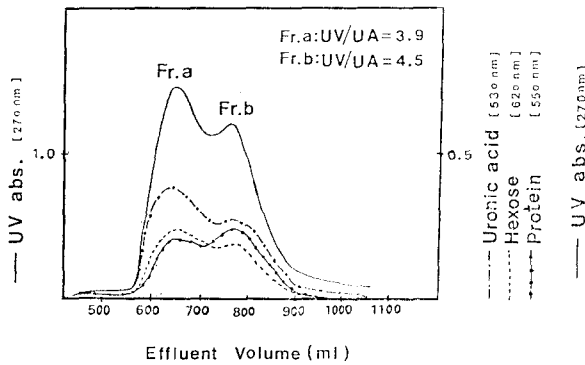


Fig. 2. Gel filtration of a polysaccharide fraction obtained at room temp from *D. indica* on Sephadex G-25.

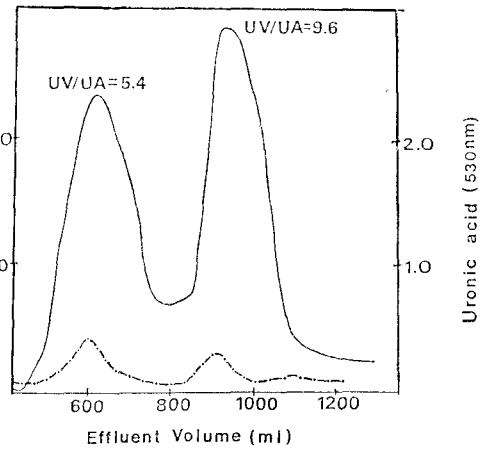


Fig. 3. Gel filtration of 80% EtOH precipitate from *D. indica* on Sephadex G-25.

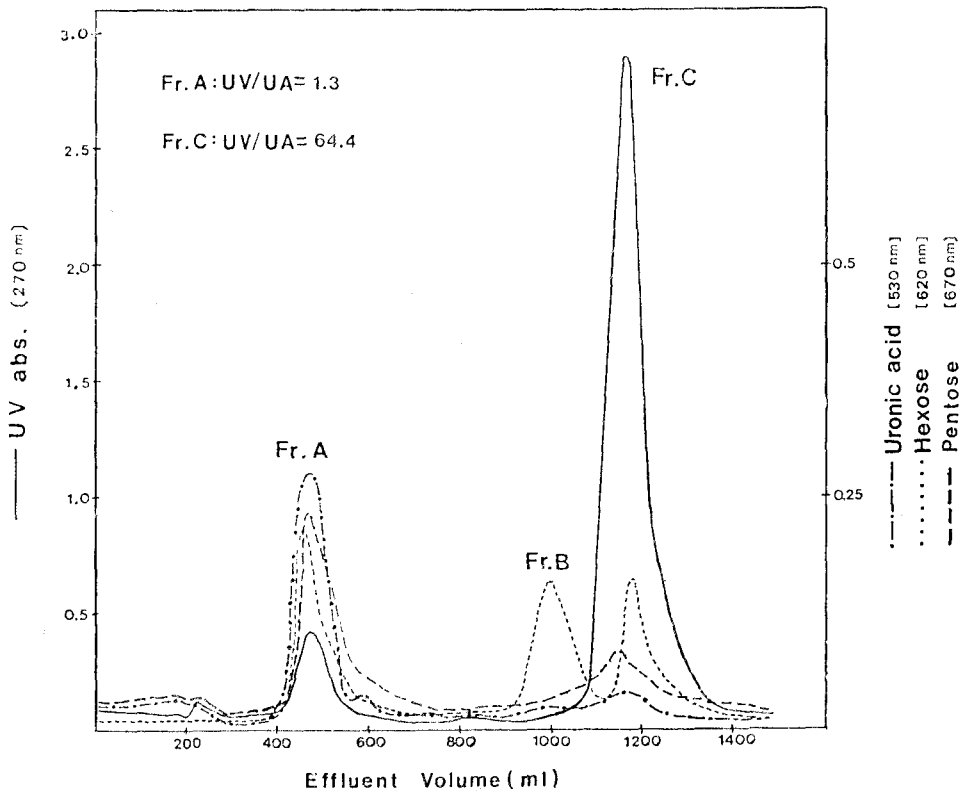


Fig. 4. Gel filtration of 5% HAc extract from *D. indica* on Sephadex G-25.

어(Fig. 2) 나타나는 것으로 보아 사매의 다당체와 UV 270 nm에서 흡수극대를 보이는 물질은 추출 및 분리과정의 온도 변화에 따라 분리양상이 다르게 나타나는 것을 알 수 있었다.

한편, 다당류 분획만을 순수하게 분리하기 위

하여 5% EtOH 투석액을 80% EtOH로 침전시켜 Fig. 3에서의 같이 두 부분으로 해리된 분획을 얻었으며 UV 흡수와 uronic acid peak가 정확하게 일치하지는 않았다.

그리하여 또 다른 방법, 즉, 산으로 처리하기

위하여 5% HAc으로 추출하여 gel filtration (Sephadex G-25) 한 결과, 다당류 성분과 UV 흡수물질이 Fig. 4와 같이 해리되어 Fr. A는 다당체를 함유하고 UV 흡수가 매우 낮게 나타났으며, 그와는 대조적으로 Fr. C는 UV 흡수가 매우 강하게 나타났다.

Fig. 5는 Fig. 1부터 Fig. 4까지의 실은 또는 냉방추출, 80% EtOH 추출, 5% 초산 추출에 따라 UV 흡수와 uronic acid peak가 각기 달리 나타난 것을 effluent volume과 void volume의 비율로서 표시한 것이다.

이 결과로 알 수 있는 것은 탄닌성 물질이 다당체 및 단백질과 복합체로 있다가 80% EtOH 처리에 의해 일부 해리되고 산성조건(5% HAc)에서는 거의 완전히 해리한 것으로 생각된다. 한편 270 nm에서는 2개의 peak (Fr. A, C)을 보인 반면, 620 nm에서는 한 개의 peak(Fr. B)만을 보여, Fr. B는 Fr. A, Fr. C와 다른 물질로 보인다. 실제로 Fr. A와 Fr. C는 270 nm에서 peak를 나타낼 뿐만아니라, carbazol test⁸⁾로 uronic acid를 분석한 530 nm와 orcinol method⁹⁾

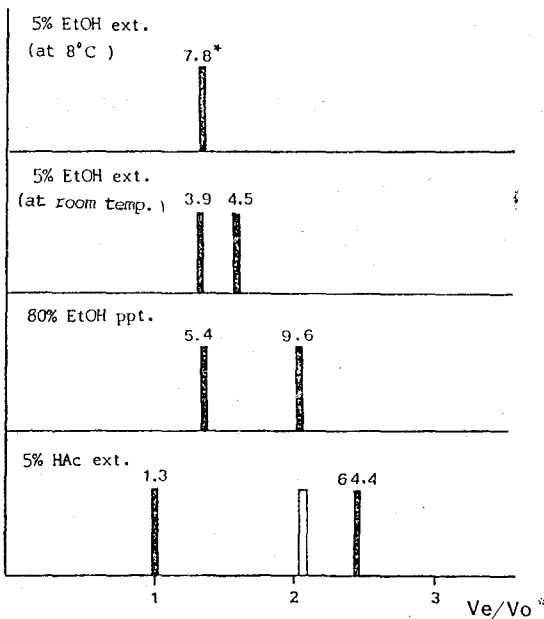


Fig. 5. Liberation of gallic acid from polysaccharide of *D. indica*.

*UV/UA ■ UV, sugar
 □ UA, sugar

*Ve/Vo: elution volume/void volume

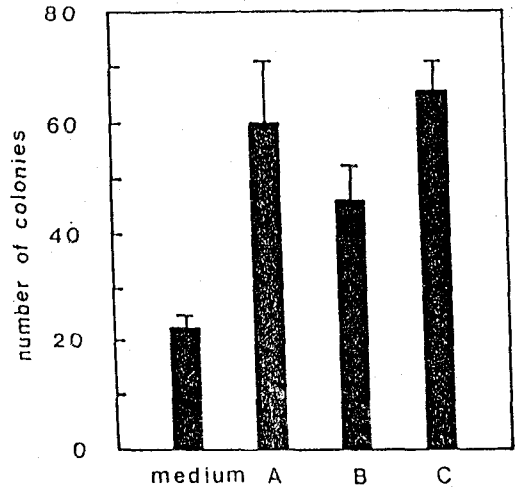


Fig. 6. Proliferation of bone marrow cells from ICR mice in the presence of three different peak fractions from Sephadex G-25 column chromatography of *Duchesnea indica* extract.

Table I. Amino acid contents of Fr. a and Fr. b protein ($\mu\text{g/g}$ sample)

amino acid	Fr. a	Fr. b
glutamic acid	1324.17	1544.87
glycine	788.24	788.24
arginine	783.9	trace
threonine	178.68	536.04
aspartic acid	—	594.54
serine	trace	157.64
alanine	trace	133.64
cysteine	—	181.74
leucine	—	196.76
lysine	—	219.29

로 pentose를 분석한 670 nm에서도 peak를 보이고 있다. 따라서 Fr. B는 Fr. A와 Fr. C와는 또 달리 free sugar만의 분획인 것으로 생각된다.

사마의 Fr. a 및 b (Fig. 2)의 단백질을 구성하고 있는 amino acid 정량 분석 결과는 Table I과 같으며, 표준 pierce H type과 비교할 때 Fr. a는 glutamic acid, serine, glycine, arginine, alanine, lysine 등 6종의 amino acid는 확인되었으나 3종의 아미노산은 어떤 것인지 확인 할 수 없었다. Fr. a의 단백질의 구성 amino acid중 가장 많은 조성을 나타낸 것은 glutamic acid인 반면에 적은 것은 threonine이며 serine을 비롯해서

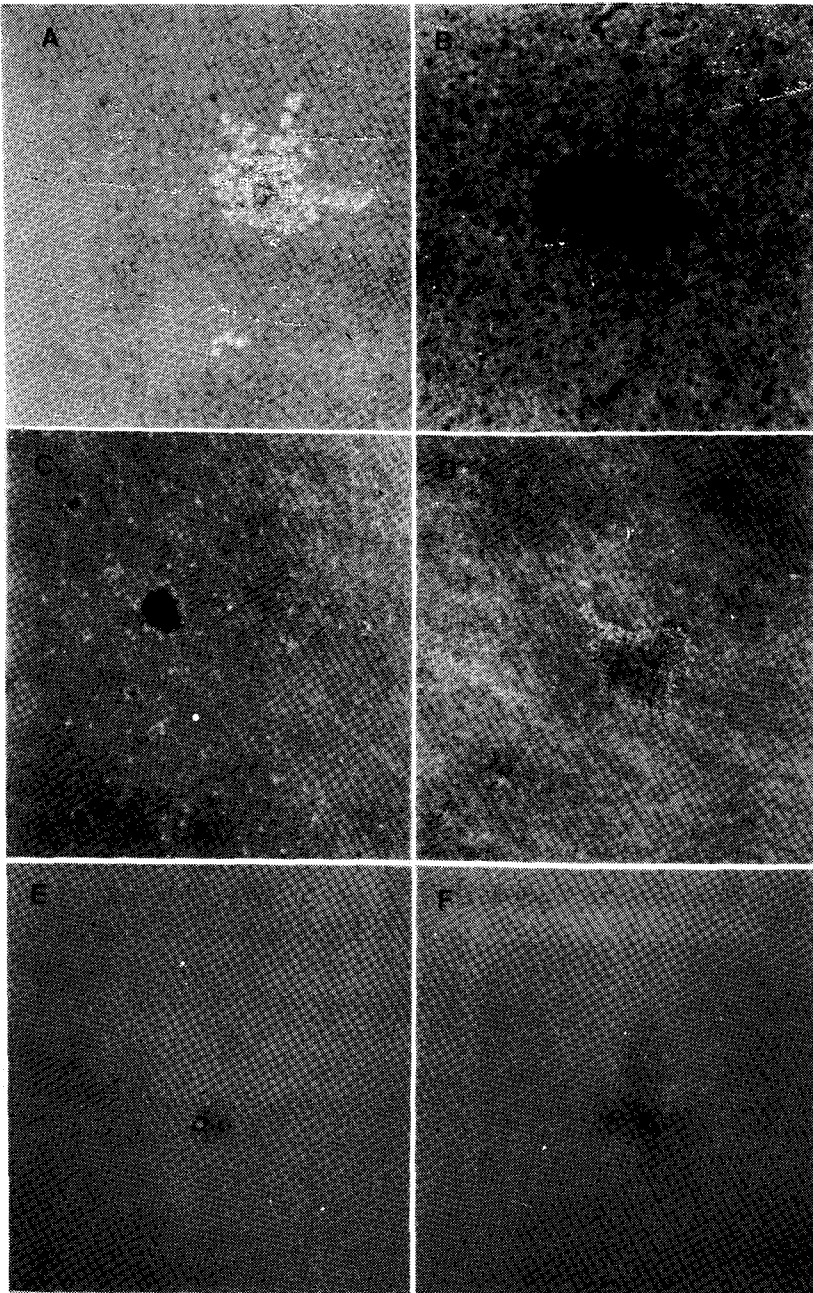


Fig. 7. Fractions stimulated the growth of colonies from murine bone marrow cells in soft agar (A typical colony is represented)

* A: incubated with rCSF I

B: incubated with lymphocyte culture supernatant induced with Con A

C and D: incubated with fractions from Sephadex G-25 column chromatography of 5% ethanol extract of *D. indica*

E and F: incubated with fractions from Sephadex G-25 column chromatography of 5% acetic acid extract of *D. indica*

** Fractions: Three different peak fractions from Sephadex G-25 column chromatography of *Duchesnea indica* extract.

그밖의 것은 불확실하게 나타났다. Fr. b의 단백질은 Table I에서 보는 바와 같이 Fr. a 보다 조성 amino acid의 종류가 훨씬 많다. 확인된 것은 aspartic acid, glutamic acid, serine, glycine, arginine, threonine, alanine, proline, valine, cysteine, leucine 및 lysine 등 12종이고, 미확인 amino acid로써 8종의 peak가 관찰되어 사매의 단백질을 조성하고 있는 amino acid의 종류가 다양하였다. Fr. b의 조성 amino acid는 역시 Fr. a 단백질과 마찬가지로 glutamic acid의 함량이 가장 많았으며, alanine의 함량이 가장 적게 나타났다.

이상의 결과로 Fr. a와 b에 있는 단백질은 크게 2가지로 볼 수 있으며 amino acid 조성이 상당히 다르며, protein에 대해서는 계속 연구되어야 하리라 보며 항암성과는 어떤 관련성이 있는지도 연구되어야 하리라 믿는다.

2. 뱀달기에서 유효성분의 추출 및 추출물의 colony stimulating factor (CSF) activity

여러 보고들에 의하면 뱀달기 추출물이 항암성과 항종양성을 나타낸다고^{6,7)} 알려졌는데 이런 보고들은 뱀달기에 있는 어떤 성분들이 생체 내에서 실제로 면역세포의 기능 또는 생성에 영향을 준다는 것을 추측케 함으로 본 논문에서는 ICR계 생쥐의 골수세포를 이용하여 뱀달기 추출물이 어떤 영향을 주는지 알아보았다.

뱀달기의 추출물로 부터 얻은 Fr. A, B, C의 colony stimulating factor activity¹³⁾를 알아본 결과는 Fig. 6에서 보는 바와 같이 음성 대조구로 골수세포에 배지(EMEM) 만 준 경우에 비해 2~4배의 많은 colony를 형성하였다. Fr. A와 C는 3배 정도로 많은 colony를 형성한 반면, Fr. B는 2배 정도로 많은 colony를 형성하였다.

이런 결과는 Fr. A와 C가 270, 530과 670 nm에서 흡광도를 보인 반면, Fr. B는 620 nm에서 단 흡광도를 보인 것과 관련이 있을 것 같다.

뱀달기의 초산 추출물 및 에타놀 추출물에 의해 생성되는 colony의 형태는 Fig. 7과 같다. 양성 대조구로 사용한 rCSF-1에 의해 유도된 colony와 Con A를 처리한 림파구 배양액으로부터 유도되는 colony에 비해 colony를 이루는

구성세포의 크기가 적고, colony의 구조는 좀더 조밀하였다. 뱀달기의 에틸아세테이트 추출물과 부타놀 추출물의 CSF 활성을 측정된 결과, 모든 추출물에서 colony stimulating activity를 관찰할 수 있었으나, 부타놀 1:1의 경우에는 추출물에서 유래된 어두운 색소 때문에 제대로 colony를 셀 수 없어 N.D.로 표기하였다.

즉 뱀달기 추출물은 골수세포에 배지(EMEM, Flow)만 준 경우에 비해 2~4배 많은 colony를 형성하여 뱀달기 추출물이 colony stimulating activity를 가진 것으로 확인하였다.

〈1990년 6월 1일 접수 : 6월 15일 수리〉

감사의 말씀 : 본 연구는 1989년도 문교부 학술연구조성비(자유공모과제)에 의하여 수행되었으며 이에 감사한다.

문헌

1. 陸昌洙 : 原色 韓國藥用植物圖鑑 p. 559 (1989).
2. 鄭普燮, 金一赫, 金在佶 : 原色天然藥物大辭典, 上卷 南山堂, p. 231 (1980).
3. 陳存仁 : 圖說 漢方醫藥大辭典, 第 4 卷, 講談社, 東京, p. 231 (1982).
4. Lee, S.J.: Korean Folk Medicine, Monogr. Series No. 3, 東明社, 서울, p. 68 (1970).
5. 新醫藥學雜誌, 2, 24 (1975).
6. Lee, I.R. and Kim, Y.H.: *J. Kor. Research Institute for Better Living*, 35, 129 (1985).
7. Lee, I.R. and Kim, Y.H.: *Arch. Pharm. Res.* 9, 1 (1986).
8. Gerhardt, P., Murray, R.G.E. and Costilow, R.N.: *Manual of methods for general bacteriology*, p. 333 (1981).
9. Stanley, E.R., Hansen, G., Woodcock, J. and Metchalf, D.: *Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 34, 2272 (1975).
10. Weir, D.M.: *Handbook of experimental immunology*. Vol. 2, p. 44 (1986).
11. Robert, N., Moore, M.A.S. and Barry, T.: *Immunology.*, 135, 2374 (1983).
12. Lee, I.R., Wee, S.W. and Han, Y.N.: *Kor. J. Pharmacogn.*, 20, 1 (1989).
13. Hood, H.E., Weissman, I.L., Wilson, J.H. and Wood, W.B.: *Immunology.*, 2nd ed. p. 152 (1984).