

조개나물 추출물의 세포독성과 항균효과

류명환, 엄용대, 변종호, 조 훈,¹ 양은영,¹ 강길웅,² 신민교, 백승화^{2,*}

원광대학교 한의과대학 본초학교실, ¹건일제약(주) 중앙연구소, ²한의학전문대학원 천연물학교실

Studies on the Cytotoxicity and Antimicrobial Effects of the Extract of *Ajuga multiflora* Bunge

Myeng Hwan Ryu, Yong Dea Aeam, Jong Ho Byun, Hoon Cho,¹ Eun Yeong Yang,¹
Kil Ung Kang,² Min Kyo Shin and Seung Hwa Baek^{2,*}

Department of Herbage, School of Oriental Medicine and ²Department of Natural Products,
Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea.
¹Kunhil Pharmaceutical Co., Ltd., Chunan, Chungnam 330-810, Korea.

Abstract – This study was carried out to evaluate cytotoxic effects of *Ajuga multiflora* Bunge extracts on murine leukemia tumor (P388D₁) cell lines. Disruptions in cell organelles were determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide (MTT) assay. The comparison of IC₅₀ values of *Ajuga multiflora* Bunge extracts in L1210 and P388D₁ cell lines showed that their susceptibility to these extracts decreased in the following order: Adriamycin > methanol extract > chloroform extract > ethyl acetate extract > hexane extract > water extract by the MTT assay. In order to develop an antimicrobial agent, dried *Ajuga multiflora* Bunge was extracted with several solvents, and then antimicrobial activity was investigated. The minimal inhibitory concentration (MIC) of the extract against microorganisms were also examined. Antimicrobial activities of amocla and ketoconazole as references were compared to those of extracts of H₂O, *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol. The antimicrobial activity of all extracts from the sample had growth inhibition activity against gram-negative bacteria, gram-positive bacteria and fungi (MIC > 200 µg/ml). These results suggest that the methanol soluble extract of *Ajuga multiflora* Bunge may be a valuable choice for the studies on the treatment of murine leukemia tumor cell lines.

Key words – *Ajuga multiflora* Bunge, MTT assay, antimicrobial, minimal inhibitory concentration.

조개나물 (*Ajuga multiflora* Bunge)은 꿀풀과 (Labiatae)에 속하는 多年生草本이며^{1,4)} 同屬 近緣植物로 흰조개나물 (*A. multiflora* Bunge var. *leucantha* Nakai)이 있다.^{3,5)} 이 조개나물은 우리나라 전국 각지의山野의 양지바른 풀밭에서 자라는 植物로 그 자원이 풍부하다. 韓醫學 臨床에서 조개나물의 全草 *Ajugae multiflorae* Herba를 夏枯草의 代用 韓藥材로서 清熱散結, 清肝明目, 降血壓 등의 效能이 있기 때문에 주로 癰瀝, 癭瘤, 肝火上炎, 目赤, 頭痛, 高血壓 등의 病증을 치료하는데 응용하고 있다.^{1,5,6)} 이 조개나물에

대하여 중국에서는 "多化筋骨草"라 칭하면서 全草를 "清熱, 涼血, 消腫"^{7,9)} 혹은 "清熱解毒, 生肌, 降壓"의 效能이 있다고 하였으며, 또한 "白夏草"라 칭하고 "利尿, 涼血, 消腫의 效能으로 小便不利, 高血壓, 淋巴腺炎, 癰腫 등의 病증을 치료한다".¹⁰⁾

이 조개나물에 대하여 이상에서와 같이 夏枯草의 代用的 範疇내에서 韓醫學 臨床에 응용되고 있다. 그러므로 저자는 조개나물의 전초의 약효를 구명하고자 물, methanol, ethyl acetate, chloroform 및 *n*-hexane의 추출물을 얻고, 이 추출물을 이용하여 gram 양성균, gram 음성균 및 진균에 대한 항균 및 항진균

*교신저자 : Fax 0653-841-4893

활성을 관찰하는 한편, 이 추출물을 이용하여 암 연구에 검색방법으로 많이 이용되고 있는 MTT 분석법으로 마우스의 백혈병 세포인 L1210 세포와 P388D₁ 세포에 대하여 세포독성효과를 관찰한 결과를 이에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에서 사용한 조개나물 (N-980 510)은 경기도 구리시 아차산 에서 채집하여 외부형태를 비교 조사하여 확인 후 사용하였다. 실험에 사용된 식물체는 원광대학교 한의과대학 본초학교실에 보관되어 있다.

실험기기 - CO₂ incubator (NUAIRE), deep freezer (Ishin), nitrogen tank (MVE, XC34/14), ELISA reader (Molecular Devices, spectra MAX 340), microscope (Olympus, CK2), micropipette (Gilson), 96 well (Falcon), conical tube (Falcon).

시약 - FBS (fetal bovine serum), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyl-2H-tetrazoliumbromide, RPMI medium 1640, antibiotic-antimyzolic, hepes, L-glutamine, Mueller Hinton broth (Difco), Mueller Hinton agar (Difco), Sabouraud dextrose broth (Difco), Sabouraud dextrose agar (Difco), D-PBS (Dulbecco's phosphate buffer solution), HBSS (Hanks' balanced salt solution) 등은 Gibco 제품을 사용하였으며, 0.4% Tripan blue solution, dimethylsulfoxide (DMSO), sodium dodecyl sulfate (SDS) 등은 Sigma 제품을 사용하였고, 추출용매는 시약급을 재증류하여 사용하였다.

검액제조 - 조개나물 2g을 100 ml 둥근 플라스크에 넣고 1차 증류수 20 ml를 넣고, 상온에서 24시간 동안 교반한 후 추출하였다. 이와같이 세번 반복 추출하여 얻은 추출물을 0.4 µm필터로 여과한 후, 여과액을 35°C에서 감압농축시킨 후 냉동건조하여 물 추출물 355 mg을 얻었다. 헥산, 에틸 아세테이트, 클로로포름은 상온에서 위의 방법에 따라 추출한 후, 용매를 감압농축하여 헥산 추출물 27 mg, 에틸 아세테이트 추출물 34 mg, 클로로포름 추출물 31 mg, 메탄올 추출물 394 mg을 얻었다.

시료의 처리 - 조제한 시료는 즉시 4°C 냉장고에 저장하였다가 사용직전에 배지로 희석하여 실험에 사용하였다.

사용균주 - 항균 및 항진균 시험용으로 사용된 균

주는 국립보건원으로부터 분양 받아 사용하였으며, Table II에 나타낸 바와 같이 Gram 양성세균으로는 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, gram 음성세균으로는 *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1636, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 진균으로는 *Aspergillus niger* ATCC 9029, *Candida albicans* ATCC 10231을 사용하였다. 항균대조군 amocla와 항진균 대조군 ketoconazole 을 사용하였다.

균주의 배양 - 세균 배양에는 Mueller Hinton broth를 사용하였고, 배지에 균을 이식하여 37°C 배양기에서 16~20시간동안 배양하였다. 진균 배양에는 Sabouraud dextrose broth를 사용하였으며, 배지에 균을 이식하여 22°C 배양기에서 5~7일 배양하여 사용하였다.

항균 및 항진균력 측정 - 각 용매 추출물에 대한 항균 및 항진균력은 고체배지 희석법^{11,12,13)}을 이용하여 측정하였다. 각 추출물을 10% DMSO 생리식염수에 용해시킨 후 추출물의 농도를 최고농도 2,000 µg/ml에서 최저농도 6.25 µg/ml까지 2 배씩 희석하였다. 희석된 각각의 시료 2.0 ml를 petri dish에 취하고 여기에 배지 18.0 ml를 섞어 배지가 굳은 다음 배양시킨 균을 백금으로 5 mm정도 도말하여 세균은 37°C 배양기에서 24시간, 진균은 22°C 배양기에서 5~7일간 배양하였다. 항균력의 대조군으로는 amocla (건일, amoxicillic acid sod., clavulanic acid pot.)를 사용하였고, 항진균력의 대조군으로는 ketoconazole을 사용하였다, 각 배양이 끝나면 집락형성 여부를 관찰하여 성장이 인정되지 않는 가장 낮은 농도를 최소억제농도 (minimal inhibitory concentration, MIC)¹⁴⁾로 판정하였다.

세포독성능 측정을 위한 세포주 - 암세포 성장억제능 측정을 위해 사용한 L1210과 P388D₁은 mouse 유래 암세포주로서 L1210은 lymphocytic leukemia이며 P388D₁은 lymphoid neoplasma이다. 세포독성능 측정을 위한 세포주는 서울대학교 세포주은행에서 분양 받아 실험실에서 계대배양하면서 실험하였다.

세포배양배지 - 세포배양에 사용된 배지는 L-glutamine이 포함된 RPMI-1640에 NaHCO₃ (2g, 23.81 mmol)을 혼합한 후, 3차 증류수에 녹인 다음 membrane filter (0.2 µm)로 여과한 후, 여액을 56°C에서 30분간 inactivation 시킨 우태아 혈청 FBS를 전체양의 1%가 되도록 혼합한 다음, 1N NaOH와 1N HCl

을 사용하여 pH 7.2가 되도록 하였다.

세포배양 - 세포독성능 측정에 사용된 부유세포 (suspension cell)인 L1210, P388D₁은 위에서 제조한 세포배양배지를 사용하여, 세포의 지수적 성장 (exponential growth)을 유지하도록 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2~3일간 배양한 후, conical tube (falcon)에 옮겨 1500 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포침전물을 분리하였다. 분리된 세포침전물을 다시 D-PBS에 부유시켜 원심분리한 다음, 상등액을 제거하여 세포만을 취하였다. 동일한 방법으로 반복 세척한 후, 일부를 취하여 0.4% tripan blue을 가하여 염색되지 않은 살아있는 세포를 haemocytometer로 세어 5×10⁵ cells/ml의 농도가 되도록 새로운 배지에 부유시켜 배양하여 실험에 들어갔다.

MTT assay - 암세포에 대한 세포독성능 측정은 MTT colorimetric 검정법으로 실험하였다.¹⁵⁻¹⁷⁾ 암세포에 대한 세포독성능을 측정하기 위해, 96 well flat bottom microtiter의 각 well에 logarithmic phase에 도달한 암세포 L1210, P388D₁을 2×10⁵ cells/ml 농도로 100 µl/well씩 접종하고, 각각의 검체를 단계 희석하여 10 µl/well 각 well에 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ incubator 조건하에서 4시간 동안 배양한 후, 형성된 불용성 formazan crystal products를 용해시키기 위하여, 10% SDS를 함유한 0.01N HCl 용액을 각 well당 150 µl씩 가해 37°C, 5% CO₂ incubator 조건하에서 1일간 배양하여, ELISA reader (Molecular Devices, spectra MAX 340)로 흡광도 (540 nm)를 측정하여 IC₅₀값을 구하였다. 비교약물로는 adriamycin (일동제약)을 사용하였고, 약물없이 동일한 조건하에서 배양된 세포를 control로 하였다. IC₅₀값은 대조군의 50% 수준으로 암세포의 성장을 억제하는 약물의 농도 (µg/ml)로 주어지며, 미국 암 연구소 (NCI; National Cancer Institute, USA)의 manual 방법에 의해 결정하였다.¹⁸⁾

세포의 광학현미경적 관찰 - 광학현미경으로 세포를 관찰하기 위하여, P388D₁세포는 MTT정량을 하기 전에 도립현미경으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

암연구에 검색방법으로 많이 이용되고 있는 MTT 분석법을 이용하여, 조개나물 (*Ajuga multiflora* Bunge)의 전초로부터 물과 몇가지 유기용매를 사용하여 추출된 추출물에 대한 세포독성실험의 결과 (Table I)

Table I. The antitumor activities of aqueous and organic solvents of extracts of *Ajuga multiflora* Bunge. Comparison of IC₅₀ for aqueous and organic solvents of extracts of *Ajuga multiflora* Bunge by the MTT assay

Sample ^a	IC ₅₀ (µg/ml) ^b	
	Mouse lymphocytic leukemia cells (L1210)	Murine leukemia tumor cells (P388D ₁)
WAB	113.76	138.70
MTAB	31.21	12.37
CFAB	21.13	32.60
EAAB	16.17	36.40
HXAB	114.95	131.60
AM	0.02	0.02

Plant extracts; WAB; water extract of *Ajuga multiflora* Bunge; MTAB; methanol of *Ajuga multiflora* Bunge; CFAB; chloroform extract of *Ajuga multiflora* Bunge; EAAB; ethyl acetate extract of *Ajuga multiflora* Bunge; HXAB; hexane extract of *Ajuga multiflora* Bunge; AM; adriamycin
^aEach extract was examined in triplicate experiments.

^bIC₅₀ represents the concentration of an extract required for 50% inhibition of cell growth.

에 의하면, 마우스의 백혈병 세포인 L1210 세포에 대하여, 조개나물의 추출물은 비교약물인 adriamycin 보다 약한 세포독성 발현이 나타났다. MTT 분석법에 의하면, 추출물 중에서 에틸 아세테이트 추출액은 IC₅₀ 16.17 µg/ml 값으로 가장 강한 세포독성 발현을 관찰할 수 있었다. 비교약물인 adriamycin으로 L1210 세포에 대한 조개나물 추출물의 세포독성에 대한 비교는 다음과 같은 순서로 세포독성이 감소하였다. MTT 분석법에 의하면, 아드리아마이신 > 에틸 아세테이트 추출물 > 클로로포름 추출물 > 메탄올 추출물 > 물 추출물 > 헥산 추출물 순으로 정량분석값을 얻을 수 있었다. 조개나물 추출액을 MTT 분석법으로, P388D₁ (murine leukemia tumor cells) 세포에 대하여 성장 억제효과를 평가하였다. MTT 분석법에 의하면, 모든 추출물이 비교약물인 adriamycin (IC₅₀ 0.02 µg/ml)보다 낮은 항암활성을 나타냈다.¹⁹⁾ P388D₁ 세포에 대한 조개나물추출물의 비교약물인 adriamycin에 대한 항암활성에 대한 비교는 다음과 같은 순서로 항암활성이 감소하였다. MTT 분석법에 의하면, 아드리아마이신 > 메탄올 추출물 > 클로로포름 추출물 > 에틸 아세테이트 추출물 > 헥산 추출물 > 물 추출물 순으로 정량분석값을 얻을 수 있었다. 그렇지만, 메탄올 추출물은 마우스의 백혈병 세포인 L1210세포에 대하여 강한 세포독성 발현 (IC₅₀ 31.21 µg/ml)을 나타냈다. 본 실험 결과에 의하면, 에틸 아세테이트 추출물은 L1210세포

에 대하여 강한 세포독성을 나타냈으며, P388D₁세포에 대하여 강한 성장억제 활성을 관찰 할 수 있었다. 따라서 메탄올 추출물과 에틸 아세테이트 추출물의 P388D₁세포에 대한 항암물질이 함유되어 있을 것으로 판단되어 이들 추출물에 대한 최적분리조건을 확립하여 순수한 화합물을 분리한 후, 이들 화합물에 대한 P388D₁세포의 항암활성을 측정해야 할 것으로 판단된다.

조개나물의 물과 여러가지 유기용매 추출물이 고삼 추출물에 비해 항균력과 항진균력이 낮은 것으로 보아,²⁰⁾ 조개나물에 함유되어 있는 항균성물질과 항진균성물질이 적게 함유되어 있으리라 판단된다 (Table II).

결 론

조개나물 (*Ajuga multiflora* Bunge) 추출물을 MTT 분석법으로, 마우스의 백혈병 세포인 L1210세포 및 murine leukemia cell 인 P388D₁에 대하여 세포독성효과를 평가하였다. 이들 추출물은 마이크로 그램 농도의 범위에 대하여 세포독성을 나타내었으며, 조개나물의 메탄올 추출물은 IC₅₀ 12.37 µg/ml 정량분석값으로 P388D₁ 세포에 대한 가장 강한 항암활성을 나타내었다. 마우스의 백혈병 세포인 L1210세포에 대한 이들 추출물중에 에틸 아세테이트 추출물은 비교 약물인 아드리아마이신에 대한 IC₅₀ 16.17 µg/ml 정량분석값으로 가장 강한 세포독성 발현을 관찰할 수 있었다. 따라서 조개나물의 세포독성 활성물질은 에틸 아세테이트 추출물에 함유되어 있으리라 사료된다.

조개나물을 물과 메탄올, 에틸아세테이트, 클로로포

름, hexan, 메탄올을 용매로 사용하여 조개나물로부터 추출한 결과, Gram 양성균과 Gram 음성균에 대하여는 200 µg/ml 이상의 농도로 나타나, 항균대조군인 Amocla의 최소억제농도 (< 6.25 µg/ml)에 비해 항균력이 낮은 것으로 나타났다. 진균에 대해서도 200 µg/ml 이상의 농도로 MIC가 나타나, 대조군 Ketoconazole의 최소억제농도 (< 6.25 µg/ml)에 비해 항진균력이 낮은 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 BK 21 사업지원과, 한국과학재단, 전라북도청 후원, 의약자원연구센터 (98-16-01-04-A-3)의 연구지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 신민교 (1997) 임상본초학, 383-384. 영림사, 서울.
2. 이창복 (1980) 대한식물도감, 646. 향문사, 서울.
3. 정태현 (1965) 식물편, 한국동식물도감, 1013. 삼화출판사.
4. 김현삼, 리수진, 박형선, 김매근 (1988) 식물원색도감, 542 과학백과사전종합출판사.
5. 임기홍 (1978) 약용식물학, 253-254. 동명사, 서울.
6. 신길구 (1973) 신씨본초학, 623-625. 수문사, 서울.
7. 謝宗萬, 余友苓 (1996) 全國中草藥名鑒, 910. 人民衛生出版社, 北京.
8. 안덕균 (1998) 한국본초도감, 161. (주)교학사, 서울.
9. 嚴仲鑑, 李萬林 (1997) 中國長白山藥用植物彩色圖志, 358. 人民衛生出版社, 北京.

Table II. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of *Ajuga multiflora* Bunge extracted with different solvents^{a)} against various microorganisms

Strains	MIC (µg/ml)						
	Amocla	Ketoconazole	WAB	MTAB	CFAB	EAAB	HXAB
<i>S. aureus</i>	< 6.25	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
<i>B. subtilis</i>	< 6.25	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
<i>M. luteus</i>	< 6.25	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
<i>E. coil</i>	< 6.25	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
<i>P. aeruginosa</i>	< 6.25	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
<i>K. pneumoniae</i>	< 6.25	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
<i>A. niger</i>	> 200	< 6.25	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
<i>C. albicans</i>	> 200	< 6.25	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200

Plant extracts; WAB; water extract of *Ajuga multiflora* Bunge; MTAB; methanol of *Ajuga multiflora* Bunge; CFAB; chloroform extract of *Ajuga multiflora* Bunge; EAAB; ethyl acetate extract of *Ajuga multiflora* Bunge; HXAB; hexane extract of *Ajuga multiflora* Bunge

^{a)} Each extract was examined in triplicate experiments

10. 김재길 (1984) 원색천연약물대사전, 163. 남산당, 서울.
11. 미생물 및 면역학 분과회 (1998) 실험종합미생물학, 116-118. 대학사, 서울.
12. 유영효, 박남준, 김병오, 최문정, 심점순, 강태충, 이재욱, 김대영 (1994) 새로운 퀴놀론계 항균제 DWQ-013의 항균작용. 약학회지 38 : 265-273
13. 민병선, 방규호, 이준성, 배기환 (1996) Candida와 Penicillium속 진균에 대한 천연물의 항진균효과 검색. 약학회지 40 : 582-590
14. 이건설 외 (1996) 진단병원미생물학, 589-601. 고려의학, 서울.
15. Mosmann, T. J. (1983) Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival; application of proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65 : 55-63
16. Keepers, Y. P., Pozao, P. E., Peters, G. T., Otte, J. A., Winograd, B. and Pinedo, H. M. (1991) Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *Eur. J. Cancer* 27 : 897-900
17. Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdr, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. (1987) Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research* 47 : 936-942.
18. a) Goldin, A., Venditti, J. M., Macdonald, J. S., Muggia, F. M., Henney, J. E. and Devita, V. T. (1981) Current Results of the Screening Program at the Division of Cancer Treatment, National Cancer Institute. *Europ. J. Cancer* 17 : 129-142
b) Kallmann, R. F. (1985) The Use of Rodent Tumors in Experimental Cancer Therapy. *Cancer res* 45 : 6541-6545
19. Cho, H., Yang, E. Y., Kim, J. S., You, I. S., Ryu, D. G., Lee, J. H., Kang, K. U and Baek, S. H. (1999) Studies on the cytotoxicity of Sophora flavescens Ait extracts against L1210 and P388D₁ cells (II). *Kor. J. Pharmacogn* 30 : 351-354
20. 조훈, 원성란, 양은영, 김종수, 유일수, 류도곤, 이정호, 강길웅, 백승화 (1999) 고삼추출물의 항균효과 (I). 약학회지 43 : 419-422

(2000년 1월 17일 접수)