

白花蛇舌草 抽出物の 抗菌實驗 및 SOD類似活性, 電子供與能에 關한 研究

徐仁教¹, 金相贊¹, 李振泰², 卞俊哲³, 卞晟僖³

(¹慶山大學校 韓醫科大學 方劑學教室, ²慶山大學校 生命資源工學部, ³慶山大學校 濟韓東醫學術院)

Study on SOD like activity and Electric donor ability of *Hedyotis*

diffusa W_{ILLD.}

Ingyo Seo¹, Sangchan Kim¹, Jintae Lee², Junseok Byun³, Sunghui Byun³.

¹College of Oriental Medicine of Kyungsan University, Daegu 712-715, Korea

²Faculty of Life Science Resources & Engineering of Kyungsan University, Kyungsan

712-240, Korea.

³Jeahan Oriental Medical Academy, Daegu 712-715, Korea

ABSTRACT

In order to study on SOD like activity and Electric donor ability of *Hedyotis diffusa* W_{ILLD.}, testing antibacterial effect on E. coli O157 which causes infectious inflammatory disease; measuring inhibitory effect on tyrosinase which stimulates melanin formation; and measuring the influence of it to SOD like activity, DPPH and TBARS which are related to ageing and carcinogenesis.

The results of these experiments, are as follows.

1. In the antibacterial experiment with the extract of *Hedyotis diffusa* W_{ILLD.} on *E. coli* O157, there was no change in proliferation from the beginning of culture to two hours after, but proliferation inhibiting effect on *E. coli* O157 was detected from three hours after the beginning of culture.

2. Tyrosinase inhibitory effect was measured as $0.39 \pm 0.026\%$. Compared with the control group, the effect was very slight.

3. The SOD like activity of the extract of *Hedyotis diffusa* W_{ILLD.} was measured as $21.33 \pm 4.264\%$. Compared with the extracts of several other herbs, it was much more significant.

4. The DPPH of the extract of *Hedyotis diffusa* W_{ILLD.} was $53.3 \pm 0.91\%$ when 0.02g was used and $83.5 \pm 1.82\%$ when 0.05g was used. The result when 0.05g was used was more significant than 0.02g was used.

5. The TBARS of the extract of *Hedyotis diffusa* W_{ILLD.} was measured as 0.724 ± 0.004 MDAappm. Compared with the extracts of several other herbs, the result was more significant.

From these results, we found that *Hedyotis diffusa* W_{ILLD.} can be used in therapy of dysentery with bloody stool and fever which is caused by infection with *E. coli* O157 and that it can be also used effectively as age resister or anticarcinogen.

Key word : *Hedyotis diffusa* W_{ILLD.} SOD like activity, Electric donor ability, *E. coli* O157.

I. 緒 論

白花蛇舌草는 꼭두서니과의 한해살이풀 백운풀(*Hedyotis diffusa* Willd.)의 지상부¹⁾로서, 濟州道²⁾ 및 廣東, 廣西, 福建 등지에서 주로 생산된다³⁾. 이 약재는 古代本草書에는 수재되어 있지 않고, <廣西中藥誌>에 처음으로 기재된 것으로, 원래 中國南方의 民間藥으로, 濕熱瘡毒, 蟲垂炎 등의 症에 사용되었던 것이지만, 근래에는 惡性腫瘤, 癌症에 유효한 효과가 있다고 報告되고 있다⁴⁾.

白花蛇舌草는 味苦甘寒⁵⁾한 性味로, 胃·大腸·小腸에 入하여⁵⁾ 清熱解毒, 活血利尿, 消腫止痛하는 效能으로^{6,7)} 惡性腫瘤, 闌尾炎, 肺炎, 喉頭炎, 扁桃腺炎, 腎盂腎炎, 痢疾, 癰癤, 帶狀疱疹, 毒蟲咬傷 등⁶⁾을 主治하고, 또 白花蛇舌草가 配合된 七草湯은 黃褐斑에 사용되기도 한다⁸⁾. 이 약재의 成分으로는, ursolic acid, oleanolic acid, P-coumaric acid, stigmasterol, β -sitosterol, erysimoside, hentriacontane 등⁹⁾이 있다. 이 약재에 대한 근래 研究動向을 보면, 宋¹⁰⁾은 白花蛇舌草가 P815 murine masocytoma癌株의 成長을 抑制했다고 報告하였으며, 金¹¹⁾은 ursolic acid를 白花蛇舌草의 抗癌活性物質로 報告하였으며, 또 金 등¹²⁾은 白花蛇舌草에서 分離한 ursolic acid, asperuloside의 抗癌 및 抗轉移 효과를 보고하였다. 그러나 白花蛇舌草의 主治症中 白血病, 肝癌細胞¹³⁾, 肝炎⁵⁾, 抗癌 및 抗轉移效果^{11,12)} 등 주로 腫瘍에 대한 研究는 활발하였으나, 感染性 炎症疾患 및 外科적 질환의 연구는 부족한 상태이다.

이에 저자는 白花蛇舌草를 이용하여 血痢를 일으키는 *E. coli* O157, melanin생성을 촉진하는 tyrosinase 및 老化和 癌의 發生에 관여하는¹⁴⁾ superoxide dismutase(SOD)유사 활성, DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl), 및 TBARS(2-thio barbituric reactive substance)의 변화를 관찰하여 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗方法

1. 藥材

實驗에 使用된 藥材는 大邱藥令市에서 購入하여 精選한 後 實驗에 使用하였다.

2. 白花蛇舌草 抽出物の 항균실험

(1) 白花蛇舌草의 熱水抽出物조제

白花蛇舌草 100g에 dH₂O 100ml를 넣은 다음, 80℃에서 3시간동안 열탕처리하여 추출된 액을 rotary evaporator에서 농축하였다. 농축된 액체를 동결건조하여 분말로 만들고, 시료로 사용할 때마다 buffer에 녹여 필터멸균하여 사용하였다.

(2) 白花蛇舌草 抽出物の 항균실험

白花蛇舌草 抽出物の 항균실험에 사용된 균주로서는 병원성식중독균 *E. coli* O157을 사용하였으며, 미생물배양배지는 Trypticase Soy Broth액체배지를 이용하였다. 실험은 먼저 전배양으로서 3ml의 액체배지에 *E. coli* O157을 백금니로 찍어 접종한 후, 37℃에서 하룻밤동안 shaking incubation 하였다. 전배양된 균액을 멸균된 25ml의 액체배지에 각각 100 μ l씩 접종하고, 白花蛇舌草 抽出物(동결건조추출물0.1g/dH₂O10ml)를 500 μ l첨가하여 37℃에서 shaking incubator로 배양하였다. 배양중 균수의 증식측정은 spectrophotometer (HITACHI UV-2001, Japan)로서 파장 660nm에서 균의 증식변화를 관찰하였다.

3. Tyrosinase inhibitor 효과측정

Tyrosinase 저해활성측정 방법은 tyrosinase의 작용 결과 생성되는 DOPA chrome을 비색법에 의해 측정하는 Yagi등의 방법¹⁵⁾에 준하여 실행하였다. mushroom tyrosinase의 농도를 3,400unit/mL로 하여 0.5mL사용하고, 기질로서 DOPA를 0.5mL, buffer 1mL의 혼합액에 시료용액 1mL를

첨가 25℃, 2분간 반응시켜 475nm에서 측정하고 DOPA chrome의 변화를 저해 값으로 환산하였다(Scheme. 1). 白花蛇舌草 抽出物을 sample로서 이용하였으며 0.01g/ml의 농도를 만들어 사용하였다.

1. Sample : lyophilized material
2. Buffer : 1/15 M phosphate buffer(pH 6.8)
3. Mushroom tyrosinase : 3,400 unit/mL
4. Substrate : 10mM DOPA

A : Absorbance at 475 nm without test sample after incubation

B : Absorbance at 475 nm without test sample before incubation

C : Absorbance at 475 nm with test sample after incubation

D : Absorbance at 475 nm with test sample before incubation

	Control	Test
water	1 mL	
sample solution		1 mL
buffer	1 mL	1 mL
DOPA	0.5 mL	0.5 mL
tyrosinase	0.5 mL	0.5 mL
total	3 mL	3 mL

↓

Incubation for 2 min at 25℃

↓

DOPA chrome change value(at 475 nm)

$$\text{inhibition}(\%) = \frac{(A - B) - (C - D)}{(A - B)} \times 100$$

Scheme 1. Assay of tyrosinase activity.

4. 白花蛇舌草 抽出物の 항산화제 유사활성 측정(SOD like activity)

白花蛇舌草 抽出物の 항산화제 유사활성 측정은 Marklund 등의 방법¹⁶⁾에 따라 실행하였다. 시료로서 동결건조 시킨 白花蛇舌草 抽出物 0.5g을 10ml의 Tris-HCl buffer(pH8.5)에 녹인 것을 사용하였다. 실험으로는 白花蛇舌草 抽出物 0.2ml에 Tris-HCl buffer(pH8.5) 3 ml와 7.2mM pyrogallol 0.2mL를 가하여 25℃에서 10분간 방치후, 1N HCl 1ml로 반응을 정지시킨 후 420nm에서 흡광도를 측정하여

[1-(시료첨가구흡광도-抽出物흡광도)/무첨가구의 흡광도]×100으로 나타내었다(Scheme. 2).

0.2ml of *Hedyotis diffusa* WILLD. extract

↓

Add 3ml of Tris-HCl buffer(pH8.5)

↓

Add 0.2ml of 7.2mM pyrogallol

↓

Incubation for 10min at 25℃

↓

Add 1ml of 1N HCl

↓

Measure at 420nm

Scheme 2. Assay of SOD like material in *Hedyotis diffusa* WILLD. extract

5. 白花蛇舌草 抽出物の 전자공여능 (DPPH) 측정

白花蛇舌草 抽出物の 전자공여능 측정방법은 Blois의 방법¹⁷⁾에 준하여 실행하였다. 전자공여능 측정은 白花蛇舌草 抽出物 2ml에 0.2mM DPPH 1ml를 넣고 vortex mix 후, 30분간 방치한 다음 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 $[1 - (\text{시료첨가구흡광도} - \text{抽出物흡광도}) / \text{무첨가구의 흡광도}] \times 100$ 으로 나타내었다(Scheme. 3).

6. Hydroxyl radical(\cdot OH) 생성 측정; TBARS 측정

Hydroxyl radical(\cdot OH) 생성측정은

Gutteridge의 방법¹⁸⁾에 의해 측정하였다. 반응혼합물 1ml를 37°C의 water bath에서 1시간동안 반응시킨후, 25 μ l의 dibutylhydroxytoluene (BHT) 7.2%를 첨가하여 산화반응을 정지시켰다. 반응혼합물을 잘 섞은 다음 2ml TCA/TBA를 첨가한 후, 열탕에서 15분간 가열하였다. 냉각후 2,000 xg에서 15분간 원심분리시켰다. 상등액을 흡광도 531nm에서 측정하였고 표준시료로서는 시료대신 증류수를 사용하여 측정하였다. TBARS값은 ml 반응혼합물에 대해 μ g malondialdehyde (MDA)로 표시하였다(Scheme. 4).

2ml of *Hedyotis diffusa* W_{ILLD.} extract

↓

1ml of 0.2mM DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

↓

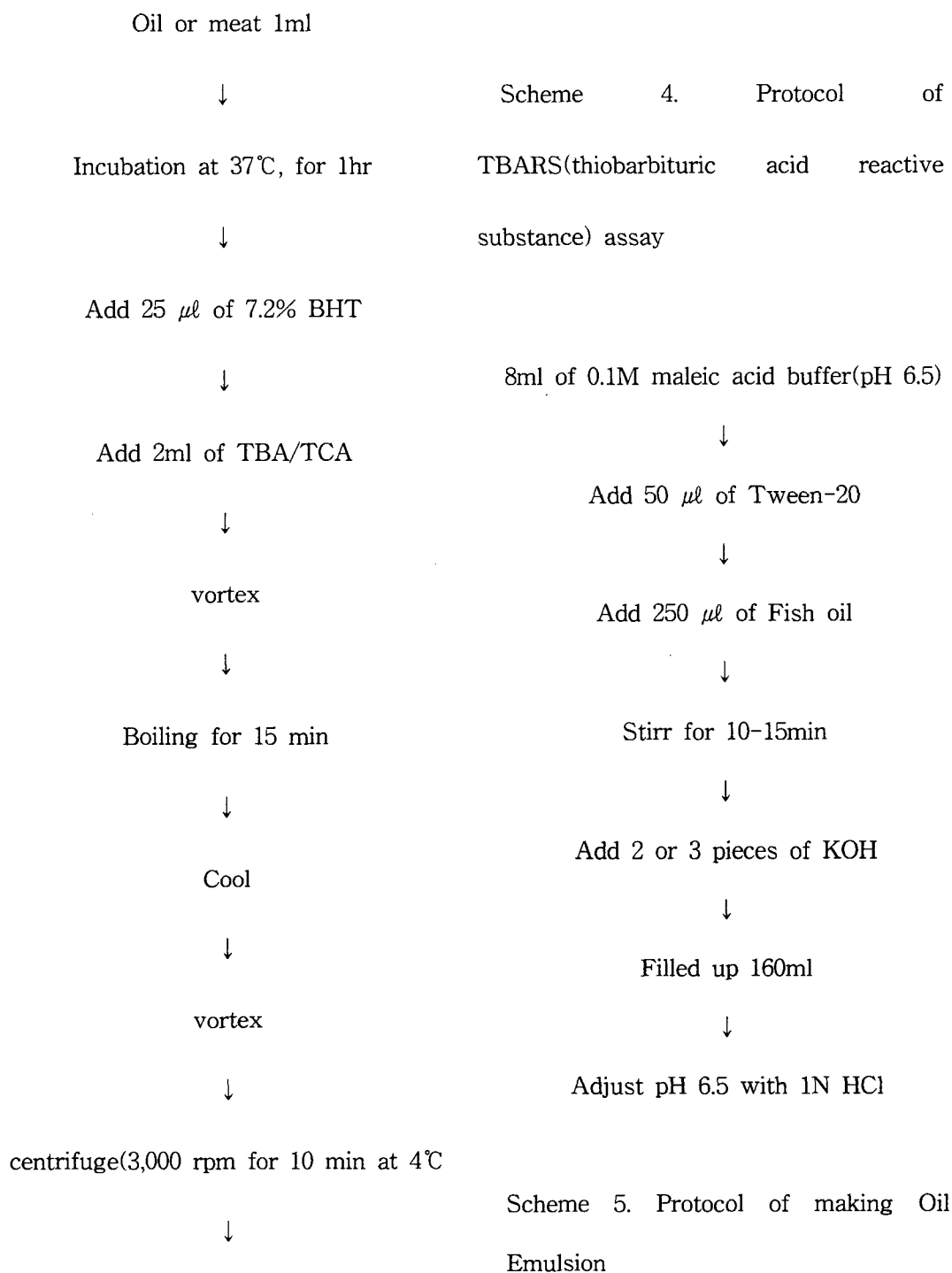
Incubation for 30 min at R.T.

↓

Measurement at 517nm

Scheme 3. Assay of electron donating ability(EDA)

Measurement at 531nm



III. 實驗成績

1. 白花蛇舌草 抽出物의 항균실험

白花蛇舌草 抽出物의 *E. coli* O157에 대한 항균실험으로서 각각 $0\mu\text{l}$ 와 $500\mu\text{l}$ 의 抽出物을 넣고 배양하였다. 본 배양 3시간까지의 증식곡선에서 *E. coli* O157은 白花蛇舌草 500

μl 를 넣어 배양한 것에서 약간의 증식억제 효과가 나타났다(Fig.1). Fig.1에서 배양시작 후 처음 2시간까지는 증식변화가 나타나지 않았으나 3시간 이후부터 *E. coli* O157에 대한 증식억제효과가 나타났다(Table 1)(Fig.1).

Table 1. Effect of inhibition of *Hedyotis diffusa* W_{ILLD.} extract to growth of *E. coli* O157

Time(hour)	1	1.5	2	2.5	3	3.5
Control	0.179	0.218	0.584	0.743	0.907	1.201
HDW	0.178	0.221	0.564	0.662	0.861	0.929
Inhibition rate(%)	0.55	-1.38	3.42	10.90	5.07	22.65

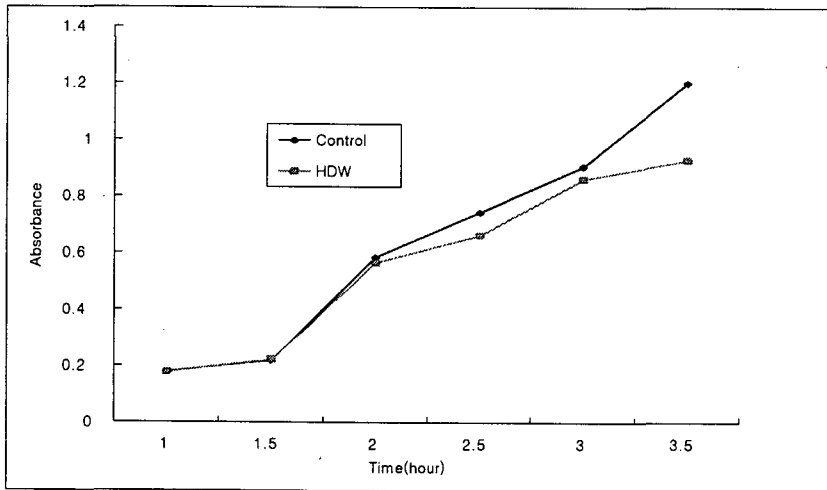


Fig. 1. Effect of inhibition of *Hedyotis diffusa* W_{ILLD.} extract to growth of *E. coli* O157

2. Tyrosinase inhibitor 효과측정

Tyrosinase 저해효과는 10mM의 DOPA를 기질로 하고, 1700 unit의 tyrosinase를 반응시켜 대조구로 하였다. 白花蛇舌草 抽出물을 1%농도로 하여 기질인 DOPA와 반응시키고 다시 tyrosinase와 반응시켜 tyrosinase inhibitor를 측정하여 대조구와 비교하였다. 그 결과 白花蛇舌草 抽出물의 tyrosinase inhibition ratio는 $0.39 \pm 0.026\%$ 로 극히 미약한 수준으로 나타났다.

3. 白花蛇舌草 抽出물의 항산화제 유사활성측정

白花蛇舌草 抽出물의 항산화제 유사활성측정은 白花蛇舌草 抽出물 자체의 색소영향을 배제하기 위하여 시료첨가구의 흡광도에서 抽出물의 흡광도를 뺐다. 白花蛇舌草 抽出물의 항산화제 유사활성은 $21.33 \pm 4.264\%$ 로 나타났다.

4. 白花蛇舌草 熱水抽出물의 전자공여능측정(DPPH)

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 tocopherol, polyhydroxy 방향족화합물과 방향족 아민류에 의해 환원되면서 짙은 자색이 탈색되어 전자공여능측정이 가능하다. 白花蛇舌草 熱水抽出물 0.02g을 methanol 2ml에 녹여 DPPH와 반응시켰을 때의 전자공여능은 $53.3 \pm 0.91\%$, 0.05g을 사용하였을 때의 전자공여능은 $83.5 \pm 1.82\%$ 로 나타났다(Table 2)(Fig.2).

Table 2. Comparison of Electric donor ability between *Hedyotis diffusa* WILLD.

Extracts	Electric donor ability(EDA) %
<i>Hedyotis diffusa</i> WILLD. 0.02g	$53.3 \pm 0.91^{a)}$
<i>Hedyotis diffusa</i> WILLD. 0.05g	$83.5 \pm 1.82^{***}$

a) : Mean \pm standard error.

(***, $P < 0.001$; compared to *Hedyotis diffusa* W_{ILLD.} 0.02g group)

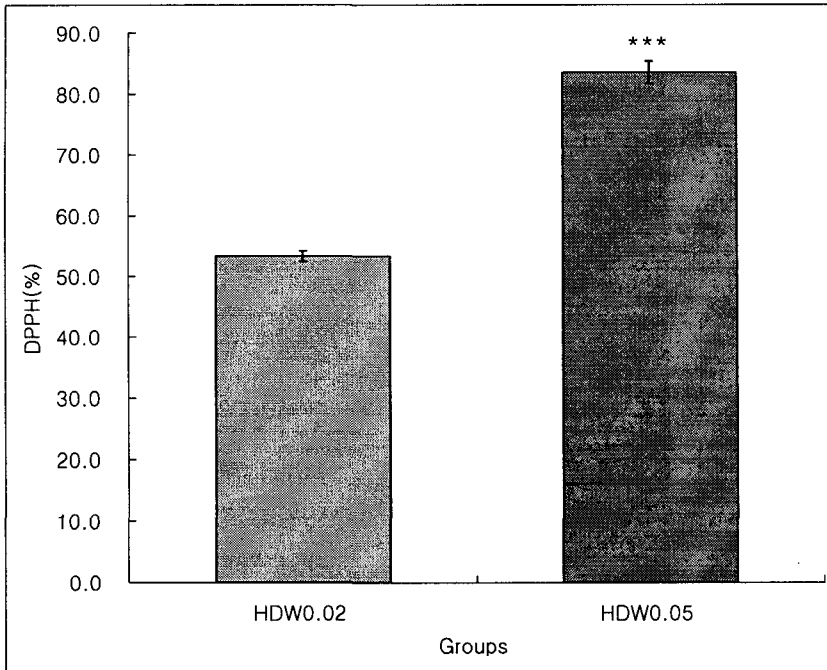


Fig. 2. Comparison of Electric donor ability between *Hedyotis diffusa* W_{ILLD.}

(***, $P < 0.001$; compared to *Hedyotis diffusa* W_{ILLD.} 0.02g group)

Bars show mean \pm standard error.

HDW0.02 : *Hedyotis diffusa* W_{ILLD.} 0.02g

HDW0.05 : *Hedyotis diffusa* W_{ILLD.} 0.05g

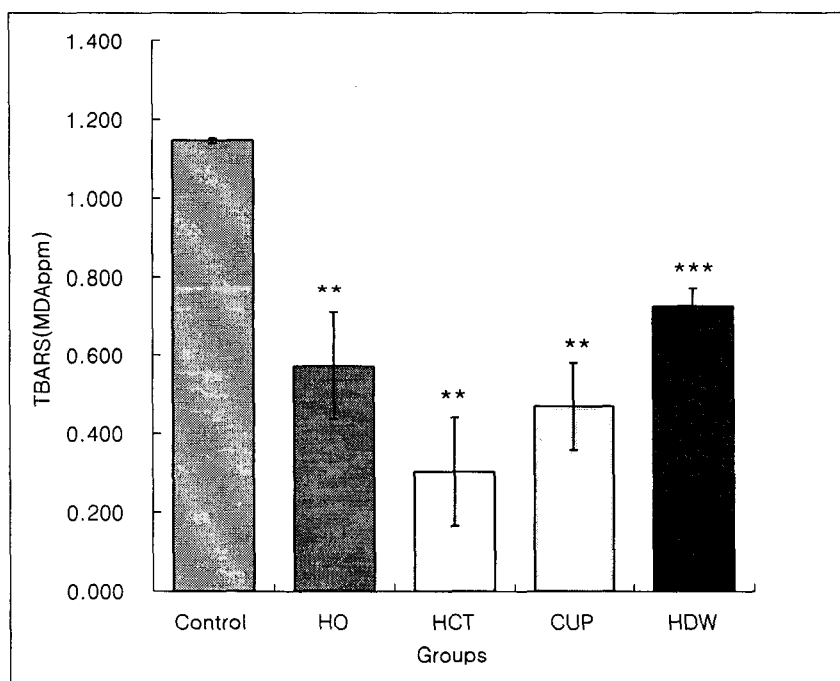
1.147 \pm 0.006 MDAppm이 있으며, 이에 비해 瓦松구는 0.572 \pm 0.136, 魚腥草구는 0.303 \pm 0.137, 榆白皮구는 0.469 \pm 0.111, 白花蛇舌草구는 0.724 \pm 0.044를 각각 나타내었다(Table 3)(Fig.3).

5. TBARS측정

白花蛇舌草 抽出物이 지방산화의 방지에 미치는 영향에 대해 실험하였다. 항산화효과를 비교하기 위하여 실험대조구로서 oil emulsion을 이용하였다. 결과는 대조구에서

Table 3. TBARS values(MDA) of various extracts

Group	Number of inspection	MDA(malondialdehyde)
Control	3	1.147±0.006 ^{a)}
HO	3	0.572±0.136**
HCT	3	0.303±0.137**
CUP	3	0.469±0.111**
HDW	3	0.724±0.044***



HO : Herba Orostachyos(瓦松)

HCT : Houttuynia cordata Thunb.(魚腥草)

CUP : Cortex Ulmi Pumilae(榆白皮)

HDW : *Hedyotis diffusa* WILLD.(白花蛇舌草)

a) : Mean ± standard error.

(**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; compared to control group)

Fig. 3. TBARS values(MDA) of various extracts

HO : Herba Orostachyos(瓦松)

HCT : Houttuynia cordata Thunb.(魚腥草)

CUP : Cortex Ulmi Pumilae(榆白皮)

HDW : *Hedyotis diffusa* WILLD.(白花蛇舌草)

Bars show mean ± standard error.

a) : Mean ± standard error.

(**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; compared to control group)

IV. 考 察

白花蛇舌草는 꼭두서니과의 한해살이풀 백운풀(*Hedyotis diffusa* Willd.)의 지상부¹⁾로서, 우리나라에서는 제주도의 습지에서²⁾ 생산되며, 중국에서는 廣東, 廣西, 福建 등지에서 주로 생산된다³⁾. 이 약재는 古代本草書에는 수재되어 있지 않고, <廣西中藥誌>에 처음으로 기재되어 있다. 이 약재는 원래 中國南方의 民間藥으로, 주로 濕熱瘡毒, 蟲垂炎 등의 症에 사용되었던 것이지만, 근래 20여년간, 惡性腫瘤, 癌症에 유효한 효과가 있다고 報告된 이후 점차 常用하는 약재가 되어 <中華人民共和國藥典>1977年版에 수재되었다⁴⁾.

白花蛇舌草는 異名으로, 蛇舌草, 鶴舌草, 二葉葎으로 불리기도 한다^{3,6,19)}. 本草古典인 <新修本草>등^{20,21)}을 보면 이와 유사한 蛇舌이라는 이름의 藥材가 있으나, 이는 玉石類의 藥物로서 白花蛇舌草와는 다른 것이다.

白花蛇舌草의 性味는 <廣西中藥誌>에⁵⁾ 味苦甘, 性溫, 無毒라고 기록되어 있으나, 요즘은 味苦甘寒한 것으로 인식되고 있으며, 歸經은 <廣西中藥誌>에⁵⁾ 入心, 肝, 脾三經한다고 하였으나, 이 역시 근래에는 入胃, 大腸, 小腸하는 것으로 인식하고 있다⁵⁾. 效能은 清熱解毒, 活血利尿, 消腫止痛하는 효능을 갖고 있으며^{6,7)}, 또 生體의 抵抗力을 제고시키는 효능으로²²⁾ 惡性腫瘤, 闌尾炎, 肺炎, 喉頭炎, 扁桃腺炎, 腎盂腎炎, 痢疾, 癰癤, 帶狀疱疹, 毒蟲咬傷 등⁶⁾을 主治하며, 清熱 利尿하는 효능으로 赤痢, 腸炎을 治療하기도 한다^{22,23)}. 또 洪은 蟲垂炎의 要藥이라고 하였으며²²⁾, 白花蛇舌草가 配合된 白車湯(白花蛇舌草15g, 車前子15g, 山梔子9g, 茅根30g, 紫蘇葉6g)은 小兒의 腎炎에 특히 뛰어난 것으로 알려져 있다²⁴⁾.

이 약재의 성분으로는, 우르솔酸(ursolic acid), 올레아놀酸(oleanolic acid), P-쿠마르酸(P-coumaric acid), 스틱마스테롤(stigmasterol), β -시토스테롤(β -sitosterol), 에리시모시드

(erysimoside), 헨트리라콘탄(hentriacontane) 등⁹⁾이 있는 것으로 알려졌으며, 이 약재에 대한 근래 研究動向을 보면, 白花蛇舌草 煎湯液의 藥理作用으로는 in vitro에서 黃色葡萄狀球菌과 赤痢菌에 대해 미약한 작용이 있으며, 細網內皮系와 白血球의 食食能을 促進하고, 急性淋巴球型, 顆粒球型, 單核球型 및 慢性顆粒球型 등의 細胞에 대해 강한 抑制作用이 있는 것이 알려져 있고²⁵⁾, in vitro에서 사람 白血病과 肝癌細胞에 대해, in vivo에서 Walker256, cervical carcinoma 14, sarcoma-180 및 肝癌株에 대해 抗腫瘍效果가 있다고 報告되었다¹³⁾. 白花蛇舌草가 配合된 三草湯(白花蛇舌草31.25g, 夏枯草31.25g, 甘草15.625g)을 이용하여 急性黃疸型肝炎 72例를 治療하여 100%의 有效率을 報告하였으며⁵⁾, 또 다른 白花蛇舌草가 配合된 七草湯(白花蛇舌草15~60g, 旱蓮草15~30g, 益母草10~30g, 穀精草10~15g, 豨薟草10~15g, 夏枯草6~15g, 紫草6~12g)을 黃褐斑 110例에 사용하여 97.27%의 總有效率을 보고하였다⁸⁾. 또 이 약재에는 精子生成抑制作用이 있다고 報告되었는데, 動物實驗으로는 雌性小鼠에게 3週間 白花蛇舌草를 經口投與하고, 얼마 후 辜丸을 摘出하여 檢査했던 바 精原細胞는 一次精母細胞로. 하지만 發育하여 停止해 있고 曲細精管은 空洞이 되어 있었음이 보고되었고²⁶⁾, 사람(성인)의 경우에는, 白花蛇舌草를 투여한 102例를 관찰한 결과, 服藥 3週後의 精液檢査에서 10%~33%의 精子數가 減少되었음이 報告되었다⁵⁾.

우리나라에서의 연구를 보면, 宋¹⁰⁾은 白花蛇舌草가 시험관내에서 大食細胞로 하여금 NO의 생성을 촉진하여, P815 murine masocytoma癌株의 成長을 抑制했다고 報告하였으며, 金¹¹⁾은 L1210, A549에 대해 가장 좋은 細胞毒性을 보였던 핵산층에서 ursolic acid를 分離하여, 이를 白花蛇舌草의 抗癌活性物質로 報告하였다. 또 金¹²⁾은 白花蛇舌草에서 分離한 ursolic acid, asperuloside를

SF295, SK-OV-3, HCT15, B16-BL/6, UN-2의 癌株에 單獨, 併用投與하여 抗癌 및 抗轉移效果를 研究하였다.

이와 같이 白花蛇舌草의 惡性腫瘍, 闌尾炎, 肺炎, 喉頭炎, 扁桃腺炎, 腎盂腎炎, 痢疾, 癰癤, 帶狀疱疹, 毒蟲咬傷⁶⁾, 赤痢, 腸炎^{22,23)}, 蟲垂炎²²⁾ 등의 主治症中 白血病, 肝癌細胞¹³⁾, 肝炎⁵⁾, 抗癌 및 抗轉移效果^{11,12)} 등 주로 腫瘍에 대한 研究는 활발하였으나, 감염성 염증질환 및 외과적 질환의 연구는 부족한 상태이다. 이러한 관계로 血痢를 일으키는 *E. coli* O157, 멜라닌(melanin) 생성을 촉진하는 tyrosinase 및 老化和 癌의 發生에 관련한다고 인식되고 있는¹⁴⁾ superoxide dismutase(SOD) 유사활성, DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl), 및 TBARS(2-thio barbituric reactive substance)에 대하여 白花蛇舌草의 효능을 관찰하였다.

1. 白花蛇舌草 抽出물의 抗菌實驗

E. coli O157(1982년 원인미생물발견)은 Ebola出血熱(1977), Hantavirus感染症(1977), Campylobacter感染症(1977), 成人T細胞白血病(1980), Lyme病(1982), AIDS(1983), *Helicobacter pylori*感染症(1983), C型肝炎(1989)과 함께 emerging infectious disease(新興傳染病)의 한 종류로서, 사회적 관심을 집중시키고 있다²⁷⁾. *E. coli*는 사람과 온혈동물 장관의 정상세균총이지만 병원성이 있는 균주가 있어 설사증상의 원인이 된다. *E. coli* O157:H7에 의해 생산된 독소를 verotoxin이라고 부르는데²⁸⁾, 이미 생성된 독소는 열에 안정하므로 인체의 피해를 줄이기 위해서는 오염예방이 중요하다²⁹⁾. Verocytotoxin-producing *E. coli*(VTEC)는 사람에서 출혈성 대장염과 출혈성 요독증후군의 원인체이다^{30,31)}. Verocytotoxin을 생성하는 *E. coli*는 43종 이상의 혈청형이 알려져 있으며, verocytotoxin으로 인한 환자로부터 분리되는 균의 절반 이상이 *E. coli* O157:H7인 것으로

알려져 있다^{29,32)}. *E. coli* O157:H7은 1982년 미국 Michigan과 Oregon주에서 최초로 사람에서의 병원체로 보고된 이후 발병조사의 초점이 되어왔다^{33,34)}. 이들 발생의 대부분이 덜 조리된 쇠고기와 멸균되지 않은 우유의 섭취와 관련이 있으며^{35,36)}, 염소소독을 하지 않은 지방 간이상수도, 사과주스, 채소, 샐러드 등의 섭취로도 발생하는 것으로 알려져 있다³⁷⁾. 이웃 일본에서 O157에 의한 식중독사건이 처음 보고된 것은 1990년이며, 그 후 거의 매년 집단 식중독 발생사례가 보고되고 있다. 1996년의 오카야마현에서 O157에 의한 집단식중독이 일어나 2명이 사망하고 사카시에서는 학교급식에 의한 것으로 생각되는 집단식중독이 일어나 다수의 유증환자가 발생했다. 이후는 거의 전국에 걸쳐 O157에 의한 식중독이 보고되었으며, 세계보건기구(WHO)에서는 주간역학보고서에서 이러한 감염사고는 어느 나라에서나 일어날 수 있다고 각국에 주의를 촉구했다³⁸⁾. 우리나라에서도 1994년에 식중독 환자로부터 *E. coli* O157을 분리하여 보고한 바 있다^{29,39)}.

VTEC는 여러동물 특히 소의 내장에 넓게 분포되어 있으며, 시판되는 돼지고기, 닭고기, 양고기 등에서도 *E. coli* O157:H7이 검출되어 *E. coli* O157:H7의 매개체 역할을 할 수 있는 것으로 보고되고 있다³²⁾. 따라서 육회나 생간 등을 날 것으로 먹는 식습관의 주요 소비층이 어린이들인 fast food와 냉동식품의 확대 보급으로, 우리나라에도 이 균으로 인한 발병 가능성이 충분히 잠재되어 있다²⁹⁾.

이에 대한 연구로는 Bifidobacteria, Lactobacillus⁴⁰⁾, Benzoate, Sorbate 및 pH의 병용처리 효과⁴¹⁾, Fermented Milk⁴²⁾, 유산발효유⁴³⁾가 *Escherichia coli* O157에 미치는 영향은 보고되었으나, 아직 한약재에 대한 O157의 연구는 미진한 상태이며, 黃⁴⁴⁾이 蒼朮, 厚朴, 理中湯, 四逆湯 등을 사용할 수 있는 가능성을 제시하였으나, 실험적 근거가 부족하다.

또 *E. coli* O157의 감염으로 발생하는 주 증은 Hemorrhagic colitis, hemolytic uremic syndrome, thrombotic purpura 등⁴⁵⁾으로, 이는 白花蛇舌草가 清熱解毒, 活血利尿, 消腫止痛하고^{6,7)} 腎盂腎炎, 痢疾, 帶狀疱疹등⁶⁾을 主治하고 赤痢, 腸炎 등을 治療하는^{22,23)} 것을 볼 때 충분히 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

본 실험에서 白花蛇舌草 抽出物이 *E. coli* O157에 미치는 영향은, 배양 3시간까지의 증식곡선에서, *E. coli* O157만 배양한 것에 비해, *E. coli* O157과 白花蛇舌草抽出物을 같이 배양한 그룹에게서 약간의 증식억제 효과가 나타났다. 배양시작후 처음 2시간까지는 증식 변화가 나타나지 않았으나 3시간 이후부터 *E. coli* O157에 대한 증식억제효과가 좀 더 현저히 나타났다. 이것은 미생물의 성장곡선 중 log phase에서 증식억제가 된다는 점에서 전체적인 균수의 증식억제가 가능하였던 것으로 생각된다.

2. 白花蛇舌草 抽出物의 Tyrosinase inhibitor 효과측정

皮膚의 색은 여러 因子에 의해 결정되나, 가장 중요한 因子는 멜라닌(melanin)과 카로틴(carotene)의 量 및 眞皮에 있는 혈관의 수와 이 곳을 흐르는 血液의 색깔 등이다. 특히 멜라닌은 表皮에서 특수하게 분화된 멜라닌 細胞에서 合成이 되는데, 멜라닌 細胞는 주로 基底層細胞 사이나 基底細胞의 아래 그리고 털주머니에서 관찰되는 細胞로 멜라닌을 生成하여 세포질돌기를 통하여 表皮의 기저층과 가시층의 세포로 운반된다. 멜라닌 細胞(melanocyte)에서 멜라닌 合成(melanogenesis)을 조절하는 것으로 알려진 물질들은 tyrosinase(타이로신가수분해효소), tyrosinase related protein 1(TRP-1)과 DOPA chrome tautomerase(TRP-2)등이 있으며, tyrosinase는 다음의 세가지 단계 즉, Tyrosine에서 3,4-dihydroxy phenyl alanine(DOPA)로

DOPA에서 dopaquinone으로의 산화 그리고 5,6-dihydroxyindole(DHI)로 indole quinone으로 산화를 각각 촉매하는 것으로 알려져 있다⁴⁶⁾.

이러한 멜라닌생성에 관한 한약재의 연구는 최근 朴⁴⁷⁾등이 백출抽出物을 이용하여, JNK(c-Jun N-terminal kinase) 및 전사활성인자(transcriptional activator)인 AP-1의 활성 억제를 측정하여 보고한 바가 있다.

본실험에서의 tyrosinase 저해효과는 10mM의 DOPA를 기질로 하고, 1700 unit의 tyrosinase를 반응시켜 대조구로 하였다. 白花蛇舌草 抽出物을 1%농도로 하여 기질인 DOPA와 반응시키고 다시 tyrosinase와 반응시켜 tyrosinase inhibitor를 측정하여 대조구와 비교하였다. 그 결과 白花蛇舌草 抽出物의 tyrosinase inhibition ratio는 $0.39 \pm 0.026\%$ 로 극히 미약한 수준으로 나타났다. 이것은 抽出物이 crude한 상태임을 고려하면 당연한 결과이며 보다 정제된 fraction으로 조제하여 관찰할 필요가 있을 것으로 생각된다.

3. 白花蛇舌草 抽出物의 항산화제 유사활성측정

세포의 노화현상을 설명하기 위해 많은 가설이 제안되고 있지만, 이들은 크게 'wear and tear theory'(소모설)와 'genome-based theory'(유전자설)의 개념으로 나누어 진다¹⁴⁾. Wear and tear theory은^{14,48)} 세포의 노화현상을 세포의 생존능을 점차 잠식해가는 외부의 영향에 지속적으로 노출된 결과 생체기능이 저하된 것으로 설명하는 견해이다. 이 견해에 해당되는 것으로 free radical theory^{14,48)}, post-transnational modifications(cross-linkage theory), accumulation of waste product theory, error-catastrophe theory가 있고, genome-based theory는 장수한 조상을 둔 경우, 그렇지 못한 경우보다 더 오래사는 경향이 있다는 것으로, 즉 수명이란 유전적인

조절하에 있다는 학설이다. 이 견해에 해당되는 것으로, finite doubling potential of cells, somatic mutation theory, programmed ageing theory 등이 있다¹⁴⁾.

이중 자유라디칼이론은, 나이가 들어감에 따라 free radical에 의한 손상이 증가한다는 것으로, 생체가 radiation에 노출되거나, 내부 효소반응에 의해서 생성되는 free radical은 단백질의 -SH기와 반응해서 효소의 활성을 잃게 하거나 가교결합(cross-linking bridge)의 촉진, DNA, RNA, 효소 및 membrane에 손상을 일으켜 세포사(cell death)를 유발한다는 것이다^{14,48)}.

즉, 자유라디칼은 결합조직의 교차결합을 증가시키고, 세포막을 손상시키며, DNA의 돌연변이를 유발하고, 체단백질의 기능을 감퇴시킨다. 이러한 자유라디칼에 의한 반응의 결과가 나이가 증가함에 따라 체내에 축적됨으로써 노화가 진행되는 것으로 본다. 자유라디칼에 의한 손상을 최소화하기 위해서는 O_2^- 와 H_2O_2 를 대사과정에서 형성되는대로 제거해야 한다. 세포는 이러한 자유라디칼로부터 세포를 보호하기 위하여 구획화된 항산화 방어체계를 갖추고 있다. 항산화작용을 하는 것으로는 글루타치온 과산화효소(glutathione peroxidase, GSH-px), 초과산화물 불균등화 효소(SOD), 카탈라아제(catalase)와 같이 세포내에서 생성되는 효소와, Vitamin A, C, E, 카로틴 등과 같이 외부에서 공급되는 영양소와 대사산물이 있다. 이들은 자유라디칼이 체내에 축적되는 것을 억제하는 중요한 작용을 하고 있으므로 세포내의 이들 항산화제의 농도를 일정한 수준으로 유지하는 것이 중요하다⁴⁸⁾.

이러한 항산화능의 측정지표로는 비효소적인 측면에서 α -tocopherol, β -carotene과 ascorbic acid 등과, 효소적인 측면에서 SOD, catalase, glutathione proxidase(GP)와 glutathione transferase(GST)를 비롯하여 기질인 glutathione(GSH) 등이 알려져 있으며

⁴⁹⁾, 이들의 활성 감소는 노화촉진의 한 요인으로 추측하고 있다⁵⁰⁾.

노화에 관한 연구로는, 李등⁵¹⁾이 人蓼을 투여하여 혈청의 항산화활성과 간의 이물질대사 효소들의 활성을 검사하였으며, 崔등⁵²⁾은 蘆根抽出物 투여군의 SOD활성효과를 보고하였으며, 백등⁵³⁾은 손바닥 선인장(*Opuntia ficus-indica* : 백년초)의 열매는 생체내 과산화지질 생성방지와 함께 GSH함량을 증가시키고(SAMP8), catalase활성의 증가를 야기하므로 (SAMR1) 항산화작용과 밀접한 관련이 있다고 보고하였다.

본 실험에서의 白花蛇舌草 抽出物の 항산화제 유사활성측정은, 白花蛇舌草 抽出物 자체의 색소영향을 배제하기 위하여 시료첨가구의 흡광도에서 抽出物の 흡광도를 제거하였다. 白花蛇舌草 抽出物の 항산화제 유사활성은 $21.33 \pm 4.264\%$ 로 나타났다. 이 결과는 chitosan의 SOD유사활성(51.3%)보다는 낮았으나 sesamol(19.9%)와 橘皮(8.4%)보다는⁵⁴⁾ 비교적 높은 수치를 보였다. 이것은 白花蛇舌草 抽出物の 항산화제 유사활성이 비교적 다른 식물체抽出物에 비해 우수하다는 것을 나타내고 있다.

4. 白花蛇舌草 抽出物の 전자공여능 측정(DPPH)

DPPH(전자공여능)는 자유라디칼(free radical)을 scavenge하는 작용으로 주로 phenolic acids와 flavonoids 및 기타 phenol 성 물질에 대한 항산화작용의 지표로 이용되고 있다. 이것은 환원력이 큰 것일수록 전자공여능이 높은 것이다⁵⁵⁻⁶²⁾.

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 tocopherol, polyhydroxy 방향족화합물과 방향족 아민류에 의해 환원되면서 짙은 자색이 탈색되므로 전자공여능측정이 가능하다.

白花蛇舌草 熱水抽出物 0.02g을 methanol 2ml에 녹여 DPPH와 반응시켰을 때의 전자공여능은 $53.3 \pm 0.91\%$, 0.05g을 사용하였을

때의 전자공여능은 $83.5 \pm 1.82\%$ 로 나타났다. 이것은 白花蛇舌草 抽出物에 대한 농도의존적(dose dependence)인 반응이 인정된다. 이는 강등⁵⁵⁾의 솔잎 熱水抽出物(80.9%)결과보다 더 우수하였다. 또 白花蛇舌草 熱水抽出物 0.05g은 0.02g을 사용하였을 경우에 비하여 유의성있는 결과를 보였다($P < 0.001$). 일반적으로, 熱水抽出物보다 ethanol 抽出物의 경우가 보다 뛰어난 전자공여능을 나타내므로 앞으로 白花蛇舌草 ethanol 抽出物에 대한 전자공여능을 측정하여 비교할 만한 것으로 생각된다.

5. 白花蛇舌草 抽出物の TBARS 측정

Thiobarbituric acid(TBA)의 반응물질인 세포질액내의 thio barbituric reacting substance(TBARS)량을 통하여 정량분석하면 과산화지질의 양을 판단할 수 있다⁵³⁾. 과산화지질은 생체막의 불포화 지방산과 활성산소가 반응하여 발생하는 물질로 생체막과 조직의 손상을 유도하는 것으로 알려져 있다⁵³⁾. 자유라디칼이 불포화지방산과 작용하여 지질과산화물(lipid peroxide)을 만들고 이것이 단백질, 핵산 등의 아미노기와 반응하면 그 반응 산물로 형광물질인 리포푸신이 형성된다. 또한 불포화지방산과의 반응은 연쇄적으로 일어나 계속적으로 많은 자유라디칼 형성을 유도하므로, 불포화지방산의 산화는 세포내에서 일어나는 자유라디칼 형성 반응으로는 가장 중요하게 생각되고 있다⁴⁸⁾.

본 실험에서의 白花蛇舌草 외에 瓦松, 魚腥草, 榆白皮등도 같이 실험하여 비교하여 보았다. 白花蛇舌草 抽出物の 항산화효과를 비교하기 위하여 실험대조구로는 oil emulsion을 이용하였다. 결과는 대조구에서 1.147 ± 0.006 MDAppm이었으며, 이에 비해 瓦松구는 0.572 ± 0.136 , 魚腥草구는 0.303 ± 0.137 , 榆白皮구는 0.469 ± 0.111 , 白花蛇舌草구는 0.724 ± 0.044 를 각각 나타내었다. 이 결과에서 瓦

松, 魚腥草, 榆白皮, 白花蛇舌草모두 유의한 감소효과가 있었으며($P < 0.01$), 특히 白花蛇舌草 抽出物の 지방산화억제 작용은 다른 약재들에 비해 더욱 유의성이 큰 것으로 나타났다($P < 0.001$).

V. 結 論

白花蛇舌草(*Hedyotis diffusa* Willd.)로 감염성 염증질환을 일으키는 *E. coli* O157, melanin생성을 촉진하는 tyrosinase 및 老化和 癌의 發生에 관여하는 SOD유사활성, DPPH, TBARS의 변화를 관찰하여 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 白花蛇舌草 抽出物の *E. coli* O157에 대한 항균실험에서는 배양시작후 처음 2시간까지는 증식변화가 나타나지 않았으나 3시간 이후부터 *E. coli* O157에 대한 증식억제효과가 나타났다.
2. Tyrosinase 저해효과는 대조구와 비교하여, $0.39 \pm 0.026\%$ 로 극히 미약한 수준으로 나타났다.
3. 白花蛇舌草 抽出物の 항산화제 유사활성은 $21.33 \pm 4.264\%$ 로 나타났다. 이는 다른 몇몇의 植物體抽出物에 비해 우수한 결과이다.
4. 白花蛇舌草의 DPPH는, 熱水抽出物 0.02g에서 $53.3 \pm 0.91\%$, 0.05g에서 $83.5 \pm 1.82\%$ 로 나타나, 熱水抽出物 0.05g은 0.02g을 사용하였을 경우에 비하여 유의성있는 결과를 보였다.
5. 白花蛇舌草가 지방산화방지에 미치는 영향은, TBARS치가 0.724 ± 0.044 MDAppm로 나타나, 다른 몇몇의 약재들에 비해 유의성있는 결과를 보였다.

위의 결과로 보아 白花蛇舌草는 *E. coli* O157 感染時 熱을 同伴한 血痢에 사용될

수 있음을 알 수 있고, 또 老化防止나 發癌抑制에도 적절히 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

<參考文獻>

1. 安德均 : 原色 韓國本草圖鑑. 서울 : 敎學社. 1988 ; 83
2. 康秉秀, 高雲彩, 金先熙, 盧昇鉉, 宋昊竣, 辛民敎, 安德均, 李尙仁, 李映鍾, 李棣熙, 朱榮丞 : 本草學. 서울 : 永林社. 1991 ; 223~224
3. 張貴君 : 常用中藥鑑定大全. 하얼빈 : 黑龍江科學技術出版社. 1993 ; 278~279
4. 馮耀南, 劉明, 劉儉, 陳昌亮, 周路山, 龐耀鏡 등 : 中藥材商品規格質量鑑別. 廣州 : 暨南大學出版社. 1995 ; 198~199
5. 顏正華 : 中藥學. 北京 : 人民衛生出版社. 1991 ; 200~201
6. 王文安 : 中國中草藥配伍大全. 呼和浩特 : 內蒙古人民出版社. 1993 ; 779
7. <中國本草圖錄>編寫委員會 : 中國本草圖錄·卷二. 香港 : 商務印書館. 1989 ; 184
8. 越純修 : 中醫皮膚科學. 北京 : 科學出版社. 1994 ; 207
9. 常毅敏 : 抗癌本草. 서울 : 바람과 물결. 1992 ; 195
10. 宋昊竣, 金台現. 白花蛇舌草 煎湯液 投與가 마우스의 抗腫瘍 免疫反應에 미치는 影響. 本草分科學會誌 1994 ; 9(1) : 83~97
11. 金聖勳. 白花蛇舌草로부터 分離된 抗癌活性物質에 關한 研究. 大田大學校 韓醫學研究所論文集 1996 ; 4(2) : 1~25
12. 金聖勳, 宋圭鏞, 柳時容. 白花蛇舌草 핵산 分割과 多糖體과 糖體가 抗癌 및 抗轉移 活性에 미치는 영향(Ursolic acid와 Asperuloside 병용투여시 항암 및 항전이 효과에 관한 연구). 大韓東醫病理學誌 1999 ; 13(1) : 65~75.
13. 구명, 서홍화, 이연문, 낙화생 : 항종류분 초도보. 香港 : 상무인서관. 1990 ; 20
14. 정해영. Free Radical에 의한 노화 및 발암 기전. 한국노화학회지. 1992 ; 2(1) : 1~11
15. Yagi, A., Kanbara, T. and Morinobu, N.. *Planta Medica* 1986 ; 3981 : 517
16. Marklund, S. and Marklund, G.. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 1974 ; 47 : 468
17. Blois, M. S.. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958 ; 26 : 1198
18. Gutteridge, J. M. C.. Reactivity of hydroxyl and hydroxyl-like radicals discriminated by release of thiobarbituric acid-reactive material from deoxy sugars, nucleosides and benzoate. *Biochem. J.* 1984 ; 224 : 761
19. 中藥藥物大全編委會 : 中國藥物大全(中藥卷). 北京 : 人民衛生出版社. 1993 ; 70
20. 蘇敬 : 新修本草. 上海 : 上海古籍出版社. 1985.
21. 陶弘景 : 名醫別錄. 北京 : 人民衛生出版社. 1986 ; 273
22. 洪元植 : 現代中共의 癌治療. 서울 : 英文社. 1980 ; 301
23. 葉銘洪 : 治癌中藥及處方. 台北 : 華聯出版社. 1987 ; 197
24. 李尙仁, 安德均, 辛民敎 : 漢藥臨床應用. 서울 : 成輔社. 1982 ; 152~153
25. 강소신의학원 : 중약대사전 상책. 大邱 : 大城出版社. 1984 ; 754
26. 陳存仁 : 圖說 漢方醫療大事典·第4卷. 東京 : 講談社. 1982 ; 228
27. 鈴木 肇 : 醫學大辭典. 東京 : 南山堂.

- 1999 ; 1031~1032
28. Konowalchuk, J., Speirs, J. I., Stavric, s.. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 1977; 18 : 775~779
 29. 고주언, 홍종해. 도체표면의 분변오염과 Vertoxin 생성 *Escherichia coli* O157:H7 분리에 관한 연구, *한국식품위생안전성학회지*. 1997 ; 12(2) : 153~159
 30. Pai, C. H.. Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxinproducing *Escherichia coli*; a two-year prospective study. *J. Infect. dis.*, 1988 ; 157 : 1054~1057
 31. Karmali, M. A.. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1989 ; 2 : 15~38
 32. Hardas, U. D., Jalgaonkar, S. V., Kulkarni, V. K.. Cytotoxin effect of culture filtrate of enteropathogenic *Escherichia coli* from diarrhea in children on Vero cell culture. *Indian J. Med. Res.*, 1982 ; 76 : 86~88
 33. Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Herbert, R. J. *et al.* Hemorrhagic colitis associated with rare *Escherichia coli* Serotype. *N. Engl. J. Med.*, 1983 ; 308 : 681~685
 34. Wells, J. G., Davis, B. R., Wachsmuth, K, Riley, L. W., Remis, R. S. Sokolow, R., Morris, G. K.. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J. Clin. Microbiol* 1983 ; 18 : 512~520
 35. Weeranta, R. D., Dolye, M. P.: Detection and production of verotoxin 1 of *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1983 ; 18 : 512~520
 36. Doyle, M. P., Schoeni, J. L.. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meat and poultry. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987 ; 53 : 2394~2396
 37. Bryant, H. E., Athar, M. A., Pai, C. H.. Risk factor for *Escherichia coli* O157:H7 infection in an urban community. *J. Infec. Dis.*, 1987 ; 160 : 858~864
 38. 박선희. 장관출혈성 대장균O157에 의한 식중독 발생시 일본의 대처 내용분석 및 우리의 대응방안 수립을 위한 제언, *한국식품위생안전성학회지* 1997 ; 12(2) : 153~159
 39. 국립보건원: 감염병발생정보, 5, 1994 ; 2~3
 40. 안영태, 신필기, 김현욱. 젓산균과 바피더스균에 의한 *Escherichia coli* O157:H7과 *Salmonella typhimurium*의 생장억제, *한국식품위생안전성학회지* 1997 ; 12(3) : 181~187
 41. 김덕진, 권오진, 변명우. *Escherichia coli* O157의 제어를 위한 Benzoate, Sorbate 및 pH의 병용처리 효과, *한국식품위생안전성학회지* 1997 ; 12(3) : 200~204
 42. 안영태, 임정현, 강호진, 장영호, 김현욱. 발효유제품내에서 *Escherichia coli* O157:H7과 *Samolella ser. typhimurium*의 생존, *한국식품위생안전성학회지* 1997 ; 12(3) : 175~180
 43. 신광순, 김용환, 손원근, 석주명, 김상현. 토끼에서 유산 발효유제품 급여에 의한 *Escherichia coli* O157:H7 및 *Salmonella typhimurium*의 증균억제효과, *한국식품위생안전성학회지* 1997 ; 12(3) : 188~194
 44. 黃煌 저, 남경중의학원청량회 역 : 中醫十

- administration of the Kampo medicine Sho-saiko-to in rats. *Jpn J Pharmacol*, 1999 ; 80(4) : 379~382
62. Jung HA, Park JC, Chung HY, Kim J, Choi JS. Antioxidant flavonoids and chlorogenic acid from the leaves of *Eriobotrya japonica*, *Arch Pharm Res.*, 1999 ; 22(2) : 213~218