

단삼 추출물의 세포독성과 항균효과

곽정숙 · 백승화¹

목포과학대학 치위생과, ¹원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, 기초자연과학연구소

Cytotoxicity and Antimicrobial Effects of Extracts from *Salvia miltiorrhiza*

Jung Sook Kwag and Seung Hwa Baek¹

Department of Dental Hygiene, Mokpo Science College, Mokpo 530-730, Korea

¹Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine and Institute of Basic Natural Sciences, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Abstract – This study was carried out to evaluate cytotoxic effects of *Salvia miltiorrhiza* extracts on NIH 3T3 fibroblasts and KB cell lines. Disruptions in cell organelles were determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The comparison of IC₅₀ of values of *Salvia miltiorrhiza* extracts in KB cell lines showed that their susceptibility to these extracts decreased in the following order: hexane extract > chloroform extract > methanol extract > dichloromethane extract > ethyl acetate extract > ethanol extract by the MTT method. The dried roots of *Salvia miltiorrhiza* was extracted several solvents, and then antimicrobial activity was investigated. The minimal inhibitory concentrations (MIC's) of the extract against microorganisms were also examined. Antimicrobial activity of ketoconazole as reference was compared to those of extracts of hexane, chloroform, dichloromethane, ethyl acetate, ethanol and methanol. The antimicrobial activity of all extracts from the sample had growth inhibition activity against gram-negative bacteria, gram-positive bacteria and fungi. These results suggest that the hexane and chloroform soluble extracts of *Salvia miltiorrhiza* may be a valuable choice for the studies on the tumor cell lines and growth inhibition activity.

Key words – Cytotoxicity, antimicrobial effect, minimal inhibitory concentration, growth inhibition activity, NIH 3T3 fibroblasts, KB cell lines, *Salvia miltiorrhiza*

현대에 이르러 천연물에 대한 소비자들의 요구가 높아져 각 분야에 걸쳐 부작용이 적은 천연물의 이용이 증가하고 있으며, 특히 천연물을 이용한 항균성 및 항암성 물질의 개발 연구가 활성화되고 있다. 단삼은 꿀풀과의 다년생 약용 식물로 적삼, 자단삼, 대홍포, 활혈근이라고도 불리며, 뿌리가 붉기 때문에 단삼이라고 한다.¹⁻³⁾ 한방에서 자주 이용되고 있는 단삼은 중국 및 동남아 지역에서도 항암치료를 위한 생약처방에 널리 사용하고 있으며, tanshinone, miltinone, tansinol, 비타민 E 등의 성분을 함유하고 있으며, 그 성분 중 przewaquinone C가 항암활성이 있다고 발표된 바 있고, tanshinone 및 그 유도체가 *in vitro* 실험에서 KB cell, Hela cell, Colo-205 cell 등에 효과가 있다고 보고되어 있다.⁴⁾ 또한 목 등⁵⁾의 연구에 따르면 단삼추출물은 균종에 따라 차이는 있지만 그람 양성균에 대하여 우수한 항균효과를 나

타내어, 단삼추출물의 최소억제 농도 (MIC)가 spore를 형성하는 그람 양성 간균인 *B. cereus*에 대하여 3.13 µg/ml, 그람 양성 구균인 *S. aureus*에 대하여는 6.25 µg/ml, 우식증의 원인균인 *S. mutans*에 대해서는 12.5 µg/ml를 나타내었다.

본 연구는 단삼의 뿌리를 유기용매로 추출하여 얻은 추출물의 암세포에 대한 세포독성효과와 항균효과를 측정하여 본 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료 – 단삼은 중국산 수입품을 시중의 한약건재상에서 구입하여, 원광대학교 한의과대학 본초학교실 신민교 교수로부터 외부형태를 비교 조사하여 확인 후 사용하였다. 실험에 사용된 식물체(NP990910)는 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과에 보관되어 있다.

실험기기 – CO₂ incubator (NUAIRE), Deep freezer

*교신저자(E-mail) : shbaek@wonkwang.ac.kr
(FAX) : 063-850-6225

(Ilshin), Nitrogen freezer (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-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide, RPMI medium 1640, antibiotic-antimyzolic, herpes, L-glutamine, D-PBS (Dulgecos phosphate buffer solution), HBSS (Hanks' balanced salt solution) 등은 Gibco 제품을 사용하였으며, 0.4% Trypan blue solution, DMSO, SDS (sodium dodecyl sulfate) 등은 Sigma 제품을 사용하였고, 추출용매는 시약급을 재증류하여 사용하였다.

감액조제 - 본 연구에서는 분쇄된 단삼 20 g을 500 ml 둥근 플라스크에 1차 증류수 100 ml을 넣고, 75°C에서 3시간 동안 물 증탕하여 환류추출하였다. 이와같이 세 번 반복추출하여 얻은 추출물을 0.4 µm 필터로 여과한 후 여과액을 증류기로 55°C에서 감압농축시킨 후 냉동건조하여 물추출물 742.0 mg을 얻었다. 한편 hexane, chloroform, dichloromethane, ethyl acetate, ethanol, methanol은 상온에서 위의 방법에 따라 추출하였으며, 용매를 감압농축하여 hexan 추출물 5.9 mg, 크로르포름 추출물 11.9 mg, 디크로르메탄 추출물 170 mg, 에틸 아세테이트 추출물 183.6 mg, 에탄올 추출물 698 mg, 메탄올 추출물 722 mg을 각각 얻었다.

시료의 처리 - 조제한 시료는 즉시 4°C의 냉장고에 저장하였다가 사용직전에 10%의 DMSO (dimethylsulfoxide)에 희석하여 실험에 사용하였다. 각각 1 : 1 (mg/ml)로 희석한 시료는 실험농도에 적합하도록 10배 serial dilution을 하여 실험에 사용하였다.

균주 - 항균 및 항진균 실험용으로 사용된 균주는 국립보건원으로부터 분양받아 사용하였으며, 그람 양성 세균으로는 *Streptococcus mutans* JC-2, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, 그람 음성균으로는 *Pseudomonas putida* KCTC 8729, *Salmonella typhimurium* KCTC 1925, 항진균 효과를 측정하기 위하여 효모형 균주는 *Candida albicans* KCTC 1940를 사용하였다.

항균 및 항진균력 측정 - 각 균주에 대한 단삼 추출물의 항균 및 항진균 효과를 파악하기 위하여 최소억제농도 (Minimal inhibitory concentration, MIC)를 측정하였다. 액체배지 희석법을 이용하여, 96-micro well plate (Numclon, Denmark)에 단삼 추출물의 농도를 최고농도 200 µg/ml에서 최저농도 3.125 µg/ml까지 2배씩 연속적으로 희석하였다. *S. mutans*는 37°C 배양기에서 24시간 배양한 후 ELISA reader (Molecular Devices Spectra MAX 340)에 의한 흡수파장 630 nm에서 흡광도를 측정하여, 배지의 탁도를 확인하였으

며, 순수배양액의 흡광도 (Optical density, OD)값과 같은 결과를 얻은 것을 MIC로 결정하였다.

세포주 - 암세포 성장억제능 측정을 위해 정상 치은섬유아세포 (NIH 3T3 fibroblast)와 암세포주로서 구강유상피암세포 (KB cells)를 사용하였다. 세포독성능을 측정하기 위한 세포주는 서울대학교 세포주은행에서 분양받아 실험실에서 계대배양하면서 실험하였다.

세포배양배지 - 세포배양에 사용된 배지는 L-glutamine이 포함된 RPMI-1640에 NaHCO₃ (2 g, 23.81 mmol)을 혼합한 후, 3차 증류수에 녹인 다음 membrane filter (0.2 µm)로 여과한 후, 여액에 56°C에서 30분간 inactivation시킨 우태아 혈청 FBS를 전체양의 1%가 되도록 혼합한 다음, 1 N NaOH와 1 N HCl을 사용하여 pH 7.2가 되도록 하였다.

세포배양 - 세포독성능 측정에 사용된 NIH3T3, KB 세포는 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 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포침전물을 분리하였다. 분리된 세포침전물을 다시 D-PBS에 부유시켜 원심분리한 후, 상등액을 제거하여 세포만을 취하였다. 동일한 방법으로 반복 세척한 후, 일부를 취하여 0.4% trypan blue을 가하여 염색되지 않은 살아있는 세포를 haematocytometer로 세어 5×10⁵ cells/ml의 농도가 되도록 새로운 배지에 부유시켜 배양한 후, 실험에 사용하였다.

MTT assay - 암세포에 대한 세포독성능 측정은 MTT 검정법으로 실험하였다.⁶⁻⁸⁾ 암세포에 대한 세포독성능을 측정하기 위해 96 well flat bottom microtiter의 각 well에 logarithmic phase에 도달한 구강유상피암세포와 정상세포를 2×10⁵ cells/ml 농도로 100 µl/well 씩 접종하고, 각각의 검체를 단계 희석하여 10 µl/well 씩 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ incubator 조건하에서 4시간 동안 배양한 후, 형성된 불용성 formazan crystal products를 용해시키기 위하여, 10% SDS를 함유한 0.01 N HCl 용액을 각 well당 150 µl씩 가해 37°C, 5% CO₂ incubator 조건하에서 1일간 배양한 후, ELISA reader (Molecular Devices spectra MAX 340)로 흡광도 (540 nm)를 측정하여 IC₅₀ 값을 구하였으며, 미국 암 연구소 (NCI; National Cancer Institute, USA)의 manual 방법에 의해 결정하였다.⁹⁻¹⁰⁾

세포의 광학현미경적 관찰 - 광학현미경으로 세포를 관찰하기 위하여, NIH3T3, KB 세포는 MTT정량을 하기 전에 도립현미경으로 관찰하였다.

통계처리 - 실험결과의 통계처리는 Student's *t*-test에 준하였고, *P*-value가 0.05 이하일 경우 유의한 것으로 판명하였다.

Table I. The cytotoxic activities of *Salvia miltiorrhiza* extract with different solvents by the MTT method on NIH 3T3 fibroblasts and KB cells

Sample ^{a)}	IC ₅₀ ^{b)} (µg/ml)	
	NIH 3T3 fibroblasts	KB cells
HXSM	10.0	5.0
CHSM	13.0	7.0
DMSM	18.0	13.0
EASM	37.0	16.0
ETSM	13.0	25.0
MTSM	6.0	12.0

^{a)}Each extract was examined in triplicate experiments. Plant extracts: HXSM; Hexane soluble extract of *Salvia miltiorrhiza*, CHSM; Chloroform soluble extract of *Salvia miltiorrhiza*, DMSM; Dichloromethane soluble extract of *Salvia miltiorrhiza*, EASM; Ethyl acetate soluble extract of *Salvia miltiorrhiza*, ETSM; Ethanol soluble extract of *Salvia miltiorrhiza*, MTSM; Methanol soluble extract of *Salvia miltiorrhiza*. ^{b)}IC₅₀ represents the concentration of an extract required for 50% inhibition of cell growth.

결과 및 고찰

단삼추출물의 세포독성 측정 - 단삼을 물과 각종 유기용매를 사용하여 추출한 추출물을 검체로하여 MTT정량분석법에 따라 치은섬유아세포 (NIH 3T3 fibroblasts)와 구강유상피암세포 (KB cells)에 대한 세포독성을 측정한 실험결과는 Table I과 같다.

단삼 (*Salvia miltiorrhiza*)의 물과 몇가지 유기용매를 사용하여 추출된 추출물의 세포독성실험결과 (Table I)에 의하면, 에탄올 추출물의 경우 KB에 대한 IC₅₀ 값은 25.0 µg/ml 인 반면 헥산추출물의 경우에는 5.0 µg/ml로 가장 강한 세포독성을 보여주고 있다. 이들 추출물은 마이크로그램농도의 범위에서 투여량에 따라 세포독성을 보였다. KB 세포에 대한 단삼추출물의 세포독성은 헥산 추출물 > 클로로포름

추출물 > 메탄올 추출물 > 디클로르메탄 추출물 > 에틸 아세테이트 추출물 > 에탄올 추출물순으로 세포독성이 감소하였다. 단삼추출액을 MTT 정량분석법으로, NIH 3T3 세포에 대해서도 성장억제 효과를 평가하였다. NIH 3T3 세포에 대한 세포독성실험에 의하면, 추출물 중 메탄올 추출물이 가장 강한 세포독성 IC₅₀ 6.0 µg/ml을 보였다. 이러한 결과로 보아 메탄올추출물에 항암활성이 높은 화합물이 함유되어 있으리라 생각된다. NIH3T3 세포에 대한 단삼 추출물의 세포독성은 메탄올 추출물 > 헥산 추출물 > 클로로포름 추출물=에탄올 추출물 > 디클로르메탄 추출물 > 에틸 아세테이트 추출물순으로 감소하였다. 암세포인 KB는 헥산과 같은 비극성용매에 용해도가 높은 생리활성물질이 함유되어 있으리라 사료되며, NIH3T3 세포는 메탄올과 같은 극성용매에 용출되는 생리활성물질에 기인되는 것으로 사료된다.

단삼 추출물에 대한 항균활성 - 일반적으로 모든 추출물에 대한 최소억제농도는 그람양성균과 그람음성균, 진균에 대한 항균 및 항진균력은 높은 것으로 나타났으나, *S. typhimurium* KCTC 1925, 그람음성균은 모든 추출물에 대한 최소억제농도는 200 µg/ml 이상의 농도로 항균활성이 나타나지 않았다. 또한 메탄올 추출물의 *S. epidermidis* ATCC 12228와 *S. aureus* ATCC 29213, 그람양성균, *S. typhimurium* KCTC 1925, 그람음성균과 진균인 *C. albicans* KCTC 1940에 대하여서도 최소억제농도가 200 µg/ml 이상의 농도로 항균활성이 미미하였다. 헥산 추출물, 클로로포름 추출물, 디클로르메탄 추출물에 대한 최소억제농도는 *C. albicans* KCTC 1940에 대하여 100 µg/ml 농도로 나타났으며, 메탄올 추출물의 경우 *S. mutans* JC-2과 *P. putida* KCTC 8729에 대한 최소억제농도도 같은 항균활성이 나타났다. 메탄올 추출물에 대한 항균력을 제외한 모든 추출물에 대한 최소억제농도는 그람양성균인 *S. epidermidis* ATCC 12228에 대해서는 50 µg/ml 농도로 항균활성이 측정되었으며, *S. aureus* ATCC

Table II. Minimal inhibitory concentrations (MIC's) of *Salvia miltiorrhiza* extracted with different solvents against various microorganisms

Microorganism	MIC (µg/ml)						
	HXSM	CHSM	DMSM	EASM	ETSM	MTSM	KT
<i>S. mutans</i>	3.125	3.125	6.25	6.25	6.25	100	>200
<i>S. epidermidis</i>	50	50	50	50	50	>200	>200
<i>S. aureus</i>	50	50	50	100	50	>200	>200
<i>P. putida</i>	6.25	3.125	6.25	6.25	6.25	100	>200
<i>S. typhimurium</i>	>200	>200	>200	>200	>200	>200	<6.25
<i>C. albicans</i>	100	100	100	200	200	>200	<6.25

Each extract was examined in triplicate experiments. Plant extracts: HXSM; Hexane soluble extract of *Salvia miltiorrhiza*, CHSM; Chloroform soluble extract of *Salvia miltiorrhiza*, DMSM; Dichloromethane soluble extract of *Salvia miltiorrhiza*, EASM; Ethyl acetate soluble extract of *Salvia miltiorrhiza*, ETSM; Ethanol soluble extract of *Salvia miltiorrhiza*, MTSM; Methanol soluble extract of *Salvia miltiorrhiza*.

29213에 대해서는 에틸아세테이트 추출물의 최소억제농도 100 µg/ml 농도를 제외하고는 똑같은 항균력이 측정되었다. 그람양성균인 *S. mutans* JC-2에 대한 최소억제농도는 디클로르메탄 추출물, 에틸아세테이트 추출물과 에탄올 추출물에 대하여서는 6.25 µg/ml 농도로 측정되었으며, 그람음성균인 *P. putida* KCTC 8729에 대한 최소억제농도는 메탄올 추출물을 제외하고는 똑같은 최소억제농도로 나타났으나, 클로르포름 추출물의 최소억제농도 3.125 µg/ml 보다 낮은 항균효과가 측정되었다 (Table II).

단삼의 헥산과 메탄올 추출물에 항암활성이 높은 화합물이 함유되어 있을 것으로 판단되며, 헥산추출물과 클로르포름 추출물의 항균력이 *S. mutans* JC-2과 *P. putida* KCTC 8729에 대해 가장 높은 항균활성(MIC, 3.125 µg/ml)으로 보아, 이들 추출물에 대한 최적분리조건을 확립하여 순수한 화합물을 분리한 다음, 분자구조의 규명에 대한 추가 연구가 필요하다고 생각된다.

결 론

단삼추출물을 이용하여 구강암에 대한 항암활성 및 구강내 질환을 유발하는 세균에 대한 항균효과를 알아보기 위해 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 치은 섬유아세포 (NIH 3T3 fibroblasts)와 구강유상피암세포 (KB cells)에 대한 세포독성을 알기 위하여, MTT 정량분석법으로 단삼 추출물을 실험한 결과 섬유모세포에 대한 세포독성은 메탄올 추출물이 최소억제농도 (6.0 µg/ml)로 가장 높게 나타났으며, 인체구강 암세포에 대한 항암효과는 헥산 추출물의 최소억제농도 (5.0 µg/ml)가 가장 높게 나타났다.

2. 그람 양성균, 그람 음성균, 진균에 대한 항균 및 항진균활성에 대한 실험결과 그람 양성균에 대한 치아우식증의 원인균인 *S. mutans*에 대하여 헥산과 크로르포름 추출물이 가장 높은 항균력이 나타났으며, 그람 음성균에서는 *P. putida*에 대하여 크로르포름 추출물이 높은 항균력을 나타내었으며, 진균인 *C. albicans*에 대해서는 최소억제농도 (200 µg/ml)의 항진균효과가 관찰되었다.

감사의 말씀

본 연구는 원광대학교 교비연구비와 일부 두뇌한국 21사업의 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 은재순, 임종필, 박이규, 염정렬, 최동성, 안문생(1991) 단삼엑기스의 간보호 작용. *한국생약학회지*. **22**: 95-100.
2. Kim, O. H., Yang, J. S., and Jung, E. J. (1993) *In vitro* anticancer screening and evaluation of natural products in human tumor cell lines. Report; *National Institute Safety Research* **6**: 201-207.
3. Mok, J. S., Kim, Y. M., Kim, S. H., and Chang, D. S. (1995) Antimicrobial property of the ethanol extract from *Salvia miltiorrhiza*. *J. Fd. Hyg. Safety*. **10**: 23-28.
4. 김옥희, 장수연, 박만기, 류항목, 양지선(1997) 단삼등 천연물의 항암작용. *응용약물학회지*. **7**: 29-34.
5. 목중수, 박옥연, 김영목, 장동석(1994) 용매와 추출조건에 따른 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 추출물의 항균력. *한국영양식량학회지*. **23**: 1001-1007.
6. Mosmann, T. J. (1983) Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival; application of proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**: 55-63.
7. 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.
8. 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.
9. Goldin, A., Vendititi, J. M., Macdonald, J. S., Muggia, F. M., Henney, J. E., and Devita, B. T. (1981) Current results of the screening program at the division of cancer treatment, National Cancer Institute. *Europ. J. Cancer*. **17**: 129-142.
10. Kallmann, R. F. (1985) The use of rodent tumors in experimental cancer therapy. *Cancer Res.* **45**: 6541-6545.
11. 鄭宇烈, 田炳薰(1997) MMC등의 抗癌化學療法劑로 誘發된 細胞毒性에 미치는 丹蔘의 影響. *대한동의병리학회지*. **11**(2): 113-117.
12. 정국찬, 이지영, 김동청, 서성욱, 황우익(2000) 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 추출물의 암세포 증식억제 효과에 관한 연구. *한국식품영양과학회지*. **29**(4): 726-731.
13. 이현옥(2001) 약용식물로부터 추출한 천연물질의 항균효과와 항암활성. 원광대학교 박사학위논문. 원광대학교.

(2003년 8월 26일 접수)