

地榆 (*Sanguisorbae officinalis* L.)의 항암 및 항균효과

안봉진* · 이순애 · 손준호 · 곽재훈 · 박정미 · 이진영

대구한의대학교 화장품공학과

(2003년 12월 18일 접수, 2004년 2월 12일 수리)

본 연구에서는 탄닌성분을 다량 함유하고 있는 장미과 식물 지유의 생리활성기능을 살펴 식품 및 화장품산업의 천연소재로서의 활용가능성을 검토하였다. 각종 암세포에 대한 세포증식 억제율은 시료 농도가 증가함에 따라 유의적으로 증가하였고, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*와 같은 세균에 대한 clear zone 형성을 관찰한 결과 추출물 0.5 mg/disc, 1 mg/disc의 농도에서 모든균에서 clear zone 형성을 관찰할 수 있었으며, 생균수 측정의 결과 500 ppm 및 1,000 ppm에서 균수가 서서히 증가한 후 감소하였다.

Key words: 지유, 항암활성, MTT, 항균활성

서 론

地榆(*Sanguisorbae officinalis* Linne)는 장미과에 속하는 다년생 초본으로 중국 북부지역에 자생하며, 동속근연식물(同屬近緣植物)의 뿌리를 건조한 것으로 性은 微寒 無毒하고, 味는 苦酸 澀이라하며,¹⁾ 방중형으로 주근의 울곡이 불규칙하고, 다수의 분지가 있는데 길이가 10~20 cm, 직경이 0.5~1.5 cm에 이르며, 근두에는 대개 아경이 있고, 외면은 암갈색을 띠고 세로주름이 현저하다. 지유의 뿌리는 지혈제, 진통제, 수렴효과를 가지며, 화상, 내인성 뇌출혈 치료제로 전통 중국 약제로 이용되어져 왔다.²⁾ 위와 같은 민간 치료와는 달리 지유에서 분리된 dimeric ellagitanin의 sanguin H-6는 DNA topoisomerase 저해와 세포독성활성과 관련되어진 것으로 알려져 있으며,³⁾ sanguin H-6와 H-11은 질소 산화물을 억제하는 것으로 알려져 있다.⁴⁾ 또한 지유에는 사포닌배당체, pomolic acid, 비타민A, triterpenoides,⁵⁾ 탄닌과 관련 화합물⁶⁾인 phenolic acid, sanguisorbic acid dilactone 및 3가지 ellagitanins인 sanguin H-1, H-2, H-3⁷⁾ 등을 17% 정도 함유하며, 그 중 탄닌 성분은 생리활성 기능 중 고혈압 억제, 통풍예방, 항산화 효과, 항암 등 다양한 약리효과가 검증된 바 있으나, 지유에 관한 연구는 그 성분,^{8,9)} 항균,¹⁰⁾ 항암¹¹⁾에 관한 보고가 있으나 아직은 미미한 실정이다.

이에 본 연구에서는 한국산 지유를 이용하여 항암 및 항균 효과를 살펴본 식품 및 화장품의 소재로서 개발하기 위한 기초자료를 확립하고자 한다.

재료 및 방법

시료 조제 및 실험재료. 본 실험에 사용된 지유(*Sanguisorbae officinalis* L.)는 대구 약령시장에서 구입하여 물로 세척하여 음

건 후 사용하였고, 시료의 추출은 시료 100 g에 80% EtOH 10 배의 양을 가하여 실온에서 24시간 침지한 후, 상등액과 침전 물을 분리하여 상등액은 별도로 모아두고, 침전물을 위와 같은 방법으로 3회 반복 추출하여 분리된 상등액을 원심분리 및 여과, 농축하여 동결건조 후 냉동실에 보관하여 본 실험의 시료로 사용하였다. 세포주는 피부암세포인 SK-MEL-2, SK-MEL-31, G361와 유선암세포인 MDA-MB-231 및 폐암세포인 A549를 사용하였다. 세포 배양을 위한 배지는 RPMI 1640 medium(Gibco BRL Co., USA)과 fetal bovine serum(Gibco BRL Co., USA), penicillin/streptomycin(Gibco BRL Co., USA)을 사용하였으며, 암세포증식 억제 실험에서는 MTT(Sigma Chemical Co., Ltd. USA), Trypsin 250(Difco, USA), Trypan blue stain 0.4%(Gibco BRL Co., USA)와 Haemacytometer (Marienfeld, Germany)를 사용하였다. 항균력 검색실험에서 사용한 균주는 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus* ATCC 13565, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, 그람 음성균인 *Escherichia coli* ATCC 43895를 계대배양하여 사용하였다. 전배양 및 본 배양을 위한 액체 배지는 tryptic soy broth (Difco, USA)를 사용하였으며 생육 저해환 측정 및 생균수 측정을 위한 고체배지는 tryptic soy agar(Difco, USA)를 사용하였고, 균액의 희석액으로는 0.1% peptone수를 사용하였다.

세포배양. 본 실험에 이용한 세포 SK-MEL-2(malignant melanoma), SK-MEL-31(malignant melanoma), G361(melanoma), MDA-MB-231(breast cancer), A549(lung cancer)은 Korean Cell Line Bank(KCLB)로부터 구입하였다. 각 세포의 배양은 10% fetal bovine serum(FBS)과 100 unit/ml의 penicillin/streptomycin을 1%를 첨가한 RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

MTT assay에 의한 항암 효과 측정. 추출물의 암세포주에 대한 증식 억제효과는 Charnichael 등의 방법¹²⁾에 따라 MTT assay를 실시하였다. 즉, 암세포주를 96 well plate에 1×10⁴ cells/well이 되게 180 μl 분주하고 시료를 농도별로 조제하여 20 μl 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양하였고, 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건

*연락처

Phone: 82-53-819-1429; Fax: 82-53-819-1429

E-mail: anbj@dhu.ac.kr

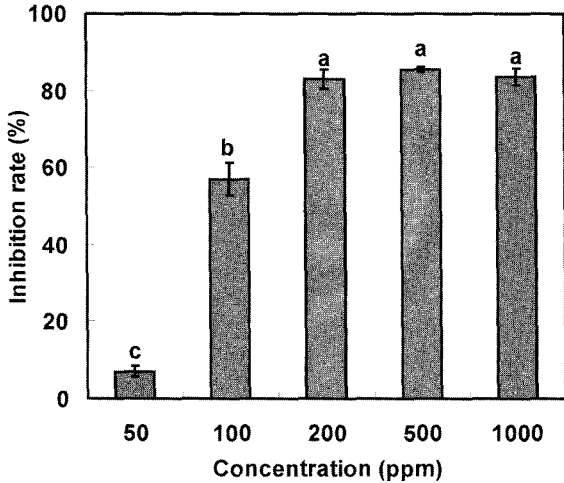


Fig. 1. Growth inhibition rate of *Sangisorbae officinalis* L. extract on malignant melanoma (SK-MEL-31). Values are means of 5 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

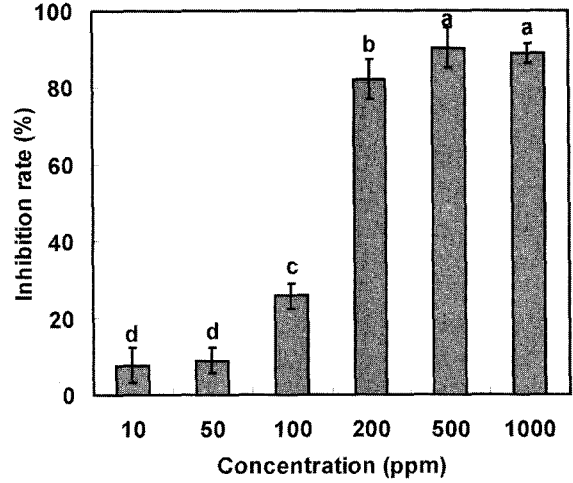


Fig. 3. Growth inhibition rate of *Sangisorbae officinalis* L. extract on melanoma (G361). Values are means of 5 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

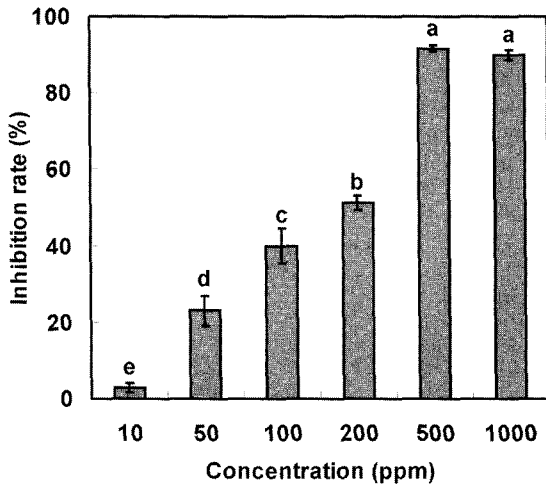


Fig. 2. Growth inhibition rate of *Sangisorbae officinalis* L. extract on malignant melanoma (SK-MEL-2). Values are means of 5 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

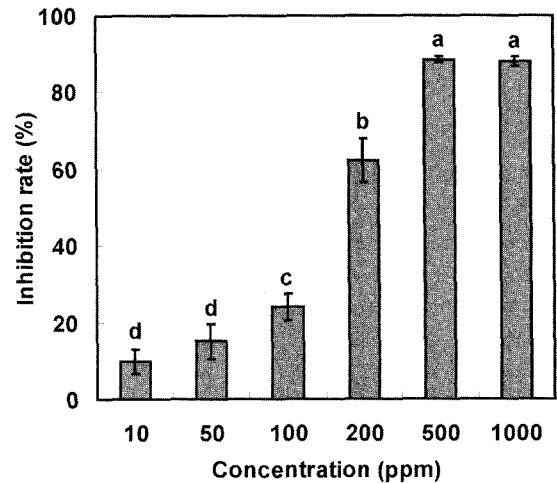


Fig. 4. Growth inhibition rate of *Sangisorbae officinalis* L. extract on breast cancer (MDA-MB-231). Values are means of 5 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

으로 배양하였다. 여기에 5 mg/ml 농도로 제조한 MTT 용액 20 μ l를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well 당 DMSO : EtOH(1 : 1) 150 μ l를 가하여 30분간 교반한 뒤 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하여 암세포주의 성장억제효과를 측정하였다.

세균배양 및 생육 저해환(clear zone) 측정. 항균력 검색실험에서 전 배양 및 본 배양을 위한 액체 배지는 tryptic soy broth(TSB)를 사용하였으며, 생육 저해환 및 생균수 측정을 위한 고체배지는 tryptic soy agar(TSA)를 사용하였다. 균액의 희석액으로는 0.1% peptone수를 사용하였다.

추출물의 항균력 측정은 paper disc법으로 측정하였다. 즉, 평판 배지에 배양된 각 균주를 1백금이 취해서 tryptic soy broth 10 ml에서 18~24시간 배양하여 활성화시킨 후 다시 TSB배지

10 ml에 균액을 0.1 ml 접종하여 3~6시간 본 배양한 후 TSA평판배지 1개당 균액을 약 10^7 cells되게 접종하여 멸균 먼봉으로 균일하게 도말하였다. 멸균된 8 mm filter paper disc (Whatman, Japan)를 평판배지에 올려놓은 다음 50 μ l/disc가 되도록 지유 추출물을 농도별로 흡수시켜 35°C에서 18~24시간 배양하여 disc주위의 clear zone(mm)의 직경을 측정하였다.

생균수 측정. 추출물의 항균력 검색은 생균수 측정으로 측정하였다. 즉, 평판 배지에 배양된 각 균주를 1백금이 취해서 TSB배지 10 ml에서 18~24시간 배양시켰다. 각 농도의 추출물이 첨가된 TSB 배지에 균액을 약 10^5 cells/ml가 되도록 접종하여 0~48시간 배양하면서 일정 시간 간격으로 TSA평판배지에 희석수로 적당히 희석한 후 균액을 0.1 ml 도말하여 35°C의 incubator에서 24시간 동안 배양한 후, 나타난 colony 수를 colony forming unit(Log CFU/ml)로 나타내었다.

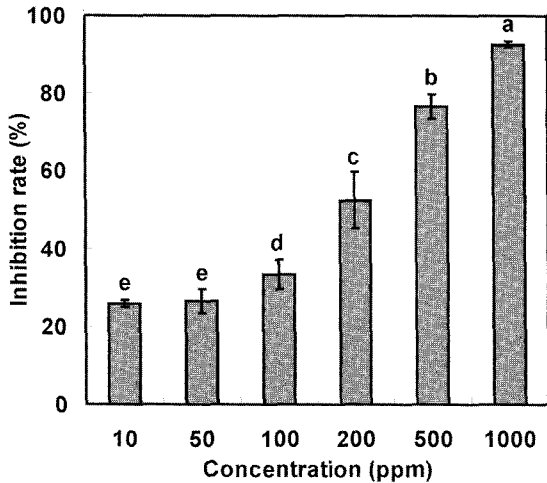


Fig. 5. Growth inhibition rate of *Sanguisorbae officinalis* L. extract on lung cancer(A549). Values are means of 5 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

결과 및 고찰

MTT assay에 의한 항암 효과. MTT 검색법은 96-well plate를 사용하며 검사결과를 ELISA reader(Multiwell microplate reader)를 이용하여 많은 시료를 간단하게 관독할 수 있어 세포독성 및 세포증식 검색법으로서 sulforhodamin B(SRB) 검색법과 더불어 널리 사용되고 있는 assay 중의 한 방법이다. 암세포의 경우 대사과정에서 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의해 노란색 수용성 MTT tetrazolium을 자주색을 띠

Table 1. Inhibition zone of *Sanguisorbae officinalis* L. extract on pathogenic bacteria

Strains	Concentration (mg/disc)		
	0.25	0.5	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	- ^b	9.4±0.77 ^a	11.4±0.94
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	9.3±0.50	10.4±0.75
<i>Escherichia coli</i>	-	8.2±0.15	8.9±0.41

*a: Inhibition zone in diameter(mm), b: No inhibition.

는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시킨다. MTT formazan의 흡광도는 550 nm 근처 파장에서 최대가 되며, 이는 대략적으로 왕성한 세포의 농도를 반영하는 것이다.¹³⁾

지유 추출물의 암세포에 대한 세포증식 억제율은 Fig. 1~5와 같이 나타났다. 암세포 모두 시료 농도가 증가함에 따라 세포증식 억제율이 유의적으로 증가하였으며, 200 ppm에서 모두 50% 이상의 성장 저해가 나타났다. Kim 등¹⁴⁾은 솔잎 추출물이 폐암 세포인 A549에 대하여 85.99%, 78.59%의 증식 억제 효과를 나타낸다고 하였으며, Chung 등¹⁵⁾은 된장과 청국장의 메탄올 추출물이 P388D1 세포에 대하여 500 µg/ml의 농도에서 각각 95.7%, 91.7%의 증식 억제 효과를 나타내어, 지유 추출물 500 ppm에서의 90%의 저해와 유사하게 나타났다.

생육 저해환(Clear zone). 지유의 항균 효과를 검토하기 위하여 포도상구균인 *Staphylococcus aureus*, 대장균인 *Escherichia coli* 및 피부 상재균인 *Staphylococcus epidermidis*에 대한 clear zone 형성을 관찰한 결과 Table 1과 같이 나타났다. 지유 추출물 0.5 mg/disc, 1 mg/disc의 농도에서 모든 균

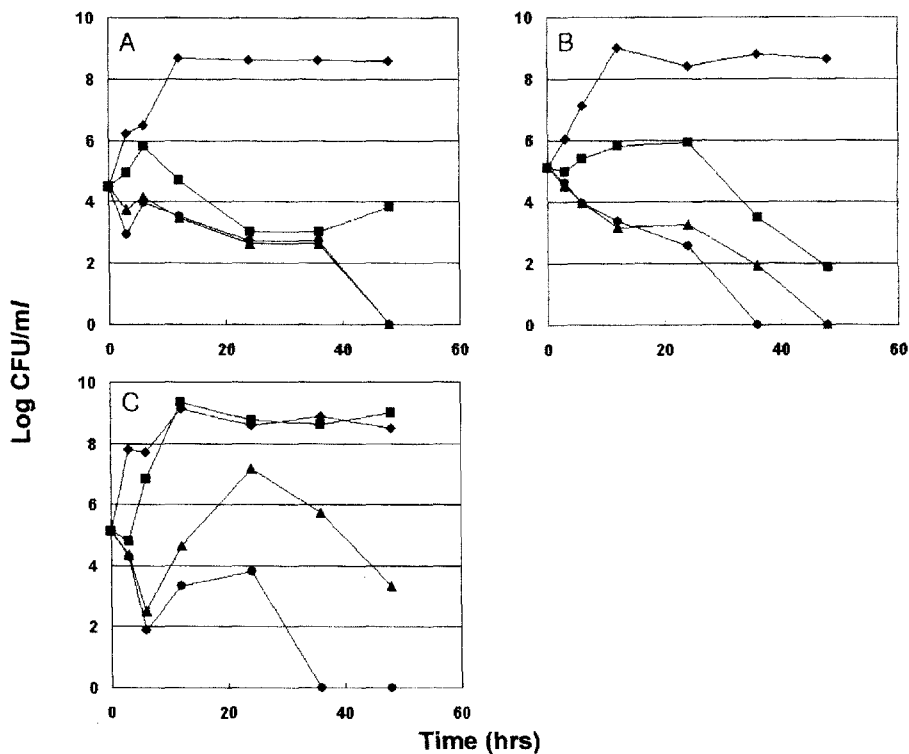


Fig. 6. Effect of *Sanguisorbae officinalis* L. extract on the survival of pathogenic bacteria in tryptic soy broth. A: *Staphylococcus epidermidis* B: *Staphylococcus aureus*, C: *Escherichia coli*. ◆-◆: control, ■-■: 100 ppm, ▲-▲: 500 ppm, ●-●: 1000 ppm.

에 대한 clear zone형성을 관찰할 수 있었으며, 시료농도 1 mg/disc에서 *Staphylococcus aureus*의 경우 11.4 ± 0.94 mm, *Staphylococcus epidermidis*의 경우 10.4 ± 0.75 mm, *Escherichia coli*의 경우 8.9 ± 0.41 mm의 clear zone을 관찰할 수 있었다. Kim 등¹⁶⁾은 민들레 chloroform 분획물이 1.5 mg/disc의 농도에서 *Staphylococcus aureus*의 경우 11 mm, *Escherichia coli*의 경우 9 mm의 저해환을 형성시켰다고 보고하였고, Kang 등¹⁷⁾은 갖의 에탄올 추출물이 시료농도 2 mg/disc에서 *Staphylococcus aureus*와 *Escherichia coli*를 저해한다고 보고한 바 있다. 이들에 비하여 본 연구에서 사용한 지유추출물이 더 낮은 농도에서 이들의 증식을 억제함을 알 수 있었다.

생균수 측정. 추출물의 항균력 검색은 생균수 측정으로 확인하였으며, 그 결과 Fig. 6과 같이 나타났다. *Staphylococcus epidermidis*의 경우 모든 시료농도에서 균의 증식이 억제되었으며, 12시간 배양한 경우 대조군과 시료농도 100 ppm에서는 4 log cycle의 차이를 나타내었고, 36시간의 경우 1,000 ppm에서는 균이 사멸하여 8.5 log cycle의 차이를 나타내었다. *Staphylococcus aureus*의 경우 사용한 시료농도 모두에서 생육이 저해되었으며, 100 ppm의 경우 24시간까지 서서히 증가한 후 감소하였으나, 500 ppm에서 48시간, 1,000 ppm에서 36시간 내에 균이 사멸되었다. *Escherichia coli*의 경우 시료농도 100 ppm에서는 균의 증식 억제가 나타나지 않았으나, 500 ppm 및 1,000 ppm에서는 균수가 서서히 증가한 후 감소하였다.

참고문헌

- National college of oriental medicine herbology professor association. (1994) Herbology, Yonglim Press, Seoul, pp. 392-393.
- Cheng, D.-L. and Cao, X.-P. (1992) Pomolic acid derivatives from the root of *Sanguisorba officinalis*. *Planta Med.* **59**, 240-245.
- Bastow, K. F., Bori, I. D., Fukushima, Y., Kashiwada, Y., Tanaka, T., Nonaka, G., Nishioka, I. and Lee, K.-H. (1993) Inhibition of DNA topoisomerases by sanguin H-6, a cytotoxic dimeric ellagitannin from *Sanguisorba officinalis*. *Planta Med.* **59**, 240-245.
- Yokozawa, T., Chen, C. P., Tanaka, T. and Kitani, K. (2000) A study on the nitric oxide production-suppressing activity of *Sanguisorbae Radix* components. *Biol. Pharm. Bull.* **23**, 717-722.
- Reher, G. and Budesinsky, M. (1992) Triterpenoids from plants of the *anguisorbeae*. *Phytochemistry* **31**, 3909-3914.
- Tanaka, T., Nonaka, G. and Nishioka, I. (1983) 7-O-Galloyl-(+)-catechin and 3-O-galloylprocyanidin B-3 from *Sanguisorba officinalis*. *Phytochemistry* **22**, 2575-2578.
- Nonaka, G., Tanaka, T. and Nishioka, I. (1982) Tannins and related compounds. Part 3. A new phenolic acid, sanguisorbic acid dilactone and three new ellagitannins, *sanguins* H-1, H-2, and H-3, from *Sanguisorba officinalis*. *J. Chem. Soc. Perkin Translation* **4**, 1067-1777.
- Biamond, P., Swaak, A. J., van Eijk, H. G. and Koster, J. F. (1988) Superoxide dependent iron release from ferritin in inflammatory diseases. *Free Radic. Biol. Med.* **4**, 185-198.
- Yoshihiro, M., Masato, F., Akihito, Y., Yutaka, S., Shigenori, F. and Hiroshi, S. (2001) Triterpene glycosides from the roots *Sanguisorba officinalis*. *Phytochemistry* **57**, 773-779.
- Kokoska, L., Polesny, Z., Raba, V., Nepovim, A. and Vanek, T. (2002) Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* **82**, 51-53.
- Elena, A. G., Petrichenko, V. M., Solodnikov, S. U., Suhinina, T. V., Kline, M. A., Glenn, C., Chi, N. and Howard, M. (2002) Anticancer and antithrombin activity of Russian plants. *J. Ethnopharmacol.* **81**, 337-342.
- Charmichael, J., Degraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Michell, J. B. (1987) Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay. assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936-942.
- Park, J. G., Kramer, B. S., Steinber, S. M., Carmichael, J., Collins, J. M., Minna, J. D. and Gazdar, A. F. (1987) Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Res.* **47**, 5875-5879.
- Kim, E. J., Jung, S. W., Choi, K. P. and Ham, S. S. (1998) Cytotoxic effect of the pine needle extracts. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **30**, 213-217.
- Chung, K. S., Yoon, K. D., Kwon, D. J., Hong, S. S. and Choi, S. Y. (1997) Cytotoxicity testing of fermented soybean products with various tumour cells using MTT assay. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 477-482.
- Kim, H. K., Chun, H. J. and Han, Y. S. (1998) Screening of antimicrobial activity of the dandelion extract. *Kor. J. Soc. Food Sci.* **14**, 144-147.
- Kang, S. K. (1995) Isolation and antimicrobial activity of antimicrobial substance obtained from leaf mustard. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **24**, 695-701.

Cytotoxic and Antibacterial Activities of *Sanguisorbae officinalis* L.

Bong-Jeun An*, Soon-Ae Lee, Jun-Ho Son, Jae-Hoon Kwak, Jung-Mi Park and Jin-Young Lee (*Department of Cosmetic Engineering, Daegu Haany University*)

Abstract: The cytotoxic and antibacterial activities of *Sanguisorbae officinalis* L., which is known as a major tannin source, were investigated to check the possible use of natural nutraceuticals or cosmetics. The *S. officinalis* inhibited cancer cell growth in a dose-dependant manner. Also, the clear zone against various bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* were evident at 0.5 and 1 mg/disc. When the concentrations were 500 and 1,000 ppm, growth of all aerobic bacteria increased at early stage but decrease afterward. The results indicated that *S. officinalis* had the anti-skin cancer activity as well as antibacterial activity against skin-related bacteria.

Key words: *Sanguisorbae officinalis*, cytotoxic activity, MTT, antibacterial activity

*Corresponding author