



## 참소리쟁이 뿌리 추출물 및 분획의 항균 활성과 항생제 증강 활성

양선아<sup>\*,\*\*†</sup> · 김아영<sup>\*\*</sup> · 표병식<sup>\*\*\*</sup> · 김선민<sup>\*\*\*</sup>

\*조선대학교 의과학과, \*\*동신대학교 BIO센터, \*\*\*동신대학교 한약재산업학과

### Antibacterial and Antibiotic Activity Enhancing Effect of Extract and Fractions from the Root of *Rumex japonicus* Houtt

Sun A Yang<sup>\*,\*\*†</sup>, A Young Kim<sup>\*\*</sup>, Byoung Sik Pyo<sup>\*\*\*</sup> and Sun Min Kim<sup>\*\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Department of Biomedical Sciences, Chosun University, Gwangju 61452, Korea.

<sup>\*\*</sup>Bio Center, Dongshin University, Naju 58245, Korea.

<sup>\*\*\*</sup>Department of Oriental Medicine Materials, Dongshin University, Naju 58245, Korea.

#### ABSTRACT

**Background:** The objective of this study were to determine the antibacterial activity and antibiotic activity-enhancing effect of 70% ethanol extract of the root of *Rumex japonicus* Houtt. and its fractions when used in combination with gentamicin against aerobic skin flora.

**Methods and Results:** The antibacterial activity and antibiotic (gentamicin) activity enhancing effect against aerobic skin flora were determined using the disc diffusion assay. Chloroform fraction (CF) and ethyl acetate fraction (EF) showed higher activities against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* than those shown by other fractions. Regarding the antibiotic (gentamicin) activity-enhancing effect against aerobic skin flora, the *n*-hexane fraction (HF) and CF showed strong activity. The combination of HF and CF with gentamicin was evaluated using the broth dilution assay to determine the inhibitory effect on the growth of aerobic skin flora. The combination of CF with gentamicin exhibited the highest inhibitory effect on the growth of *S. aureus* and *S. epidermidis*. MTT assay performed to determine the viability of L929 cells revealed that EF treatment resulted in viability of 33.96 - 116.76% at the tested concentration. The combination of 70% ethanol extract and its other fractions with gentamicin showed low cell toxicity.

**Conclusions:** Appropriate use of antimicrobial agents is important prior to the development of new antibiotics. The 70% ethanol extract of the root of *R. japonicus* Houtt. and its fractions showed significant synergism with gentamicin when used in combination against *S. aureus* and *S. epidermidis*. Thus, *R. japonicus* Houtt. could be used as a functional materials in antimicrobial-related fields.

**Key Words:** *Rumex japonicus* Houtt., Antibacterial Activity, Cytotoxicity, Antibiotic Activity Enhancing Effect

#### 서 언

포도상 구균 중 *Staphylococcus aureus*는 직경이 0.5 - 10 μm 정도의 황색 구균으로 불규칙적인 포도송이 형태를 이루며 겨드랑이, 피부, 비강, 회음부 등에서 존재하는 상재균이며, 상처 난 피부에 화농을 일으키며, 피부 표면의 종기, 부스럼, 여드름 및 아토피 등 여러 피부질환의 원인균이다 (Winston and

Shalita, 1991; Raimer, 2000). *Staphylococcus epidermidis*는 피부의 적당한 pH를 유지하여 밖으로부터 침투하는 세균을 방어하기도 하지만 원발성 피부질환 및 여드름 증상을 악화시키는 속발성 원인균으로 점액 (slime)을 생성하여 항생제로부터 균체를 보호하고, 혈구 응집 능력과 식균작용을 억제하며 숙주의 면역계를 손상시키기도 한다 (Peter and Smith, 1977; Feibleman and Tasmusaen, 1980; Sohn *et al.*, 2006).

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-61-336-3106 (E-mail) sa861126@gmail.com

Received 2017 October 12 / 1st Revised 2017 November 3 / 2nd Revised 2017 November 16 / 3rd Revised 2017 November 29 / Accepted 2017 November 29

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

항생제는 미생물에 의해 만들어진 항균효과를 가지는 물질로서, 세포벽 합성 저해, 단백질 합성저해, 핵산 합성저해, 대사경로 저해로 분류된다. 여러 항생제 중 gentamicin은 30S ribosomal RNA에 결합하여 단백질 합성을 방해하는 aminoglycosid계 항생제로 그람 음성균 감염 치료시 전 세계에서 널리 이용되는 항생제이다 (Yoshizawa *et al.*, 1998; Barton-Davis *et al.*, 1999). Gentamicin과 같은 aminoglycosid계 항생제는 항균작용에 있어서 매우 효과적이지만 이독성과 신장독성 등의 부작용을 유발하며, gentamicin에 의해 유도된 이독성은 약물 처리 시간 또는 용량에 비례하여 증가한다고 알려져 있다 (Tablan *et al.*, 1984; Forge and Schacht, 2000).

또한 항생제 사용의 증가는 다양한 다중약제내성의 발견으로 이어졌으며, 항생제 내성을 나타내는 유전자를 다른 균주에 전달하여 항생제에 대하여 빠른 저항성을 갖는 진화를 한다 (Neu, 1992; Goossens *et al.*, 2005). 따라서 항생제 내성 균주는 사람과 동물 등 다양한 곳에서 급증하였다. 내성 균주의 발현 빈도를 감소시킬 수 있으며, 독성 및 부작용이 있는 항생제의 독성을 약화시킬 수 있는 항생제 병용 투여는 세균의 복합 감염의 경우 보다 넓은 항균 범위를 갖는 등의 기대효과가 크기 때문에 항생제의 항균 효과를 증대시키면서 인체에 무해하며 부작용이 없는 천연물 유래의 항균물질에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다 (Cha *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010, 2014).

본 연구에서는 마디풀과 (Polygonaceae)에 속하는 다년초 식물인 참소리쟁이 (*Rumex japonicus* Houtt.) 뿌리의 추출물 및 분획과 gentamicin의 항생제 증감 효과를 그람 음성 세균인 *S. aureus*와 *S. epidermidis*에서 확인하여 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

본 연구에 이용한 참소리쟁이 (*Rumex japonicus* Houtt.)는 2016년 삼흥건재약업사에서 구입하여 냉장 보관 (4°C 이하)하며 실험에 사용하였으며, 약재 (DSUBIC-16-0002)는 동신대학교 BIO센터에 냉장 보관되어 있다.

### 2. 추출 및 분획

마쇄한 참소리쟁이 뿌리를 70% ethanol (EtOH)을 이용하여 2 시간씩 3 회에 걸쳐 80°C에서 환류냉각추출을 실시한 후 추출액은 여과 후 농축기 (BUCHI, Flawil, Switzerland) 및 동결건조기 (Sam Won Industry, Seoul, Korea)를 이용하여 추출물을 획득하였으며, 4°C 이하로 냉장보관하면서 실험에 사용하였다. 분말화된 추출물 중 일부를 증류수에 분산시킨 후 *n*-hexane, chloroform (CHCl<sub>3</sub>), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (BuOH)을 이용하여 순차적으로 용매분획을 수행하였다. 용매분

획으로 획득한 시료는 여과 후 농축 및 동결건조를 이용하여 분말화 하였으며 냉장보관 (4°C 이하)하면서 실험에 사용하였다.

### 3. 시용 균주와 세포주 및 시약

미생물 균주 *Staphylococcus epidermidis* (KCTC1917)와 *Staphylococcus aureus* (KCTC3881), 동물세포주 L929 cell은 한국생명공학연구원 생물자원센터 (BRC)에서 분양 받아 사용하였다. 미생물 균주 2 종은 nutrient agar (NA) 및 broth (NB) 배지를 사용하였으며, 세포주는 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)과 1% penicillin-streptomycin (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)을 혼합한 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, WelGENE Inc., Gyeongsan, Korea)을 이용하여 실험에 사용하였다. 그 외 실험에 사용된 시약들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다.

### 4. Disc diffusion assay에 의한 항균활성 측정

참소리쟁이 뿌리 추출물 및 분획과 gentamicin의 및 병용 효과를 확인하기 위하여 disc diffusion assay를 이용하여 각 균주를 대상으로 항균효과를 측정하였다. 각 균주를 계대 배양한 배양액 100  $\mu$ l 를 항균시험용 평판배지에 분주한 후 멸균 면봉을 이용하여 도말하여 준비하였고, 직경 6 mm의 paper disc에 여러 농도의 시료를 천천히 흡수시킨 뒤 용매를 휘발시키는 건조과정을 거쳐 평판배지 위에 밀착시킨 상태로 37°C에서 배양하였다. 24 시간 배양 후 disc 주면에 생성된 생육저해환 (clear zone, mm)의 지름을 측정하여 항균활성 및 병용 효과를 확인하였다.

### 5. Broth dilution assay에 의한 생육 저해 활성 측정

Disc diffusion assay를 통해 우수한 항생제 병용 효과를 나타낸 시료가 *S. epidermidis*와 *S. aureus*의 생장에 어떠한 영향을 미치는지 조사하기 위해 broth dilution assay를 이용하여 항균활성을 측정하였다 (Mulyaningsih *et al.*, 2010).

2 배 희석법을 이용하여 여러 농도로 제조한 gentamicin과 0.1 mg/ml의 농도가 되도록 *n*-hexane 분획 (HF)과 CHCl<sub>3</sub> 분획 (CF)을 각각 30  $\mu$ l씩 처리한 후 균액을 30  $\mu$ l씩 첨가하여 37°C에서 24 시간 배양하였다. 배양액을 200  $\mu$ l 를 취하여 96 well plate에 옮겨 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료액 대신 PBS를 사용한 음성 대조군의 흡광도를 기준으로 생육저해 활성을 산출하였다.

### 6. 세포 생존율 측정

참소리쟁이 뿌리 추출물 및 분획과 gentamicin의 세포 생존

율은 세포독성 실험에 많이 이용되는 생쥐의 섬유모세포의 일종인 L929 세포주를 이용하여 MTT assay로 확인하였다 (Shin *et al.*, 2003).

1 × 10<sup>4</sup> cells/well이 되도록 96 well plate에 L929 세포를 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 24 시간 동안 안정화 및 부착을 시킨 후, 농도별로 희석한 시료액을 처리하여 24 시간 동안 배양하였다. PBS에 5 mg/ml의 농도로 제조한 MTT 용액을 10 µl 씩 각 well에 첨가하고, MTT가 환원되도록 4 시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 반응시켰다. 배지를 제거한 후, 100 µl의 DMSO를 첨가하여 각 well에 생성된 formazan 결정을 용해시킨 후 흡광도를 540 nm에서 측정하였으며, 시료 대신 PBS를 첨가한 well의 평균 흡광도를 이용하여 세포 생존을 산출하였다.

7. 통계분석

모든 측정값은 3 회 이상 반복하여 실험한 결과의 평균값과 표준편차 (means ± SD)로 표기하였으며, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 windows용 SPSS (Statistical Package for Social Science, version 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 수행하였다. 각 군 간의 측정치 비교는 One-way analysis of variance (ANOVA)를 시행한 후 Duncan's Multiple Range Test (DMRT)로 유의성은 신뢰구간 p < 0.05에서 의미를 부여하였다.

결과 및 고찰

1. 추출 및 분획수율

참소리쟁이 (*Rumex japonicus* HOUTT) 뿌리 추출물과 용매분획의 수율은 Table 1과 같다. 참소리쟁이 뿌리를 70% EtOH로 80°C에서 환류추출을 이용하여 얻은 추출물의 수율은 34.64%이었다.

이러한 결과는 Rhim 등 (2012)의 소리쟁이의 95% EtOH 추출 수율 14.5%에 비해 높은 수율이었다. 또한 뿌리를 사용하는 약재인 적작약의 EtOH 추출 수율이 3.25%, 해당화 뿌리의 EtOH 추출 수율이 4.97%로 다른 식물의 뿌리 EtOH 추출물보다 높은 수율을 보여주었다 (Lee *et al.*, 2003; Bak *et al.*, 2011). 분획의 경우 58.13%로 aqueous 분획 (AF)이 가장 높은 분획수율을 나타내었으며, HF, CF, EtOAc 분획 (EF), BuOH 분획 (BF)은 각각 3.56%, 2.45%, 10.54%, 25.33%의 분획수율을 보여주었다.

2. 추출물 및 분획의 항균활성

Disc diffusion assay를 이용하여 참소리쟁이 뿌리 추출물과 분획의 항균활성을 Table 2에 나타내었다. *S. aureus*에 대한 항균활성 결과를 살펴보면, 3 mg/disc로 sample을 처리하였을

Table 1. Yields of 70% ethanol extract and its fractions from the root of *Rumex japonicus*.

Sample	Yield (%)
ER	34.64
HF	3.56
CF	2.45
EF	10.54
BF	25.33
AF	58.13

ER; 70% Ethanol extract of *Rumex japonicus*, HF; n-Hexane fraction, CF; Chloroform fraction, EF; Ethyl acetate fraction, BF; n-Butanol fraction, AF; Aqueous fraction.

Table 2. Antibacterial activities of 70% ethanol extract and its fractions from the root of *Rumex japonicus*.

Sample	Concentration (mg/disc)	Diameter of clear zone (mm)	
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
ER	3.0	8.83 ± 0.75 <sup>ed</sup>	8.43 ± 0.31 <sup>de*</sup>
	1.0	8.13 ± 0.31 <sup>e</sup>	7.40 ± 0.26 <sup>de</sup>
HF	3.0	9.33 ± 0.49 <sup>d</sup>	8.33 ± 0.06 <sup>de</sup>
	1.0	7.97 ± 0.81 <sup>e</sup>	7.57 ± 0.12 <sup>e</sup>
CF	3.0	11.20 ± 0.60 <sup>c</sup>	10.00 ± 0.44 <sup>c</sup>
	1.0	9.87 ± 0.35 <sup>d</sup>	8.73 ± 0.32 <sup>de</sup>
EF	3.0	11.40 ± 0.20 <sup>c</sup>	9.63 ± 0.93 <sup>c</sup>
	1.0	9.20 ± 0.46 <sup>d</sup>	9.07 ± 0.55 <sup>de</sup>
BF	3.0	7.83 ± 0.12 <sup>e</sup>	—
	1.0	— <sup>1)</sup>	—
AF	3.0	—	—
	1.0	—	—
GM	1 µg/disc	22.33 ± 1.19 <sup>b</sup>	16.43 ± 0.35 <sup>b</sup>
	0.5 µg/disc	19.13 ± 0.40 <sup>a</sup>	14.37 ± 0.45 <sup>a</sup>

ER; 70% Ethanol extract of *Rumex japonicus*, HF; n-Hexane fraction, CF; Chloroform fraction, EF; Ethyl acetate fraction, BF; n-Butanol fraction, AF; Aqueous fraction, GM; Gentamicin. <sup>1)</sup>no inhibition. Means values ± SD form triplicate separated experiments are shown. Means within a column followed by the same letter are not significant based on the DMRT (\*p < 0.05).

때 추출물은 8.83 mm의 생육저해환을 형성하였으며, CF와 EF이 각각 11.20 mm, 11.40 mm의 생육저해환을 형성함으로써 다른 분획보다 높은 활성을 보여주었다. *S. epidermidis*의 경우 *S. aureus*의 결과와 마찬가지로 CF와 EF을 3 mg/disc로 처리하였을 때 각각 10.00 mm, 9.63 mm의 생육저해환을 형성함으로써 추출물과 다른 분획보다 높은 활성을 나타내었다. *S. aureus*와 *S. epidermidis* 두 균주에서 실험을 실시한 모든 sample은 농도 의존적인 활성을 보여주었다.

소리쟁이 80% methanol (MeOH) 추출물 및 그 분획의 항균활성의 경우 BF와 EF에서 가장 높은 활성을 보여주었다 (Jeong *et al.*, 2006). 이러한 결과는 싸리나무 줄기 추출물의

추출 용매에 따른 활성 차이와 오직산의 추출 용매에 따른 항염증 활성 차이 등의 결과로 미루어보아 추출 용매의 차이에서 기인된 결과인 것으로 판단되어 진다 (Lee *et al.*, 2011; Yoo *et al.*, 2012). *S. aureus*에 대한 지유 추출물 및 분획의 항균활성의 경우 시료를 3 mg/disc로 처리하였을 때 8.85 - 13.67 mm의 생육저해환을 형성하였다는 보고 (Seo *et al.*, 2016)와 *S. aureus*와 *S. epidermidis*에 대한 산뱃나무 가지 추출물 및 분획의 항균활성을 측정된 결과 1 mg/disc로 처리하였을 때 *S. aureus*에서는 8.37 - 10.08 mm의 생육저해환을 *S. epidermidis*에서는 8.25 - 9.78 mm의 생육저해환을 보여주었다는 보고 (Yang *et al.*, 2016)와 비교하여 볼 때 항균물질로의 활용가능성이 충분하다고 판단되었다.

### 3. Disc diffusion assay에 의한 추출물 및 분획의 항생제 증강 효과

참소리쟁이 뿌리 추출물 및 분획과 상용 항생제중 하나인 gentamicin을 병행하여 처리하였을 때 항균효과의 변화를 비교한 결과, *S. aureus*의 경우 gentamicin을 0.5 µg/disc의 농도로 단독 처리하였을 때 19.13 mm의 생육저해환을 형성하였으나, gentamicin 0.5 µg/disc와 HF와 CF를 1 mg/disc의 농도로 병행 처리하였을 때 각각 30.37 mm, 35.70 mm의 생육저해환을 형성하여 gentamicin을 단독으로 처리하였을 때보다 약 1.5 - 2 배 정도 더 높은 항균활성을 나타내었다 (Table 3). 하지만

**Table 3.** Enhancing antibiotic effect of 70% ethanol extract and its fractions from the root of *Rumex japonicus*.

Sample	Concentration	Diameter of clear zone (mm)	
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
ER+GM	1.0 mg/disc+1.0 µg/disc	19.30±0.61 <sup>gh</sup>	15.00±0.53 <sup>e*</sup>
	1.0 mg/disc+0.5 µg/disc	16.83±0.67 <sup>i</sup>	11.83±0.65 <sup>g</sup>
HF+GM	1.0 mg/disc+1.0 µg/disc	32.03±0.76 <sup>c</sup>	25.00±0.26 <sup>b</sup>
	1.0 mg/disc+0.5 µg/disc	30.37±0.42 <sup>d</sup>	23.70±0.66 <sup>c</sup>
CF+GM	1.0 mg/disc+1.0 µg/disc	37.90±0.95 <sup>a</sup>	26.70±0.61 <sup>a</sup>
	1.0 mg/disc+0.5 µg/disc	35.70±0.30 <sup>b</sup>	24.93±0.15 <sup>b</sup>
EF+GM	1.0 mg/disc+1.0 µg/disc	19.93±0.74 <sup>h</sup>	14.07±0.60 <sup>f</sup>
	1.0 mg/disc+0.5 µg/disc	15.07±0.06 <sup>j</sup>	11.73±0.35 <sup>g</sup>
BF+GM	1.0 mg/disc+1.0 µg/disc	20.70±0.50 <sup>f</sup>	14.00±0.53 <sup>f</sup>
	1.0 mg/disc+0.5 µg/disc	16.60±0.46 <sup>i</sup>	12.03±0.21 <sup>g</sup>
AF+GM	1.0 mg/disc+1.0 µg/disc	19.57±0.55 <sup>gh</sup>	17.20±1.01 <sup>d</sup>
	1.0 mg/disc+0.5 µg/disc	18.70±0.36 <sup>h</sup>	13.73±0.25 <sup>f</sup>
GM	1.0 µg/disc	22.33±1.19 <sup>e</sup>	16.43±0.35 <sup>d</sup>
	0.5 µg/disc	19.13±0.40 <sup>gh</sup>	14.37±0.45 <sup>ef</sup>

ER; 70% Ethanol extract of *Rumex japonicus*, HF; *n*-Hexane fraction, CF; Chloroform fraction, EF; Ethyl acetate fraction, BF; *n*-Butanol fraction, AF; Aqueous fraction, GM; Gentamicin. Means values ± SD form triplicate separated experiments are shown. Means within a column followed by the same letter are not significant based on the DMRT (\**p* < 0.05).

*S. aureus*에 높은 항균활성을 보여주었던 EF의 경우 gentamicin과의 상승작용은 나타나지 않았다. *S. epidermidis*에 gentamicin을 1 µg/disc의 농도로 처리하였을 때 16.43 mm의 생육저해환을 형성하였으며, *S. aureus*의 결과와 마찬가지로 gentamicin 0.5 µg/disc와 HF와 CF를 1 mg/disc로 병행하였을 때 25.00 mm, 26.70 mm의 생육저해환을 형성하면서 상승작용을 보여주었다 (Table 3).

EF의 항균 효과를 나타내는 물질과 HF와 CF의 항생제 증강효과를 나타내는 물질이 다르다는 것을 확인 할 수 있었으며, 이러한 결과는 용매의 극성에 따른 분리로 인한 시료 간 활성 성분의 차이로 인해 나타나는 결과로 판단되었다. 추후 연구 진행 시 물질 분리 및 정제를 통해 항균 효과와 항생제 증강효과를 나타내는 물질을 규명한다면 새로운 항균 물질 개발이 가능할 것으로 생각되었다.

### 4. Broth dilution assay에 의한 분획의 항생제 증강 효과

Disc diffusion assay를 통해 우수한 항생제 병용 효과를 나타낸 시료가 *S. epidermidis*와 *S. aureus*의 생장에 어떠한 영향을 미치는지 조사하기 위해 broth dilution assay를 이용하여 항균활성을 측정된 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

*S. aureus*의 성장 저해 곡선을 살펴보면 고농도에서는 gentamicin을 단독으로 처리한 실험군이 높은 저해능을 보여주었지만 저농도에서는 급격히 활성이 낮아지는 것으로 확인되었으며 CF와 gentamicin을 병행하여 처리한 실험군에서는 저농도에서도 약 60%의 저해 활성을 나타내었다 (Fig. 1a). HF를 병행 처리한 경우 고농도에서는 CF 병행 처리군보다 높은 저해활성을 보였지만 저농도에서는 약 15%의 저해활성을 나타냄으로서 gentamicin을 단독으로 처리한 실험군보다는 높았지만 CF와 병행 처리한 실험군보다는 낮은 활성을 보여주었다. *S. epidermidis*의 성장 저해 곡선도 *S. aureus*의 결과와 마찬가지로 저농도의 CF와 gentamicin을 병행 처리하였을 때 약 70%의 저해활성을 보여줌으로써 1.19%의 저해활성을 나타낸 gentamicin 단독 처리군보다 높은 활성을 보여주었다 (Fig. 1b).

시료의 특성상 여러 활성 성분의 복합적인 작용으로 정확한 메커니즘을 확인하기에는 어려움이 있으므로 추가적으로 물질 분리 및 정제를 통해 활성 성분을 규명하고 활성 메커니즘을 연구함으로써 천연 항균 소재로 개발할 수 있을 것으로 생각되었다.

### 5. MTT assay에 의한 세포독성

상용 항생제 중 하나인 gentamicin을 참소리쟁이 뿌리 추출물 및 분획과 병행하여 처리하였을 때의 세포독성을 MTT assay를 이용하여 측정된 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

Gentamicin을 단독으로 처리하였을 때에는 실험이 실시된

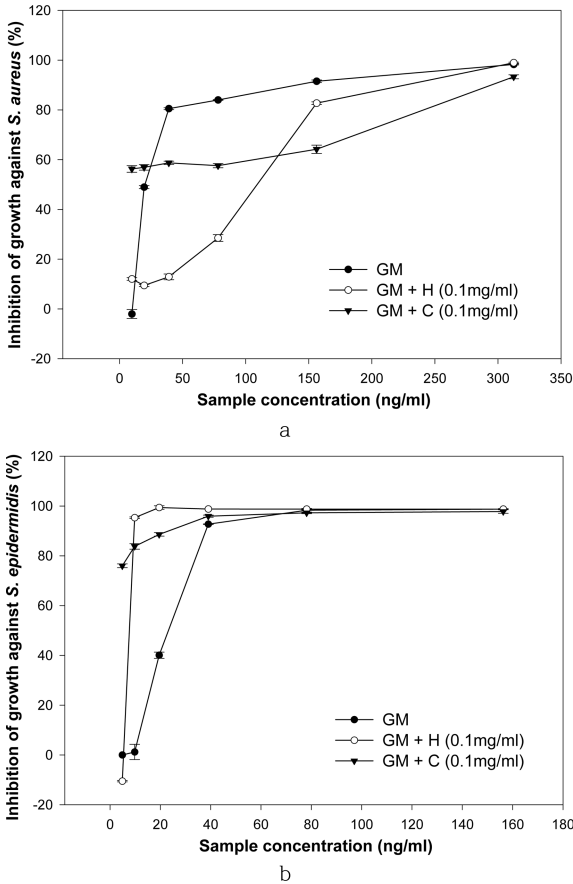


Fig. 1. Inhibitory effect of 70% ethanol extract and its fractions from the root of *Rumex japonicus* on growth of *S. aureus* and *S. epidermidis*. GM; Gentamicin, HF; *n*-Hexane fraction of *Rumex japonicus*, CF; Chloroform fraction. Values are means  $\pm$  SD (n = 3).

모든 농도에서 95.00% 이상의 세포 생존율을 보였으나, 10 mg/ml 농도의 EF를 gentamicin 1 mg/ml과 병행하여 처리한 실험군의 세포 생존율이 33.96%로 세포독성이 있음을 확인할 수 있었다. 항생제 증강 효과가 우수하였던 HF를 2 mg/ml 이하의 농도로 gentamicin 1 mg/ml과 병행하여 처리하였을 때, 100.84 - 112.89%의 세포 생존율을 나타냄으로써 gentamicin을 단독 처리한 실험군보다 높은 세포 생존율을 보여줌으로써 세포 성장을 촉진하는 결과를 확인할 수 있었다. 또한 CF를 2 mg/ml 이하의 농도로 gentamicin 1 mg/ml과 병행하여 처리하였을 때, 76.44 - 99.56%의 세포 생존율을 나타냄으로써 우려할 만한 독성을 나타내지는 않았다. 하지만 CF를 10 mg/ml의 농도로 gentamicin 1 mg/ml과 병행하여 처리하였을 때, 50.80%의 세포 생존율을 보여줌으로써 세포의 성장을 저해시키는 것으로 확인되었다.

참소리쟁이 뿌리 70% EtOH 추출물 및 분획과 상용 항생제인 gentamicin의 항생제 증강 효과를 그림 음성 세균인 *S.*

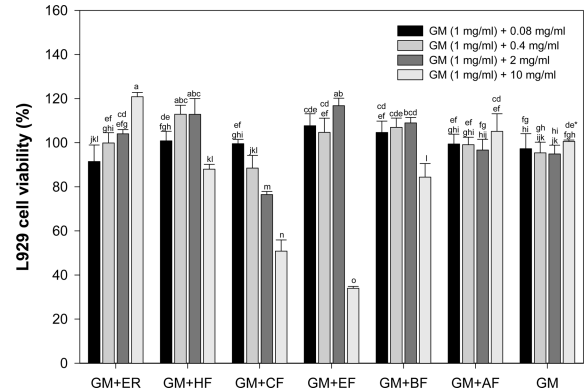


Fig. 2. L929 cell viabilities of the extract and fractions from the root of *Rumex japonicus* HOUTT and gentamicin by MTT assay. GM; Gentamicin, ER; 70% Ethanol extract of *Rumex japonicus* HOUTT, HF; *n*-Hexane fraction, CF; Chloroform fraction, EF; Ethyl acetate fraction, BF; *n*-Butanol fraction, AF; Aqueous fraction. Means values  $\pm$  SD from triplicate separated experiments are shown. Means within a column followed by the same letter are not significant based on the DMRT (\* $p$  < 0.05).

*aureus*와 *S. epidermidis*에서 disc diffusion assay를 이용하여 확인한 결과, 두 균 모두 추출물과 분획을 단독으로 처리하였을 때에는 CF와 EF이 높은 항균활성을 보여주었지만, gentamicin을 병행하여 처리하였을 때에는 HF와 CF에서 높은 항생제 증강 효과를 나타내었다.

우수한 항생제 증강 효과를 나타내었던 HF와 CF이 *S. epidermidis*와 *S. aureus*의 성장에 어떠한 영향을 미치는지 조사하기 위해 broth dilution assay를 이용하여 항균활성을 측정 한 결과 CF를 항생제와 병행하여 처리하였을 때 두 균 모두 낮은 농도에서도 균의 성장을 유의적으로 억제시키는 것을 확인할 수 있었다. 또한 MTT assay를 이용하여 참소리쟁이 뿌리 70% EtOH 추출물과 분획과 상용 항생제인 gentamicin (1 mg/ml)을 병행하여 처리하였을 때 세포독성을 확인한 결과, HF와 CF를 2 mg/ml 이하의 농도로 처리하였을 때에는 우려할 만한 독성은 없는 것으로 확인되었다. 하지만 CF를 10 mg/ml의 고농도로 처리하였을 때 50.80%의 세포 생존율을 나타냄으로써 세포의 성장을 저해하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 참소리쟁이 뿌리는 항생제 보조제로서의 활용 가치가 높은 것으로 생각되었다.

## REFERENCES

Bak JP, Son JH, Kim YM, Jung JH, Leem KH, Lee EY and Kim EH. (2011). Suppression effect of the inflammatory response in macrophages by paeoniae radix rubra extracts. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 19:373-379.

- Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma DI, Leland SE and Sweeney HL.** (1999). Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of *mdx* mice. The Journal of Clinical Investigation. 104:375-381.
- Cha JD, Jeong MR, Jeong SI and Lee KY.** (2007). Antibacterial activity of sophoraflavanone G isolated from the roots of *Sophora flavescens*. Journal of Microbiology and Biotechnology. 17:858-864.
- Feibleman CE and Tasmusaen JE.** (1980). Gram-negative acne. Cutis. 25:194-195.
- Forge A and Schacht J.** (2000). Aminoglycoside antibiotics. Audiology and Neurotology. 5:3-22.
- Goossens H, Ferech M, Stichele RV and Elseviers M.** (2005). Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: A cross-national database study. The Lancet. 365:579-587.
- Jeong GT, Lee KM and Park DH.** (2006). Study of antimicrobial and antioxidant activities of *Rumex crispus* extract. Korean Chemical Engineering Research. 44:81-86.
- Lee KI, Choi CH, Kim SM and Pyo BS.** (2010). Antibacterial activity and enhancing antibiotic effect of extract and fractions from *Curcuma longa* against MRSA strain. Korean Journal of Pharmacognosy. 41:38-42.
- Lee KI, Yang SA and Kim SM.** (2011). Antioxidative and nitric oxide production inhibitory activities of *Lespedeza bicolor* stem extracts depending on solvents. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 19:368-372.
- Lee MK, Lee SH, Choi GP, Yu CY, Lee JH and Lee HY.** (2003). Screening of immune enhancement activities of the extracts from *Rosa rugosae* radix. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 11:13-18.
- Lee YS, Lee DY, An TJ, Lee JH, Ahn YS, Cha SW, Mun SH, Kang OH, Kwon DY and Han SH.** (2014). Synergistic effect of brazilein in combination with hygromycin-b against *Staphylococcus aureus*. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 22:504-509.
- Mulyaningsih S, Sporer F, Zimmermann S, Reichling J and Wink M.** (2010). Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. Phytomedicine. 17:1061-1066.
- Neu HC.** (1992). The Crisis in antibiotic resistance. Science. 257:1064-1073.
- Peter G and Smith AL.** (1977). Group A streptococcal infections of the skin and pharynx. The New England Journal of Medicine. 297:311-317.
- Raimer SS.** (2000). Managing pediatric atopic dermatitis. Clinical Pediatrics. 39:1-14.
- Rhim TJ, Choi MY and Park HJ.** (2012). Antioxidative activity of *Rumex crispus* L. extract. Korean Journal of Plant Resources. 25:568-577.
- Seo GE, Kim SM, Pyo BS and Yang SA.** (2016). Antioxidant activity and antimicrobial effect for foodborne pathogens from extract and fractions of *Sanguisorba officinalis* L. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 24:303-308.
- Shin KM, Park YM, Kim IT, Hong SP, Hong JP and Lee KT.** (2003). *In vitro* antiinflammatory activity of amygdalin in murine macrophage RAW 264.7 cells. Korean Journal of Pharmacognosy. 34:223-227.
- Sohn HY, Kin YS, Kum EJ, Kwon YS and Son KH.** (2006). Screening of anti-acne activity of natural products against *Propionibacterium acnes*. Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology. 34:265-72.
- Tablan OC, Reyes MP, Rintelmann WF and Lerner AM.** (1984). Renal and auditory toxicity of high-dose, prolonged therapy with gentamicin and tobramycin in pseudomonas endocarditis. The Journal of Infectious Diseases. 149:257-263.
- Winston MH and Shalita AR.** (1991). Acne vulgaris: Pathogenesis and treatment. The Psychiatric Clinics of North America. 38:889-903.
- Yang SA, Pyo BS and Kim SM.** (2016). Antibacterial and nitric oxide production inhibitory activities of *Prunus sargentii* branches extract and its fractions against pathogens of acne. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 24:129-135.
- Yoo SR, Jeong SJ, Kim YJ, Lim HS, Jin SE, Jeon WY, Shin IS, Shin NR, Kim SS, Kim JH, Ha HK, Lee MY, Kim OS, Seo CS and Shin HK.** (2012). Effects of water and ethanol extracts from Ojeok-san on inflammation and its related diseases. Journal of Korean Oriental Internal Medicine. 33:418-428.
- Yoshizawa S, Fourmy D and Puglisi JD.** (1998). Structural origins of gentamicin antibiotic action. The EMBO Journal. 17:6437-6448.