

지실 추출물의 세포독성과 항균효과

양현옥, 오현주¹, 박남규,¹ 최은영,² 이현옥,³ 양은영,⁴ 천현자,⁵ 정순량,⁶ 이강민,⁷ 백승화^{1,*}
원광보건대학 미용피부관리과, ³치위생과, ¹원광대학교 한의학전문대학원 천연물학교실, ⁵해부학교실,
²김천과학대학 피부미용과, ⁴건일제약(주) 중앙연구소, ⁶우석대학교, 자연과학대학 화학과,
⁷전북대학교 자연과학대학 생명과학부

Cytotoxicity and Antimicrobial Effects of the Extract of *Poncirus trifoliata*

Hyun Ok Yang, Hyun Ju Oh¹, Nang Kyu Park¹, Eun Young Choi,² Hyun Ok Lee,³ Eun
Yeong Yang,⁴ Hyun Ja Chun,⁵ Soon Ryang Chung,⁶ Kang Min Lee,⁷ Seung Hwa Baek^{1,*}
*Department of Cosmetics and Department of Hygiene,³ Wonkwang Health Science
College, Iksan 570-750, Korea, Department of Natural Products^{1*} and Department of
Anatomy⁵, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University,
Iksan 570-749, Korea, Department of Beauty and skin care,² Kimcheon Science
College Kimcheon 740-200, Korea., Kunhil Pharmaceutical Co., Ltd.,⁴ Chunan,
Chungnam 330-810, Korea, Department of Chemistry, College of Natural Sciences,
Chonju Woosuk University,⁶ Chonju 565-800, Korea. Department of Molecular Biology,
Junbuk University,⁷ Junju 561-759, Korea.*

Abstract

This study was carried out to evaluate cytotoxic effects of *Poncirus trifoliata* Raf. extract on lymphocytic leukemia tumor (L1210) cell lines. Disruptions in cell organelles were determined by 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide (MTT) assay. The comparison of IC50 Values of *Poncirus trifoliata* Raf. extract in L1210 cell lines showed that their susceptibility to these fractons decreased in the following order: adriamycin > Fr. 4 > Fr. 6 > Fr. 5 > Fr. 3 > Fr. 1 > Fr. 2 by the MTT assay. In order to develop an antumicrobial agent, *Poncirus trifoliata* Raf. was extracted with ethanol, and then it was fractionated with several mobile phase. The antitumor activities of fractions of the ethanol soluble extract was investigated. The minimal inhibitory concentrations (MIC) of fractions of the ethanol soluble extract of *Poncirus trifoliata* Raf. against microorganisms were also examined. Antimicrobial activities of ampicillin and ketoconazole as references were compared to those of fractions of

the ethanol soluble extract of *Poncirus trifoliata* Raf. The antimicrobial activities of all fractions from the extract had growth inhibition activities against gram-positive bacteria, gram-negative bacteria and fungi (MIC > 200 µg/ml). These results suggest that fraction 4 of the ethanol soluble extract of *Poncirus trifoliata* Raf. possessed the most antitumorous agent..

Key words - *Poncirus trifoliata* Raf. L1210 cell lines, MTT assay, minimal inhibitory concentration, antitumor activity, antimicrobial activity, gram-positive bacteria, gram-negative bacteria, fungi.

I. 서 론

운향과인 탕자나무 (*Poncirus trifoliata* Rafinesque)는 「선만 식물지」에는 지굴, 지곡, 지실이라 한다. 만주와 중국이 원산지이며 여순에 이식한 것을 볼수 있다고 기록되어있다. 낙엽 활엽 소교목으로 높이 3 m에 달하며, 강한 가시가 있고, 잎은 어긋나며 3출엽이고, 작은 잎은 난형으로 혁질이며, 가장자리에 톱니가 있고, 엽병에 좁은 날개가 있다. 과실은漿果로서 구형이며, 가을에 황색으로 익는다. 익지 않은 열매를 枳實; *Poncirus fructus*라 한다. 분포는 수직적으로 標高 100 ~700 m, 수평적으로는 제주, 전남북, 경남, 충남북 그리고 경기도에서 자생하며, 주로 마을부근에서 植栽한다.¹⁾ 한방과 민간에서 방향성 고미건위 약으로 胃部脹滿, 알레르기성 체질, 위내가스제거, 과피는 자궁하수, 內臟無力症, 鎭痛, 해열, 건위, 각위, 上血, 해수등에 약재로 쓰인다.^{1,2)} 피부의 두드러기는 은진 이라고 한다. 보통 부패된 음식을 먹었을 때, 식중독으로 인해 생겨나는 것으로 胃, 肝, 腎 등 내장기에 장애가 생기기 때문에, 자가중독 증상의 하나로 탕자즙을 짜내서 이 즙을 환부에 바르면, 처음에는 약간 쓰라리지만 차츰 없어지며, 환부가 부드러워지면서 곧 깨끗하게 없어지며, 환부가 부드러워지면서 곧 깨끗하게 낫는다고 한다. 또 손발이

트고, 터졌을 때도 약효가 있다.³⁾ 지실은 이상에서와 같이 韓醫學 臨床에 응용되고 있다. 본 연구는 지실의 세포독성과 항균력을 규명하고자, 지실을 에탄올로 추출하여 추출물을 분획하여, gram 양성균, gram 음성균 및 진균에 대한 항균 및 항진균력을 측정하였으며, 암 연구에 검색방법으로 많이 이용되고 있는 MTT 정량분석법으로, 마우스의 백혈병 세포인 L1210세포에 대하여, 세포독성효과에 대한 결과를 보고하는 바이다

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에서 사용한 지실은 충남 논산시 광석면에서 채집하여, 외부형태를 비교 조사하여 확인 후 사용하였다. 실험에 사용된 식물체는 원광대학교 한의학전문대학원 천연물학교실에 보관되어 있다.

2. 실험기기

CO₂ incubator (NUAIRE), deep freezer (Ilshin), nitrogen tank (MVE, XC34/14), ELISA reader (Molecular Devices, spectra MAX 340), microscope (Olympus, CK2), micropipette (Gilson),

96well (Falcon), conical tube (Falcon), rotary evaporator, round flask, extractor.

3. 시약

FBS(fetal bovine serum), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-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, 매는 시약급을 재증류하여 사용하였다. 추출에 사용한 물 (H₂O), ethyl alcohol, chloroform, n-hexane, methyl alcohol은 증류 정제하여 사용하였으며, 기타 용매는 시약급을 재증류하여 사용하였다.

4. 추출 및 분획

지실 30 g을 5,000 ml 둥근 플라스크에 넣고, ethanol 300 ml를 넣고 상온에서 24시간 동안 교반후 추출하였다. 이와 같이 세 번 반복 추출하여 얻은 에탄올추출물을 0.4 μm 필터로 여과한 후, 여과액을 35℃에서 감압농축시킨 후 냉동건조하여 ethanol추출물 4.55 g을 얻었다. Ethanol 추출물 4.55 g을 10 ml 둥근 플라스크에 넣고, 에탄올 (3 ml)을 넣어 녹인 후 C₁₈실리카겔 (9.10 g)을 넣어 용매를 감압 증류시키어 제거시킨다. 이때 coating 된 지실의 에탄올 추출물을 C₁₈ 실리카겔 (50.0 g)이 충전된 컬럼 크로마토그래피에 넣어 전개용매로 용리시키어 분획을 얻는다. 이동상의 용매 조건에 따라 각각의 분획을 얻은 후, 용매를 감압농축하여 Fr. 1, 1.557 g, Fr. 2, 0.880

g, Fr. 3, 0.679 g, Fr. 4, 0.588 g, Fr. 5, 0.119g, Fr. 6, 0.045 g을 얻었다.

5. 시료의 처리

조제한 시료는 즉시 4℃ 냉장고에 저장하였다가 사용직전에 배지로 희석하여 실험에 사용하였다.

6. 항균력에 사용된 균주

항세균 및 항진균 시험용으로 사용된 균주는 그람 양성균으로는 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) JC-2, *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 29213을 사용하였으며, 그람 음성균으로는 *Pseudomonas putida* (*P. putida*) KCTC 8729, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) KCTC 1636, *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) KCTC 1925, *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922을 사용하였다. 항진균효과를 측정하기 위하여, 사용된 효모형 균주는 *Candida albicans* (*C. albicans*) KCTC 1940를 사용하였으며, 항균대조균으로는 ampicillin과 항진균에 사용된 대조균으로는 ketoconazole을 사용하였다.

7. 균주의 배양

세균배양에는 Mueller Hinton broth를 사용하였으며, 배지에 균을 이식하여 37℃ 배양기에서 16~20 시간동안 배양하였다. 진균배양에는 Sabouraud dextrose broth를 사용하였으며, 배지에 균을 이식하여 22℃ 배양기에 5~7 일 배양하여 사용하였다.

8. 항균 및 항진균력 측정

각 균주에 대한 지실의 에탄올 추출물에 대한 분획의 항균 및 항진균효과를 파악하기 위하여, 최소억제농도 (minimal inhibitory concentration, MIC)를 측정하였다. 액체 배지 희석법을 이용하여, 96-microwell plate (Nunclon, Denmark)에 지실의 에탄올 추출물에 대한 분획의 농도를 최고농도 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 최저농도 3.125 $\mu\text{g/ml}$ 까지 2배씩 연속적으로 희석하였다. *S. mutans*는 37°C 배양기에서 18시간동안 배양한 후에 일정양을 접종하였다. 37°C 배양기에서 24시간 배양한 후 ELISA (Spectra Max 250, Molecular Deveses)에 의한 흡수파장 630 nm에서 흡광도를 측정하여, 배지의 탁도를 확인하였으며, 순수배양액의 흡광도 (optical density, OD) 값과 같은 결과를 얻은 것을 최소억제농도 (MIC)로 결정하였다.

9. 세포독성능 측정을 위한 세포주

암세포 성장억제능 측정을 위해 사용한 L1210은 mouse 유래 암세포주로서 L1210은 lymphocytic leukemia이다. 세포독성능 측정을 위한 세포주는 서울대학교 세포주은행에서 분양 받아 실험실에서 계대배양하면서 실험하였다.

10. 세포의 배양 배지

세포배양에 사용된 배지는 L-glutamine이 포함된 RPMI-1640 (Gibco, USA)에 NaHCO_3 (2 g, 23.81 mmol)을 혼합한 후, 3차 증류수에 녹인 다음 membrane filter (0.2 μm)로 여과한 후, 여액에 56°C에서 30분간 inactivation 시킨 소의 태아 혈청 FBS를 전체양의 1%가 되도록 혼합한 다음, 1N NaOH와 1N HCl을 사용하여 pH 7.2가 되도록 하였다.

11. 세포배양

세포독성능 측정에 사용된 부유세포 (suspension cell)인 L1210은 위에서 제조한 세포배양배지를 사용하여, 세포의 지수적 성장 (exponential growth)을 유지하도록 37°C, 5% CO_2 incubator에서 2~3일간 배양한 후, conical tube (falcon)에 옮겨 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포침전물을 분리하였다. 분리된 세포침전물을 다시 DPBS에 부유시켜 원심분리한 다음, 상등액을 제거하여 세포만을 취하였다. 동일한 방법으로 반복 세척한 후, 일부를 취하여, 0.4% tripan blue을 가하여 염색되지 않은 살아있는 세포를 haematocytometer로 세어 5×10^5 cells/ml의 농도가 되도록, 새로운 배지에 부유시켜 배양하여 실험에 들어갔다.

12. MTT assay

암세포에 대한 세포독성능 측정은 MTT colorimetric 검정법으로 실험하였다.⁴⁻⁶⁾ 암세포에 대한 세포독성능을 측정하기 위해, 96well flat bottom microtiter 각 well에 logarithmic phase에 도달한 암세포 L1210을 2×10^5 cells/ml 농도로 100 $\mu\text{l/well}$ 씩 접종하고, 각각의 검체를 단계별로 희석하여 10 $\mu\text{l/well}$ 각 well에 첨가하고, 37°C, 5% CO_2 incubator 조건하에서 4시간동안 배양한 후, 형성된 불용성 formazan crystal products를 용해시키기 위하여, 10% SDS를 함유한 0.01N HCl 용액을 각 well당 150 μl 씩 가해 37°C, 5% CO_2 incubator 조건하에 1일간 배양하여, ELISA reader (Molecular Devices, spectra MAX 340)로 흡광도 (540 nm)를 측정하여 IC_{50} 값을 구하였다. 비교약물로는 adriamycin(일동제약)을 사용하였으며, 약물없이 동일한 조건하에서 배양된 세포를 control로 하였다. IC_{50} 값은 대조군의 50%수준으로 암세포의 성장을 억제하는 약물의 농도 ($\mu\text{g/ml}$)로 주어지며, 미국 암 연구소 (NCI; National Cancer Institute, USA)

의 manual 방법에 의해 결정하였다.^{7,8)}

13. 세포의 광학현미경적 관찰

광학현미경으로 세포를 관찰하기 위하여, L1210세포는 MTT정량을 하기전에 도립 현미경으로 관찰하였다.

III. 결과 및 고찰

지실(*Poncirus trifoliata* Raf.)의 에탄올 추출물 4.55 g을 C₁₈ 관 flash chromatography로 분리하여 6개의 분획을 얻었다. 이들 분획 1, 1.557g (34.2%), 분획 2, 0.880 g (19.5%), 분획 3, 0.679 g (15%), 분획 4, 0.588g (13%), 분획 5, 0.119g (2.6%), 분획 6, 0.045g (1%)를 얻었다. 여기서 지실로부터 에탄올을 사용하여 추출된 추출물을 C₁₈ 관 flash chromatography로 분리하여 얻은 분획 1의 수율이 가장 많은 것으로 보아, 용매의 극성이 큰 물과 CH₃CN : H₂O (1 : 9)구성으로된 분획 1에 많이 이행됨을 알 수 있다. 이 분획에 사

용된 전개용매가 극성이 큰 물과 아세토니트릴을 사용하여 용리하였기 때문에 분획 1에 많은 양의 생리활성물질을 얻을 수 있었다. 암연구 검색방법으로 많이 이용되고 있는 MTT 정량분석법을 이용하여, 지실의 에탄올 추출물에 대한 분획을 세포독성실험을 한 결과에 의하면 (Table 1), 마우스 백혈병 세포인 L1210 세포에 대하여, 지실의 에탄올 추출물에 대한 모든 분획은 비교약물인 adriamycin보다 약한 세포독성 발현이 나타났다. MTT 정량분석법에 의하면, 지실의 에탄올 추출물에 대한 분획 4는 IC₅₀, 1.37 µg/ml값으로 가장 강한 세포독성 발현을 관찰할 수 있었다. 비교약물인 adriamycin으로 L1210세포에 대한 지실의 에탄올 추출물에 대한 분획의 세포독성에 대한 비교는 다음과 같은 순서로 감소하였다. MTT 분석법에 의하면, AM > Fr. 4 > Fr. 6 > Fr. 5 > Fr. 3 > Fr. 1 > Fr. 2 순으로 정량분석값을 얻을 수 있었다. 본 실험결과에 의하면, 지실의 에탄올 추출물에 대한 분획 4는 마우스의 백혈병 세포인 L1210세포에 대하여 강한 세포독성을 나타냈다 (Table 1).

Table I. The antitumor activities of fractions of the ethanol soluble extract of *Poncirus trifoliata* Raf. Comparison of IC₅₀ for fractions of the ethanol soluble of extracts of *Poncirus trifoliata* Raf. by the MTT assay^a

Fraction	IC ₅₀ (µg/ml) ^b						AM
	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 4	Fr. 5	Fr. 6	
Mobile phase	H ₂ O, CH ₃ CN : H ₂ O (1 : 9)	CH ₃ CN : H ₂ O (1 : 3)	CH ₃ CN : H ₂ O (1 : 1)	CH ₃ CN : H ₂ O (3 : 1), CH ₃ CN : H ₂ O (9 : 1)	CH ₃ CN, CH ₃ CN : CHCl ₃ (1 : 1), CHCl ₃	MeOH	
Cell							
L1210	45.41	111.48	35.39	1.37	2.72	2.06	0.02
Mass (mg)	1,557	886	679	588	119	45	-

Plant extracts: ETPT: Ethanol extract of *Poncirus trifoliata* Raf.; AM: Adriamycin.

^aEach extract was examined in triplicate experiments. ^b IC₅₀ represents the concentration of an extract of required for 50% inhibition of cell growth

지실 (*Poncirus trifoliata* Raf.)의 에탄올 추출물의 분획에 대한 항균력은 그람 양성균인 *S. mutans*, *S. epidermidis*, *S. aureus*와 그람 음성균인, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *S. typhimurium*와 *E. coli*, 진균인 *C. albicans*에 대하여, 지실의 에탄올 추출물과 분획에 대한 최소억제농도는 200 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도로 항균력이 관찰되었다. 그러나 비교약물인 ampicillin에 대한 최소억제농도는 *S. mutans*와 *S. aureus*는 3.125 $\mu\text{g/ml}$ 이었으며, *S. epidermidis*와 *P. aeruginosa*는 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 나타났으며, 음성균인 *P.*

putida, *S. typhimurium*과 *E. coli*와 진균인 *C. albicans*에 대한 항균과 항진력은 지실의 에탄올 추출물의 분획과 같은 최소억제농도 (>200 $\mu\text{g/ml}$)로 관찰되었다. Ketoconazole에 대한 최소억제농도는 *C. albicans*와 *S. typhimurium*는 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 나타났으며, *S. mutans*, *S. epidermidis*, *P. putida*와 *E. coli*는 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 관찰되었다. *P. aeruginosa*는 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도와 *S. aureus*는 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 나타나, 지실의 에탄올 추출물의 분획에 대한 항균력보다 비교약물의 항균력이 우수함을 알 수 있었다 (Table II).

Table II. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of fractions of *Poncirus trifoliata* Raf. extracted with ethanol against microorganisms

Strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$)								
	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 4	Fr. 5	Fr. 6	ETPT	AM	KT
<i>S. mutans</i>	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	3.125	50
<i>S. epidermidis</i>	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	50	50
<i>S. aureus</i>	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	3.125	200
<i>P. aeruginosa</i>	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	50	100
<i>P. putida</i>	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	50
<i>S. typhimurium</i>	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	25
<i>E. coli</i>	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	50
<i>C. albicans</i>	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	25

Plant extracts: ETPT: Ethanol extract of *Poncirus trifoliata* Raf.; AM: Ampicillin. KT: Ketoconazole.

IV. 결 론

지실 (*Poncirus trifoliata* Raf.)의 에탄올 추출물의 분획을 MTT정량분석법으로, 마우스의 백혈병 세포인 L1210 세포에 대하여 세포독성을 평가하였다. 이들 추출물에 대한 분획은 마이크로그램 농도의 범위에 대하여 세포독성을 나타내었으며, 지실의 에탄올 추출물의 분획 4는 IC_{50} 1.37 $\mu\text{g/ml}$ 정량분석값으로,

L1210 세포에 대한 가장 강한 항암활성을 나타내었다. 그러나 마우스의 백혈병 세포인 L1210세포에 대한 지실의 에탄올 추출물중에 분획 4는 비교약물인 아드리아마이신에 대한 IC_{50} 0.02 $\mu\text{g/ml}$ 정량분석값보다 낮은 세포독성의 발현을 관찰할 수 있었다. 따라서 지실의 에탄올 추출물의 분획 4의 세포독성에 대한 생리활성물질은 분획 4에 함유되어 있으리라 사료된다. 지실의 에탄올 추출물의 분획에 대한

최소억제농도를 측정한 결과, Gram 양성균인 *S. mutans*, *S. epidermidis*와 *S. aureus*와 Gram 음성균인 *P. aeruginosa*에 대한 최소억제농도는 200 $\mu\text{g/ml}$ 이상으로 나타나, 항균 대조균인 ampicillin의 최소억제농도(< 3.12 5~50 $\mu\text{g/ml}$)에 비해 항균력이 낮은 것으로 나타났다. 진균에 대해서도 200 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 최소억제농도가 나타나, 대조균 ketoconazole의 최소억제농도 ($< 50\sim 200$ $\mu\text{g/ml}$)에 비해 항진균력이 낮은 것으로 나타났다.

V. 감사의 글

본 연구는 원광보건대학 교비연구비와 일부 BK 21 사업지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

VI. 참고문헌

1. 옥창수 (1997), 原色韓國藥用植物圖鑑, p. 321, 아카데미 서적
2. 宋柱澤, 鄭炫培 (1983), 한국자원식물, 미도문화사
3. 김태정 (1996), 한국의 자원식물 II, 서울대학교 출판부
4. Mosmann, T.(1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application of proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65: 55-63.
5. 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.
6. 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 Res.*, 47 : 936-942.
7. 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.
8. Kallmann, R.F.(1985): The use of rodent tumors in experimental cancer therapy. *Cancer Res.*, 45: 6541-6545.