

복수암 생쥐와 인체 암세포에 대한 알로에의 항암 작용

정혜윤 · 김재현* · 황세진* · 이동권#

성균관대학교 약학대학, *국립보건안전연구원

(Received February 2, 1993)

Anticancer Effects of Aloe on Sarcoma 180 in ICR Mouse and on Human Cancer Cell Lines

He Yun Jeong, Jae Hyun Kim*, Se Jin Hwang* and Dong Kwon Rhee#

College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea

* National Institute of Safety Research, Seoul 122-020

Abstract—Anticancer effects of Aloe on sarcoma 180 in ICR mouse or human cancer cells were determined. Sarcoma 180 cells were inoculated subcutaneously into male ICR mouse to determine effect of Aloe on tumor growth, or inoculated intraperitoneally into male ICR mouse to determine effect of Aloe on life span prolongation, followed by oral administration of *Aloe vera* (10 mg/kg/day, 50 mg/kg/day) or *Aloe arborescens* (10 mg/kg/day, 100 mg/kg/day) once a day for 14 days. The administration of *Aloe vera* or *Aloe arborescens* did not suppress tumor growth. However the life span of ICR mouse was prolonged to 19% ($P < 0.05$), 22% ($P < 0.05$), and 32% ($P < 0.05$) by administration of *Aloe vera* 10 mg/kg/day, *Aloe vera* 50 mg/kg/day, and *Aloe arborescens* 100 mg/kg/day, respectively. To determine anticancer effect of Aloe *in vitro*, Aloe extract was added to the culture of human gastric cancer cells (SNU-1) and colorectal cancer cells (SNU-C2A), and concentration of Aloe to inhibit cancer cell growth was determined using MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) cytotoxicity assay. High ID_{50} values of *Aloe vera* and *Aloe arborescens* against gastric cancer cell line (SNU-1) and colorectal cancer cell line (SNU-C2A) suggest that Aloe gel does not have anticancer effect on these specific human cancer cells although high concentration of Aloe inhibited growth of human cancer cells significantly.

Keywords □ *Aloe vera* and *Aloe arborescens*, anticancer effect.

Aloe는 여러가지 치료작용을 나타내거나 치료효과를 간접적으로 돕는다고 보고되어 있다. 지금까지 보고된 논문은 주로 Aloe의 위액 분비 억제작용,¹⁾ 화상치료,^{2,3)} 동상치료,⁴⁾ 상처치료⁵⁾ 및 항염증작용^{6,7,8,9)}과 면역 조절작용¹⁰⁾ 등에 대하여 많이 연구되어 있으나 항종양 작용에 대해서는 일부 상반된 보고가 되어 있다.

즉, Wolfe 등(1990)은 *in vivo*에서 rat의 간세포를 aloe-emodin 및 chrysophanol로 처리하였을 때 DNA 합성이 2~3배 증가되었으며, *in vitro*에서 chrysophanol 이 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine이

나 3-methylcholanthrene에 의하여 유도된 C3H/M2 mouse fibroblast의 형질 전환을 촉진함으로써 종양 촉진 작용을 나타낸다고 보고하였다.¹¹⁾ 또 Bösch와 Friederich 등(1987)은 천연의 anthraquinone인 emodin이 *Salmonella/mammalian microsome assay* (Ames test)에서 strain TA 1537에 대하여 특이하게 변이원성이었다고 보고하였으며,¹²⁾ Morooka 등(1987)은 emodin이 *Salmonella assay*에서 변이원성이 있는 것으로 보고하였고,¹³⁾ Tikkanen 등(1983)은 emodin이 *Salmonella assay*에서 strain TA 2637에 대하여 변이원성이 있는 것으로 보고하였다.¹⁴⁾ 또한 Brown 등(1976, 1979)은 9,10-anthraquinone 유도체들에 대하여 실시한 *Salmonella assay* (5 균주를 사용)

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

결과 이들 화합물 중 35%가 변이원성이 있는 것으로 보고하였으며,¹⁵⁾ 70가지 anthraquinone들에 대하여 실시한 *Salmonella* assay(5 균주를 사용)에서는 1/3 이 frame shift mutagen 이었다고 보고하였다.¹⁶⁾

이와 상반되게 Aloe의 항암 작용에 대하여 보고된 논문을 보면, Kupchan과 Karim(1976)은 *Rhamnus frangula* L.로 부터 분리한 aloe-emodin이 mouse에 emodin이 *Salmonella/mammalian* microsome assay(Ames test)에서 strain TA 1537에 대하여 특이하게 변이원성이었다고 보고하였으며,¹²⁾ Morooka 등에서 P-388 입과구 백혈병에 대하여 유의성 있는 종양 억제 효과를 나타내었다고 보고하였으며,¹⁷⁾ Gribel과 Pashinskii(1986)는 Aloe 액즙의 항전이 효과(anti-metastatic properties)를 생쥐와 흰쥐의 3가지 종양에 대하여 실험한 결과 Aloe 액즙이 주된 종양 성장(major tumor growth)에는 영향을 미치지 않았으나, 종양 진행의 여러 단계에서 종양 무게(tumor mass), 전이 병소(metastatic foci) 및 전이 빈도(metastasis frequency)를 감소시켰다고 보고하였다.¹⁸⁾ 또 Yoshimoto 등(1987)은 *Aloe arborescens* Mill.로 부터 분리된 lectin 성분(ATF 1011)이 종양 세포 표면에서 T cell에 작용함으로써 종양특이 면역을 증강시켰다고 보고하였다.¹⁹⁾ 따라서 Aloe 액즙 및 성분의 변이원성이나 항암 작용에 대해서는 보다 많은 연구가 필요할 실정이다.

본 연구에서는 Aloe의 항암 작용 유무를 확인하기 위하여 *in vivo* 및 *in vitro*에서 실험을 실시하였다. *in vivo* 실험으로는, 경구로 복용한 Aloe의 항암 효과를 확인하기 위하여, Sarcoma 180 세포를 ICR 생쥐의 피하에 이식하고 Aloe를 경구투여한 다음 실험군의 종양 무게가 대조군과 차이가 있는지를 비교하였으며, 또 Sarcoma 180 세포를 ICR 생쥐의 복강에 이식하고 Aloe를 경구투여한 다음 대조군과 비교하였을 때 수명 연장 효과가 있는지를 측정하였다. *in vitro* 실험으로는 인체의 위암 세포주(SNU-1)와 대장암 세포주(SNU-C2A)에 대한 Aloe의 항암작용을 확인하기 위하여 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)검색법을 이용한 세포 독성 실험을 실시하였다.

실험재료 및 방법

in vivo 실험

실험재료—*Aloe vera* gel powder(*Aloe vera* Linne, *Aloe barbadensis* Miller)와 *Aloe arborescens* gel powder(*Aloe arborescens* Miller)는 남양 알로에로부터 제공되었으며 이들을 각각 1% CMC 용액에 현탁하여 실험에 사용하였다. *Aloe vera*는 Vera products, inc. (U.S.A.)에서 제조된 초저온 분무 건조법으로 100배 농축된 분말을 사용하였으며, 외견상 백색에서 황갈색을 나타내었다. *Aloe arborescens*는 Minamiizu Aloe Kako Kumiai(Japan)에서 제조된 열풍 건조된 분말을 사용하였으며, 외견상 밝은 녹색을 나타내었다.

실험동물 및 사육조건—실험에 사용한 동물은 체중 33 ± 5 g의 웅성 ICR계 생쥐로서 사료(삼양 사료)는 항생제가 첨가된 생쥐용 pellet을 사용하였다. 사육시 물과 사료는 충분히 공급하였으며 Aloe 시료의 투여는 매일 오후 4시에서 9시 사이에 실시하였다.

복수암 세포액의 조제와 투여—서울대학교 약학대학 미생물학 교실에서 2마리의 복수암(Sarcoma 180)생쥐를 분양받아 복수암 세포액을 조제하여 약 20일 간격으로 새로운 생쥐의 복강에 이식함으로써 실험에 사용할 때까지 복수암 생쥐를 계속 유지하였다. 즉, 복수암 생쥐의 복강으로부터 복수액을 취하여 0°C의 생리식염수에 현탁하여 400×g에서 2분간 원심분리한 다음, 바닥에 가라앉은 암세포를 다시 0°C의 생리식염수에 현탁하여 400×g에서 2분간 원심분리하였다. 이 암세포 침전물을 다시 0°C의 생리식염수에 현탁한 다음, 0.4% trypan blue 용액으로 세포를 염색하고 hemocytometer를 사용하여 세포액의 농도가 1×10^7 cells/ml이 되도록 세포액을 희석하였다. 농도가 1×10^7 cells/ml이 된 복수암 세포액을 0.1 ml/씩(1×10^6 cells/mouse) ICR 생쥐의 피하(종양 생성 억제 실험) 또는 복강(수명 연장 실험)에 주사하였다.

Aloe의 Sarcoma 180에 대한 종양 생성억제 실험—웅성 ICR 생쥐 8~9마리를 한 군으로 하여 각 군에 1% CMC 용액에 현탁시킨 *Aloe vera*, *Aloe arborescens* 또는 1% CMC 용액을 1일 1회 14일간 연속적으로 경구 투여하였다. 즉, Aloe의 종양 예방 효과를 보기 위하여 Aloe 시료를 3일간 계속하여 경구 투여하고, 음성 대조군을 제외한 5개 군에 1×10^6 개(0.1 ml of 1×10^7 cells/ml)의 Sarcoma 180 세포를 각 ICR 생쥐의 왼쪽 겨드랑이에 피하 주사한 다음, Aloe 시료를 11일간 계속하여 경구 투여하였다. Sarcoma 180

세포 이식 후 16일째 되는 날, 생쥐를 경추 탈구하여 치사시킨 다음 고히암을 적출하여 평균 무게를 산출하였다.

종양의 조직병리학적 관찰—Sarcoma 180 이식 후 16일째 되는 날 고히암을 적출하여 무게를 측정한다. 고히암 조직을 10% formalin에 고정하여 paraffin 포매한 후 두께 5 μm 정도의 절편(microtome; Reichert-Jung, Austria)을 제작하여 Hematoxylin-Eosin 염색²⁰⁾을 실시하고 광학 현미경으로 관찰하였다.

Aloe의 복수암 mouse에 대한 수명 연장 실험—양성 ICR 생쥐 8~9마리를 한 군으로 하여 각 군에 1% CMC 용액에 현탁시킨 *Aloe vera*, *Aloe arborescens* 또는 1% CMC 용액을 1일 1회 14일간 연속적으로 경구 투여하였다. 즉, Aloe의 종양 예방 효과를 보기 위하여 Aloe 시료를 3일간 계속하여 경구 투여하고, 음성 대조군을 제외한 5개 군에 1×10^6 개(0.1 ml of 1×10^7 cells/ml)의 Sarcoma 180 세포를 각 ICR 생쥐에 복강 주사한 다음, Aloe 시료를 11일간 계속하여 경구투여하였다. 각 군의 평균 생존일을 측정하여 Sarcoma 180 만을 투여한 양성 대조군의 평균 생존일에 대한 Aloe 시료 투여군의 평균 생존비율(Test/Control %)을 산출하고 이 값을 수명 연장 효과의 판정 기준으로 사용하였다.

in vitro 실험

MTT 검색법을 이용한 Aloe의 인체 암세포주에 대한 항암 작용 실험

Aloe 시료 용액의 제조—남양 알로에로부터 제공 받은 *Aloe vera* gel powder와 *Aloe arborescens* gel powder(in vivo 실험시와 동일한 제품)를 각각 100 mg/ml의 농도로 Phosphate-buffered saline(PBS)²¹⁾에 녹이거나 현탁시킨 다음, 0.22 μm membrane filter를 사용하여 여과 멸균하고, PBS로 75 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12.5 mg/ml의 농도가 되도록 희석하여 실험에 사용하였다.

Mitomycin C 시료의 제조—분말 상태의 Mitomycin C를 멸균한 PBS에 1 mg/ml의 농도로 녹이고 5°C에서 보관해 두었다가 사용할 때 멸균한 PBS로 1.7 $\mu\text{g/ml}$ 및 3.6 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도가 되도록 희석하여 실험에 사용하였다.

암 세포주—서울대학교 의대 암 연구소 내의 한국

세포주 은행(KCLB)으로부터 인체의 위암 세포주 1종(SNU-1)²⁰⁾과 대장암 세포주 1종(SNU-C2A)²⁰⁾을 분양 받았다.

세포 배양에 사용한 배지의 제조

① RPMI 1640 basic media의 제조—RPMI 1640 1 liter pack(GIBCO)을 900 ml의 탈이온수에 서서히 가하여 녹이고 HEPES[N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid](SIGMA) 4.75 g과 NaHCO_3 2.23 g을 녹인 후, 1N HCl과 1N NaOH로 pH 7.25~7.3으로 맞춘 다음 탈이온수를 가하여 전체 1 liter가 되게 하였다. 이 용액을 0.45 μm membrane filter로 여과 멸균한 다음 5°C에서 보관하였다.

② complete media의 제조—RPMI 1640 basic media 900 ml에 heat-inactivated Fetal bovine serum(GIBCO) 101.1 ml을 가하고(Heat-inactivation; Fetal bovine serum을 56°C에서 30~40분간 유지), Penicillin-Streptomycin 용액(GIBCO, 10000 units/ml of Penicillin G sodium and 10000 $\mu\text{g/ml}$ of Streptomycin sulfate) 10.1 ml을 가하였다. 이렇게 하므로써 전체 1011.2 ml 내에는 Penicillin G가 100 units/ml, Streptomycin이 100 $\mu\text{g/ml}$ 정도 포함되도록 complete media를 제조하였다.

세포 배양 조건—5% CO_2 를 함유하는 공기 조성 하에서 온도 조건을 37°C로 유지하여 세포를 배양하였다.

기타 시약의 제조

Trypsin-EDTA(1X) 용액의 제조—PBS 100 ml에 Trypsin (bovine pancreas, SIGMA T-8128) 0.05 g과 Ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA, SIGMA) 0.02 g을 가하여 녹인 다음 0.22 μm membrane filter로 여과 멸균한 후 분주하여 -20°C에 보관하였다가 0°C에서 녹여 실험에 사용하였다.

MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 용액의 제조—MTT(SIGMA)을 2 mg/ml의 농도로 PBS에 녹인 후 0.22 μm membrane filter로 여과 멸균하여 사용하였다.

기타 MTT로부터 생성된 formazan 결정을 녹이는데 필요한 Dimethylsulfoxide(DMSO)는 1급 시약을 사용하였고, 세포 배양에 필요한 96-well microtiter plate와 culture flask(75 Cm^2)는 Falcon에서 구입하

였으며, 흡광도 측정에는 8-ELISA reader(enzyme-linked immunosorbent assay reader, Titer Multiscan Mcc)를 사용하였다.

실험 방법(MTT 검색법)

단일 세포 부유액(Single Cell Suspension)의 제조—culture flask 바닥에 부착하여 자라는 SNU-C2A의 경우, flask로부터 배지를 제거하고 PBS 5 ml를 가하여 세포를 씻어준 후 PBS를 제거하고, trypsin-EDTA(1X) 용액 3 ml를 가하여 37°C에서 2~3분간 배양하였다. 여기에 배지 10 ml를 가하여 pipetting한 후 전체 세포 용액을 50 ml centrifuge tube로 옮기고 1000 rpm에서 3분간 원심분리한 다음, 상등액은 버리고 침전된 세포에 10 ml의 배지를 가하고 pipetting하여 단일 세포 부유액을 얻었다. 배지에 부유해서 자라는 SNU-1의 경우에는, trypsin 처리를 생략하고 culture flask내의 전체 세포 용액을 50 ml centrifuge tube로 옮긴 다음 pipetting하여 단일 세포 부유액을 얻었다. 이렇게 함으로써 얻어진 각각의 단일세포 부유액을 배지로 10배 희석한 후 hemocytometer(Superior, West Germany)를 사용하여 세포 밀도를 측정하였다.

예비 실험—본 실험에 앞서 각 well에 접종할 적정 세포수를 결정하기 위하여 예비 실험을 실시하였다. 즉 96-well microtiter plate에 Aloe 시료를 전혀 첨가하지 않고 위암 세포주(SNU-1) 및 대장암 세포주(SNU-C2A)를 각각 접종한 다음 86시간 동안 배양하여, MTT 처리시의 OD₅₄₀ 값이 0.4~0.7 범위에 있는 적정 세포수를 결정하였다.

본 실험—예비 실험에서 결정된 적정 농도가 되도록 세포 용액(SNU-1 또는 SNU-C2A)을 희석하여 96-well microtiter plate에 180 µl씩 가하고(흡광도 측정시의 blank에는 세포가 포함되지 않은 배지만을 180 µl씩 가하였다), 37°C, 5% CO₂ 공기 조성하에서 세포를 30분간 배양하였다. 30분간 배양 후 세포가 접종되어 있는 plate에 Aloe 시료군에는 Aloe vera 또는 Aloe arborescens 시료 용액(100 mg/ml, 75 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12.5 mg/ml)을, 양성 대조군에는 Mitomycin C 용액(1.7 µg/ml 또는 3.6 µg/ml)을, 음성 대조군과 blank에는 PBS를 각각 20 µl씩 가한 다음, 암세포와 시료를 접종한 plate를 37°C, 5% CO₂ 공기 조성 하에서 86 시간 동안 계속하여 배양하였다. 암세포와 시료가 접종된 plate를 86시간 동안 배양한

다음 0.1 mg의 MTT(50 µl of 2 mg/ml)를 모든 well에 가하여 주고 37°C, 5% CO₂ 공기 조성하에서 4시간 동안 더 배양하였다. 4시간 동안 배양 후 배지에 부유해서 자라는 SNU-1의 경우 plate를 450×g에서 5분간 원심분리한 다음(culture flask 바닥에 부착하여 자라는 SNU-C2A의 경우에는 원심분리 과정을 생략하였다). 바닥에 형성된 formazan 결정이 흐트러지지 않도록 주의하면서 배지를 30 µl정도만 남기고 모두 흡입하여 제거하였다. 배지가 제거된 각 well에 dimethylsulfoxide를 150 µl씩 가하고 formazan 결정이 녹을 때까지 약 15분간 천천히 흔들어서 준 다음 plate를 즉시 scanning multiwell spectrophotometer(enzyme-linked immunosorbent assay reader, Titer Multiscan Mcc)에 올려 놓고 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

결과분석—96-well microtiter plate의 8개 well로부터 각 column의 평균 OD₅₄₀ 값을 구하여 음성 대조군(100% 생존군)의 평균 OD₅₄₀ 값에 대한 백분율 값(Percent of Control Absorbance)을 산출하였다. 이 백분율은 대조군과 비교하였을 때의 세포 생존율에 해당하는 값이다. 또한 50% 억제 농도(Median Inhibitory Dose, ID₅₀)는 540 nm에서의 흡광도를 50% 감소시키는 약물의 농도로 정의되며,²²⁾ 위암 세포주(SNU-1)와 대장암 세포주(SNU-C2A)에 대하여 Aloe vera 및 Aloe arborescens의 ID₅₀ 값을 산출하므로써 Aloe의 항암작용의 지표로 사용하였다.

결과 및 고찰

in vivo 실험

Aloe의 Sarcoma 180에 대한 종양 생성 억제 실험—Table I은, 음성 ICR 생쥐의 왼쪽 겨드랑이에 Sarcoma 180 세포(1×10⁶ cells/mouse)를 피하 주사하고 Aloe vera(10 mg/kg/day, 50 mg/kg/day), Aloe arborescens(10 mg/kg/day, 100 mg/kg/day), 또는 1% CMC 용액을 1일 1회 14일간 계속하여 경구 투여한 다음, 종양 이식 후 16일째 되는날 고형암을 적출하여 평균 무게를 측정된 결과를 나타낸 것이다.

Table I에서 Aloe vera(10 mg/kg/day, 50 mg/kg/day) 및 Aloe arborescens(10 mg/kg/day, 100 mg/kg/day)의 경구투여에 의하여 Sarcoma 180 종양의 생장이 유의성 있게 억제되지 않은것을 확인할 수 있다.

Table I—Effect of *Aloe vera* and *Aloe arborescens* on the growth of sarcoma 180(s.c.) in ICR mouse

sample administration	n	tumor weight(g)	relative change(%) ^{a)}
(-)control(Sarcoma 180-)	7	0	
(+)control(Sarcoma 180 only)	9	1.230± 0.380 ^{b)}	100
<i>Aloe vera</i> (10mg/kg/day)	8	1.277± 0.385	103(N.S.) ^{c)}
<i>Aloe vera</i> (50 mg/kg/day)	9	1.077± 0.548	88(N.S.)
<i>Aloe arborescens</i> (10mg/kg/day)	8	1.450± 0.324	118(N.S.)
<i>Aloe arborescens</i> (100mg/kg/day)	8	1.159± 0.499	94(N.S.)

After three consecutive days of Aloe administration, sarcoma 180 cells(1×10^6 cells/mouse) were inoculated subcutaneously into male ICR mouse followed by Aloe administration for consecutive eleven days. After 16 days of sarcoma 180 inoculation, solid tumor was isolated and weighed.

$$a) \text{ Relative change(\%)} = \frac{\text{tumor weight of treated mice}}{\text{tumor weight of (+)control mice}} \times 100$$

b) mean± standard deviation

c) N.S.: statistically not significant

종양의 조직병리학적 관찰—Fig. 1은 Sarcoma 180 세포 이식(1×10^6 cells/mouse) 후 16일째 되는 날 고형암을 적출하여 무게를 측정 한 다음, 조직 표본을 제작하여 Hematoxylin-Eosin으로 염색 후 광학 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 것이다. Fig. 1에서 Sarcoma 180을 이식하지 않은 음성 대조군의 조직에서는 골격근(skeletal muscle), 액와 임파절(axillary lymph node) 및 지방 조직(fat tissue) 등의 정상적인 액와 조직이 관찰되었다(Fig. 1-A). 또한 Sarcoma 180만을 투여한 양성 대조군의 조직에서는 저배율 관찰 조건에 핵/세포질 비율(Nucleus/Cytoplasm ratio)이 높았고 호염기성(basophilia)을 나타내는 종양 조직이 광범위하게 침윤(infiltration)되어 소량의 정상적인 골격근 조직 및 지방 조직이 종양 조직의 내부에서 관찰되었으며, 핵이 소실되고 호산성(eosinophilia)을 나타내는 괴사 종양 조직(necrotized tumor tissue)이 종양 조직 사이에 광범위하게 소주(trabecula) 형태로 분포되어 있었다(Fig. 1-B). 고배율 소견에서 종양 조직은 전형적인 악성 종양에서 나타나는 다형태성(pleomorphism)을 나타내었다. 종양 세포에서는 다핵성 거대 세포(multinucleated giant cell)와 비정형 유사분열(atypical mitosis), 부정형의 핵소체(nucleoli) 등이 관찰되었으며 핵/세포질 비율(Nucleus/Cytoplasm ratio)이 높았다(Fig. 1-E). 괴사 종양 조직에서는 핵이 소실된 원형의 세포가 모인 세포괴(cell mass)가 관찰되었으며 종양 조직과 괴사 조직은 분명한 경계를 지니고 있었다(Fig. 1-G). *Aloe vera* 10

mg/kg/day 투여군과 *Aloe vera* 50 mg/kg/day 투여군의 종양 조직은 저배율 관찰 조건에서 전체적으로 Sarcoma 180만을 투여한 양성 대조군과 유사한 소견을 나타내었으며, *Aloe vera* 50 mg/kg/day 투여군에서는 양성 대조군에 비하여 괴사 조직의 양은 다소 감소하였으나 정상 조직의 양은 다소 증가된 소견을 나타내었다(Fig. 1-C). *Aloe vera* 10 mg/kg/day 투여군과 *Aloe vera* 50 mg/kg/day 투여군의 종양 조직의 고배율 관찰 조건에서는 양성 대조군과 유사한 정도의 다형태성(pleomorphism)을 나타내어 양성 대조군에서 나타난 악성 종양의 소견을 모두 나타내었다. *Aloe arborescens* 10 mg/kg/day 투여군과 *Aloe arborescens* 100 mg/kg/day 투여군의 종양 조직은 저배율 관찰 조건에서 Sarcoma 180만을 투여한 양성 대조군과 유사하면서 양성 대조군에 비하여 괴사 조직의 양이 다소 증가된 소견을 나타내었으며(Fig. 1-D) 고배율 소견에서도 양성 대조군의 종양 조직과 유사한 소견을 나타내었다(Fig. 1-F). 이상의 종양 조직에 대한 조직병리학적 관찰 결과를 종합하면, *Aloe vera* 50 mg/kg/day 투여군과 *Aloe arborescens* 100 mg/kg/day 투여군에서 종양 조직의 괴사 정도에 약간의 변화를 나타내었으나 이것은 Aloe 치료의 항암 작용과 관련된 의미를 지니지 않는 것으로 생각되며, 결과적으로 본 실험에 사용된 *Aloe vera*(10 mg/kg/day, 50 mg/kg/day) 및 *Aloe arborescens*(10 mg/kg/day, 100 mg/kg/day)의 용량으로는 Sarcoma 180의 전반적인 발암 및 진행 과정에서 조직병리학적으로 특기할 만한 영

향을 나타내지 않은 것으로 사료된다.

Aloe의 복수암 mouse에 대한 수명 연장 실험—
Table II는 음성 ICR 생쥐의 복강에 Sarcoma 180 세포(1×10^6 cells/mouse)를 주사하고 *Aloe vera*(10

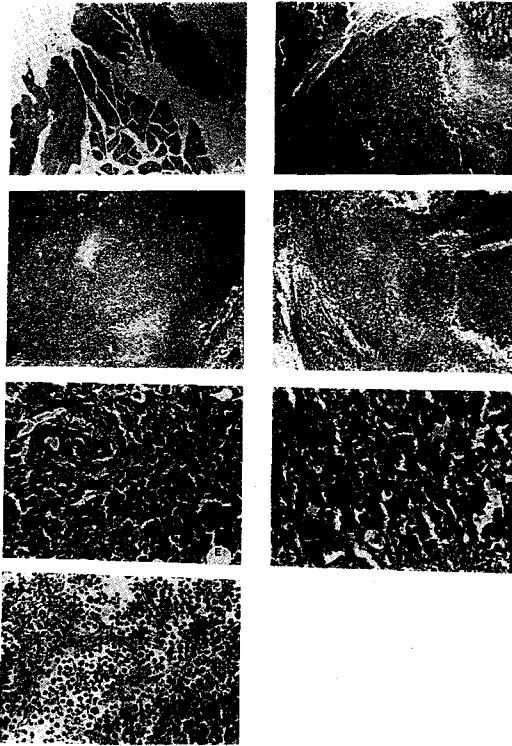


Fig. 1—Histopathologic examination of various experimental groups stained with hematoxylin and eosin. After three consecutive days of Aloe administration, sarcoma 180 cells were inoculated subcutaneously into male ICR mouse followed by Aloe administration for consecutive eleven days. After 16 days of sarcoma 180 inoculation, solid tumor was isolated, weighed, stained with hematoxylin and eosin, and observed under the microscope.

(A) negative control; natural tissue, X100, (B) positive control; Sarcoma 180 only, X50, (C) Sarcoma 180⁺, *Aloe vera* 50 mg/kg/day, X50, (D) Sarcoma 180⁺, *Aloe arborescens* 10 mg/kg/day, X50, (E) Same as (B) but magnified by 400 times, (F) Same as (D) but magnified by 400 times, (G) Same as (B) but magnified by 400 times.

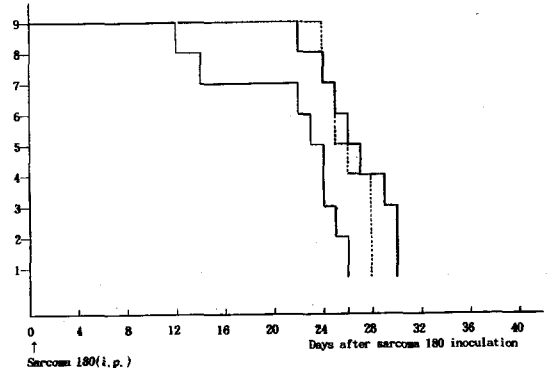


Fig. 2—Effect of oral administration of *Aloe vera* gel on the life span of ICR mice inoculated with sarcoma 180(I.P.). After three consecutive days of Aloe administration, sarcoma 180 cells were inoculated intraperitoneally into male ICR mouse on 0 days followed by Aloe administration for consecutive eleven days. Survivors of each group were measured daily.

— ; (+)control(Sarcoma 180 only)
 - - ; *Aloe vera*(10 mg/kg/day)
 — — ; *Aloe vera*(50 mg/kg/day)

mg/kg/day, 50 mg/kg/day), *Aloe arborescens*(10 mg/kg/day, 100 mg/kg/day) 또는 1% CMC 용액을 1일 1회 14일간 계속하여 경구투여한 다음 각 군의 평균 생존일을 측정하여 나타낸 것이다. Table II에서 *Aloe vera* 10 mg/kg/day, *Aloe vera* 50 mg/kg/day 및 *Aloe arborescens* 10 mg/kg/day, *Aloe arborescens* 100 mg/kg/day의 경구투여에 의하여 복수암 mouse의 수명이 각각 19%($P < 0.05$), 22%($P < 0.05$), 16%, 32%($P < 0.05$) 증가하였다.

Fig. 2와 Fig. 3은 Sarcoma 180이식 후 날짜 경과에 따른 각 군의 생존 개체수를 나타낸 것이다. Fig. 2에서 *Aloe vera* 10 mg/kg/day 투여군과 *Aloe vera* 50 mg/kg/day 투여군에서 Sarcoma 180만을 투여한 양성 대조군에 비하여 날짜 경과에 따른 생존 개체수가 많았으며, *Aloe vera* 50 mg/kg/day 투여군에서 수명 연장 효과는 더 큰 것을 확인할 수 있었다. 또한 Fig. 3에서 *Aloe arborescens* 10 mg/kg/day 투여군과 *Aloe arborescens* 100 mg/kg/day 투여군에서 Sarcoma 180만을 투여한 양성 대조군에 비하여 날짜 경과에 따른 생존 개체수가 많았으며 *Aloe arborescens* 100 mg/

Table II—Effect of *Aloe vera* and *Aloe arborescens* on the life span of ICR mouse inoculated with sarcoma 180(i.p.)

Sample administration	n	life span(day)	Test/Control(%) ^{a)}
(-) control(Sarcoma 180 -)	8	∞	∞
(+) control(Sarcoma 180 only)	9	21.8± 5.2 ^{b)}	100
<i>Aloe vera</i> (10 g/kg/day)	8	26.0± 1.8	119(P<0.05)
<i>Aloe vera</i> (50 mg/kg/day)	8	26.6± 2.9	122(P<0.05)
<i>Aloe arborescens</i> (10 mg/kg/day)	9	25.3± 4.8	116
<i>Aloe arborescens</i> (100 mg/kg/day)	8	28.8± 5.3	132(P<0.05)

After three consecutive days of Aloe administration, sarcoma 180 cells(1×10⁶ cells/mouse)were inoculated intraperitoneally into male ICR mouse followed by Aloe administration for consecutive eleven days. Average life span of each group was measured.

a) Test/Control(%) = $\frac{\text{average life span of treated group}}{\text{average life span of (+) control group}} \times 100$

b) mean± standard deviation

kg/day 투여군에서 수명 연장 효과가 더 큰 것을 확인할 수 있었다.

Table II와 Fig. 2,3의 결과를 종합할 때 *Aloe vera* 10 mg/kg/day, *Aloe vera* 50 mg/kg/day 및 *Aloe arborescens* 10 mg/kg/day, *Aloe vera* 50 mg/kg/day 및 *Aloe arborescens* 10 mg/kg/day, *Aloe arborescens* 100

mg/kg/day의 경구투여에 의하여 복수암 생쥐의 수명이 각각 19%(P<0.05), 22%(P<0.05), 16%, 32%(P<0.05) 증가하였으며, Sarcoma 180 이식 후 날짜 경과에 따른 생존 개체수를 측정된 결과에서도 *Aloe*

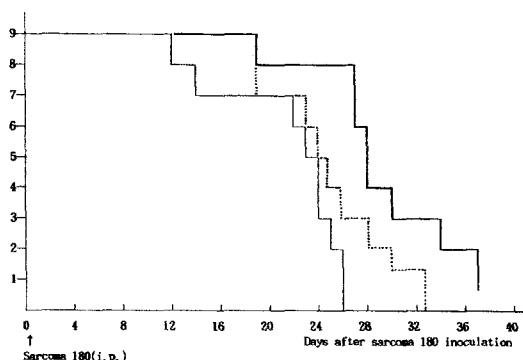


Fig. 3—Effect of oral administration of *Aloe arborescens* gel on the life span of ICR mice inoculated with sarcoma 180(i.p.). After three consecutive days of Aloe administration, sarcoma 180 cells were inoculated intraperitoneally into male ICR mouse on 0 day followed by Aloe administration for consecutive eleven days. Survivors of each group were measured daily.
 — ; (+)control(Sarcoma 180 only)
 - - ; *Aloe arborescens*(10 mg/kg/day)
 . . . ; *Aloe arborescens*(100 mg/kg/day)

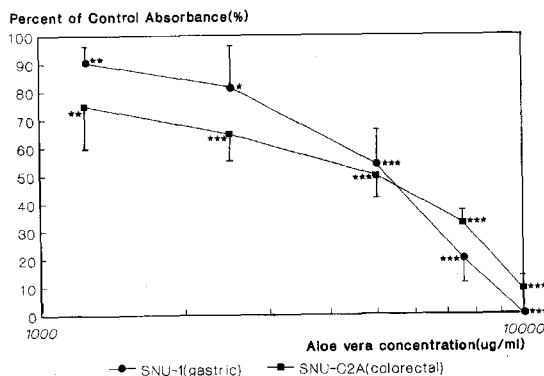


Fig. 4—Effect of *Aloe vera* on the growth of human cancer cell lines.

After 86 hour incubation of 96-well microtiter plate containing cancer cells and Aloe, 0.1 mg of MTT(50 μl of 2 mg/ml) was added to each well and incubated for 4 hours further. 150 μl of dimethylsulfoxide was added to each well and absorbance at 540 nm was measured.

Percent of Control Absorbance(%) = $\frac{\text{average OD}_{540} \text{ value of each group}}{\text{average OD}_{540} \text{ value of (-)control group}} \times 100$

Student's t-test was performed. *, P<0.05, **, P<0.01, ***, P<0.001

vera(10 mg/kg/day, 50 mg/kg/day) 및 *Aloe arborescens*(10 mg/kg/day, 100 mg/kg/day) 투여군에서 Sarcoma 180만을 투여한 양성 대조군에 비하여 동일한 날짜에 생존 개체수가 많았다. 이러한 결과로부터 경구투여한 *Aloe vera*(10 mg/kg/day, 50 mg/kg/day) 및 *Aloe arborescens*(10 mg/kg/day, 100 mg/kg/day)가 복수암 생쥐에 대하여 수명 연장 효과가 있었던 것으로 사료된다.

in vitro 실험

MTT검색법을 이용한 Aloe의 인체 암세포주에 대한 항암작용 실험—MTT 검색법은 살아 있는 세포 내의 mitochondria 효소인 succinate dehydrogenase의 작용에 의하여 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)가 푸른 색의 formazan으로 환원되는 원리를 이용하여 흡광도 측정 에 의하여 살아 있는 세포수를 비례적으로 측정하는 방법이다²³⁾

예비실험—96-well microtiter plate에 Aloe 시료를 전혀 첨가하지 않고 위암 세포주(SNU-1) 및 대장암 세포주(SNU-C2A)를 접종하여 86시간 동안 배양한 다음, MTT로 처리하였을 때의 OD₅₄₀ 값이 0.4~0.7 범위에 있는 적정 세포수는 위암 세포주(SNU-1)의 경우 1800 cells/well 이었고, 대장암 세포주(SNU-C2A)의 경우 5580 cells/well 이었다. 이들 세포 농도는 암세포가 활발히 증식하면서, Aloe 시료 농도의 변화에 따라 OD₅₄₀ 값에 민감하게 차이를 나타내는 범위였다.

본실험—예비 실험으로부터 결정된 적정수의 세포를 180 μl의 배지에 부유시켜 96-well microtiter plate의 각 well에 가한 다음(SNU-1; 1800 cells/well, 180 μl of 1.0×10⁴ cells/ml, SNU-C2A; 5580 cells/well, 180 μl of 3.1×10⁴ cells/ml), PBS, Mitomycin C 또는 Aloe 시료를 각각 20 μl씩 첨가하였다. 암세포와 Aloe 시료를 접종한 96-well microtiter plate를 86시간 동안 배양한 다음, MTT 처리하고 각 column의 평균 OD₅₄₀ 값을 측정하여 음성 대조군(100% 생존군)의 평균 OD₅₄₀ 값에 대한 백분율(Percent of Control Absorbance)²²⁾을 산출하였다. 이 백분율은 음성 대조군(100% 생존군)과 비교하였을 때, Aloe 시료 투여군의 세포 생존율에 해당하는 값이다.

$$\text{Percent of Control Absorbance(\%)} = \frac{\text{average OD}_{540} \text{ value of test group}}{\text{average OD}_{540} \text{ value of (-) control group}} \times 100$$

Fig. 4와 Fig. 5는 위암 세포주(SNU-1)와 대장암 세포주(SNU-C2A)에 대한 *Aloe vera* 및 *Aloe arborescens*의 성장 억제 곡선을 나타낸 것이다. Fig. 4에서 *Aloe vera*(1250 μg/ml, 2500 μg/ml, 5000 μg/ml, 7500 μg/ml, 10000 μg/ml)의 농도가 증가함에 따라 위암 세포주(SNU-1) 및 대장암 세포주(SNU-C2A)의 증식이 유의성 있게 억제된 것을 확인할 수 있었다. 또한 Fig. 5에서는 *Aloe arborescens*(1250 μg/ml, 2500 μg/ml, 5000 μg/ml, 7500 μg/ml, 10000 μg/ml)의 농도가 증가함에 따라 위암 세포주(SNU-1) 및 대장암 세포주(SNU-C2A)의 증식이 유의성 있게 억제된 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 5에서 *Aloe arborescens*의 위암 세포주(SNU-1)의 증식에 대한 효과를 보면, *Aloe arborescens* 1250 μg/ml, 2500 μg/ml, 5000 μg/ml의 농도 범위에서는 *Aloe arborescens*의 농도가 증가함에 따라 암세포의 증식이 억제되었으나 *Aloe arborescens* 5000 μg/ml,

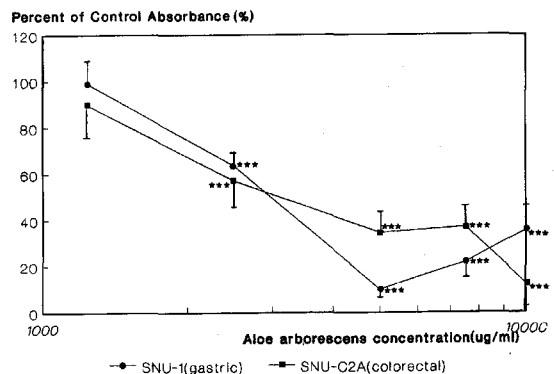


Fig. 5—Effect of *Aloe arborescens* on the growth of human cancer cell lines. After 86 hour incubation of 96-well microtiter plate containing cancer cells and Aloe, 0.1 mg of MTT(50 μl of 2 mg/ml) was added to each well and incubated for 4 hours further. 150 μl of dimethylsulfoxide was added to each well and absorbance at 540 nm was measured.

$$\text{Percent of control absorbance(\%)} = \frac{\text{average OD}_{540} \text{ value of each group}}{\text{average OD}_{540} \text{ value of (-) control group}} \times 100$$

Student's t-test was performed. ***: P<0.001

Table III—ID₅₀ values of *Aloe vera*, *Aloe arborescens* and Mitomycin C against human cancer cell lines

Sample	ID ₅₀ ^{a)} ($\mu\text{g/ml}$)	
	SUN-1(gastric)	SNU-C2A(colorectal)
<i>Aloe vera</i>	5250	5000
<i>Aloe arborescens</i>	3000	3050
Mitomycin C (positive control)	0.17 ²⁰⁾	0.36 ²⁰⁾

After 86 hour incubation of 96-well microtiter plate containing cancer cells and Aloe, 0.1 mg of MTT(50 μl of 2 mg/ml) was added to each well and incubated for 4 hours further. 150 μl of dimethylsulfoxide was added to each well and absorbance at 540 nm was measured.

a) ID₅₀(Median Inhibitory Dose): the concentration of drug which produced 50% reduction of absorbance at 540 nm.

7500 $\mu\text{g/ml}$, 10000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 범위에서는 *Aloe arborescens*의 농도가 증가함에 따라 오히려 백분율 값(Percent of control absorbance)이 다소 증가되었다. 이것은 *Aloe arborescens*가 밝은 녹색(light green brown color)인 점을 고려할 때 그 색이 흡광도에 영향을 미친 것으로 추측되며 암세포의 증식이 다시 활발해진 것은 아니라고 생각된다.

Table III은 Fig. 4,5로부터 *Aloe vera* 및 *Aloe arborescens*의 ID₅₀ 값을 인체의 위암 세포주(SNU-1)와 대장암 세포주(SNU-C2A)에 대하여 산출한 결과를 나타낸 것이다. Table III에서 *Aloe vera*의 ID₅₀ 값은 위암 세포주(SNU-1)에 대하여 5250 $\mu\text{g/ml}$ 이었으며 대장암 세포주(SNU-C2A)에 대하여 5000 $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 또 *Aloe arborescens*의 ID₅₀ 값은 위암 세포주(SNU-1)에 대하여 3000 $\mu\text{g/ml}$ 이었으며 대장암 세포주(SNU-C2A)에 대하여 3050 $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 이와 같은 ID₅₀ 값들은 일반적으로 천연물의 항암작용 검색에서 유효 성분의 존재 가능성과 그 성분 분석의 필요성이 인정되는 범위(약 200 $\mu\text{g/ml}$ 이하)를 크게 넘어서는 값으로서,²⁴⁾ *Aloe vera* 및 *Aloe arborescens*가 저농도에서 인체의 위암 세포주(SNU-1)와 대장암 세포주(SNU-C2A)에 대하여 항암 효과가 없었던 것으로 사료된다.

결 론

*Aloe*의 항암 작용 유무를 확인하기 위하여 *in vivo* 및 *in vitro* 실험으로부터 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *in vivo* 실험으로, 피하에 Sarcoma 180을 이식하고 *Aloe vera*(10 mg/kg/day, 50 mg/kg/day) 또는 *Aloe arborescens*(10 mg/kg/day, 100 mg/kg/day)를 1일 1회 14일간 계속하여 경구 투여한 다음 종양 이식 후 16일째 되는 날 고형암을 적출하여 평균무게를 측정된 결과, Aloe 투여에 의하여 Sarcoma 180 종양의 성장을 유의성 있게 억제할 수 없었으며, 종양 조직의 조직병리학적 관찰 소견상 Sarcoma 180의 발암 및 진행 과정에 있어서 대조군과 유의성 있는 차이를 발견할 수 없었다. 이와 상반되게 Aloe의 복수암 생쥐에 대한 수명 연장 실험에서는 *Aloe vera* 10 mg/kg/day, *Aloe vera* 50 mg/kg/day 또는 *Aloe arborescens* 10 mg/kg/day, *Aloe arborescens* 100 mg/kg/day의 경구 투여에 의하여 복수암 생쥐의 수명이 각각 19%($P < 0.05$), 22%($P < 0.05$), 16%, 32%($P < 0.05$) 증가하였다.

2. *in vitro* 실험으로, MTT 검색법을 이용한 Aloe의 인체 암세포주에 대한 항암 작용 실험 결과, *Aloe vera* 및 *Aloe arborescens*의 ID₅₀ 값은 위암 세포주(SNU-1)에 대하여 각각 5250 $\mu\text{g/ml}$ 과 3000 $\mu\text{g/ml}$ 이었으며, 대장암 세포주(SNU-C2A)에 대하여 각각 5000 $\mu\text{g/ml}$ 과 3050 $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 이러한 결과로부터 Aloe gel이 인체의 암세포주에 대하여 항암 효과가 없었던 것으로 사료된다.

문 헌

- Hirata, T. and Suga, T.: Biologically active constituents of leaves and roots of *Aloe arborescens* var. *natalensis*. *Z. Naturforsch.* **32c**, 731-734 (1977).
- Rodriguez-Bigas, M., Cruz, N. I., and Suarez, A.: Comparative evaluation of *Aloe vera* in the management of burn wounds in guinea pigs. *Plast Reconstr. Surg.* **81**, 386-389 (1988).
- Kaufman, T., Kalderon, N., Ullmann, Y., and Berger, J.: *Aloe vera* gel hindered wound healing of experimental second-degree burns: a quantitative controlled study. *J. Burn Care Rehabil.*, **9**, 156-159 (1988).
- McCauley, R. L., Heggens, J. P., and Robson, M. C.: Frostbite. Methods to minimize tissue loss. *Po-*

- stgrad Med.* **88**, 67-68(1990).
- 5) Davis, R. H., Leitner, M. G., Russo, J. M., and Byrne, M. E.: Wound healing. Oral and topical activity of *Aloe vera*. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.* **79**, 559-562 (1989).
 - 6) Davis, R. H., Leitner, M. G., Russo, J. M., and Byrne, M. E.: Antiinflammatory activity of *Aloe vera* against a spectrum of irritants. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.* **79**, 263-276 (1989).
 - 7) Davis, R. H. and Maro, N. P.: *Aloe vera* and giberellin. Antiinflammatory activity in diabetes. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.* **79**, 24-26 (1989).
 - 8) Davis, R. H., Rosenthal, K. Y., Cesario, L. R., and Rouw, G. A.: Processed *Aloe vera* administered topically inhibits inflammation. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.* **79**, 395-397 (1989).
 - 9) Fujita, K., Ito, S., Teradaira, R., and Beppu, H.: Properties of a carboxypeptidase from aloe. *Biochemical Pharmacology* **28**, 1261-1262 (1979).
 - 10) 't Hart, L. A., van Enckevort, P. H., van Dijk, H., Zaat, R., de Silva, K. T., Labadie, R. P.: Two functionally and chemically distinct immunomodulatory compounds in the gel of *Aloe vera*. *J. Ethnopharmacol.* **23**, 61-71 (1988).
 - 11) Wolffe, D., Schmutte, C., Westendorf, J., and Marquardt, H.: Hydroxyanthra quinones as tumor promoters: enhancement of malignant transformation of C3H mouse fibroblasts and growth stimulation of primary rat hepatocytes. *Cancer Res.* **50**, 6540-6544 (1990).
 - 12) Bosch, R., Friederich, U., Lutz, W. K., Brocker, E., Bachman, M., and Schlatter, Ch.: Investigation on DNA binding in rat liver and in *Salmonella* and on mutagenicity in the Ames test by emodin, a natural anthraquinone. *Mutation research* **188**, 161-168 (1987).
 - 13) Morooka, N., Nakano, S., Itoi, N., and Ueno, Y.: The chemical structure and the mutagenicity of emodin metabolites. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 1247-1252 (1987).
 - 14) Tikkanen, L., Matsushima, T., and Natori, S.: Mutagenicity of anthra quinones in the *Salmonella* preincubation test. *Mutation Research* **116**, 297-304 (1983).
 - 15) Brown, J. P. and Brown, R. J.: Mutagenesis by 9, 10-anthraquinone derivatives and related compounds in *Salmonella typhimurium*. *Mutation research*, **40**, 203-224 (1976).
 - 16) Brown, J. P. and Dietrich, P. S.: Mutagenicity of anthraquinone and benzanthrone derivatives in the *Salmonella*/Microsome test: Activation of anthraquinone glycosides by enzymatic extracts of rat cecal bacteria. *Mutation research* **66**, 9-24 (1979).
 - 17) Kupchan, S. M. and Karim, A.: Tumor inhibitors. 114. Aloe emodin: Antileukemic principle isolated from *Rhamnus frangula* L. *Lloydia* **39**, 223-224 (1976).
 - 18) Gribel' N. V. and Pashinskii, V. G.: Antimetastatic properties of aloe juice. *Vopr Onkol* **32**, 38-40 (1986).
 - 19) Yoshimoto, R., Kondoh, N., Isawa, M., and Hamuro, J.: Plant lectin, ATF1011, on the tumor cell surface augments tumor-specific immunity through activation of T cells specific for the lectin. *Cancer Immunol. Immunother.* **25**, 25-30 (1987).
 - 20) 제갈승주, 조직기술학 이론과 실제, 고려의학, 7-156 (1986).
 - 21) Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., *Molecular Cloning Manual* B.12.
 - 22) Park, J. G., Kramer, B. S., Steinberg, S. M., Carmichael, J., Collins, J. M., Minna, J. D., and Gazdar, A. F.: Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Research* **47**, 587 5-5879 (1987).
 - 23) Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., and Mitchell, J. B.: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research* **47**, 936-942 (1987).
 - 24) Robert, K. Y., Cheng, C. C.: Screening and Evaluation of anticancer agents. *Meth. and Find. Exptl. Clin. Pharmacol.* **10**, 67-101 (1988).
 - 25) Park, J. G., Frucht, H., Larocca, R. V., Bliss, D. P., Kurita, Jr. Y., Chen, T. R., Henslee, J. G., Trepel, J. B., Jensen, R. T., Johnson, B. E., Bang, Y. J., Kim, J. P., and Gazdar, A. F.: Characteristics of cell lines established from human gastric carcinoma. *Ca-*

- ncer Research* **50**, 2773-2780 (1990).
- 26) Park, J. G., Oie, H. K., Sugarbaker, P. H., Henslee, J. G., Chen, T. R., Johnson, B. E., and Gazdar, A.: Characteristics of cell lines established from human colorectal carcinoma. *Cancer Research* **47**, 6710-6718 (1987).