

수종의 한국산 야생식물에서의 항암효과 검색

박성희, 조성지, 이인선,¹ 이정옥,² 이인자*, 김종원

대구효성가톨릭대학교 약학대학, ¹계명대학교 자연대학, ²한국화학연구소

Cytotoxicity of Some Natural Products in Human Cancer Cells

Sung Hee Park, Sung Ji Cho, In Sun Rhee,¹ Chong Ock Lee,²

In Ja Rhee* and Chong Won Kim

College of Pharmacy, Taegu Hyosung Catholic University, Kyungsan 713-702, Korea;

¹Dept. of Food Science and Technology, Keimyung, Taegu 704-701, Korea; and

²Pharmaceutical Screening Team, Korea Research Institute of
Chemical Technology, Taejeon 305-606, Korea

Abstract - The objective of this research is to find new antitumoral substances from natural products. Several of natural products have been used as food that were isolated into hexane(Hex.) and/or ethylacetate(EtOAc) extracts. we have tested cytotoxicities of these plants against human solid tumor cells. The cytotoxic activity of these plants were tested using Sulforhodamin B(SRB) assay. Hexane extracts of *Chrysanthemum sinense*, *Allium tuberosum*, *Beta vulgaris*, *Ixeris dentata* have revealed cytotoxicities against five human solid tumor cells, and its cytotoxicities of each cell line were 10-100 μ l/ml ED50 (Effective dose that cause 50% inhibition of cell growth *in vitro*)

Key words - Natural products; SRB assay; human tumor cells.

현재 항암제로 사용되고 있는 약물들의 대부분은 크게 두가지의 문제점을 가지고 있다. 그 중하나의 약물투여 후 나타나는 심각한 부작용과 또 다른 하나는 사용하는 항암제에 대하여 내성을 나타내는 암세포들의 출현이다. 특히 현재 사용되는 항암요법제들의 대부분은 조혈 및 면역 기능에 이상을 초래할 뿐 아니라 암세포 이외에 정상세포에도 독성을 나타내고 있어 특이적이며 선택적인 항암제의 개발이 절실히 요구되고 있다.^{1,2)} 이러한 연구의 일환으로, 최근에는 옛날부터 우리나라를 비롯한 동양권에서 암의 치료에 이용되어온 생약으로부터 부작용이 적고 항암력이 뛰어난 항종양성 신물질을 찾는 연구가 활

발이 진행되고 있다. 한방이나 민간에서 궤양이나 감염 또는 종양에 응용되었던 생약을 중심으로 이런 연구들이 활발히 진행되고 있으며 여러종의 유효성분들이 보고되었다.³⁻⁵⁾ 본실험에서는 일상생활에서 식용으로 섭취하는 식물중에서 항암활성을 나타내는 물질을 검색하여 부작용이 적은 항암제 또는 항암보조제로서 가치있는 성분을 검색 하고자 한다.

식용식물에서 항암제를 개발할 목적으로 국내 산야에 자생하는 식용식물 20여종을 채취하여 ethylacetate분획과 hexane분획으로 추출하였고, 항암효과는 NCI(National Cancer Institute)에서 공급받은 A549(non-smal cell lung cancer cell line), SK-OV-3(ovarian cancer cell line), SK-MEL-2(malignant melanoma cell line), XF

*교신저자 : Fax 053-850-3602

498(central nerve system cancer cell line), HCT-15(colorectal adenocarcinoma cell line) 등 5종의 암세포를 사용하여 SRB(sulforhodamine B) 법으로 세포독성을 실험하였다.

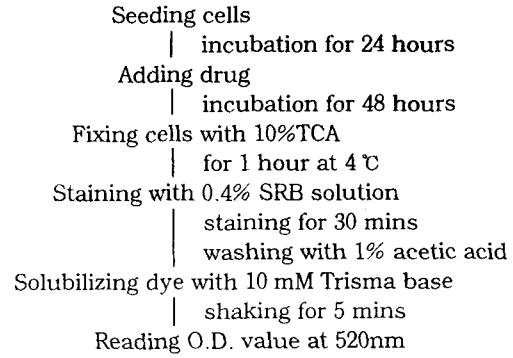
재료 및 방법

재료 및 추출-경상도 일대에서 자생하는 식용식물 약 20여 종을 채집하여 음건하고 세절하였다. 세절한 식물을 각각 hexane과 ethylacetate(EtOAc)로 가열 추출하고 냉각후 여과하였다. 모아진 여액을 rotary evaporator로 감압농축하고 speed vac concentrator로 건조하여 분말상의 hexane 엑스와 EtOAc 엑스를 얻었다. 이를 100% DMSO에 적정 농도로 용해하여 실험에 이용하였다.

세포주 및 세포배양-실험에 사용한 세포인 A549(non-smal cell lung cancer cell line), SK-OV-3(ovarian cancer cell line), SK-MEL-2(malignant melanoma cell line), XF498(central nerve system cancer cell line), HCT-15(colorectal adenocarcinoma cell line)은 모두 인체기원 암세포주로서 NCI(National Cancer Institute)에서 공급받은 것을 사용하였다. 배양액으로는 glutamine, sodium bicarbonate, gentamycin 및 amphotericin을 첨가한 RPMI1640 용액을 5% fetal bovine serum으로 보강한 배지를 사용하였으며, 37 °C, 5% CO₂, 100% 습도의 조건에서 배양하였다.

세포는 3~4일에 한번씩 계대 유지하였으며, 부착면으로부터 세포를 분리하기 위하여 0.25% trypsin용액에 3 mM 1,2-cyclohexanediaminetetraacetic acid를 첨가한 용액을 사용하였다.

세포독성실험 (SRB 법)^{6,7)}-세포들을 96well microplate에 각각 분주하고, 24시간동안 배양하여 세포가 바닥면에 부착한 후에 배양액을 제거하고, 각 농도의 실험약물을 넣어 CO₂ incubator에서 배양하였다. 48시간동안 배양후 배양액을 완전히 제거하고 10% trichloroacetic acid(TCA)로 4 °C에서 1시간동안 세포를 고정한다. 0.4% SRB(sulforhodamine B)로 세포를 염색하고, 착색된 SRB를 10 mM Trisima base로 용해하여 520 nm에서의 흡광도 값을 얻는다. 약물을 가하지 않은 well



Scheme 1. Flow scheme of SRB(sulforhodamin B) Assay.

(C)과 약물을 가한 각 well(T)의 흡광도를 측정하고, 약물을 처음 가할때의 well(Tz)의 흡광도와 비교하여, $[(T-Tz)/(C-Tz)]$ 100의 수식으로 세포독성을 계산하였고, Tz)T인 경우에는 $[(T-Tz)/(C)]$ 100의 수식으로 계산하였다. Fig. 1에 개략적인 실험방법을 정리하였다.

결과 및 고찰

수 천년동안 민간에서 식용으로 사용해온 야생의 식용식물중에 항암효과가 있을것으로 사려되는 것 약 20여종을 hexane 또는 ethylacetate로 추출하여 5종의 human solid tumor cell에 적용시켜 보았다. 실험에 사용한 A549(non-smal cell lung cancer cell line), SK-OV-3(ovarian cancer cell line), SK-MEL-2(malignant melanoma cell line), XF498(central nerve system cancer cell line), HCT-15(colorectal adenocarcinoma cell line)은 NCI(National Cancer Institute)에서 공급받은 것이며, 암세포주들에대한 세포독성실험은 SRB assay법으로 실시하였다. Table I에 미역취, 치자, 복분자, 명아주, 들나물의 hexane 또는 ethylacetate추출물에대한 세포독성실험결과를 나타내었다. 미역취와 명아주의 hexane 추출물은 유의적인 세포독성을 나타내었으며 HCT-15 cell line의 경우에는 각각 33.25 µg/ml와 22.42 µg/ml 농도에서 ED₅₀ 값을 나타내었다. 그러나 SK-OV-3 cell의 경우는 모두 100 µg/ml농도 이상의 ED₅₀ 값을 나타내어 세포에 특이적이며 선택적인 독성을 나타냄을 알수 있다. 오매, 모과, 아카시아,

Table I. Cytotoxicity of natural product against A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF-498 and HCT-15 *in vitro*

samples	conc. (µg/ml)	A549	SK-OV-3	K-MEL-	XF-498	HCT-15
<i>Solidago</i>	3.13	96.10	99.20	99.80	98.17	97.89
<i>virga-aurea</i>	6.25	98.15	98.35	99.36	96.11	94.00
<i>var. asiatica</i>	12.50	92.44	98.82	90.15	95.23	85.24
hexane ext.	25.00	78.65	99.00	87.50	88.56	72.24
	50.00	60.11	98.41	70.30	65.82	54.59
	100.00	12.43	63.03	-6.08	27.12	-24.32
<i>Gardenia</i>	3.13	99.27	98.39	99.58	99.71	99.28
<i>jasminoides</i>	6.25	99.83	99.56	99.37	99.88	97.37
EtOAc ext.	12.50	99.10	99.36	98.83	98.91	99.20
	25.00	99.91	98.81	95.36	98.40	94.50
	50.00	92.46	91.74	82.85	93.12	96.47
	100.00	82.38	92.32	78.79	85.66	83.47
<i>Gardenia</i>	3.13	99.28	98.78	98.97	99.82	99.92
<i>jasminoides</i>	6.25	98.92	97.15	99.04	99.68	99.92
hexane ext.	12.50	99.48	99.44	98.12	99.61	99.77
	25.00	92.87	99.87	92.36	99.61	95.76
	50.00	76.18	99.36	72.65	98.80	71.53
	100.00	39.18	78.56	49.51	76.94	23.84
<i>Rubus</i>	3.13	98.07	97.68	99.22	98.98	99.68
<i>coreanus</i>	6.25	96.98	96.80	99.08	98.11	99.68
hexane ext.	12.50	98.95	97.26	87.28	97.81	98.20
	25.00	86.77	99.71	75.69	91.50	97.76
	50.00	63.82	94.20	57.67	61.16	91.43
	100.00	25.79	66.78	31.84	35.45	90.97
<i>Chenopodium</i>	3.13	99.96	99.45	99.84	99.79	97.03
<i>album</i>	6.25	99.78	99.70	99.72	98.80	93.41
hexane ext.	12.60	93.24	98.75	94.59	97.49	62.91
	25.00	85.52	99.28	82.88	87.15	58.81
	50.00	71.53	99.08	60.08	71.54	27.12
	100.00	32.79	57.25	-15.19	36.80	-32.02
<i>Sedum</i>	3.13	102.22	98.96	98.55	99.82	97.78
<i>sarmentosum</i>	6.25	103.14	98.78	97.17	99.72	96.41
hexane ext.	12.50	97.10	99.28	98.99	99.52	95.78
	25.00	87.96	99.72	79.88	98.14	94.63
	50.00	71.67	97.26	62.95	77.06	94.53
	100.00	30.77	37.62	7.85	33.89	89.41

Table II. Cytotoxicity natural product against A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF-498 and HCT-15 *in vitro*

samples	conc. (µg/ml)	A549	SK-OV-3	K-MEL-	XF-498	HCT-15
<i>Prunus</i>	3.13	99.70	99.29	97.32	99.68	98.61
<i>mume</i>	6.25	99.11	98.54	99.97	99.82	99.70
hexane ext.	12.50	98.05	98.21	98.75	96.35	97.54
	25.00	99.01	99.76	99.03	99.07	97.96
	50.00	87.29	98.61	99.72	93.16	88.85
	100.00	86.58	100.05	99.13	93.68	82.53
<i>Chaenomeles</i>	3.13	99.73	97.34	99.10	98.23	97.93
<i>japonica</i>	6.25	98.02	98.88	99.21	99.75	98.74
EtOAc ext.	12.50	99.47	99.56	99.62	99.75	95.31
	25.00	98.88	98.25	99.29	98.68	81.90
	50.00	95.46	98.25	99.62	98.58	65.32
	100.00	93.27	98.60	99.14	91.37	47.44

Table II. Continued.

samples	conc. (µg/ml)	A549	SK-OV-3	K-MEL-	XF-498	HCT-15
<i>Chaenomeles japonica</i> hexane ext.	3.13	98.32	99.21	97.68	96.65	99.66
	6.26	94.75	100.37	98.76	98.75	100.77
	12.50	95.36	101.18	99.59	95.52	98.52
	25.00	98.53	100.16	99.97	97.99	101.94
	50.00	95.13	102.67	98.28	92.10	92.59
	100.00	97.92	102.34	96.82	88.84	92.73
<i>Robinia pseudo-acacia</i> hexane ext.	3.13	97.64	99.83	97.37	99.50	97.54
	6.25	94.87	97.86	98.91	99.07	98.76
	12.50	95.86	98.75	98.62	95.79	97.95
	25.00	99.76	99.39	99.68	99.70	97.95
	50.00	96.61	99.91	96.60	97.83	99.01
	100.00	89.99	98.81	90.45	95.96	89.30
<i>Morus alba</i> hexane ext.	3.13	96.91	97.68	99.94	99.61	99.33
	6.25	97.83	95.84	99.90	98.62	99.60
	12.50	99.44	97.93	98.50	99.93	99.96
	25.00	99.68	99.33	99.55	97.96	99.50
	50.00	99.10	99.01	98.66	95.07	94.31
	100.00	97.39	88.77	90.04	87.09	98.77
<i>Aster scaber</i> hexane ext.	3.13	97.32	99.86	99.46	99.01	98.93
	6.25	98.04	97.24	101.70	96.12	100.60
	12.50	96.62	98.37	96.27	95.68	102.34
	25.00	98.76	100.80	93.12	90.00	102.83
	50.00	98.17	101.51	97.97	94.40	97.93
	100.00	97.73	98.28	84.13	89.04	98.35

Table III. Cytotoxicity natural product against A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF-498 and HCT-15 *in vitro*

samples	conc. (µg/ml)	A549	SK-OV-3	K-MEL-	XF-498	HCT-15
<i>Chrysanthemum sinense</i> EtOAc	3.13	98.40	99.57	99.24	98.62	95.60
	6.25	96.02	98.80	98.67	99.98	93.39
	12.5	93.47	96.01	95.70	99.83	91.62
	25	95.94	97.93	93.00	96.80	63.99
	50	76.25	95.16	78.21	95.61	71.94
	100	57.34	97.24	67.76	87.45	54.07
<i>Chrysanthemum sinense</i> hexane ext.	3.13	101.43	106.34	100.79	105.13	98.04
	6.25	100.44	102.07	103.47	106.32	96.39
	12.5	52.53	102.67	102.87	100.97	82.92
	25	-68.24	99.73	71.19	75.68	-38.37
	50	-70.77	28.31	-78.10	-17.47	-97.08
	100	-79.39	-99.95	-86.89	-95.31	-92.78
<i>Oenanthe stolonifera</i> hexane ext.	3.13	100.24	99.34	98.79	105.01	64.79
	6.25	100.92	99.24	98.82	103.25	101.58
	12.5	102.28	100.00	98.09	105.10	96.29
	25	101.79	102.44	99.42	99.23	96.15
	50	94.76	100.96	94.01	99.18	98.83
	100	94.03	102.28	98.42	95.43	99.19
<i>Allium tuberosum</i> hexane ext.	3.13	97.84	98.72	93.73	95.41	96.33
	6.25	88.67	98.28	88.70	98.14	93.83
	12.5	90.40	99.50	86.96	97.64	89.74
	25	68.88	99.84	75.15	87.91	71.66
	50	25.14	71.74	30.97	68.76	32.27
	100	-69.93	3.38	-83.17	041.00	-94.93

Table III. Continued.

samples	conc. ($\mu\text{g/ml}$)	A549	SK-OV-3	K-MEL-	XF-498	HCT-15
<i>Portulaca oleracea</i> hexane ext.	3.13	99.90	102.36	96.67	97.91	98.74
	6.25	98.44	98.07	98.26	99.98	97.47
	12.5	96.64	96.67	97.01	98.57	97.37
	25	92.78	99.18	87.59	99.26	90.71
	50	81.59	97.97	82.47	96.53	71.75
	100	31.73	99.46	49.38	52.65	20.08
<i>Beta vulgaris</i> hexane ext.	3.13	93.72	99.15	98.63	98.76	95.28
	6.25	92.59	98.35	95.34	99.89	97.09
	12.5	91.59	98.67	90.00	99.72	91.16
	25	72.59	98.83	82.52	93.56	68.97
	50	30.88	98.08	49.53	64.79	43.59
	100	-69.51	14.25	-66.43	-6.63	-78.17

Table IV. Cytotoxicity of natural product against A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF-498 and HCT-15 *in vitro*

samples	conc. ($\mu\text{g/ml}$)	A549	SK-OV-3	K-MEL-	XF-498	HCT-15
<i>Arctium lappa</i> hexane ext.	3.13	100.60	95.96	99.62	98.75	99.67
	6.25	97.65	101.03	100.30	99.37	100.80
	12.5	99.85	99.98	96.61	99.49	95.91
	25	101.86	98.90	94.40	94.93	97.73
	50	101.23	96.72	97.45	99.63	91.34
	100	99.59	97.08	84.41	91.48	90.87
<i>Mentha arvensis</i> var. <i>piperascens</i> EtOAc	3.13	99.32	98.75	99.78	99.72	99.56
	6.25	96.97	99.19	96.38	99.41	99.79
	12.5	97.18	99.24	99.57	98.66	95.25
	25	99.19	98.47	87.92	96.67	96.41
	50	99.95	98.26	99.53	99.95	95.25
	100	89.83	98.98	97.35	95.63	90.20
<i>Mentha arvensis</i> var. <i>piperascens</i> hexane ext.	3.13	102.56	102.89	103.38	106.60	108.65
	6.25	98.86	98.01	101.43	105.61	107.55
	12.5	101.14	103.56	104.06	107.22	108.31
	25	89.09	105.18	99.23	99.47	100.50
	50	84.87	102.77	95.61	95.15	101.74
	100	77.90	107.63	93.81	89.41	104.14
<i>Ixeris dentata</i> hexane ext.	3.13	94.77	98.10	100.23	99.43	97.06
	6.25	91.47	99.77	89.87	99.34	95.66
	12.5	89.09	92.33	87.99	95.49	90.37
	25	67.87	60.28	67.46	82.52	56.59
	50	26.98	12.15	17.87	38.21	0.12
	100	-77.29	-55.79	-94.54	-95.08	-93.26
<i>Artemisia asiatica</i> hexane ext.	3.13	97.30	96.07	99.18	98.99	98.04
	6.25	98.53	95.48	96.68	98.80	99.20
	12.5	98.77	96.55	99.89	96.73	99.62
	25	97.11	95.22	99.07	98.84	99.36
	50	88.19	99.26	96.07	98.97	95.97
	100	86.24	99.94	96.07	98.10	77.43

오디, 취나물의 hexane 또는 ethylacetate 추출물
에 대한 세포독성실험 결과는 5종의 암세포 모두에 유
의적인 독성을 나타내지 않았다. 실험결과는 Table
II에 정리하였다. Table III에 의하면 국화, 부추, 근

대의 hexane 추출물은 5종의 암세포 모두에 유의적
인 세포독성을 나타내었다. 특히 국화는 hexane 추
출물에서는 10-50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 ED_{50} 값을 나타
낸 반면 ethylacetate 추출물은 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도 이

Table V. Effective dose of 50% cell growth inhibition of natural product against A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF-498 and HCT-15 *in vitro*

samples	ED ₅₀ (µg/ml)				
	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF-498	HCT-15
<i>Solidago virga-aurea</i> var. <i>asiatica</i> hex.	47.37	>100	44.82	63.5	33.25
<i>Chenopodium album</i> hex.	73.88	>100	39.47	79.87	22.42
<i>Chrysanthemum sinense</i> hex.	10.64	49.33	17.65	23.54	12.02
<i>Allium tuberosum</i> hex.	26.66	53.16	26.68	37.28	26.3
<i>Beta vulgaris</i> hex.	27.65	74.79	30.34	45.68	27.76
<i>Ixeris dentata</i> hex.	26.2	25.67	24.87	28.32	23.3
<i>Sedum sarmentosum</i> hex.	71.51	121.9	47.56	83.83	>100

ED₅₀: Effective dose of 50% cell growth inhibition. hex.: hexane extract. All data are represented mean of at least three distinct experiment.

상의 ED₅₀ 값을 나타내어 국화의 경우 hexane에 의해 추출되고 ethylacetate에는 녹지 않는 성분이 유효물질로 지속적인 분리와 정제를 할만한 가치가 있다고 사려된다. Table IV에 우영, 박하, 썬바귀, 애엽의 세포독성실험 결과를 나타내었다. 썬바귀의 hexane 추출물이 5종 암세포 모두에 유의적인 세포독성을 나타내었으며 ED₅₀ 값을 Table V에 정리하였다. 이와 같이 식용으로 널리 이용되는 식물을 이용하여 암세포주에 대한 세포독성실험을 행한 결과 미역취, 명아주, 국화, 부추, 근대, 썬바귀, 들나물의 hexane 추출물이 유의적인 세포독성을 나타내었다. 특히 국화, 부추, 근대, 썬바귀의 hexane 추출물은 5종의 암세포에 모두 50 µg/ml 농도이하에서 ED₅₀ 값을 나타내어 우수한 항암제로서의 가능성이 있으므로, 유효물질을 분리하고 계속해서 세포독성기작을 연구할 필요가 있다고 사려된다.

결 론

실험에 사용한 sample들은 수 천년동안 식용으로 이용해온 식물의 hexane 또는 ethylacetate 추출물로서 부작용이 없고 경제적인 항암성분 검색을 목적으로 본 실험을 행하였다. 실험에 이용한 식물중 미역취, 명아주, 국화, 부추, 근대, 썬바귀, 들나물의 hexane 추출물이 인체 유래 5종의 암세포에 유의적인 세포독성을 나타내었으며 Table V에 ED₅₀을 표시하였다. 이 식물들은 약 10-100 µg/ml 의 ED₅₀ 값을 가지며, 특히 국화, 부추, 근대, 썬바귀 hexane 추출물은 5종 암세포 모두에 유의적인 세포독성을 나타내었다. 국화, 부추, 근대, 썬바귀는 생활주위에서 흔히 볼 수 있는 식용의 식물로서 5종의 암세

포에 모두 50 µg/ml 이하의 ED₅₀ 값을 나타내어 경제적이며 동시에 우수한 항암제로서의 가능성을 시사하고 있어, 지속적인 유효성분 분석과 암세포에 대한 작용기작 연구를 수행할 필요가 있다.

인용문헌

- Critchfield, J. W., Welsh, C. J., Phang, J. M. and Yeh, G. C. (1994) Modulation of adriamycin and efflux by flavonoids in HCT15 colon cells. *Biochem. Pharmacol.* 48: 1437-1440.
- Klohs, W. D. and Steinkampf, R. W. (1988) Possible link between the intrinsic drug resistance of colon tumors and detoxification mechanism of intestinal cells. *Cancer Res.* 48: 3025-3028.
- 이인란, 송지영, 이윤실 (1992) 천연물로부터 항암물질의 분리. *생약학회지* 23: 132-138.
- 박재갑, 현진원, 임경화, 신진이, 원용진, 이영득, 신국현, 장일무, 우원식 (1993) 전통약용식물의 항암효과에 대한 연구. *생약학회지* 24: 223-230.
- 이인선, 박성희, 이인자 (1996) 전통 약용식물 권백의 항암효과에 대한 혈액암세포주 U937의 감수성 및 그 작용기구에 대한 분자생물학적 연구. *식품위생안전학회지* 11: 71-75.
- Ryu, S. Y., Choi, S. U., Lee, C. O. and Zee, O. P. (1992) Anticancer activity of *Psoralea corylifolia*. *Arch. Pharm. Res.* 15: 356-359.
- Skehan, P., Streng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Visica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. R. (1990) New colorimetry cytotoxicity assay for anti-cancer drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1107-1111.

(1996년 12월 22일 접수)