

紅花가 人體의 癌細胞柱에 미치는 影響

한 중 현 · 유 광 석* · 강 성 용*

ABSTRACT

Cytotoxicity of *Carthami Flos* on Human cancer cell-lines(I)

Han Jong-Hyun, Yoo Kwang-Suk, Kang Sung-Young*

Medicinal Resources Research Center of Wonkwang University,
College of Oriental Medicine, Dongshin University*

The purpose of this study was to investigate effect of water extract of *Carthami Flos* on the proliferation of human cancer cell-lines.

The effects of *Carthami Flos* on the proliferation of A431, HeLa, MOLT-4, K562 cells, Balb/c 3T3 cells, mouse thymocytes, splenocytes and human lymphocytes were estimated by MTT colorimetric assay.

The results were as follows;

1. *Carthami Flos* did not effect A431, HeLa, MOLT-4, K562 cells.
2. The cytotoxicity of mitomycin C on K562 cells was increased by the combination of *Carthami Flos*.
3. *Carthami Flos* inhibited the proliferation of Balb/c 3T3 cells.
4. *Carthami Flos* stimulated the proliferation of thymocytes.

* 원광대학교 의학자원연구소센터

** 동신대학교 한의과대학

- 5. Carthami Flos stimulated the proliferation of splenocytes.
- 6. Carthami Flos stimulated the proliferation of human lymphocytes.

I. 緒論

癌은 難治性 疾患으로 治療法도 多樣하여 外科的인 手術, 放射線療法, 化學療法 및 免疫療法등을 開發하여 使用하고 있다. 특히 癌腫에 따른 免疫, 化學療法들은 癌腫에 따른 感受性 및 治療後의 豫候, 副作用등으로 많은 問題點이 대두되고 있다.

現在 使用하고 있는 抗癌劑들은 生體에 대한 毒性이 심하여 正常的인 細胞의 代謝를 크게 抑制하거나 細胞의 突然變異 및 癌化를 助長할 수 있기 때문에 抗癌劑의 使用에 커다란 障礙로 指摘되고 있다. 이러한 問題點들을 解決하기 위하여 副作用이 적은 새로운 抗癌劑의 開發에 重點을 두고 있으며 특히 天然物로부터 有用한 抗癌劑를 開發하려는 勞力이 試圖되고 있다.

그 동안 進行되어 왔던 抗癌劑 開發 方法들은 주로 細胞毒性이 強力한 物質을 찾는 것이었지만 最近에는 細胞毒性은 弱하지만 既存 抗癌劑와 併用하여 抗癌性を 增加시키고 副作用을 줄일수 있는 物質을 찾기 위한 勞力들을 進行하고 있으며¹⁻³⁾, 이 方法에 대한 많은 關心을 가지고 있다.

본 實驗에서는 抗癌성이 있다고 알려진 紅花를 選擇하여 人體 皮膚癌細胞(human epidermoid carcinoma)인 A431 細胞, 子宮癌細胞(human cervix epitheloid carcinoma)인 HeLa 細胞, 急性白血病細胞(human acute lymphoblastic leukemia)인 MOLT-4 細胞, 慢性骨髓性白血病細胞(human myelogenous leukemia)인 K562 細胞에 대한 細胞毒성을 觀察하였으며, 抗癌劑인 mitomycin C와 併用하여 處理하였을 때의 細胞毒성을 觀察하였다. 한편 正常細胞에 대한 細胞毒성을 檢索하기 위하여 마우스 纖維芽細胞(Balb/c 3T3), 마우스 胸腺 및 脾臟細胞, human lymphocyte에 미치는 細胞毒성을 檢討한 結果 若

干의 知見을 얻었기에 이에 報告하는 바이다.

II. 實驗 材料 및 方法

1. 實驗 材料

1) 實驗 動物

胸腺 및 脾臟細胞 浮游液 調制時에는 6~8週齡 Balb/c 3T3系 마우스(수컷)를 使用하였다.

2) 試藥 및 機器

實驗에 使用한 試藥은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DME, Sigma), RPMI 1640(Gibco), mitomycin C(MMC, Kyowa), fetal bovine serum(FBS, Gibco), trypsin(Gibco), penicillin-streptomycin (Sigma), Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS-A, Sigma), 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide(MTT, Sigma), Ficoll-Hypaque (Sigma)등이며 기타 試藥은 1급 試藥을 使用하였다. 使用機器는 culture flask(Nunc), multi-well plate (96-well, Costar), Microplate Reader, (Dynatech MR5000), CO₂ incubator(Vision scientific Co.), centrifuge (VS-6000 CF), inverted microscope(Nikon Co.), freeze dry apparatus (Labconco)등을 使用하였다.

2. 實驗 方法

1) 試料의 調劑

本 實驗에 使用한 藥材는 市中 乾材藥房에서 良質의 것을 購入하여 精選하여 使用하였다.

Table I. The yield of water extract of *Carthami Flos*

韓藥名	生藥名	收得率(%)
紅花	Carthami Flos	21.0

紅花 30g에 蒸溜水 1,000 ml를 加하여 加熱 抽出 後, 過하여 濾液을 rotary evaporator로 濃縮 한 다음, freeze dryer로 凍結乾燥하여 粉末을 얻어 (Table I), 細胞實驗時에 蒸溜水에 溶解시킨 뒤 membrane filter(d 0.45 μ m)로 過 滅菌하여 使用 하였다.

2) 細胞柱 및 細胞 培養條件

A431, HeLa 및 Balb/c 3T3 細胞柱는 DME 培地 를, MOLT-4, K562, 마우스 胸腺 및 脾臟細胞와 human lymphocyte는 RPMI 1640 培地를 使用하였 으며 培地에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin(100 units/ml, 100 μ g/ml)을 添加하여 使用하였다.

系代 培養은 1:10~1:20 比率로 3일 間隔으로 하였다. 細胞 增殖에 미치는 藥材 및 抗癌劑의 影響을 觀察하기 위한 實驗은 系代培養 2일째의 細胞를 使用하였다.

3) MTT法에 의한 細胞 增殖率 測定

本 實驗에 使用한 MTT法은 Mosmann⁴⁾이 開發하여 Kotnik등⁵⁾이 變形시킨 方法으로, 96-well plate 의 각 well에 細胞 浮游液 100 μ l (2x10⁵ cells/ml) 를 接種하여 37 $^{\circ}$ C의 CO₂ incubator에서 24시간 培養 後 濃度別로 稀釋된 藥材 100 μ l를 넣고 37 $^{\circ}$ C의 CO₂ incubator에서 48시간 培養하였다. 培養 終了 4時間 前에 5 mg/ml 濃度로 DPBS-A에 稀釋된 MTT溶液 20 μ l를 각 well에 添加하고 培養 終了時까지 銀箔紙로 빛을 遮斷하였다. 培養 終了時 培養液을 除去한 後 生成된 formazan crystal을 DMSO 100 μ l로 溶出시킨 다음 發色된 각 well의 吸光度를 Microplate Reader를 利用하여 570 nm에서 測定하고 對照群의 吸光도와 比較하여 細胞 增殖率을 百分率로 換算하였다.

4) 細胞柱에 미치는 藥材의 影響

細胞柱에 미치는 紅花의 影響을 알아보기 위해 각 well에 細胞를 2x10⁵ cells/ml 濃度로 接種하고

24시간 培養하여 細胞를 附着시킨 후 紅花의 濃度를 多樣하게 處理하여 3)과 同一한 方法으로 測定 하였다.

5) 癌細胞柱 대한 mitomycin C의 IC₅₀ 測定

癌細胞柱의 增殖을 50% 抑制할 수 있는 mitomycin C의 濃度(IC₅₀)를 구하기 위해 각 well 에 細胞를 2x10⁵ cells/ml로 接種하고 24시간 培養 하여 細胞를 附着시킨 후, 抗癌劑를 多樣한 濃度로 癌細胞柱에 處理하여 3)과 同一한 方法으로 測定하여 IC₅₀ 을 計算하였다.

6) 癌細胞柱에 미치는 紅花와 mitomycin C 併用 處理 影響

癌細胞柱에 미치는 紅花와 抗癌劑의 併用處理 影響을 알아보기 위해 각 well에 細胞를 2x10⁵ cells/ml 濃度로 接種하고 24시간 培養하여 細胞를 附着시킨 후 多樣한 濃度の 紅花와 抗癌劑의 IC₅₀ 濃度를 附着된 細胞에 處理하여 3)과 同一한 方法으로 測定하였다.

7) 마우스 胸腺 및 脾臟細胞의 分離

마우스의 胸腺 및 脾臟細胞 分離는 Wysocki⁶⁾ 및 Mizel등⁷⁾의 方法을 利用하였다. Balb/c 3T3 마우스 를 頸椎脫骨하여 屠殺시킨 후 摘出した 胸腺 및 脾臟을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 粉碎하고 stainless mesh로 過하여 2회 洗滌한 다음 10 ml 注射器로 조심스럽게 細胞浮游液을 取하여 1500 rpm에서 10分間 遠心分離하였다. 얻어진 細胞를 DPBS-A에 在浮游시켜 3회 反復 洗滌한 후 胸腺 및 脾臟細胞를 分離하였으며 分離한 胸腺 및 脾臟細胞의 生存率 및 總細胞數를 hemocytometer를 利用하여 測定하였다.

8) 마우스 胸腺 및 脾臟細胞에 미치는 紅花의 影響

胸腺 및 脾臟細胞 富裕液을 RPMI 1640 培地로 稀釋하고 96-well plate에 1.2x10⁶ cells/ml 濃度로 接種하여 Concanavalin A 1 μ g/ml 및 紅花를 添加

한 후 37°C의 CO₂ incubator에서 48시간 배양한 다음, 배양 종료 4시간 전에 MTT試藥을 추가하였다. 배양 종료시 0.1N HCl에 용해시킨 10% SDS 100 μ l를 각 well에 추가하고 遮光狀態에서 18시간 더 배양한 후 發色된 각 well의 吸光度를 Microplate-Reader로 570 nm에서 測定하여 對照群의 吸光度에 대한 實驗群의 吸光度를 百分率로 換算하여 計算하였다.

9) Human lymphocyte의 分離

Human lymphocyte의 分離는 Callard⁸⁾ 및 Ly and Mishell⁹⁾ 등의 方法에 따라 健康한 成人 男子의 血液에 Ficoll-Hypaque溶液을 加하여 分離하였다. Heparin 處理된 注射器로 血液 10 ml를 取하여 12 ml의 DPBS-A에 混合한 다음 10 ml의 Ficoll-Hypaque溶液 위에 稀釋 血液을 層이 分明히 境界를 이루도록 조심스럽게 加했다. 3000 rpm에서 30分間 遠心分離한 후 pasteur pipet을 利用하여 Ficoll-Hypaque溶液 위층에 密集된 單核球 層을 取한 다음 5倍 부피의 DPBS-A로 稀釋하여 2500 rpm에서 10分間 遠心分離하였다. 얻어진 細胞를 DPBS-A에 在浮游시켜 2회 더 洗滌한 후

hemocytometer를 利用하여 細胞의 生存率 및 總細胞數를 測定하였다.

10) Human lymphocyte에 미치는 紅花의 影響 細胞를 RPMI 1640培地로 稀釋하여 96-well palte에 1.2x10⁶ cells/ml 濃度로 接種한 후 紅花를 添加하고 37°C의 CO₂ incubator에서 48時間 培養한 다음 培養 終了時 0.1N HCl에 溶解시킨 10% SDS 間 더 培養한 후 發色된 각 well의 吸光度를 Microplate-Reader로 570 nm에서 測定하여 對照群의 吸光度에 대한 實驗群의 吸光度를 百分率로 換算하여 計算하였다.

III. 實驗成績

1. 癌細胞柱에 미치는 紅花의 效果

A431, HeLa, MOLT-4 및 K562 細胞柱에 미치는 紅花의 直接的인 效果를 알아보기 위하여 各 細胞柱에 紅花를 0.1, 1 및 10 μ g/ml를 各各 加하여 培養하였다. 紅花를 처리하지 않은 對照群의 細胞生存率을 100%로 하였을 때 모든 細胞柱에서 細胞毒性을 나타내지 않았다(Table II).

Table II. Cytotoxicity of Carthami Flos on human epidermoid carcinoma(A431) cells, human cervix epitheloid carcinoma(HeLa) cells, human acute lymphoblastic leukemia (MOLT-4) cells and human myelogenous leukemia(K562) cells.

	A431	HeLa	MOLT-4	K562
Control	100±1.7	100±1.5	100±3.6	100±1.7
Carthami Flos 0.1	101.2±0.9	97.2±2.7	97.9±3.3	92.4±2.6
1.0	97.6±2.1	98.1±2.6	94.6±2.0	94.2±5.2
10.0(μ g/ml)	101.6±0.7	101.6±2.4	99.0±1.4	108.7±1.4

The value represents the mean±SE from 4 experiments.

*; Significantly different from control group.

2. 癌細胞柱에 대한 mitomycin C의 IC₅₀ 濃度

各 癌細胞柱의 增殖을 50% 抑制하는 mitomycin C의 濃度는 Table III과 같다.

Table III. IC₅₀ of mitomycin C on human cancer cell-lines

Drugs	IC ₅₀ (μg/ml)
A431	10.77
HeLa	3.57
MOLT-4	0.46
K562	22.1

3. 癌細胞柱에 미치는 紅花와 mitomycin C의 併用處理 效果

癌細胞柱에 미치는 紅花와 mitomycin C의 併用 處理 效果를 알아보기 위해 紅花를 0.1, 1 및 10 μg/ml까지 加하고 mitomycin C의 IC₅₀ 濃度를 添加하여 培養하였다. Mitomycin C의 IC₅₀ 濃度를 處理한 對照群의 細胞生存率을 100%로 하였을 때, A431, HeLa, MOLT-4 細胞柱에서는 紅花를 併用 處理한群에서 細胞 增殖이 抗癌劑 單獨 處理時에 비해 別 差異가 없었다. 그러나 K562 細胞柱에서는 1.0 및 10 μg/ml을 併用 處理한 群에서 K562 細胞 增殖이 抗癌劑 單獨 處理時 보다 有意한 抑制를 보였다 (Table IV).

Table IV. The combined effect of *Carthami Flos* and mitomycin C on human epidermoid carcinoma(A431) cells, human cervix epitheloid carcinoma(HeLa) cells, human acute lymphoblastic leukemia(MOLT-4) cells and human myelogenous leukemia(K562) cells.

	A431	HeLa	MOLT-4	K562
Control	100±1.7	100±2.2	100±1.5	100±1.7
Carthami Flos	0.1	105.3±2.0	96.5±1.2	102.2±1.0
	1.0	99.7±1.3	96.1±3.7	102.7±1.4
	10.0(μg/ml)	104.0±2.1	95.8±2.9	105.6±1.7
				85.2±1.6*
				83.2±1.6*

The value represents the mean±SE from 4 experiments.

*: Significantly different from control group(p<0.01).

4. 3T3, Thymocytes, Splenocytes, Lymphocyte 細胞柱에 미치는 紅花의 效果

마우스 纖維芽細胞柱인 Balb/c 3T3 細胞, 마우스 胸腺細胞 培養系, 마우스 脾臟細胞 培養系 및 human lymphocyte에 대한 紅花의 直接效果를 알

아보기 위하여 紅花를 0.1, 1 및 10 μg/ml를 各各 加하고, 對照群의 細胞生存率을 100%로 하였을 때 Balb/c 3T3 細胞의 增殖에 影響을 미치지 않았으나 마우스 胸腺細胞 培養系, 마우스 脾臟細胞 培養系 및 human lymphocyte에 대하여 紅花 1.0 및 10 μg/ml의 濃度에서 活性을 增加시켰다(Table V).

Table V. Effect of Carthami Flos on Balb/c 3T3 cells, mouse thymocytes, mouse splenocytes and human lymphocytes.

Drugs	3T3	Thymocytes	Splenocytes	Lymphocyte
Control	100±2.0	100±0.5	100±1.0	100±1.6
Carthami Flos 0.1	96.2±2.4	101.4±0.7	106.8±3.1	103.7±3.8
1.0	94.3±2.7	105.4±1.8	118.1±2.9*	111.1±2.3*
10.0(μg/ml)	95.1±1.9	121.8±1.1**	140.3±3.2**	112.7±0.5**

The value represents the mean±SE from 4 experiments.

; Significantly different from control group(; P<0.01, **; P<0.001).

IV. 考察

紅花는 菊花科(Compositae)에 屬하는 1年生 草本인 잇꽃의 花瓣으로 夏季에 花冠이 鮮紅色이 되면 採取, 陰乾하여 藥으로 使用한다. 紅花의 性味는 辛溫無毒하며 歸經은 心, 肝經이다. 效能으로는 活血通經, 祛瘀止痛하여 血滯로 인한 經閉, 腹痛, 癥瘕 또는 産後 血暈등과 虛血阻滯로 인한 病症에 適用한다¹⁰⁻¹²⁾.

紅花의 成分은 紅色色素인 carthamin (0.3-0.6%), 黃色色素인 saflor yellow(20-30%), 프라보노이드인 carthamidine, neocarthamin 등외에 지방유, 리그난 등을 含有하며 藥理作用으로는 孫¹³⁾에 의하면 紅花煎劑는 마우스, 토끼, 모르모트, 고양이, 개 등의 子宮에 대하여 in vivo, 또는 in vitro 에서 緊張性を 높이고 律動性的 收縮을 나타낸다. 大量에서는 自發運動은 增強되며 痙攣을 일으키지만 이 作用은 妊娠子宮에서 顯著하고 持續的으로 나타난다. 腸管平滑筋에 대해서도 興奮作用을 일으키지만 作用은 持續的이지는 않다.

한편, 後藤 등¹⁴⁾은 햄스터의 子宮에 대해서, 渡邊 등¹⁵⁾은 인플루엔자 바이러스등에 대한 抗菌作用, 山原 등¹⁶⁾은 rat 스트레스 潰瘍에 대한 研究를 찾아볼 수 있다.

본 實驗에서는 抗癌性이 있다고 알려진 紅花를

選擇하여 人體 皮膚癌細胞(human epidermoid carcinoma)인 A431 細胞, 子宮癌細胞(human cervix epitheloid carcinoma)인 HeLa 細胞, 急性白血病細胞(human acute lymphoblastic leukemia)인 MOLT-4 細胞, 慢性骨髓性白血病細胞(human myelogenous leukemia)인 K562 細胞에 대한 細胞毒性을 觀察하였으며, 抗癌劑인 mitomycin C와 併用하여 處理하였을 때의 細胞毒性을 觀察하였다. 한편 正常細胞에 대한 細胞毒性을 檢索하기 위하여 마우스 纖維芽細胞(Balb/c 3T3), 마우스 胸腺 및 脾臟細胞, human lymphocyte에 미치는 細胞毒性을 檢討하였다.

紅花를 물로 抽出한 뒤 多樣한 人體 癌細胞柱에 대한 細胞毒性을 測定한 結果 人體 急性白血病 細胞柱인 MOLT-4 細胞, 皮膚癌 細胞柱인 A431 細胞, 子宮癌細胞柱인 HeLa 細胞, 慢性骨髓性白血病 細胞柱인 K562 細胞에 대해서 細胞毒性을 나타내지 않았다.

既存 抗癌劑인 mitomycin C(MMC)와 併用處理를 實施하여 既存 抗癌劑의 作用을 增加시킬 수 있는 可能性을 檢討한 結果 A431, HeLa 및 MOLT-4 細胞柱에 대해 紅花를 mitomycin C와 併用 處理시 mitomycin C 單獨 處理時에 비해 有意한 細胞毒性을 觀察할 수 없었으나, K562 細胞柱에 대해 紅花는 mitomycin C와 併用 處理時 mitomycin C 單獨

處理時에 비해 17% 정도의 細胞毒性을 增加시켰으나, 이러한 結果는 慢性骨髓性白血病에 대해서 紅花와 抗癌劑인 MMC를 併用 使用時 抗癌劑의 作用을 增強시킬 수 있음을 意味하는 것이며, 이러한 併用效果는 抗癌劑의 用量을 줄일 수 있음을 示唆하는 것이다. 이러한 作用은 細胞속으로 抗癌劑의 uptake를 促進하여 나타나는 것인지 아니면 또다른 機轉에 의해 作用하는 것인지는 追後 研究되어야 할 課題이다.

그러나 癌細胞柱에 대해 細胞毒性을 나타내는 物質들은 正常細胞에 대하여도 細胞毒性을 나타낼 수 있는 가능성이 있기 때문에, 正常細胞의 모델로 가장 흔히 사용되는 Balb/c 3T3 細胞柱에 대해서 紅花는 細胞毒性을 나타내지 않았다.

一般的으로 抗癌劑들은 免役細胞에 대한 副作用이 있는것으로 알려져 있기때문에 紅花가 마우스 胸腺, 脾臟細胞 및 human lymphocyte에 미치는 영향을 測定함으로써 免役細胞에 대한 副作用을 檢索하여 보았다. 그 결과 紅花는 胸腺細胞, 脾臟細胞 및 human lymphocytes의 活性을 增加시켰다.

V. 結論

人體 癌細胞柱에 대한 紅花의 直接的인 細胞毒性和 抗癌劑와 併用時의 細胞毒性, 纖維芽細胞인 Balb/c 3T3 細胞, 마우스 胸腺 및 脾臟細胞, human lymphocyte에 대한 細胞毒性을 測定하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 紅花는 A431, HeLa, MOLT-4 및 K562 細胞의 增殖에 影響을 미치지 못했다.
2. 紅花는 mitomycin C와 併用處理時 K562 細胞의 增殖을 mitomycin C 單獨處理時보다 抑制하였다.
3. 紅花는 마우스 纖維芽細胞인 Balb/c 3T3 細胞의 增殖을 抑制하였다.
4. 紅花는 마우스 胸腺細胞의 增殖을 促進하였다.
5. 紅花는 마우스 脾臟細胞의 增殖을 促進하였다.
6. 紅花는 human lymphocyte의 增殖을 促進하였다.

감사의 말씀

이 연구는 1996년도 동신대학교 교내연구비와 한국과학재단 후원 의약자원연구센터의 지원에 의하여 이루어졌다. 이에 깊이 감사드린다.

參考文獻

1. J.S. Eun, H.J. Cho and J.H. Yang: Kor. J. Pharmacogn., 25(3), 356 (1994).
2. J.S. Eun and W.Y. Song: Kor. J. Pharmacogn., 25(2), 144 (1994).
3. J.S. Eun: Kor. J. Pharmacogn., 23(4), 248 (1992).
4. Mosmann, T.: J. Immunol. methods. 65, 55-63 (1983).
5. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr.: J. Immunol. methods. 129, 23 (1990).
6. Wysocki, L.J. and Sato, V.L.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75, 2844 (1978).
7. Mizel, S.B., Openheim, J.J. and Rosensteich, D.L.: J. Immunol. 120, 1497 (1979).
8. Callard, R.E., Shields, J.S. and Smith, S.H.: Assay for human B cell growth and differentiation factors. In lymphokines and interferons, Morris and Gearing(eds), IRL Press, Oxford, p.345 (1987).
9. Ly, I.A. and Mishell, R.I.: J. Immunol. Methods 5, 239 (1974).
10. 王浴生:中藥藥理與應用, 人民衛生出版社 p.462-469 (1983)
11. 江蘇新醫學院編:中藥大辭典, 上海科學技術出版社, p.992-993 (1977)
12. 辛民教:原色臨床本草學, 南山堂, p.467-468 (1986)
13. 孫世錫:紅花及藏紅花的藥理研究,中華醫學雜誌 5, 443 (1955)
14. 後藤 實登:植物 中の 子宮收縮 成分의 研究(그

- 의 1), 武田研究所年報 16, 21 (1957)
15. 渡邊 武登:植物의 抗菌性 成分의 研究(그의 1),
武田研究所年報 14, 92 (1955)
16. 山原條二登:生藥의 活性 成分에 關한 研究(제1
보)- 生藥의 抗潰瘍作用, 生藥 28, 33 (1974)