

한국산 생약으로부터 항암물질의 개발 (제 8보) 포공령 추출물이 인체 피부흑색종세포에 미치는 세포독성작용

오인교, 유은아¹, 한두석², 강길웅³, 백승화^{3*}

원광보건대학 환경공업과, ¹성신여자대학교 자연과학대학 화학과

²원광대학교 치과대학 구강해부학교실, ³자연과학대학 화학과

Development of Anticancer Agents from Korean Medicinal Plants (Part 8). Cytotoxic Activity of Taraxaci Herba Extract against Human Skin Melanoma Cells

In Kio Oh, Eun Ah Yoo¹, Du Seok Han², Kil Ung Kang³
and Seung Hwa Baek^{3*}

Department of Environmental Industry, Wonkwang Health College, Iksan 570-750, Korea;

¹*Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Sungshin Women's University,*

Seoul 136-742, Korea; ²*Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, and*

³*Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Wonkwang University,*

Iksan 570-749, Korea

Abstract - In the present study, we have evaluated cytotoxic effects of Taraxaci herba extract on human skin melanoma cells. The light microscopic study showed morphological changes of the treated cells. Disruptions in cell organelles were determined by colorimetric methods: MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide), NR (Neutral red) and SRB (Sulforhodamine B protein) assay. These results suggest that Taraxaci herba retains a potential antitumor activity.

Key words - Taraxaci herba; MTT assay; NR assay; SRB assay; antitumor activity.

포공령은 북반구에서 남미에 이르기까지 여러종이 널리 분포되어 있으며, 의약품으로는 야생종 또는 재배하여 뿌리를 이용하였다. 주로 공급지역은 불가리아, 유고슬라비아, 루마니아, 헝거리, 폴란드와 영국등지에서 얻었다. 포공령은 우리나라 전지역에 자생하고 있으며, 식용과 약용으로 이용된다. 주요 성분으로는 1960년대부터 이루어져 Booth¹⁾는 꽃에서 색소성분인 taraxacin을, Nitsche와 Pleugel²⁾은 꽃잎에서 neoxanthin과 색소인 xantho-

phyll을 분리하였고, Hansel 등³⁾은 줄기와 뿌리에서 sesquiterpene인 eudesmanolide, tetrahydrodroridentim B, eudesmanolide-β-D-glucopyranoside 및 germacranolide acids 등을 분리하였으며, Rauwald 등⁴⁾은 acylated γ-butyloacetone glucoside와 teraxacoside를 분리하였다. 민간약품으로는 혈액청결제, 이노제, 식욕증진, 소화촉진, 관절염과 습진 등에 널리 애용되었다.⁵⁾ 김⁶⁾은 포공령의 물과 알콜추출액중 알콜추출 회석시액이 HeLa-cell에 대한 cytotoxicity로서 세포변성을 강하게 일으킨다고 보고하였다. 최근에 김 등⁷⁾은

*교신저자 : Fax 0653-841-4893

포공령 물추출물이 진통과 항염작용에 비교적 양호하게 나타났다고 보고하였으며, 이는 흰꽃 민들레보다 노란꽃 민들레가 더 좋은 유효성분이 함유되어 있음을 의미한다. 이 등⁸⁾은 포공령의 메탄올 추출물을 핵산, 클로르포름, 부탄올을 계통분획 후 각 분획의 항위염작용을 염산-에탄올 위손상 모델을 이용하여 실험한 결과, 물분획이 강한 위손상 억제작용을 나타낸다고 보고한 바 있다. 한 등⁹⁾은 포공령으로부터 물 추출물을 조제하여 인체 구강유상피암종세포에 적용한 후, 일차검색에 이용되는 비색법 중 가장 민감하고 안정적인 MTT 정량분석법과 SRB 정량분석법을 이용하여 항암활성을 측정하였고, 세포증식의 지표가 되는 Ag-NOR 염색방법을 이용하여 Ag-NOR 수를 산정하여 항암활성을 보고한 바 있다.

본 연구는 포공령으로 노란꽃 민들레의 꽃을 건조하여 증류수로 추출한 물 추출물을 조제하여 인체 피부흑색종세포에 적용한 후, 1차 검색방법인 비색법 중 가장 민감하고 안정적인 MTT 정량분석법, NR 정량분석법과 SRB 정량분석법을 이용하여 세포의 항암활성을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에서 사용한 포공령은 원광대학교 한방병원에서 구입하여 외부형태를 비교 조사하여 확인 후 사용하였다. 실험에 사용된 식물체는 원광대학교 자연과학대학 천연물화학교실에 보관되어 있다.

검액재료 - 본 연구에 사용한 포공령은 원광대학교 한방병원에서 구입한 것을 검정 받아 포공령 600g을 2개의 3000 ml 등근플라스크에 1차 증류수 1500 ml과 포공령 300 g씩 넣고, 100°C에서 3시간 동안 물 증탕하여 환류추출하였다. 이와같이 3번 반복하여 얻은 추출액을 0.45 µm 필터로 여과한 후 여과액을 50°C에서 감압농축시킨 후 동결건조하였다. 건조된 양은 약 50 g 정도 얻을 수 있었다. 추출액은 실험직전에 생리식염수로 용해시켜 사용하였다.

시약 - 세포배양에 사용한 RPMI-1640, fetal bovine serum, penicillin G, streptomycin, fungizone 시약은 Gibco제 GR급이었으며, MTT정량, NR정량 및 SRB정량에 사용한 시약은 Sigma사

에서 구입하였다. 증류수는 3차 증류하여 사용하였다.

실험기기 - 세포의 배양은 CO₂ incubator(Shel-lab Co., U.S.A)를 사용하였고, 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기를 사용하였으며, 현미경은 도립 현미경(Inverted Microscope, Olympus)을 사용하였다. MTT정량, NR정량 및 SRB정량은 ELISA reader(Spectra Max 250, U.S.A., 520 nm)를 사용하였다.

시료의 처리 - 조제한 시료는 즉시 4°C 냉장고에 저장하였다가 사용직전에 배지로 희석하여 10⁻²~10⁻⁶ mg/ml 농도를 실험에 사용하였다.

세포배양 - 포공령 추출물에 대한 항암작용을 측정하기 위하여 서울대학교 암연구소에서 분양 받은 인체 피부흑색종세포(SK-MEL-3)를 사용하였다. 인체 피부흑색종세포는 RPMI-1640에 10% fetal bovine serum과 penicillin G(25 unit/ml), streptomycin(25 µg/ml)를 첨가하여 사용하였다. 각 세포의 배양은 온도 37°C, 습도 95%, 탄산가스 농도 5%의 CO₂ incubator를 사용하였다. 실험을 위하여 일차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin으로 처리하여, Turk형 혈구계산기를 이용하여 세포수가 2×10⁴ cells/ml가 되도록 세포부유액을 만들었다.

MTT 정량분석법 - Mosmann의 방법¹⁰⁾에 의하여, 세포를 포공령 추출물이 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 분석 당일 조제한 MTT 50 µg/ml가 포함된 배양액을 well당 1ml씩 넣어 3시간 배양하였다. 배양후 배양액을 버리고, dime-thylsulfoxide(DMSO)를 2 ml/well씩 넣어 5분간 실온 방치하여 MTT formazan을 용해한 후, ELISA reader로 MTT의 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

NR 정량분석법 - Borenfreund와 Puerner의 방법¹¹⁾에 의하여 세포를 배양용기당 2.0×10⁴ cells/ml이 되도록 24 well multidish에 분주하여 24시간 배양 후, 포공령 추출물이 포함된 배양액으로 교환하고, 48시간 동안 배양한 다음 50 µg/ml의 neutral red(Sigma)가 포함된 배양액을 37°C 어두운 곳에서 overnight 시킨 후, well당 1ml씩 넣어 3시간 동안 배양하였다. 배양 완료후 배양액을 버리고 phosphate buffered saline(PBS)으로 2~3회 세척하여 1% formaldehyde-1% CaCl₂를 넣

어 실온에 방치하여 3시간 동안 용해소체내에 축적된 NR을 용출하였다. 용출된 NR의 흡광도를 ELISA reader로 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

SRB 정량분석법 - Skehan 등의 방법¹²⁾에 따라 세포를 포공령 추출물이 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 배양액을 버리고 5회 세척한 후 0.4% sulforhodamine B protein(SRB)를 200 µl씩 첨가하여 1시간 동안 실온에 방치한 다음 1% acetic acid로 5회 세척하고 완전히 건조하였다. 10 mM Tris base로 결합된 protein stain을 녹인 후 ELISA reader 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

세포의 광학현미경적 관찰 - 광학현미경으로 세포를 관찰하기 위하여 인체 피부흑색종세포는 MTT 정량, NR 정량 및 SRB 정량을 하기 전에 도립현미경으로 관찰하고 사진을 촬영하였다.

통계처리 - 실험결과와 통계처리는 Student's *t*-test에 준하였고, P-value가 0.05 이하일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

인체에 사용할 때 독성에 의한 부작용이 적고, 항암작용이 강한 항암제를 한국산 생약으로부터 개발하기 위한 일환으로, 한 등¹³⁾은 소엽을 물과 유기용매로 추출하여 얻은 추출물로 세포독성실험과 마우스의 피부암에 대한 소엽 추출물의 항암효과를 분석한 결과, 용매에 의한 추출물 실험에서 독성이 적고, 항암작용이 강했던 메탄올 추출물과 독성이 강하고 항암작용도 강했던 에테르 추출물에 대하여 보고한 바 있다. 한 등¹⁴⁾은 소엽의 메탄올과 에테르 추출물을 계통분획 하여 분획한 5종의 분획을 인체 피부암 세포에 미치는 항암효과를 측정하기 위하여 세포수의 산정, MTT 정량, LDH 활성 및 세포형태를 관찰한 결과 클로로포름 분획에서 유의한 항암효과를 보고한 바 있다. 본 실험에서는 포공령으로부터 물 추출물을 조제하여 인체 피부흑색종세포에 적용한 후, 1차 검색방법인 비색방법중 가장 민감하고 안정한 방법인 MTT 정량 NR 정량 및 SRB 정량분석법을 이용하여 실험한 결과는 Table I, II, III와 같다.

MTT 정량분석법에 적용한 포공령으로부터 물 추출물을 조제하여 인체 피부흑색종세포에 적용하여 MTT량을 측정한 결과는 Table I와 같다. 포공령의

물 추출물 10⁻² mg/ml 농도에서 10⁻⁶ mg/ml 농도까지 MTT량이 통계적으로 유의하게 증가하였으며, 10⁻² mg/ml와 10⁻⁴ mg/ml 농도에서는 52%에서 35%의 항암활성을 나타냈지만, 10⁻⁵ mg/ml와 10⁻⁶ mg/ml에서는 17%와 13%의 억제효과를 볼 수 있었다. MTT 정량분석법에서는 농도가 증가함에 따라 인체 피부흑색종세포에 대한 항암활성이 증가하였으며, 포공령의 물 추출물의 농도가 감소함에 따라 MTT량이 증가하였다.

NR 정량분석법에 있어서는 포공령 추출물에서 인체 피부흑색종세포에 대하여 10⁻² mg/ml 농도에서 가장 항암활성이 큰 것으로 나타났고, 10⁻³ mg/ml와 10⁻⁴ mg/ml 농도에서는 41%와 36%의 통계적으로 유의(P<0.01)한 항암효과를 볼 수 있었다(Table

Table I. The antitumor activity of water extract of Taraxaci herba by MTT assay on human skin melanoma cells

Group Concn (mg/ml)	MTT quantity	
	Mean±S.D. ^a	% of control
Control	1.66±0.10	100.0
10 ⁻²	0.79±0.14***	47.6
10 ⁻³	0.99±0.12***	59.7
10 ⁻⁴	1.08±0.09***	65.1
10 ⁻⁵	1.39±0.17**	83.4
10 ⁻⁶	1.44±0.16*	86.9

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA. ^aThe values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 (Student's *t*-test).

Table II. The antitumor activity of water extract of Taraxaci herba by NR assay on human skin melanoma cells

Group Concn (mg/ml)	NR quantity	
	Mean±S.D. ^a	% of control
Control	1.97±0.26	100.0
10 ⁻²	1.07±0.16***	54.3
10 ⁻³	1.16±0.39**	58.9
10 ⁻⁴	1.25±0.28**	63.5
10 ⁻⁵	1.71±0.23	86.7
10 ⁻⁶	1.86±0.30	94.5

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA. ^aThe values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: **P<0.01, ***P<0.001 (Student's *t*-test).

II). MTT 정량분석법에서와 같이 포공령의 물 추출물의 농도가 감소함에 따라 NR량이 증가하였으며, 10^{-5} mg/ml와 10^{-6} mg/ml에서는 유의한 억제효과를 볼 수 없었다.

핵내의 단백질인 sulforhodamine B protein량을 측정하는 방법인 SRB 정량분석법을 이용하여 SRB량을 측정한 결과는 Table III과 같다. 포공령의 물 추출물에 대한 인체 피부흑색종세포의 항암활성이 10^{-2} ~ 10^{-5} mg/ml 농도에서 SRB량이 통계적으로 유의(P<0.001)하게 증가하였으며, 다른 정량분석법에 비하여 높은 유의성(P<0.001)을 볼 수 있었다. 그렇지만 10^{-6} mg/ml 농도에서 항암활성에 대한 유의성이 나타나지 않았으며, 포공령의 물 추출물의 농도가 감소함에 따라 SRB량이 증가하였다.

위의 3가지 검색시스템을 이용하여 얻은 결과에서 포공령의 물 추출물에 대한 인체 피부흑색종세포의 항암활성이 10^{-2} ~ 10^{-4} mg/ml 농도에서는 모든 검색에서 인체 피부흑색종세포에 대하여 통계적으로 유의성 있는 항암활성을 나타냈다. 일반적으로 모든 비색 정량분석법에서 포공령 물 추출물의 농도가 감소함에 따라 MTT량, NR량 및 SBR량이 증가함을 알 수 있었다. 그렇지만 MTT 정량분석법에서 농도가 증가함에 따라 MTT량이 SRB 정량분석법에서 보다 민감하게 감소하는 경향이 나타남은 MTT 정량분석법이 SBR 정량분석법 보다 예민함을 알 수 있었다.¹⁵⁾

육안으로 관찰할 수 없는 ELISA reader에 의한 측정치를 확인하기 위하여 인체 피부흑색종세포를

광학현미경적으로 관찰한 결과, 인체 피부흑색종세포를 24시간 배양하면 바닥에 뚜렷한 핵을 갖는 방추형으로 단층을 이루며, 48시간 배양하면 여러 형태의 세포들이 층을 이룬다(Fig. 1). 그렇지만 포공령 물 추출물의 농도가 10^{-2} mg/ml을 포함하는 배지에서는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 세포수의 감소와 세포형태의 변화가 가장 심하였고, 세포들이 응집하는 경향이 있었다.

본 연구에서는 포공령의 물 추출물에 대한 6종(10^{-2} ~ 10^{-6} mg/ml 농도)의 농도를 만들어 인체 피부흑색종세포에 대한 항암활성을 1차 검색방법인 비색 정량분석법 중 가장 민감하고 안정적인 MTT 정량분석법, NR 정량분석법 및 SRB 정량분석법의

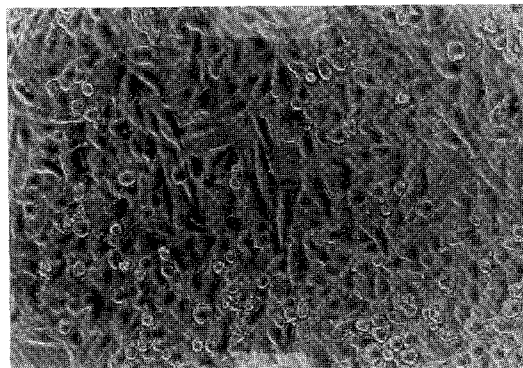


Fig. 1. Inverted photomicrograph of human skin melanoma cells after incubation in unmodified medium (control) for 2 days×200. Most cells had abundant cytoplasm and formed round shape.

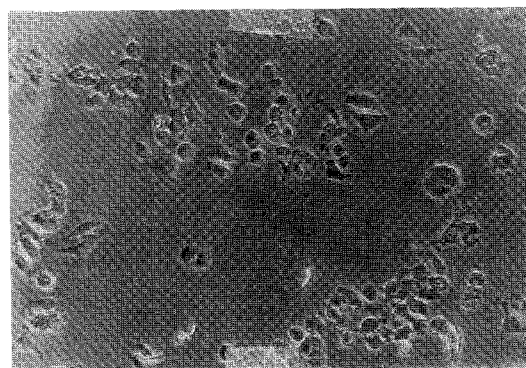


Fig. 2. Inverted photomicrograph of human skin melanoma cells after incubation in the medium containing 10^{-2} mg/ml concentration of Taraxaci herba for 2 days×200. Most cells were shirking and number of cells were decreased.

Table III. The antitumor activity of water extract of Taraxaci herba by SRB assay on human skin melanoma cells

Group Concn (mg/ml)	SRB quantity	
	Mean±S.D. ^a	% of control
Control	2.70±0.28	100.0
10^{-2}	1.35±0.17***	50.1
10^{-3}	1.62±0.12***	60.0
10^{-4}	1.72±0.07***	63.7
10^{-5}	1.95±0.28***	72.0
10^{-6}	2.46±0.55	90.9

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA. ^aThe values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: ***P<0.001 (Student's t-test).

로 측정된 결과, MTT 정량분석법과 NR 정량분석법에서는 항암활성이 10^2 mg/ml 농도에서 부터 10^4 mg/ml 농도까지 통계적으로 유의성있게 나타났으며, SRB 정량에서는 항암활성이 10^5 mg/ml 농도까지 유의하게 ($P < 0.001$) 나타났다. 인체 피부암세포에 대조물질로 사용하고 있는 아드리아 마이신의 IC_{50} ($MTT_{50} = 20.12 \mu M$, $SRB_{50} = 38.63 \mu M$)에 비교하면, 좋은 항암효과가 있다고는 할 수 없으나, 포공령의 물 추출물에 대한 항암성이 있는 물질을 분리하면, 좋은 항암활성이 있으리라 생각된다. 이에 포공령의 물 추출물에 대한 항암활성 물질이 함유되어 있을 것으로 판단되어 분광화학적 방법으로 분자구조를 규명하는 노력을 계속할 계획이다.

결 론

독성에 의한 부작용이 적고 항암활성이 강한 물질을 개발하기 위한 연구의 일환으로 포공령 물 추출물을 인체 피부흑색종세포에 적용하여 항암활성을 측정하였다. 인체 피부흑색종세포는 RPMI-1640 배지에 배양하였고, 항암활성 측정은 MTT 정량분석법, NR 정량분석법 및 SRB 정량분석법을 이용하였으며, 세포의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 도립현미경에 의한 광학현미경적 관찰을 실시하였다. 본 연구에서 측정된 결과는 다음과 같다.

1. MTT 정량분석시 모든 농도에서 통계학적으로 유의한 항암활성을 나타내었으며, 추출물의 10^2 mg/ml 농도에서 가장 높은 유의성 ($P < 0.001$)이 측정되었다.

2. NR 정량분석시 추출물의 $10^2 \sim 10^4$ mg/ml 농도에서 통계학적으로 유의한 항암활성이 나타났고, 다른 농도에서 유의성이 없었다.

3. SRB 정량분석에서는 추출물의 $10^2 \sim 10^5$ mg/ml 농도에서 통계학적으로 가장 유의 ($P < 0.001$)한 항암활성이 나타났고, 다른 10^6 mg/ml 농도에서 유의성이 없었다. SRB 정량분석법은 10^2 mg/ml 농도에서 유의 ($P < 0.001$)한 결과가 나타났으나 10^6 mg/ml 농도는 유의성이 없었다.

4. 세포의 광학현미경적으로 관찰한 결과는 포공령 물 추출물의 10^2 mg/ml 농도에서 세포수의 감소와 세포 형태의 변화가 가장 심하게 관찰되었다.

이상의 결과에서 포공령 물 추출물에 항암활성물

질이 많이 함유되어 있는 것으로 나타났다.

사 사

본 연구는 1997년도 원광보건대학 교내 연구비지원에 의해서 연구되었으며, 일부 한국과학재단, 전라북도청 후원, 의약자원연구센터의 연구지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사한다.

인용문헌

- Booth, V. H. (1964) Taraxien, The carotenoid ester in dandelion flowers. *Phytochemistry* 3: 229-234.
- Nitsche, H. and Pleugel, C. (1972) Neoxanthin from Helianthus, Taraxacum and Impatiens. *Ibid.* 11: 3383-3385.
- Hansel, R., Kartarahardja, M., Huang, J. T. and Bohlmann, F. (1980) Sesquiterpenlacton- β -D-glucopyranoside sowie ein neues eudesmanolid aus *Taraxacum officinale*. *Ibid.* 19: 857-861.
- Rauwald, H. W. and Huang, J. T. (1985) Taraxacoside, A type of acylated γ -butyrolactone glycoside from *Taraxacum officinale*. *Ibid.* 24: 1557-1559.
- Phillipson, D. J. (1994) Herbal drugs and phytopharmaceuticals, 486. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart.
- 김신규 (1971) 항 종양성 생약의 cytotoxicity에 관한 연구(I). *생약학회지* 2: 177-179.
- 김석근, 송호준 (1992) 포공령 수추출물이 진통, 소염 작용에 미치는 영향. *대한한의학회지*, 13: 152-161.
- 이은방, 김정근, 김옥경 (1993) 포공령의 항위염작용. *생약학회지*, 24: 313-318.
- Han, D. S., Lee, M. H., Choi, K. E. and Baek, S. H. (1998) Development of anticancer agents from Korean medicinal plants (Part 9). Antitumor evaluation of Taraxaci herba extracts by colorimetric methods. *Environ. Mut. Car.*, submitted.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63.
- Borenfreund, E. and Puerner, J. A. (1984) A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/

Nr90). *Tissue Culture Meth.* 9: 7-9.

12. Skehan, P., Storeng, S., Studiero, D., Monke, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bodesh, .H., Kenny, S. and Boyd, M. R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J. Nat. Cancer Inst.* 82: 1107-1112.
13. 한두석, 유현경, 백승화 (1994) 소엽의 메탄올 분획이 피부암세포에 미치는 항암효과. *대한구강해부학회지* 18: 19-26
14. 한두석, 정병호, 유현경, 김영옥, 백승화 (1994) 소엽의 세포독성 및 항암작용에 관한 연구, *생약학회지* 25: 249-257.
15. 김명신 (1998) 인체 피부흑색종세포에 대한 카나비노이드의 억제효과. *원광대학교 석사학위논문.*

(1998년 5월 22일 접수)