

한국산 생약으로부터 항암물질의 개발 (제 13보). 농길리 추출물의 세포독성 및 항암작용에 관한 연구

신민교, 송호준, 강영성, 유홍선¹, 한두석¹, 강길웅², 백승화^{2*}

원광대학교 한의과대학 본초학교실, 치과대학 구강해부학교실,
자연과학대학 화학기술·생명과학부

Development of Anticancer Agents from Korean Medicinal Plants. Part 13. Studies on the Cytotoxicity and Antitumor Activity of *Herba crataleariae sessiliflorae*

Min Kyo Shin, Ho Joon Song, Young Sung Kang, Hong Sun Ryu¹,
Du Seok Han¹, Kil Ung Kang² and Seung Hwa Baek^{2,*}

Department of Oriental Medicine, School of Oriental Medicine,

¹*Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, and*

²*Devison of Chemistry Technology & Biological Science,*

College of Natural Sciences, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Abstract - The cytotoxic and antitumor activity of *Herba crataleariae sessiliflorae* on cultured NIH 3T3 fibroblast and human oral epitheloid carcinoma cells were evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide (MTT) colorimetric method. The light microscopic study was carried out to observe morphological changes of cultured mouse fibroblast and human oral epitheloid carcinoma cells (KB). These results were obtained as follows: Ethyl acetate, chloroform and hexane extracts showed a significant cytotoxicity in NIH 3T3 fibroblast, but the other extracts did not show. All extracts exhibited a significant antitumor activity in human oral epitheloid carcinoma cells, but ethanol extract did not show a antitumor activity. Hexane extract showed low cytotoxic effect, but exhibited the most antitumor activity. The MTT absorbance in NIH 3T3 fibroblast was significantly decreased by treatment with chloroform, ethyl acetate and hexane extracts respectively. Human oral epitheloid carcinoma cells was significantly decreased by treatment with all extracts with the exception of ethanol extract. The difference in MTT absorbance in two cell types was most remarkable when treated with water and hexane extracts. Chloroform and hexane extracts showed the strongest effect in growth inhibition of human oral epitheloid carcinoma cells. These results indicated that water extract possessed no cytotoxicity and a strong antitumor activity.

Key words - *Herba crataleariae sessiliflorae*; NIH 3T3 fibroblast; human oral epitheloid carcinoma cells; MTT assay; cytotoxicity; antitumor activity.

*교신저자 : Fax 0653-841-4893

농길리 *Crotalaria sessiliflora* L.^{1,2)}는 콩과에 속하는 일년생 초본으로 높이 20-70 cm이고, 표면을 제외한 전체에 긴 갈색 털이 나 있다. 잎은 單葉이 互生하고 線形 또는 披針形이며, 양끝이 뾰족하고, 끝에는 털이 있고, 윗면은 털이 없거나 약간 있고, 밑면은 絹絲와 같은 光澤이 나는 털이 있다. 葉柄은 거의 없고 托葉은 매우 가늘고 작아서 剛毛와 같다. 總狀花序는 頂生 또는 腋生 하고 2-20개의 꽃이 한곳에 밀집한다. 苞片和 小苞片은 매우 비슷하며 線形이다. 花柄은 매우 짧으며, 結實期에는 아래로 늘어진다. 꽃받침은 길이 10-15 cm로서 黃褐色의 긴털이 밀집하였고, 齒의 끝은 뾰족하다. 花冠은 나비 모양이고 紫藍色 또는 淡藍色이고 꽃받침과 거의 같은 길이이며, 旗瓣은 圓形, 翼瓣은 旗瓣보다 짧고 倒卵狀 矩圓形, 龍骨瓣과 翼瓣은 같은 길이이고 안으로 굽어져고, 부리가 나와 있다. 수술은 10개, 藥은 2型이다. 子房은 柄이없고 花柱는 가늘고 길다. 꼬투리는 長橢圓形이고 種子는 10-15개 들어있다. 황무지의 잡초밭에 자생하며, 전국에 널리 분포되어 있다. 이 식물의 성분으로 7종의 alkaloid가 보고되어 있는데, 그 중 함량이 비교적 많은 것은 monocrotaline와 2종류가 있다. Monocrotaline 함량은 쏘라에 약 0.02%, 종자에 약 0.4%이다. 농길리의 性味는 苦辛이며 利濕 清熱解毒의 효능으로 惡性腫瘤 癰瘡 癰腫 痢疾, 小兒疳積 등 症狀을 치료한다고 하였으며, 최근에는 慢性氣管支炎, 癌症에 사용한다 하였다. 그러므로 농길리의 다양한 용도와 항암활성이 보고된 문헌¹⁻³⁾을 근거로 물과 몇 가지 유기용매로 농길리를 추출하여, 인체 구강유상피암세포에 대한 항암활성을 측정하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에서 사용한 농길리는 1998년 경기도 양평군 용군면에서 채집 (N970811)하여 외부 형태를 비교 조사하여 확인 후 사용하였으며, 실험에 사용된 식물체는 원광대학교 한의과대학 본초학교실에 보관되어 있다.

기기 및 시약 - 세포의 배양은 CO₂ incubator (Shellab Co., USA)를 사용하였고, 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기를 사용하였으며, 현미경은

도립현미경 (Inverted Microscope, Olympus)을 사용하였다. MTT정량분석법은 ELISA reader (Spectra Max 250, USA)를 사용하였다. 농길리 추출에 사용한 methanol, n-hexane, chloroform, ethyl acetate, H₂O는 증류하여 사용하였으며, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide, trypsin-EDTA 시약은 특급시약으로 Sigma에서 구입하여 사용하였다. 기타 시약은 일급시약을 사용하였다.

추출방법 - 그늘에서 말린 농길리 전초를 정선한 후, 조말하여 약 2.0 g을 평량하여 에탄올(3×40 ml, 1×30 ml)을 가하여 24시간씩 상온에서 저어준 후 추출한 다음, 이 추출액을 여지로 여과하고, 여액을 감압농축하여, 진한 녹색 에탄올 추출물 241 mg (12.02%)을 얻었다. 계속하여 클로로포름, 에틸아세테이트, 헥산, 물로 추출하고, 위의 방법에 따라 용매를 감압 농축하여 클로로포름 추출물 87.0 mg (4.35%), 에틸아세테이트 추출물 59.0 mg (2.95%), 헥산 추출물 48.0 mg (2.40%)과 물추출물 1.054 mg (52.7%)을 얻었다.

시료의 조제 - 시료는 즉시 4℃ 냉장고에 저장하였다가, 사용직전에 에틸알콜로 동량희석하였다. 각각 1:1(ml:g)로 희석한 시료는 실험농도에 적합하도록 10배 serial dilution을 하여 10⁻² mg/ml에서 10⁻⁵ mg/ml를 결정하였다.

암세포배양 - 농길리 추출물의 항암작용을 측정하기 위하여, 서울대학교 암연구소에서 분양 받은 인체 구강유상피암세포 (ATCC No. OCL-17)는 RPMI-1640 (Gibco, USA)에 10% fetal bovine serum (Gibco, USA)과 penicillin G (25 unit/ml, streptomycin (25 µg/ml)을 첨가하여 사용하였다. 세포의 배양은 온도 37℃, 습도 95%, 탄산가스 농도 5% (CO₂ incubator, Shellab, USA)를 사용하였다. NIH 3T3 fibroblast는 미국의 NIH에서 구입하였으며, 실험을 위하여 일차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin으로 처리하여, Turk형 혈구계산기를 이용하여 세포수가 2×10⁴ cells/ml 되도록 세포부유액을 만들었다.

MTT정량 분석법 - Mosmann의 방법⁴⁾에 의하여, 세포를 농길리 추출물이 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 분석 당일 조제한 MTT (Sigma) 50 µg/ml 포함된 배양액을 well당 1 ml

씩 넣어 3시간 배양하였다. 배양후 배양액을 버리고, dimethylsulfoxide (DMSO)를 2 ml/well 씩 넣어 5분간 실온 방치하여 MTT formazan을 용해한 후, ELISA reader로 MTT의 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

세포의 광학현미경적 관찰 - 살아있는 세포의 형태를 관찰하기 위하여 인체 구강유상피암종세포는 MTT정량분석법을 하기 전에 도립현미경 (Inverted microscope, Olympus)으로 관찰하고 사진을 촬영하였다.

통계처리 - 모든 실험 결과는 평균치와 표준 오차를 계산하였고, 대조군과 실험군간의 차이는 student's t-test를 사용하여, P-value가 0.05미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

암연구에 검색방법으로 많이 이용되고 있는 MTT 정량분석법을 이용하여, 물과 4종의 유기용매를 사용하여 농길리에서 추출한 각 시료가 3T3 섬유모세포에 미치는 세포독성과 인체 구강유상피암종세포

에 미치는 항암효과를 측정하기 위하여 각 시료를 10배 serial dilution하여 실험한 결과는 Table I ~VI과 Fig. 1과 같다. Table I에서 보는 바와 같이 상온에서 물과 유기용매로 추출한 후, 용매를 감압 농축하여 진한 갈색의 물추출물 1054 mg (52.7%)을 얻었다. 같은 방법으로 진한 녹색 에탄올 추출물 241 mg (12.02%), 진한 녹색 에틸아세테이트 추출물 59.0 mg (2.95%), 진한 갈색 클로로포름 추출물 87.0 mg (4.35%)과 진한 노란색 헥산 추출물 48.0 mg (2.40%)을 얻었다. 여기서 물과 에탄올 추출물의 수율이 많은 것으로 보아, 극성이 높은 물과 에탄올에 많이 이행됨을 알 수 있었다 (Table I).

Table II에서 보는 바와 같이 물 추출물은 대조군에 비하여 각 시료가 3T3 섬유모세포에 미치는 세포독성은 물 추출물 10^{-2} mg/ml 농도에서 98%로 통계적으로 유의성이 없었으며, 물 추출물의 10^{-3} mg/ml ~ 10^{-5} mg/ml 농도에서는 100%로 독성이 없는 것으로 나타났다. 농길리 물 추출물은 각 시료가 인체 구강유상피암종세포에 대하여, 10^{-3} mg/ml ($p < 0.001$) 농도와 10^{-2} mg/ml ($P < 0.001$) 농도에서는 MTT 농도가 대조군의 83%와 78%로 MTT량이 통계적으로 유의성있게 감소하였으며, 10^{-4} mg/ml ($P < 0.01$) 농도와 10^{-5} mg/ml ($P < 0.01$) 농도에서는 MTT량이 10^{-2} mg/ml ~ 10^{-5} mg/ml 농도에서 보다 MTT량이 낮은 87%와 83%의 감소량이 보였다. 즉 MTT 정량분석법에서는 농길리 물 추출물의 농도가 증가함에 따라 인체 구강유상피암종세포에 대한 항암활성이 증가하였으며, 물 추출물의 농도가 감소함에 따라 MTT량이 증가 하였다. 따라서 MTT_{50} 은 0.04 mg/ml이었다. 농길리를 극성이 큰 물을 사용

Table I. Liquid-liquid extractions of organic and aqueous soluble extracts of whole plant of *Herba crotalariae sessiliflorae*

Solvent	Weight(mg)	Color	Yield(%)
Water	1,054	Brown gum	52.7
Ethanol	241	Green gum	12.1
Ethyl acetate	59	Green gum	3.0
Chloroform	87	Brown gum	4.4
Hexane	48	Yellow gum	2.4

Table II. The effects of the water extract of *Herba crotalariae sessiliflorae* on the production of MTT formazan crystal on NIH 3T3 fibroblasts and human oral epitheloid carcinoma cells

Group	NIH 3T3 fibroblasts		Human Oral Epitheloid Carcinoma Cells	
	Mean±S.D. ^a	(% of control)	Mean±S.D. ^a	(% of control)
Concentration (mg/ml)				
control	4.15±0.15	(100.0)	3.16±0.04	(100.0)
10^{-2}	4.06±0.12	(97.9)	2.48±0.11***	(78.4)
10^{-3}	4.15±0.00	(100.0)	2.61±0.05***	(82.7)
10^{-4}	4.15±0.00	(100.0)	2.63±0.09**	(83.3)
10^{-5}	4.15±0.00	(100.0)	2.76±0.11**	(87.4)
MTT_{50}	0.23 mg/ml		0.04 mg/ml	

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).

Table III. The effects of the ethanol extract of *Herba crataleariae sessiliflorae* on the production of MTT formazan crystal on NIH 3T3 fibroblasts and human oral epitheloid carcinoma cells

Group Concentration (mg/ml)	NIH 3T3 fibroblasts		Human Oral Epitheloid Carcinoma Cells	
	Mean±S.D. ^a	(% of control)	Mean±S.D. ^a	(% of control)
control	4.15±0.00	(100.0)	3.99±0.23	(100.0)
10 ⁻²	4.15±0.00	(100.0)	3.96±0.24	(99.2)
10 ⁻³	4.15±0.00	(100.0)	3.96±0.31	(99.3)
10 ⁻⁴	4.15±0.00	(100.0)	4.00±0.15	(100.4)
10 ⁻⁵	4.15±0.00	(100.0)	4.16±0.00	(104.4)
MTT ₅₀	0.00 mg/ml		0.24 mg/ml	

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: (Student's t-test).

Table IV. The effects of the hexane extract of *Herba crataleariae sessiliflorae* on the production of MTT formazan crystal on NIH 3T3 fibroblasts and human oral epitheloid carcinoma cells

Group Concentration (mg/ml)	NIH 3T3 fibroblasts		Human Oral Epitheloid Carcinoma Cells	
	Mean±S.D. ^a	(% of control)	Mean±S.D. ^a	(% of control)
control	1.55±0.11	(100.0)	3.41±0.20	(100.0)
10 ⁻²	1.17±0.16**	(82.3)	1.99±0.10***	(58.5)
10 ⁻³	1.26±0.14*	(87.8)	2.42±0.25***	(70.9)
10 ⁻⁴	1.39±0.09*	(89.7)	2.60±0.08***	(76.5)
10 ⁻⁵	1.51±0.05	(97.4)	3.18±0.29	(93.3)
MTT ₅₀	0.02 mg/ml		0.01 mg/ml	

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<0.001 (Student's t-test).

하여 추출한 결과, 다른 용매에 비하여 추출물의 농도가 증가했으며, 추출물의 모든 농도에서 인체 구강유상피암종세포내 사립체의 활성에 영향을 미치는 것으로 보아, 농길리 물 추출물에서 항암활성을 나타내는 화합물이 많이 함유되어 있어, 모든 농도 범위에서 유의한 세포억제효과를 볼 수 있었다. 추출물의 10⁻² mg/ml 농도에서 인체 구강유상피암종세포에 대한 항암활성이 78%로 가장 높게 나타났다.

Table III에서 보는 바와 같이, 농길리 에탄올 추출물은 대조군에 비하여 각 시료가 3T3 섬유모세포에 미치는 세포독성은 모든 농도에서 MTT량이 감소하지 않아, 통계적으로 유의성이 없는 것으로 나타났다. 농길리 에탄올 추출물은 각 시료가 인체 구강유상피암종세포에 대하여, 모든 농도에서 MTT량이 거의 변화가 없었으며, 통계적으로 유의성이 없는 것으로 나타났다. 따라서 MTT₅₀은 0.24 mg/ml 이었다.

Table IV에서 보는 바와 같이, 농길리 헥산 추출

물은 대조군에 비하여 각 시료가 3T3 섬유모세포에 미치는 세포독성은 헥산 추출물 10⁻⁴ mg/ml~10⁻² mg/ml 농도에서 90%~82%로 통계적으로 유의성 (P<0.05, P<0.01)이 나타났으며, 10⁻⁵ mg/ml 농도에서는 97%로 감소하여 유의성있는 세포독성을 보이지 않았다. 그렇지만 농길리 헥산 추출물의 농도가 감소함에 따라 MTT량이 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 MTT₅₀은 0.04 mg/ml이었다. 농길리 헥산 추출물은 각 시료가 인체 구강유상피암종세포에 대하여, 10⁻⁴ mg/ml~10⁻² mg/ml (p<0.001) 농도에서는 MTT농도가 대조군의 59%~93%로 MTT량이 통계적으로 유의성있게 감소하여 유의성있는 항암활성을 나타냈으나, 10⁻⁵ mg/ml 농도에서는 MTT량이 93%로 감소하여 유의성있는 항암활성을 보이지 않았다. 즉 MTT 정량분석법에서는 농길리 헥산 추출물의 농도가 증가함에 따라 인체 구강유상피암종세포에 대한 항암활성이 증가하였으며, 헥산 추출물의 농도가 감소함에 따라 MTT량이

증가 하였다. 따라서 MTT_{50} 은 0.01 mg/ml이었다. 농길리 핵산 추출물의 모든 농도에서 인체 구강유상피암종세포내 사립체의 활성에 영향을 미치는 것을 알 수 있었으나, 10^2 mg/ml 농도에서 인체 구강유상피암종세포에 대한 항암활성이 59%로 가장 높게 나타났다.

Table V에서 보는 바와 같이, 농길리 클로르포름 추출물은 대조군에 비하여 각 시료가 3T3 섬유모세포에 미치는 세포독성은 클로르포름 추출물 10^2 mg/ml ~ 10^4 mg/ml 농도에서 91%~89%로 통계적으로 유의성($P<0.05$)이 나타났으며, 10^5 mg/ml 농도에서는 95%로 감소하여 유의성있는 세포독성을 보이지 않았다. 그렇지만 농길리 클로르포름 추출물의 농도가 감소함에 따라 MTT량이 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 MTT_{50} 은 0.08 mg/ml이었다. 농길리 클로르포름 추출물은 각 시료가 인체 구강유상피암종세포에 대하여, 10^3 mg/ml ($P<0.05$) 농도와 10^2 mg/ml ($P<0.01$) 농도에서는 MTT

농도가 대조군의 85%와 75%로 MTT량이 통계적으로 유의성있게 감소하여 유의성있는 항암활성을 나타냈으나, 10^5 mg/ml ~ 10^4 mg/ml 농도에서는 MTT량이 99%~90%로 감소하였으나 유의성있는 항암활성을 보이지 않았다. 즉 MTT 정량분석법에서는 농길리 클로르포름 추출물의 농도가 증가함에 따라 인체 구강유상피암종세포에 대한 항암활성이 증가하였으며, 클로르포름 추출물의 농도가 감소함에 따라 MTT량이 증가 하였다. 따라서 MTT_{50} 은 0.02 mg/ml이었다. 농길리 클로르포름 추출물의 모든 농도에서 인체 구강유상피암종세포내 사립체의 활성에 영향을 미치는 것을 알 수 있었으나, 10^2 mg/ml 농도에서 인체 구강유상피암종세포에 대한 항암활성이 79%로 높게 나타났다.

Table VI에서 보는 바와 같이, 농길리 에틸 아세테이트 추출물은 대조군에 비하여 각 시료가 3T3 섬유모세포에 미치는 세포독성은 에틸 아세테이트 추출물 10^4 mg/ml ~ 10^2 mg/ml 농도에서 97% ~

Table V. The effects of the chloroform extract of *Herba cratalariae sessiliflorae* on the production of MTT formazan crystal on NIH 3T3 fibroblasts and human oral epitheloid carcinoma cells

Group	NIH 3T3 fibroblasts		Human Oral Epitheloid Carcinoma Cells	
	Mean±S.D. ^a	(% of control)	Mean±S.D. ^a	(% of control)
Concentration (mg/ml)				
control	1.42±0.10	(100.0)	3.98±0.12	(100.0)
10^2	1.26±0.07*	(89.0)	2.97±0.22***	(74.8)
10^3	1.26±0.01*	(89.1)	3.36±0.19***	(84.6)
10^4	1.29±0.02*	(91.2)	3.57±0.26*	(89.9)
10^5	1.34±0.06	(94.7)	3.95±0.14	(99.4)
MTT_{50}	0.08 mg/ml		0.02 mg/ml	

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: * $P<0.05$, *** $P<0.001$ (Student's t-test).

Table VI. The effects of the ethyl acetate extract of *Herba cratalariae sessiliflorae* on the production of MTT formazan crystal on NIH 3T3 fibroblasts and human oral epitheloid carcinoma cells

Group	NIH 3T3 fibroblasts		Human Oral Epitheloid Carcinoma Cells	
	Mean±S.D. ^a	(% of control)	Mean±S.D. ^a	(% of control)
Concentration (mg/ml)				
control	1.35±0.08	(100.0)	3.61±0.21	(100.0)
10^2	1.18±0.09*	(87.9)	2.84±0.10**	(78.6)
10^3	1.24±0.05*	(92.1)	3.05±0.34*	(84.5)
10^4	1.31±0.07*	(97.3)	3.31±0.24	(91.7)
10^5	1.34±0.06	(99.2)	3.49±0.03	(96.5)
MTT_{50}	0.05 mg/ml		0.03 mg/ml	

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: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ (Student's t-test).

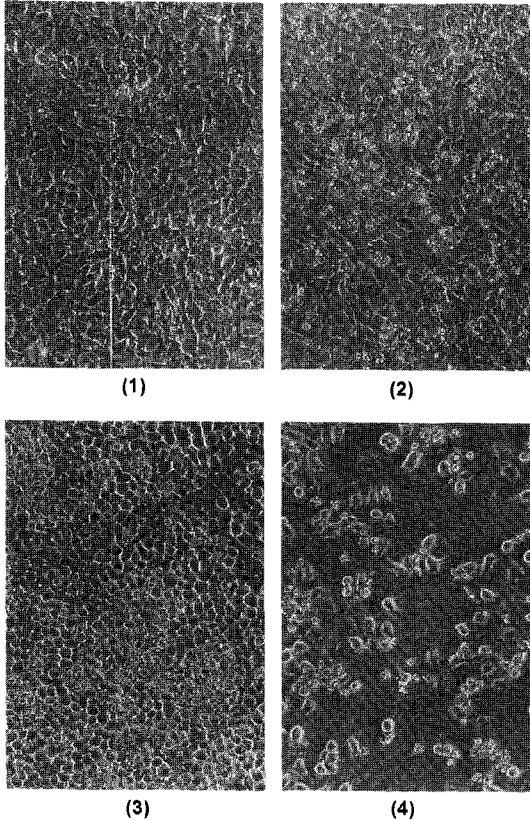


Fig. 1. An inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblast cells after incubation in unmodified medium (control). Most cells had abundant cytoplasm and formed round shape (1). An inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblast cells after incubation in the medium containing 10^{-2} mg/ml concentration of the water extract for 48 hrs ($\times 400$). Some cells were very little shrunk and number of cells were decreased very little (2). An inverted photomicrograph of human oral epitheloid carcinoma cells after incubation in unmodified medium (control) for 48 hrs ($\times 400$). Most cells had abundant cytoplasm and formed round shape (3). An inverted photomicrograph of human oral epitheloid carcinoma cells after incubation in the medium containing 10^{-2} mg/ml concentration of the water extract for 48 hrs ($\times 400$). Most cells were shown degerative and formed cell cluster (4).

88%로 통계적으로 유의성 ($P < 0.05$)이 나타났으며, 10^{-5} mg/ml농도에서는 99%로 감소하여 유의성있는 세포독성을 보이지 않았다. 그렇지만 농길리 클로르포름 추출물의 농도가 감소함에 따라 MTT량이 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 MTT_{50} 은 0.05

mg/ml이었다. 농길리 에틸 아세테이트 추출물은 각 시료가 인체 구강유상피암종세포에 대하여, 10^{-3} mg/ml ($P < 0.05$)농도와 10^{-2} mg/ml ($P < 0.01$)농도에서는 MTT농도가 대조군의 85%와 79%로 MTT량이 농길리 클로르포름 추출물과 통계적으로 비슷하게 감소하여 유의성있는 항암활성을 나타냈으나, 10^{-5} mg/ml~ 10^{-4} mg/ml농도에서는 MTT량이 97%~92%로 감소하여, 농길리 클로르포름 추출물과 같이 유의성있는 항암활성을 보이지않았다. 즉 MTT 정량분석법에서는 농길리 에틸 아세테이트 추출물의 농도가 증가함에 따라 인체 구강유상피암종세포에 대한 항암활성이 증가하였으며, 에틸 아세테이트 추출물의 농도가 감소함에 따라 MTT량이 증가 하였다. 따라서 MTT_{50} 은 0.03 mg/ml으로 농길리 클로르포름 추출물과 같은 MTT_{50} 값을 볼 수 있었다. 농길리 에틸 아세테이트 추출물의 모든 농도에서 인체 구강유상피암종세포내 사립체의 활성에 영향을 미치는 것을 알 수 있었으나, 10^{-2} mg/ml농도에서 인체 구강유상피암종세포에 대한 항암활성이 농길리 클로르포름 추출물과 거의 같게 나타났다.

광학현미경적 관찰에서 대조군과 농길리 물 추출물의 실험군에 있어서는 배양 후, 48시간 동안 well 바닥에 뚜렷한 핵을 갖춘 방추형으로 빈틈없이 부착하고 있으며, 농길리 물 추출물의 실험군에 대한 세포독성은 거의 나타나지 않았다(Fig. 1. photo. 1~photo. 2). 인체 구강유상피암종세포를 24시간 배양하면, well 바닥에 뚜렷한 핵을 갖춘 방추형으로 빈틈없이 부착하고 있으며, 72시간 후에는 여러형태의 세포들이 층을 이루고 있었다 (Fig. 1. photo. 3). 농길리 물 추출물의 실험군에서 10^{-3} mg/ml~ 10^{-4} mg/ml농도를 처리한 군에서는 세포수가 감소하고, 다수의 세포들이 응집하는 경향이었는데, 10^{-4} mg/ml농도를 처리한 군에서는 세포수의 감소와 세포형태의 변화가 적었다. 그러나 물 추출물의 10^{-2} mg/ml농도 (Fig. 1. photo. 4)를 처리한 군에서는 인체 구강유상피암종세포의 형태가 원형으로 변하였고, 세포들이 세포체를 형성하였으며, 세포수도 현저히 감소하였다.

Table I~VI에서 보는 바와 같이, 농길리 물과 유기용매 추출물을 MTT 정량분석법으로 대조군에 비하여 각 시료가 NIH 3T3세포에 미치는 세포독성을 측정하였다. 이들 추출물은 10^{-2} mg/ml~ 10^{-5} mg/

ml농도의 농도범위에서는 투여량에 따라 세포독성을 나타냈다. NIH 3T3세포에 대한 이들 농길리 추출물의 50% 세포독성에 대한 비교는 다음과 같은 순서로 세포독성이 감소하였다. 에탄올 추출물 ($MTT_{50}=0.00$ mg/ml) > 핵산 추출물 ($MTT_{50}=0.02$ mg/ml) > 에틸 아세테이트 추출물 ($MTT_{50}=0.05$ mg/ml) > 클로르포름 추출물 ($MTT_{50}=0.08$ mg/ml) > 물 추출물 ($MTT_{50}=0.23$ mg/ml) 순서로 감소하였다. 농길리 추출물은 물 추출물 ($MTT_{50}=0.23$ mg/ml) 분석법으로 인체 구강유상피암종세포에 대하여 세포의 성장억제효과를 측정하였다. 이들 추출물은 10^{-2} mg/ml ~ 10^{-5} mg/ml 농도의 농도범위에서는 투여량에 따라 항암활성을 나타냈다. 인체 구강유상피암종세포에 대한 이들 농길리 추출물의 50% 억제농도효과에 대한 비교는 다음과 같은 순서로 항암활성이 증가하였다. 에탄올추출물($MTT_{50}=0.24$ mg/ml) > 물 추출물 ($MTT_{50}=0.04$ mg/ml) > 에틸 아세테이트 추출물($MTT_{50}=0.03$ mg/ml) > 클로르포름 추출물 ($MTT_{50}=0.02$ mg/ml) > 핵산 추출물 ($MTT_{50}=0.01$ mg/ml) 순서로 감소하였다. MTT 정량분석법에서 핵산 추출물 ($MTT_{50}=0.01$ mg/ml)은 항암활성이 좋으나, 세포독성이 $MTT_{50}=0.02$ mg/ml 값으로 강하게 나타났다. 그렇지만 물 추출물($MTT_{50}=0.24$ mg/ml)은 세포독성이 대조군과 비교하여 MTT량이 변화가 없으며, 항암효과가 높게 나타나서 향후 물추출물과 핵산 추출물로부터 분획을 제조하여, 실험을 계속할 생각이다.

결 론

물과 4종의 유기용매를 사용하여 농길리로 부터 조제한 추출액이 NIH 3T3 세포에 나타내는 세포독성과 인체 구강유상피암종세포에 나타내는 항암효과를 조사하기 위하여, 혈구계산기에 의한 세포수 산정과 세포독성 판정, colorimetric assay인 tetrazolium MTT 분석과 도립 현미경에 의한 세포와 formazan crystal 형태를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세포독성은 에틸 아세테이트, 클로르포름과 핵산 추출물에서 독성이 유의성($P<0.05$)이 있었고, 그 밖에 다른 추출물에서는 나타나지 않았다. 모든 추

출물(10^{-2} mg/ml ~ 10^{-3} mg/ml) 농도에서 항암활성이 나타났으나, 에탄올 추출물에서는 통계적으로 유의성있는 항암활성이 나타나지 않았다. 핵산 추출물의 경우, 세포독성이 약하고 항암활성은 강하였다.

2. NIH 3T3 세포에 대한 MTT정량은 추출물의 농도가 증가함에 따라, 에틸 아세테이트, 클로르포름과 핵산 추출물에서 통계적으로 유의성이 있게 감소하였고, 인체 구강유상피암종세포에 대한 MTT정량은 물, 에틸 아세테이트, 클로르포름과 핵산 추출물에서 유의성있게 감소하였다. 두 세포사이의 MTT정량의 차이는 물과 핵산 추출물에서 가장 컸다.

3. 추출물의 농도에 따른 세포수의 변화와 MTT정량의 변화를 종합하면, 물 추출물에서 인체 구강유상피암종세포의 성장억제효과 강하게 나타났다.

이상의 결과에서 농길리의 물 추출물은 세포독성이 거의 없고, 항암활성이 강한 약재로 판정할 수 있었다.

사 사

본 연구는 원광대학교 교비 연구비와 일부 한국과학재단, 전라북도청후원, 의약자원연구센터(98-16-01-04-A-3)으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 신민교 (1997) 임상본초학, 566-567. 도서출판 영림사, 서울.
2. 정보섭, 신민교 (1990) 도해향약 (생약) 대사전, 676-675. 도서출판 영림사, 서울.
3. 중국약물대전편위원회 (1993) 중국약물대전, 370. 북경.
4. Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63.
5. 한두석, 정병호, 유현경, 김영옥, 백승화 (1994): 소엽의 세포독성 및 항암 작용에 관한 연구. *생약학회지* 25: 249-257.
6. 한두석, 유현경, 백승화 (1994): 소엽의 메탄올 분획이 피부암세포에 미치는 영향. *대한구강해부학회지* 18: 19-25.

(1999년 1월 17일 접수)