

수종 식물들의 Hepatoma cell 증식 저해작용

정용자 · 이은주
 경성대학교 약학대학

Anti-proliferating Effects of Some Plants on the Hepatoma Cell

Yong Za Chung and Un Joo Lee
 College of Pharmacy, Kyung Sung University

The anti-proliferating effects of some plants on hepatoma cell lines were studied by the 3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT assay), to investigate the anticancer effect with some plants around here. As the result, we saw that the anti-proliferating effect to the plants. Among the plants, *Equisetum arvense L.* and *Lactuca dentata Makino. var. flaviflora Makino* of them relatively showed a good anti-proliferating effect. *Capsicum annuum L. var. angulosum Mill (Leaf)* was the best among them. We also examined morphological changes on the hepatoma cells in this process. In case of *Capsicum annuum L. var. angulosum Mill*, the cells become vague after 2 days, and then destroyed faster than others. We can see also the condensed chromosome on the treated cells with *Capsicum annuum L. var. angulosum Mill*. And we also observed condensation through using a fluorescent microscope by PI staining, and observed DNA fragmentation.

□ Keywords - 3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, Giemsa staining, Propidium iodide

최근 천연물로부터 생리활성 물질에 대한 연구가 활발해지면서 동식물들로부터 항돌연변이 물질과 항암물질을 찾으려는 꾸준한 노력과 더불어 중앙 억제 물질들이 밝혀지고 있다¹⁻³⁾.

Human hepatoma cell line에 대한 증식억제작용을 다 음 식물들에서 관찰되었기 그 결과를 보고하는 바이다. *Capsicum annuum L. var. angulosum Mill* (고추잎), *Lactuca dentata Makino. var. flaviflora Makino* (씀바귀), *Sedum sarmentosum Bunge* (돌나물), *Perilla frutescens Brit. var. japonica. Hara*(들깨잎), *Isodin japonicus Hara* (방아잎), *Equisetum arvense L.* (쇠띠기), *Chrysanthemum coronarium L.* (쑥갓), *Arctium lappa L.* (우엉잎), *Cinnamomum camphora* (향장목)와 활인초에서 항암효과를 관찰하여 그 결과를 보고하려 한다.

실험재료 및 방법

각 식물들의 즙을 취하여 0.45 micron cellulose acetate

Table 1. Sample name and it's scientific name⁷⁾

| Used sample | Scientific name | Part of use |
|-------------|---|----------------|
| ① 고추잎 | <i>Capsicum annuum L. var. angulosum Mill</i> | Leaf |
| ② 썸바귀 | <i>Lactuca dentata Makino. var. flaviflora Makino</i> | Aerial Part |
| ③ 돌나물 | <i>Sedum sarmentosum Bunge</i> | Whole Part |
| ④ 들깨잎 | <i>Perilla frutescens Brit. var. japonica. Hara</i> | Leaf |
| ⑤ 방아 | <i>Isodin japonicus Hara</i> | Aerial Part |
| ⑥ 쇠띠기 | <i>Equisetum arvense L.</i> | Whole Part |
| ⑦ 쑥갓 | <i>Chrysanthemum coronarium L.</i> | Aerial Part |
| ⑧ 우엉잎 | <i>Arctium lappa L.</i> | Leaf |
| ⑨ 향장목 | <i>Cinnamomum camphora</i> | Leaf |
| ⑩ 청추 | <i>Capsicum annuum L. var. angulosum Mill</i> | Fruit, unripen |
| ⑪ 청추씨 | <i>Capsicum annuum L. var. angulosum Mill</i> | Seed, unripen |
| ⑫ 홍추 | <i>Capsicum annuum L. var. angulosum Mill</i> | Fruit, ripen |
| ⑬ 홍추씨 | <i>Capsicum annuum L. var. angulosum Mill</i> | Seed, ripen |
| ⑭ 활인초 | | |

교신저자: 정용자
 부산시 남구 대연동 110-1
 경성대학교 약학대학
 TEL. (051) 620-4887

membrane syringe filter (Corning 사)에 여과시켜 사용하였다. 각 시료는 Table 1과 같다. 사용한 각 시료는 시료 10 g당 추출물의 용량이 10 ml되게 하여 사용하였다.

Human hepatoma cell line을 RPMI 1640 (Sigma co.) 배지에 10% FBS (10% fetal bovine serum, Gibco BRL), 0.075% NaHCO₃ 와 antibiotics (100 units/ml penicilin G, Pfizer 주식회사)와 100 µg/ml streptomycin(동아제약주식회사)를 첨가하고, 37°C의 95% air: 5% CO₂ 배양기내에서 배양하였다.⁴⁾

살아있는 hepatoma cell의 수는 trypan blue 염색법으로 행하였다. trypsin-EDTA로 처리하여 부유 상태의 hepatoma cell이 되게 하여, 0.5% trypan blue로 염색한 후, 살아있는 세포수를 측정했다.

살아있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase에 의하여 MTT가 환원되어 청색 침전물을 형성하므로 540 nm에서 흡광도를 측정할 수 있다.⁵⁾

Trypsin-EDTA (Gibco BRL)로 처리하여 부유상태 hepatoma cell로 하고, hematocytometer를 이용하여 현미경하에서 세포수를 측정하였다. 세포배양 된 각 well에 2 mg/ml의 MTT를 50 µL씩 가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기내에서 4시간 동안 방치시켰다. 그리고 450xg에서 5분간 원심분리하여 침전물에 DMSO 150 µL를 가하고, automated microplate reader (Bio-tek instruments Inc.)에서 그 흡광도를 측정했다. 생존세포수와 MTT 비색법에 의한 흡광도의 관계는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 각 측정값은 4~6회 실험하여 평균한 값이다.

Microplate에서의 세포수에 따른 성장곡선 및 흡광도⁶⁾

96 wells microplate에 hepatoma 세포를 2×10³, 4×10³,

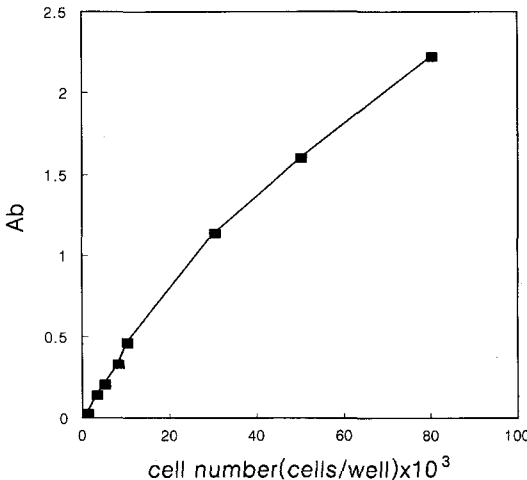


Fig. 1. Correlation between absorbance and the number of hepatoma cells

8×10³개씩 되게 각 well에 분주하여 초기 배양 세포수로 하고, 시간별 배양을 행하였다. 540 nm에서 흡광도를 측정하여 시간별 증식곡선의 변화를 관찰해보았다. 측정값은 4~6회 실험하여 평균하여 얻은 결과이며 MTT 비색법에 의해 측정된 흡광도 값으로 결과를 얻었다.

96 wells microplate의 각 well에 준비된 각 시료를 각각 10 µL, 15 µL, 20 µL씩 넣었다. 여기에 신선한 배지를 160 µL씩 넣고, PBS를 첨가하여 각 well의 용량이 총 180 µL가 되게했다. 2×10⁵개/ml 인 hepatoma 세포를 각 well당 20 µL씩 분주하여, 각 well당 4×10³개가 되게 하였다. 이것을 37°C 5% CO₂ 배양기내에서 48시간 배양한 뒤 MTT 비색법으로 그 흡광도를 측정했다. Control은 시료를 넣지 않은 well에 해당하며, MTT 비색정량법에 의한 흡광도 측정치의 감소는 살아있는 세포수의 감소, 즉 항암효과가 있는 것으로 간주하였다.

Microplate에서의 세포수에 따른 성장곡선과 흡광도에 대한 최적 실험조건을 정하기 위하여, hepatoma cell을 각 well당 (0.2 ml 용적) 2×10³, 4×10³, 8×10³ cells/well씩 접종하여, 0시간, 24시간, 36시간, 48시간, 72시간, 96시간별로 세포배양한 후 그 흡광도를 측정하였다.

각 시료에 대한 결과는, 시료를 각각 10 µL, 15 µL, 20 µL씩 첨가한 것과 첨가하지 않은 well 모두에 hepatoma를 20 µL씩 분주하여 각 well당 세포수가 4×10³개가 되게 하였다.

세포의 시간별 배양곡선은 시료를 각각 10 µL, 15 µL, 20 µL씩 첨가한 것과 넣지않은 well 모두에 hepatoma cell을 20 µL씩 분주하여 각 well당 세포수가 4×10³개가 되게 하였다. 이것을 37°C 5% CO₂ 배양기내에서 배양한 뒤, 0시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간마다 MTT 정량법으로 그 흡광도치를 측정했다

세포의 시간별 배양곡선

96 wells microplate의 각 well에 준비된 각 시료를 각각 10 µL, 15 µL, 20 µL씩 넣었다. 여기에 신선한 배지를 160 µL씩 넣고, PBS를 첨가하여 각 well의 용량이 총 180 µL가 되게했다. 2×10⁵개/ml 인 hepatoma cell을 각 well당 20 µL씩 분주하여, 각 well당 4×10³개가 되게 하였다. 이것을 37°C 5% CO₂ 배양기내에서 배양한 뒤, 0시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간에서 MTT 비색법으로 그 흡광도를 측정했다.

세포형태변화⁸⁾

25 cm² Canted Neck Flask(Corning사)에 hepatoma cell을 4×10³개/ml씩 되게 넣고, 배양시켰다. 24시간 후에 배지를 조심스럽게 제거하고, 준비된 시료를 각각의 flask에 넣었다. 여기에 신선한 배지를 첨가한 후

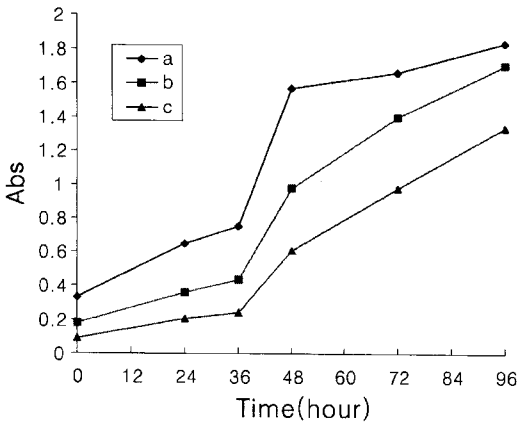


Fig. 2. Correlation between absorbance and the number of cells. Hepatoma cells of 2×10^3 , 4×10^3 and 8×10^3 cells/well were cultured during various time interval. The absorbance measured by MTT assay
 ◆ a: 8.0×10^3 ■ b: 4.0×10^3 ▲ c: 2.0×10^3

매일 역상 현미경으로 세포의 형태를 촬영했다.

염색체 변화양상을 관찰하기 위해 25 cm² Canted Neck flask에 hepatoma cell을 4×10^3 개/ml씩 되게 넣고, 배양시켜, 24시간 후에 배지를 조심스럽게 제거하고, 준비된 시료를 Flask에 75 μ L 넣었다. 여기에 신선한 배지를 첨가한 후, hepatoma cell이 성장기 중 log phase에 있을 때(40시간 뒤와 39시간 뒤) colcemid를 첨가했다. 5시간 배양시킨 후 배지를 제거하고 0.25% trypsin을 첨가했다. 10분간 배양후 trypsin이 들어있는 세포를 원심분리하여 상등액을 버린 후, 저장액에 세포를 재현탁시켜, 36.5°C에서 15분간 방치시켰다. 그 뒤 신선한 ice-cold acetic methanol로 세포를 고정시켰다. Ice에 10분간 방치한 뒤, 원심분리하여 acetic methanol을 버리고, 신선한 acetic methanol에 세포를 재현탁시켰다. 세포 현탁액을 한방울 떨어내어 cold slide에 놓고 고정시킨 후 Giemsa로 염색하여 Permouنت에서 관찰했다.

Propidium iodide 염색을 위해 hepatoma cell을 4×10^3 개/ml씩 되게 넣고 배양시켰다. 24시간 후에 배지를 조심스럽게 제거하고 준비된 시료를 넣었다. 세포를 취하여 70% ethanol을 가하고, 4°C에서 60분간 고정시켰다. 그 후, PBS에 세포를 재현탁시켜, RNase(250 μ g/ml)를 첨가하고, propidium iodide(25 μ g/ml)로 염색하였다. 25°C에서 15분간 반응시킨후, 형광현미경으로 그 형태를 관찰하였다.

실험결과 및 고찰

Microplate에서의 세포수에 따른 성장곡선과 흡광도

Fig. 2와 같다. 세포수 4×10^3 cells/well으로 48시간

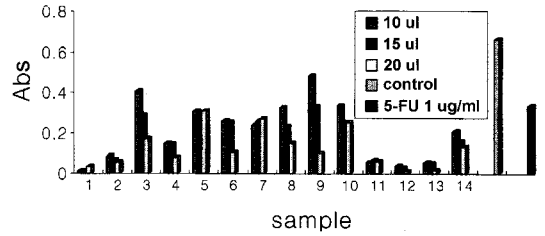


Fig. 3. Absorbance measured by MTT assay. Each samples of 10 μ L, 15 μ L, 20 μ L were added to hepatoma cell. Then, it was cultured during 2 days

동안 배양한 결과에서 적절한 실험조건을 보였으므로 이 시점을 기본 배양기간으로 정하고 실험을 행하였다.

각 시료에 대한 결과

Fig. 3에서와 같이 *Capsicum annuum L. var. angulosum Mill*, *Lactuca dentata Makino. var. flaviflora Makino*에서 살아있는 세포수의 현저한 감소를 보였다.

세포의 시간별 배양곡선

Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6은 시료를 첨가한 후, 시간별로 본 세포의 배양곡선을 농도별로 나타내고 있다. 그래프에서 보는바와 같이 확인초에서는 세포의 증식 속도가 둔화되고 있음을 알 수 있고, *Equisetum arvense L*와 *Lactuca dentata Makino. var. flaviflora Makino*에서는 시간이 지남에 따라 살아있는 세포수가 감소되고 있으며, *Capsicum annuum L. var. angulosum Mill*에서는 살아있는 세포가 거의 없음을 알 수 있다.

세포형태변화

Trypsin digestion한 후, 3일 뒤에 세포가 배양 병 바닥에 붙어 자라기 시작해서 Fig. 7에서 보는바와 같이 7일 뒤에는 선명한 형태를 갖추고, 성장을 계속한다. 그러나, 냉이(*Lactuca dentata Makino. var. flaviflora Makino*)추출액을 주입한 세포에서는 Fig. 8에서 관찰되는 것처럼 7일 후에 여러 세포들의 응집 성장을 보였으며, 이 세포응집현상이 계속되다가 13일경에 조금씩 파쇄되어 그 수가 줄어들고, 그 주변에 파쇄된 세포 파편들이 관찰되기 시작했다. 이 현상은 진행되어 발전하다가 17일 경에는 대부분의 세포가 파쇄되었다.

또한 고추잎(*Capsicum annuum L. var. angulosum Mill*)추출액의 경우는 다른 시료들에비해, 그 영향이 훨씬 빠르고, 강하게 나타나서, 시료 주입 2일 후부터 세포의 형태가 희미해지면서, 파손되는 것이 관찰되었고, 10일 후에는 거의 모든 세포가 파쇄됨을 확인할 수 있었다.

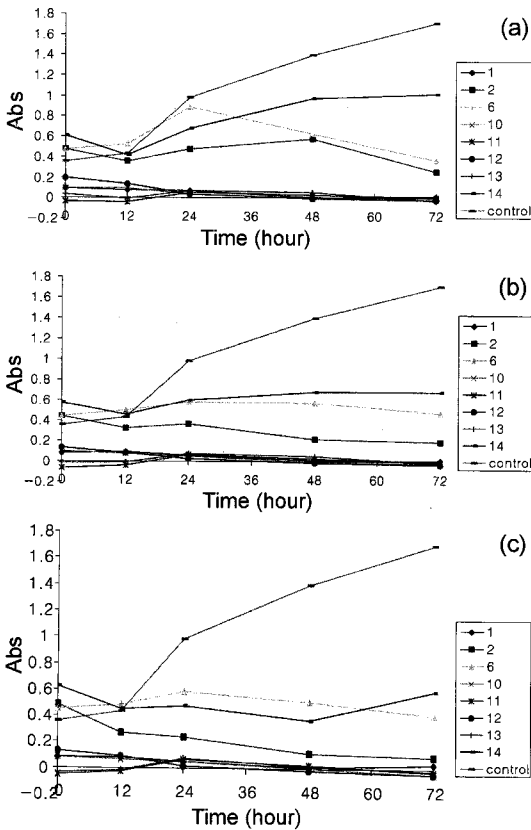


Fig. 4. (a) The absorbance examined during various time intervals. Each sample was added to hepatoma cell, then these's cultured. Used sample's 10 µL. (b) The absorbance examined during various time intervals. Each sample was added to hepatoma cell, and it was cultured. 15 µL of sample is used. (c) The absorbance examined during various time intervals in each sample. 20 µL of sample's used.

Chromosome 형태변화

이상의 관찰에서 고추잎 추출액이 hepatoma cell의 증식을 현저히 억제하였으므로 고추잎 추출물을 첨가하여 chromosome의 그 형태적변화를 관찰하였다.

정상적인 배지에서 시료첨가없이 배양한 세포의 chromosome은 37시간 경과한 후나 40시간 뒤가 별로 차이가 없었다. 그러나 추출물을 첨가한 경우는, 37시간 경과후 chromosome 농축이 관찰되었고, 40시간 경과 후의 chromosome은 그 길이가 늘어나 전체적으로 느슨하게 보였다. 이는 37시간 전후에서는 chromosome이 농축되는 것처럼 보이다가 40시간 이후에는 그 변화양상이 달라지는 것으로 보이는데 이에 대해서는 앞으로 더 깊은 연구가 필요하다고 생각된다.

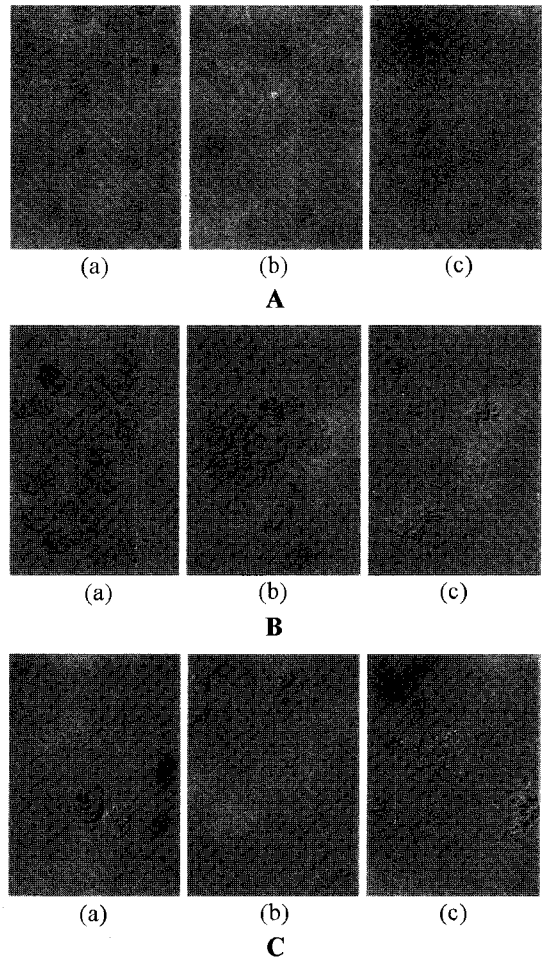


Fig. 5(A). Hepatoma cell's growth morphology in 25 cm² Canted Neck Flask. a) 3rd day, starting to grow on the bottom of cultural bottle b) 4th day c) 7th day continuing to grow with clear form Fig. 5(B). Hepatoma cell's changing morphology when *Lactuca dentata Makino. var. flaviflora Makino* are added to the medium a) 7th day, many of cells are aggregated b) 13th day, slowly fragmented c) 17th day, almost destroyed Fig. 5(C). When *Capsicum annuum L. var. angulosum Mill* are added to the medium a) 2nd day, started to be fragmented b) 10th day, almost cells destroyed c) 18th day, there were a lot of cell debris

Propidium iodide 염색법에 의한 형태학적 관찰

Propidium iodide로 염색한 결과에서도, 시료첨가없이 그 형태변화가 시간에 따라 별로 차이를 보이지 않았다. 그러나, 시료 첨가후 3시간부터 핵의 농축이 일어나기 시작하여, 6시간 경과후에는 대부분의 세포에서 핵의 농축을 볼 수 있었으며, 48시간 뒤에는 깨어진 세포로부터 나온 핵파편들을 관찰할 수 있었다.

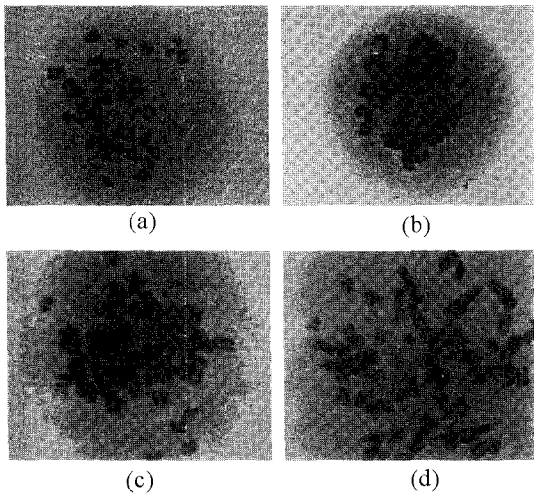


Fig. 6. The chromosomal states. The 4×10^3 /ml hepatoma cells were added to the medium in 25 cm² Canted Neck Flask. and then, *Capsicum annuum L. var. angulosum Mill* were added to it a) After 37 hrs, Normal hepatoma cell's chromosome b) After 40 hrs, Normal hepatoma cell's chromosome c) After 37 hrs, It seems to concentrate d) After 40 hrs, chromosome with loose form

결 론

우리 인근의 식물들을 중심으로 항암효과를 관찰하기 위해 암세포주(human hepatoma cell line)를 배양하여 식물들이 그 증식에 미치는 영향을 살펴보았다.

Capsicum annuum L. var. angulosum Mill 추출물을 첨가한 경우, 암세포 성장을 현저히 감소시켰으며, 청추와 청추씨, 홍추와 홍추씨에서도 분명한 항암효과가 관찰되었다. *Equisetum arvense L*와 *Lactuca dentata Makino. var. flaviflora Makino*에서도 세포성장억제를 관찰할 수 있었다.

형태적 변화에 대한 관찰에서, *Lactuca dentata Makino. var. flaviflora Makino*를 첨가한 세포에서는 7일 후에 세포응집과 13일경의 파쇄가 관찰되었다. *Capsicum annuum L. var. angulosum Mill*을 첨가한 세포의 경우에는 2일경부터 파쇄가 나타났다. Chromosome은 시료(*Capsicum annuum L. var. angulosum Mill*)첨가 37시간에 관찰되었으며, 그 chromosome은 농축현상을 보여주었다.

Propidium iodide 염색법에서 시료첨가 3시간에 농축현상을 보이기 시작하여, 시료첨가후 배양시간에 따라 농축현상이 더해가다가 48시간에 파쇄현상을 보였다.

이상의 실험결과로부터 *Capsicum annuum L. var. angulosum Mill* 추출물을 첨가한 hepatoma cell에서 apoptosis의 형태학적 특징인 chromosome의 conden-

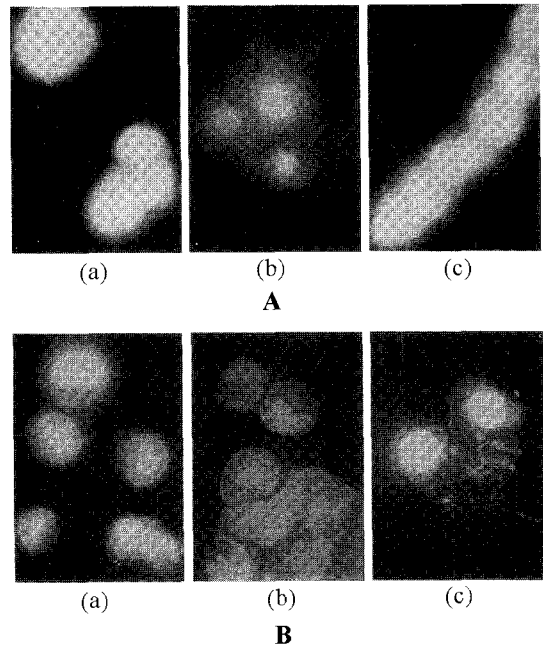


Fig. 7(A). PI staining when hepatoma cells are cultured for a) 3th hour b) 6th hour c) 48th hour Fig. 7(B). PI staining when hepatoma cells are cultured for a) 3th hour b) 6th hour c) 48th hour in medium added *Capsicum annuum L. var. angulosum Mill*

sation을 볼수 있었으며, PI 염색법에서도 핵의 농축과 48시간뒤의 깨어진 세포로부터 나온 핵파편들을 관찰할수 있었다. 그러므로, *Capsicum annuum L. var. angulosum Mill* 추출물이 hepatoma cell의 세포사를 유도한다고 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 1990년도 경성대학교 교비연구비에 의해 수행되었으므로 이에 감사를 드립니다.

문 헌

1. Kosuge T, Yokota M, Sugiyama K, et al. Studies on antitumor activity and antitumor principles of Chinese herbs. *Yakugaku Zasshi* 1985; 105(8): 791
2. Yanamoto I, Nagumo S. Tumor-inhibiting effect of Tangle and Sagassum against sarcoma 180-solid tumor. *Annal Meeting of Jap. Soc. of Cancer.*, Abstracts 1973; 1225
3. Morita K, Hara M, Kada T. Studies on natural desmutagens; Screening for vegetable and fruit factors active in inactivation of mutagenic pyrolysis products for amino acids. *Agric Biol Chem* 1987; 42: 1235
4. R. Ian Freshrey. Culture of animal cells-a manual of basic technique. Alan R. Liss Inc., New York

5. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Meth* 1986; 89: 271
6. Yong-Za Jung, Hyun-Ok Jung, Gi-Tae Hong, et al. Comparison of lectin from *Pseudixus japonicus* and Concanavalin A on lymphocytes proliferation and cytotoxicity. *Arch Pharm Res* 1991; 14(3): 207-216
7. 안주택, 정현배, 태의성. 한국 자원 식물 1984
8. Korsmeyer SJ. Bcl-2: an antidote to programmed cell-death. *Cancer Surveys* 1992; 14: 105-118