

어성초 추출물의 세포독성(IX)

이기남¹ · 이정호¹ · 송용선¹ · 정재열¹ · 김삼태¹ · 임진아² · 이인아² · 유형원² ·
장용남³ · 이택준³ · 김홍기³ · 천현자⁴ · 유일수⁵ · 김종수⁵ · 백승화²

¹원광대학교 한의학전문대학원 제3의학과, ²한약자원개발학과, ³한의과대학 예방의학교실,
⁴자연과학대학 자연과학기술학부, ⁵익산대학 환경공업화학과의

Cytotoxicity of Extracts from *Houttuynia cordata* (IX)

Ki Nam Lee,¹ Jeong Ho Lee,¹ Yong Sun Song,¹ Jae Yeal Jeong,¹ Sam Tae Kim,¹
Jin A Lim,² In A Lee,² Hyeong-Won Ryu,² Yong Nam Jang,³ Taek Jun Lee,³
Hong Ki Kim,³ Hyun Ja Chun,⁴ Il Soo You,⁵ Jong Soo Kim⁵ & Seung Hwa Baek²

¹Dept. of Third Medicine, and ²Dept. of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine,
School of Medicine and Dept. of Preventive Medicine
and ⁴Division of Natural Science, Won Kwang University, Iksan, 570-749, Korea.
⁵Dept. of Environmental Engineering & Chemical Technology, Iksan College, Iksan 570-110, Korea.

Abstract

This study was carried out to evaluate cytotoxic effects of *Houttuynia cordata* THUNB extracts on A549(lung cancer), B16(mouse melanoma), MDA-MB231(breast cancer) and SNU-C4(colon cancer) cell lines. We have determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide(MTT) assay. The 150 μ g/ml concentration of chloroform extract of *Houttuynia cordata* THUNB was shown significantly antitoxic activity on MDA-MB231(65.96 \pm 5.68%) and SNU-C4(55.94 \pm 7.39%) cell lines.

Key words : *Houttuynia cordata* THUNB, MTT assay, cytotoxic effect

* Corresponding author : Dept. of Third Medicine, Professional Graduate School, Won Kwang University.
Tel : 82-63-850-6836. E-mail : kinam1@wonkwang.ac.kr

서 론

현대인들의 식생활 습관과 환경오염 등으로 인하여 암환자가 증가하는 실정이며, 암의 치료는 수술요법, 방사선요법, 면역요법, 약물요법 등이 있다. 암의 치료에 다양한 항암제는 세포독성을 이용하여 항암효과를 측정하고 있으나 정상세포와 면역계의 세포에게도 독성을 발현하여 부작용을 일으킨다. 따라서 부작용이 적고 강력한 항암작용을 나타낼 수 있는 천연물에서 항암 활성성분의 연구가 진행되고 있다.¹⁻³⁾

암세포에 손상을 주는 세포독성은 비특이적 방어기전을 갖고 있으며, 생체내 대식세포와 림프구와 같은 표적세포에 세포독성을 유발하는 세포를 자극하여 세포독성효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 암의 발생은 환경의 오염과 유전적 인자로 인하여 발생하는 것으로 알려져 있다.^{4,5)} 천연물은 전통적으로 민간약이나 질병의 예방에 사용되어 왔으며 현재 많은 연구자들은 천연물에서 항암효과를 갖는 물질을 찾으려 노력하고 있다. 미나리과에 속하는 당근 뿌리와 씨앗의 methanol 추출물에서 인체 간암세포인 HepG2, 자궁경부암 세포인 HeLa, 유방암 세포 MCF7, 난소암 세포 SW626, 신경교종세포 C6, 신경아세포 NB41A3에 대한 세포독성효과가 있는 것으로 보고되었으며,⁵⁾ 고구마, 과일, 해조류를 섭취하면 혈청 중 β -carotene의 농도가 높게 나타나며, 위암, 자궁경부암, 대장암, 유방암, 폐암 등이 발생이 낮아지고 암세포에 억제효과가 있는 것으로 알려져 있다.^{6,7)} 굴피나무 잎 methanol 추출물에서 인체 고형암 세포인 A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF-498, HCT-15 세포에서 활성을 나타낸 것으로 보고되었으며,⁸⁾ 백출 뿌리 추출물에서 SK-MEL-3세포에서 세포독성효과와 항균효과가 있는 것으로 보고되었다.⁹⁾ 어성초를 물과 유기용매로 추출한 추출

물이 마우스의 백혈병 세포인 L1210세포, P388D₁, Vero세포에 대하여 세포독성효과와 항균, 항진균효과가 있으며, 어성초에서 분리한 quercitrin이 카드뮴에 대한 독성억제 효과가 있는 것으로 보고되었다.^{10,11)}

어성초에 함유된 methyl-*n*-nonylketone과 lauryl aldehyde 물질은 바이러스 활성을 억제하는 것으로 나타났으며, 어성초 메탄올 추출물에서 분리한 quercitrin이 카드뮴에 대한 독성억제효과가 있는 것으로 알려져 있다.¹²⁻¹⁴⁾ 본 연구에서는 어성초를 물과 유기용매로 추출하여 A549(lung cancer), B16(mouse melanoma), MDA-MB-231(breast cancer), SNU-C4(colon cancer) cell에 대하여 MIT 정량분석법으로 세포독성능을 측정하였다.

실 험

1. 실험재료

본 실험에 사용한 어성초는 전북 익산시 팔봉동에서 채취하여 외부형태를 비교한 후, 잘게 썰어 음건하여 분쇄한 시료(30g)를 hexane(300 ml)에 넣고, 상온에서 24시간 3회 반복 추출하여 0.4 μ m 필터로 여과한 후, 진공증류기로 35 $^{\circ}$ C에 감압 농축시킨 후 냉동 건조시켜 hexane 추출물을 얻었으며, chloroform, ethyl acetate, methanol, ethanol, 물을 이용하여 hexane 추출물과 같은 방법으로 추출하였다.

2. 시약 및 기기

어성초 추출 및 분리에 사용된, hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol, ethanol, H₂O, butanol은 증류하여 사용하였다. FBS (fetal bovine serum), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide,

PRMI medium 1640, antibiotic-antimyzolic, Herpes, L-glutamine, Mueller Hinton broth (Difco), HBSS(Hanks balanced salt solution) 등은 Gibco계 GR급을 사용하였고, 0.4% trypan blue solution, DMEM(dimethylsulfoxide) 등은 Sigma사에서 구입하였다. 세포의 배양은 CO₂ incubator(Shellab Co., U.S.A.)를 사용하였고, 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기를 사용하였으며, 현미경은 도립현미경(Inverted Microscope, Olympus)을 사용하였고 MTT 정량은 ELISA reader(Spectra Max 250, U.S.A.)를 사용하였다.

3. 세포배양

A549(lung cancer), B16(mouse melanoma), MDA-MB-231(breast cancer)과 SNU-C4(colon cancer 한국 세포주 은행, KCLB)의 배양은 CO₂ 배양기(37°C, 5%)에서 실시하였으며, A549, MDA, SNU-C4는 10% fetal bovine serum (FBS)이 포함된 RPMI-1640(Gibco BRL, Life Technologies Inc., U.S.A.)를 사용하였고 B16 mouse melanoma는 10% FBS가 포함된 DMEM (Gibco BRL, Life Technologies Inc., U.S.A.)을 사용하여 배양하였다. 각 세포는 약 72시간을 주기로 trypsin-EDTA Gibco BRL, Life Technologies Inc., U.S.A)용액을 사용하여 계대배양, 포집하여 사용하였다.

4. MTT assay를 이용한 세포독성 측정

암세포의 세포독성능 측정은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromide 검정법^{15,16)}으로 의하여 96 well plate에 A549, B16 mouse melanoma, MDA-MB-231, 그리고 SNU-C4를 2×10⁴ cells/ml의 농도로 분주하여 48시간 배양한 후 25, 50, 100, 150µg/ml 농도의 여성초 추출물을 처리하여 24시간 동안

배양하였다. 배양 후 상등액을 제거하고 tetrazolium bromide salt(MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.)를 0.2µg/ml 농도로 가하여 4시간 동안 배양하였으며, 생성된 formazan 결정을 dimethylsulfoxide(DMSO, Sigma)에 용해시켜 540nm 파장에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 결과 분석은 실험군의 평균 OD 540nm 값을 구하여 대조군(100% 생존군)의 평균 OD 540nm 값에 대한 백분율로 환산하였다.

5. 통계학적 해석

실험결과와 통계학적 처리는 Student's t-test 를 이용하였으며, p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

여성초를 hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol, ethanol, 물 추출물을 이용하여 A549 cell(lung cancer), B16 cell(mouse melanoma), MDA-MB-231 cell(breast cancer), SNU-C4 cell(colon cancer) cell에 대하여 세포독성능을 MTT 정량분석법으로 측정하였다.

1. A549 cell 세포독성

폐암세포인 A549 cell에서 ethyl acetate 추출물에서 가장 높은 세포독성이 나타났으며, 25µg/ml의 농도에서 chloroform 추출물, ethyl acetate 추출물, methanol 추출물은 비슷한 세포독성이 측정되었고, ethyl acetate 추출물의 100µg/ml의 농도에서 71.54±3.24%(p<0.01)와 150µg/ml의 농도 60.07±0.64%로 가장 높은 세포독성이 나타났다. Methanol 추출물에서 50µg/ml(84.54±1.23%), 100µg/ml(82.56±2.31%)로 세포독성이

비슷하게 나타났으나 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (63.81 \pm 7.37%)에서 세포독성능이 증가하는 경향을 보였으며, 물 추출물에서는 투여농도가 증가할수록 A549 cell이 증식되는 경향으로 나타났다. Ethyl acetate 추출물 \rightarrow methanol 추출물 \rightarrow chloroform 추출물 \rightarrow ethanol 추출물 \rightarrow hexane 추출물 \rightarrow 물 추출물 순으로 A549 cell의 세포독성이 감소하였다(Fig. 1).¹⁷⁻¹⁹⁾

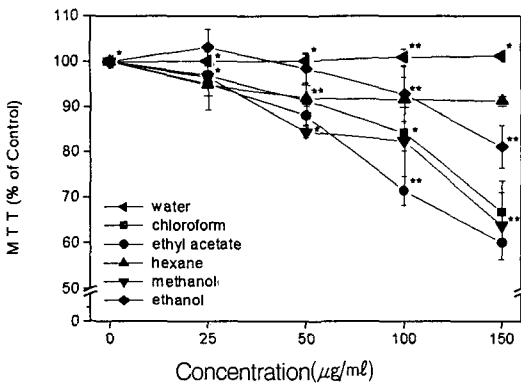


Fig. 1. Effect of *Houttuynia cordata* extracts on the viability of A549(lung cancer) cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of *Houttuynia cordata* extracts for 48 hrs. The viability of the cells were measured by MTT assay. Result were expressed as % control and data were mean \pm S.D. of at least five different experiments. Significantly different from the control value ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Student's t-test)

2. B16 cell 세포독성

마우스 피부암 세포인 B16 cell에서는 methanol 추출물의 투여농도가 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 78.83 \pm 5.75% ($p < 0.05$)로 가장 높은 세포독성이 나타났으나 저 농도인 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 107.78 \pm 0.82%로 B16 cell이 더 증식되는 현상을 보였다. Ethyl acetate 추출물과 ethanol 추출물에서는 투여농도가 증

가할수록 B16 cell의 세포독성이 나타나지 않고 증식되는 현상을 보였다. 물 추출물과 hexane 추출물에서는 투여농도가 증가하여도 세포독성은 나타나지 않았으며, A549 cell보다 B16 cell의 세포독성능은 낮게 나타났다. Methanol 추출물 \rightarrow chloroform 추출물 \rightarrow hexane 추출물 \rightarrow 물 추출물 \rightarrow ethyl acetate 추출물 \rightarrow ethanol 추출물 순으로 세포독성능이 나타났다(Fig. 2).^{19,20)}

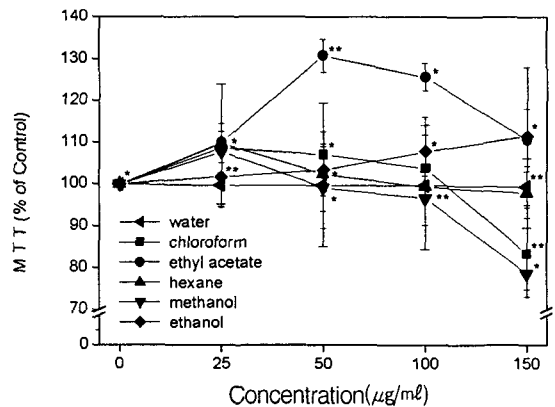


Fig. 2. Effect of *Houttuynia cordata* extracts on the viability of B16(mouse melanoma) cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of *Houttuynia cordata* extracts for 48 hrs. The viability of the cells were measured by MTT assay. Result were expressed as % control and data were mean \pm S.D. of at least five different experiments. Significantly different from the control value ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Student's t-test)

3. MDA-MB-231 cell 세포독성

유방암 세포인 MDA-MB-231 cell에서는 투여농도가 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 모든 추출물에서 세포독성이 나타나지 않고 세포가 증식되는 현상을 보였지만 농도가 증가할수록 methanol

추출물과 chloroform 추출물에서는 세포독성이 나타났지만 ethanol 추출물과 hexane 추출물에서는 세포독성이 나타나지 않고 세포가 증식되는 현상이 나타났다. 투여농도가 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도의 chloroform 추출물에서 65.95 \pm 5.68%로 가장 높은 세포독성이 나타났지만, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 methanol 추출물과 chloroform 추출물은 비슷한 세포독성이 나타났다. Chloroform 추출물 \rightarrow methanol 추출물 \rightarrow 물 추출물 \rightarrow ethyl acetate 추출물 \rightarrow hexane 추출물 \rightarrow ethanol 추출물 순으로 세포독성능이 나타났다(Fig. 3).²¹⁻²³⁾

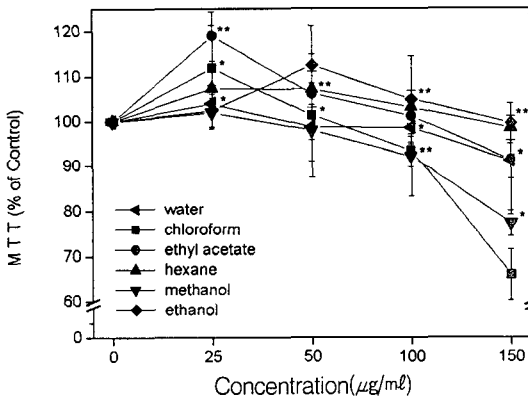


Fig. 3. Effect of *Houttuynia cordata* extracts on the viability of MDA-MB-231 (breast cancer) cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of *Houttuynia cordata* extracts for 48 hrs. The viability of the cells were measured by MTT assay. Result were expressed as % control and data were mean \pm S.D. of at least five different experiments. Significantly different from the control value ; * p < 0.05, ** p < 0.01 (Student's t-test)

4. SNU-C4 cell 세포독성

대장암 세포인 SNU-C4 cell에서는 투여농도가 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 chloroform 추출물(81.27 \pm 7.46%)과

methanol 추출물(80.08 \pm 4.34%)은 비슷한 세포독성이 나타났으나 투여농도가 고농도인 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 chloroform 추출물이 55.94 \pm 7.39%로 가장 높은 세포독성을 나타냈다. Chloroform 추출물 \rightarrow ethyl acetate 추출물 \rightarrow methanol 추출물 \rightarrow ethanol 추출물 \rightarrow 물 추출물 \rightarrow hexane 추출물 \rightarrow 순으로 세포독성능이 나타났다. 추출물의 투여농도가 저농도인 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 chloroform 추출물에서 세포독성 89.94 \pm 5.5%(p < 0.01)이 나타났지만 다른 추출물에서는 세포독성이 나타나지 않았고 물 추출물과 hexane 추출물에서는 투여농도가 증가하여도 세포독성은 나타나지 않았다. Methanol 추출물의 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (98.03 \pm 2.69%)까지는 세포독성이 크게 나타나지 않았으나 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 80.08 \pm 4.34%, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 71.53 \pm 11.7%로 투여농도가 증가할수록 세포독성도 증가하였다(Fig. 4).²³⁻²⁴⁾

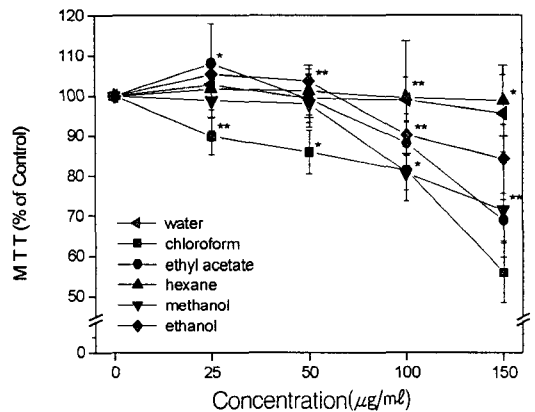


Fig. 4. Effect of *Houttuynia cordata* extracts on the viability of SNU-C4 (colon cancer) cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of *Houttuynia cordata* extracts for 48 hrs. The viability of the cells were measured by MTT assay. Result were expressed as % control and data were mean \pm S.D. of at least five different experiments. Significantly different from the control value ; * p < 0.05, ** p < 0.01 (Student's t-test)

어성초 추출물이 A549(lung cancer), MDA-MB-231(breast cancer), SNU-C4(colon cancer), B16(mouse melanoma) cell에서 세포독성 효과가 나타났으며, methanol 추출물에 암세포에 대한 세포독성억제 물질, 즉 항암활성을 갖는 물질이 가장 많이 함유되어 있는 것으로 판단된다.

결 론

어성초(*Houttuynia cordata* THUNB)에서 hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol, ethanol, H₂O 추출물을 이용하여 A549(lung cancer), MDA-MB-231(breast cancer), SNU-C4(colon cancer), B16(mouse melanoma) cell에서 세포독성을 측정한 결과, 어성초 추출물에서 세포독성이 나타났으며, 투여농도가 증가할수록 세포독성이 증가하였다. 투여농도가 150 μ g/ml에서는 methanol 추출물에서 A549 cell은 63.81%, B16 cell 78.83%와 chloroform 추출물에서는 MDA-MB-231 cell 69.95%, SNU-C4 cell 55.94%로 세포독성이 나타났다. 어성초 methanol 추출물과 chloroform 추출물에서 세포독성효과가 가장 높게 나타났다.

참고문헌

1. Lee, D. I., Kim, H. K., Lee, M. W., Choi, Y. W.; Kim, H. H., and Kim, E. J. : Augmentation of macrophage cytotoxicity and NO production by pedunculagin, YakHak Hoeji, 2000 ; 44(2) : 175-181.
2. Gilman, A. D., Goodman, L. S., Rall, T. W. and Murad, F. : Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, 7th Ed., Macmillan Publishing Co., New York, 1988 ; pp.1268-1335.
3. Pary, J. H., Park, K. H., Ho., H. S., Kim, H. D. and Pyo, M. Y. : Synthesis and antitumor activity of novel Gericudranin E derivatives, YakHak Hoeji, 1999 ; 43(5) : 559-565.
4. Fischer, S. M., Leytin, L. J., Lee, M. L., Locniscar, M, Belury, M. A. and Maldve, R. E. : Differential effects of dietary linoleic acid on mouse skin-tumor promotion and mammary carcinogenesis. Cancer Res., 1992 ; 52 : 2049-2056.
5. Han, E. J., Roh, S. B. and Bae, S. J. : Cytotoxicity of *Daucus carota* L. on various cancer cells, 2000 ; 29(1) : 153-169.
6. Gerster, H. : Beta-carotene and smoking. J. Nutr. Growth Cancer. 1987 ; 4 : 45-49.
7. Shibata, A., Sasaki, R., Ito, Y., Reular, J. B. and Broudy, V. C. : Serum concentration of beta-carotene and intake frequency of green-yellow vegetables among healthy inhabitants in Japan, Int. J. Cancer, 1989 ; 44 : 48-52.
8. Kim, Y. I., Lee, S. H. and Cho, T. S. : Isolation of anticancer agents from the leaves of *Platycarya strobilacea* S. et Z. Kor. J. Pharmacogn, 1996 ; 27(3) : 238-245.
9. Choi, E. Y., Oj, H. J., Park, N. K., Chun, H. J., Ahn, J. W., Jeon, B. H., Han, D. S., Lee, H. O. and Baek, S. H. : Screening of cytotoxicity and antimicrobial effects of extracts from *Atractylodes macrocephala* Koidz. Korean J. Oriental Physiology & Pathology, 2002 ; 12(2) : 348-352.
10. Lee, J. H., Park, N. K., Yang, E. Y., Lee, H. O., Han, D. M. and Baek, S. H. : Studies on the cytotoxicity and antimicrobial effects of the extracts of *Houttuynia cordata*(IV).

- Kor. J. Oriental Preventive Medical Society, 2000 ; 4(1) : 144-151.
11. Lee, J. H., Lee, K. N., Lee, C. W., Chun, H. J., You, I. S., Lim, J. I. and Baek, S. W. : The inhibitory effects of quercitrin from *Houttuynia cordata* against cadmium induced cytotoxicity(VII). J. Korean Chemical Society. 2003 ; 47(2) : 175-178.
 12. Pröbstle, A. Neszmelyi, A. Terkovich, G. Wagner, H. and Bauer, R. : Novel pyridine and 1, 4-dihydropyridine alkaloids from *Houttuynia Cordata*, Natural Product Letters. 1994 ; 4, 235-240.
 13. Chung, C. K., Han, S. S., Lee, S. Y., Oh, D. H., Choi. S. Y., Kang, I. J. and Nam, S. M. : Effects of *Houttuynia cordata* ethanol extracts on serum lipids and antioxidant enzymes in rats fed high fat diet. J. Kor, Soc, Food Sci. Nutr. 1999 ; 28(1), 205-211.
 14. Lee, J. H., You, I. S., Kim, J. S., Lee, K. N., Chung, W. Y., Han, D. S. and Beak, S. H. : The inhibitory effects of *Houttuynia cordata* THUMB against cadmium induced cytotoxicity(II). Kor. J. Pharm. 2000 ; 44, 432-439.
 15. Mosmann, T. : Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods, 1983 ; 65, 55-63.
 16. Keepers, Y. P., Pozao, P. E., Peters, G. T., Otte, J. A., Winograd, B. and Pinedo, H. M. : Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium(MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. Eur. J. Cancer, 1991 ; 27, 897-900.
 17. Kyoko Hayashi, Mioko Kamiya and Toshimitsu Hayashi : Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia Cordata* and its components on HSV-1, influenza Virus, and HIV, *Planta Med.* 1995 ; 61, 237-241.
 18. Mun, Y. J., Nam, Y. J., Lee, K. G., Choi, D. H., Lee, S. W., Ahn, S. H., Choi, M. K. and Woo, W. H. : The water extract of *caesalpinia sappan* induces apoptosis on Human lung cancer cell Line, A 549 Cells. Kor. J. Orien. Physiol. & Pathol. 2002 ; 16(3). 521-527.
 19. Chun, H. Y., Hwang, S. G., Kim, C. K., Jeon, B. H., Baek, S. H. and Woo, W. H. : In Vitro modulation of proliferation and melanization of B16/F10 melanoma Cells by quecetin. *Yakhak Hoeji*, 2002 ; 46(1), 75-80.
 20. Park, J. G., Park, J. C., Hur, J. M. and Kim, M. S. : Phenolic compounds from *Orostachys japonicus* having Anti-HIV-1 protease activity, *Natural Product Science*, 2002 ; 6(3), 117-121.
 21. Watanabe, N., Forman H.J. : Autoxidation of extracellular hydroquinones is a causative event for the cytotoxicity of menadione and DMNQ in A549-S cells. *Arch Biochem. Biophys.* 2003 ; 411(1), 145-57.
 22. Croute, F., Poinot, J., Gaubin, Y., Beau, B., Simon, V., Murat, J. C. and Soleilhavoup, J. P. : Volatile organic compounds cytotoxicity and expression of HSP72, HSP90 and GRP78 stress proteins in cultured human cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002 ; 1591(1), 147-155.
 23. Johnstone, E. C., Lind, M. J., Griffin, M. J. and Boddy, A. V. : Ifosfamide metabolism and DNA damage in tumour and peripheral blood lymphocytes of breast cancer patients.

- Cancer Chemother Pharmacol. 2000 ; 46(6), 433-41.
24. Nakamura, K., Yamaguchi, Y., Kagota, S., Kwon, Y. M, Shinozuka, K. and Kunitomo, M : Inhibitory effect of Cordyceps sinensis on spontaneous liver metastasis of Lewis lung carcinoma and B16 melanoma cells in syngeneic mice. Jpn. J. Pharmacol. 79(3), 335-341.