

Cytotoxic Effect of Syringic Acid on Human Oral Epithelioid Carcinoma Cells

Joo-Hyun Lee¹, Du-Suk Han¹, Seung-Joo Jekal³, Jae-Hyung Lee³,
Chong-Ho Kim³, Min-Yoo⁴ and Seung-Taeck Park^{2†}

¹College of Dental Medicine, ²School of Medicine, Wonkwang University,

³Wonkwang Health Science College, Jeonbuk, 570-749, Korea.

⁴Department of Biology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

This study was undertaken to clarify the cytotoxic effect of syringic acid by colorimetric assay on human cancer cells. For the evaluation of cytotoxicity of syringic acid, the cell viability and cell adhesion activity of syringic acid on cancer cells, human oral epithelioid carcinoma cells were determined using by colorimetric assays such as MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay and XTT (2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-caboxanilide) assay, respectively after human oral epithelioid carcinoma cells were treated with syringic acid for 48 hours. In this study, the cell viability of syringic acid on human oral epithelioid carcinoma cells showed a significant decrease by MTT assay compared with control, and also, the cell adhesion activity by XTT assay was decreased significantly in these cells after cells were treated with various concentrations of syringic acid for 48 hours. MTT₅₀ and XTT₅₀ were 282.3 μ M and 418.8 μ M syringic acid, respectively. These results suggest that syringic acid shows midcytotoxic effect on human oral epithelioid carcinoma cells by the decrease of the cell viability and the cell adhesion activity assessed by colorimetric assay in these cultures.

Key Words: Human oral epithelioid carcinoma cell, Syringic acid, Cell viability

서 론

암의 발생은 우리의 식생활과 밀접한 관련이 있는데 특히 육류를 다량 섭취하는 사람들에게서 채식을 섭취하는 사람들보다 발병율이 더욱 높다는 것은 잘 알려져 있다 (Sharma et al., 1994). 이는 동물성 성분보다는 식물성 성분이 인체의 신진대사를 조절하는데 더욱 유용한 효능을 나타낸다는 것을 제시하고 있다 (Kolodziej et al., 2001). 그러므로 모든 선진국들은 식물추출물을 이용하여 항암제를 비롯한 건강식품이나 각종 의약품의 개발에 막대한 예산지원을 아끼지 않고 있다 (Sakagami et al., 2000). 지금까지 개발된 항암제들은 물론 암세포를 죽이는 항암작용이 뛰어나지만 (Heilman et al., 2000), 반면 정상세포에 대해서도 동일한 효과를 나타냄으로써 항암제로 치료받은 환자들의 대부분은 완치 후에도 각종

부작용과 심한 후유증으로 고통을 받게 된다 (Xu et al., 1988; Sakagami et al., 2000). 따라서 식물에서 추출한 천연성분들은 기존의 화학약제에 비하여 정상세포에 대한 독성이 적으면 서도 암세포에 대해서는 강한 독성을 나타내는 선택적 독성 효과를 가지고 있다고 알려지면서 이에 대한 기전규명은 물론 성분의 추출, 효능에 대해 많은 연구를 시도하고 있다 (Shim et al., 1995). 식물에서 추출되는 성분중 페놀화합물은 수산기를 가진 일종의 방향족고리 구조를 형성하고 있는 이차대사산물의 총칭으로 여러 형태로 존재하고 있다 (Goldberg et al., 1999; Ferguson, 2001). 이들은 식물이나 과일 등에 다량 포함되어 있으며 그 밖에 녹차류나 견과류에도 풍부히 들어 있다 (Isuzugawa et al., 2001). 이들 성분은 물을 비롯하여 지질이나 화학적 매질에 잘 녹음으로서 다른 화합물질에 비하여 성분추출이 어렵지 않다는 장점이 있다 (Kawada et al., 2001). 페놀화합물에는 tannic acid를 비롯하여 gallic acid 및 syringic acid와 같은 다양한 성분들이 존재하고 있다 (Li et al., 1999). Tannic acid의 경우 공업용을 비롯한 약용이나 식품첨가제 등 매우 다양한 용도로 사용되어지고 있다 (Kolodziej et al., 2001). 특히, 탄닌산은 다량 사용하면 독성이 있음이 밝혀졌으나 반면, 강력한 항산화작용, 항돌연변이작용이 있다

*논문 접수: 2005년 8월 12일

수정재접수: 2005년 9월 25일

†교신저자: 박승택, (우) 570-749 전북 익산시 신룡동 344-2,

원광대학교 의과대학 해부학교실

Tel: 063-850-6759, Fax: 063-255-6452

e-mail: spark@wonkwang.ac.kr

고 알려져 있다 (De Heredia et al., 2001). Gallic acid의 경우는 tannic acid보다 더욱 강력한 활성을 가지고 있어 동물세포에서 세포고사를 유도할 수 있으며 또한 항산화작용이 있다고 밝혀져 있다 (Shahrzad et al., 2001). Syringic acid의 경우는 3개의 수산기중 2개가 메틸화 되어 있는 구조식을 가지고 있어 DNA 분절능이 gallic acid보다는 다소 떨어지나 강한 항산화작용과 항균작용을 가지고 있음이 밝혀졌다 (Shim et al., 1995; Isuzugawa et al., 2001). 위에서 살펴본 바와 같이 페놀화합물들은 수산기를 비롯하여 카르복실기, 메틸기, 질산기들을 가지고 있어 항산화효과는 물론이고 항암효과나 항균효과를 나타낸다고 한다 (Ferguson, 2001; Kolodziej et al., 2001). 또한 수산기와 카르복실기의 상호작용을 비롯하여 수산기의 메틸화 등에 의해 세포에 따라 선택적인 독성효과를 나타냄으로서 신물질의 개발에 좋은 재료가 되고 있다 (Shahrzad et al., 2001). 즉, gallic acid의 경우 수산기의 메틸화와 카르복실기의 에스테르화는 세포독성을 감소시키는 효과를 나타내는데 이러한 효과는 비정상적인 세포에 더욱 강하게 나타난다고 보고된 바 있다 (Isuzugawa et al., 2001). 또한 picric acid의 경우 하나의 수산기를 가지고 있으나 카르복실기는 가지고 있지 않기 때문에 암세포에 대한 독성이 약하게 나타난다고 한다 (Li et al., 1999; De Heredia et al., 2001). 물론 이에 대한 자세한 기전은 잘 알려져 있지 않으나 지금까지의 연구에 의하면 페놀화합물이 가지고 있는 수산기와 카르복실기의 상호작용은 선택적 독성효과를 나타낸다는 것이 밝혀지고 있다 (Goldberg et al., 1999). Syringic acid 역시 수산기와 카르복실기를 가지고 있어 선택적 독성효과를 나타낸다고 알려져 있을뿐만 아니라 특히 항암작용이 있다고 제시되면서 이를 이용한 신약개발에 많은 관심이 집중되고 있다 (Shim et al., 1995; Ferguson, 2001). 그러나 이에 대해 아직 많은 연구가 되어 있지 않다 (Kawada et al., 2001). 본 연구는 syringic acid가 암세포에 미치는 항암효과를 조사하기 위하여 암세포종인 인체구강유상피암종세포에 여러 농도의 syringic acid를 처리한 후 이의 독성효과를 측정하기 위하여 세포생존율 및 세포부착능을 colorimetric assay에 의하여 분석하였다.

재료 및 방법

1. 시 약

본 실험의 세포배양에 사용한 약제로는 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), RPMI 1640 배지, fungizone 및 fetal bovine serum (FBS)으로서 이들은 모두 Gibco사에서 구입하였으며, 또한, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 비롯한 2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT), phosphate buffered saline (PBS) 및 syringic acid는 Sigma사 (St. Louis, Mo)

에서 각각 구입하였다.

2. 분석기기

인체구강유상피암종세포의 배양은 CO₂ 항온기 (Shellab Co., Cornelius, U.S.A.)를 사용하였으며 세포수의 산정은 Turk형 혈구계산기 (Marienfeld Co., Mergentheim, Germany)를 사용하였다. 또한, MTT와 XTT 정량 분석은 ELISA reader (Spectra max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, U.S.A.)를 사용하였다.

3. 세포배양

인체구강유상피암종세포의 배양은 MEM 배지에 10% FBS를 비롯하여 penicillin (25 unit/ml), fungizone을 첨가하여 사용하였다. 세포연속배양은 일차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin-EDTA로 처리한 후 Turk형 혈구계산기로 세포를 5×10^4 cells/ml가 되도록 세포부유액을 만들었다.

4. 세포생존율의 분석

MTT 분석은 Mosmann (1983)의 방법에 의하여 인체구강유상피암종세포를 5×10^4 cells/ml 세포수로 산정하여 배양액에 넣고 24시간 배양한 후 1~100 μ M의 ferulic acid를 각각의 농도로 처리한 다음 48시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 MTT (Sigma, St. Louis, MO) 50 μ g/ml가 포함된 배양액을 배양용기당 1 ml 씩을 넣어 3시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 배양액을 버리고 dimethylsulfoxide (DMSO)를 배양용기당 2 ml/well 씩을 넣어 5분간 실온에서 방치하여 MTT formazan을 용해한 다음 분광광도계 ELISA reader로 MTT 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

5. 세포부착능의 분석

1 mg laminin을 PBS에 용해시킨 저장액을 냉장고에 보관한 후 실험당일 필요한 양을 희석한 다음 24 well plate에 200 μ l 씩 분주하여 하루밤 동안 건조시켰다. 건조 완료 후 PBS로 두 세 번 세척한 다음 3% BSA (bovine serum albumin, Sigma, St. Louis, Mo)를 각 well당 200 μ l 씩 첨가하여 잘 진탕한 후 다시 이를 PBS로 2~3회 세척하였다. 배양된 인체구강유상피암종세포를 5×10^4 cells/ml 밀도로 배양용기에 넣고 24시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 1~100 μ M의 syringic acid를 각각의 농도를 처리하여 48시간 동안 배양한 다음 PBS로 두 세 번 세척하였다. 세척 완료 후 XTT와 혼합 후 각 배양용기에 200 μ l 씩을 주입하여 4시간 동안 배양한 다음 450 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

6. 세포생존율과 세포부착능의 IC₅₀ 측정

Syringic acid의 독성에 대한 IC₅₀의 측정은 배양중인 인체구강유상피암종세포를 각 용기당 5×10^4 cells/ml 씩 넣어 24

Table 1. The effect of syringic acid on cell viability in human oral epitherioid carcinoma cells by MTT assay

Group Concentration of syringic acid (μM)	MTT	
	Mean ± S.D.	(% of control)
control	3.72±0.06	100
1	3.55±0.18	95.4
50	3.26±0.21	87.5*
100	3.02±0.18	81.2**

The human oral epitherioid carcinoma cells were incubated with or without syringic acid for 48 hours. The value represent the mean ± SD for triplicate experiments. * $P<0.05$; ** $P<0.01$

시간 동안 배양한 다음 100~500 μM의 syringic acid를 첨가하여 48 시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 MTT 정량 및 XTT 정량을 한 후 이들 각각에 대한 IC₅₀ 값을 측정하였다.

7. 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 students' t-test에 준하였고 P-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 세포생존을 분석

Syringic acid의 독성효과의 분석을 위하여 syringic acid가 1~100 μM의 농도로 각각 포함된 배양액에서 인체구강유상피암종세포를 48 시간 동안 배양한 다음 MTT assay에 의하여 정량 분석하였다. 그 결과 MTT 흡광도는 대조군인 100% (3.72±0.06)에 비하여 1 μM의 농도에서는 95.4% (3.55±0.18)로 나타났으며 50 μM의 농도에서는 87.5% (3.26±0.21)로 나타났으며 이는 대조군에 비하여 유의하게 감소된 것으로 나타났다 ($P<0.05$). 또한 100 μM의 syringic acid의 처리에서는 81.2% (3.02±0.18)로 나타났으며 이는 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였다 ($P<0.01$) (Table 1).

2. 세포부착을 측정

세포부착을 정량을 위해 syringic acid가 1~100 μM 농도로 각각 포함된 배양액에서 인체구강유상피암종세포를 48 시간 동안 배양한 다음 XTT를 정량 분석하였다. 그 결과 1 μM syringic acid의 농도에서는 XTT 흡광도는 대조군인 100% (3.81±0.05)에 비하여 97.1% (3.70±0.15)로 나타났으며 50 μM의 농도에서는 94.0% (3.58±0.22)로 나타났다. 또한 100 μM의 syringic acid의 처리에서는 86.7% (3.30±0.25)으로 나타나 이는 대조군에 비하여 유의하게 감소한 것으로 나타났다 ($P<0.01$) (Table 2).

Table 2. The adhesion activity of syringic acid on human oral epitherioid carcinoma cells by XTT assay

Group Concentration (μM)	XTT	
	Mean ± S.D.	(% of control)
control	3.81±0.05	100
1	3.70±0.15	97.1
50	3.58±0.22	94.0
100	3.30±0.25	86.7**

The human oral epitherioid carcinoma cells were incubated with or without syringic acid for 48 hours. The value represent the mean ± SD for triplicate experiments. Asterisks indicate significant difference from control. ** $P<0.01$

Table 3. The cell viability and adhesion activity of IC₅₀ in syringic acid in human oral epitherioid carcinoma cells by MTT or XTT assay

Cell line	IC ₅₀ (μM)	
	Cell viability (MTT)	Adhesion activity (XTT)
Human oral epithelioid carcinoma cell	282.3	418.8

Cells were incubated with syringic acid for 48 hours. IC₅₀ of cell viability and adhesion activity was measured in human oral epitherioid carcinoma cells by MTT assay or XTT assay. The values represent the mean ± SD for triplicate experiments

3. 생존율의 MTT IC₅₀ 및 부착능의 XTT IC₅₀ 측정

세포생존율의 MTT₅₀을 측정하기 위하여 인체구강유상피암종세포에 100~500 μM의 syringic acid가 각각의 농도로 포함된 배양액에서 48 시간 동안 배양한 다음 MTT 정량을 측정하였다. 그 결과 MTT₅₀은 282.3 μM에서 나타났다 (Table 3). 한편, 세포부착능에 대한 XTT₅₀을 측정하기 위하여 인체구강유상피암종세포에 100~500 μM의 syringic acid가 각각의 농도로 포함된 배양액에서 48 시간 동안 배양한 다음 XTT 정량을 측정하였다. 그 결과 XTT₅₀은 418.8 μM에서 나타났다 (Table 3).

고 찰

암발생의 지속적인 증가는 의학기술의 발전에도 불구하고 현대의학이 해결해야 할 과제의 하나다 (Sharman et al., 1994). 특히, 현대인은 과중한 업무에 따른 스트레스의 증가를 비롯하여 적당한 휴식과 알맞은 운동을 할 충분한 여유가 없기 때문에 암을 비롯한 관절염, 당뇨, 뇌졸중 및 고혈압과 같은 난치성 질환들에 항상 노출되어 있다 (Xu et al., 1988). 이중 암은 초기발견이 어렵고 어느 정도 병변이 진행된 상태에서는 치료에 의한 빠른 회복이 어려워 많은 시간과 경제적 부담을 필요로 함으로서 완치에 대한 확률이 점점 감소하고 있

다 (Sharman et al., 1994; Heilman et al., 2000). 그러나 더욱 문제는 항암치료를 받은 환자들은 많은 후유증으로 시달리는데 이는 장기간 동안 항암제를 투여한 결과라는 것은 잘 알려진 사실이다 (Sakagami et al., 2000). 따라서 독성이 없거나 적으면서 암세포에는 강한 독성을 나타낼 수 있는 약재개발이 필수적이다 (Shim et al., 1995; Kolodziej et al., 2001). 최근에는 우리나라를 비롯한 각 나라들은 이러한 목적의 하나로 식물로부터 천연성분을 추출하여 항암제를 비롯한 각종 의약품의 생산에 적극적인 지원을 아끼지 않고 있다 (Goldberg et al., 1999; Kawada et al., 2001). 이러한 이유는 식물성분은 세포에 대한 독성이 적기 때문에 장기간 치료를 하더라도 심한 부작용이나 세포독성효과가 없기 때문이다 (Isuzugawa et al., 2001). 따라서 본 연구에서는 식물에서 추출한 페놀화합물의 일종인 syringic acid가 암세포에 미치는 영향을 MTT assay와 XTT assay를 이용한 colorimetric assay로 정량 분석하였다. 이를 위하여 1~100 μM 의 syringic acid가 각각의 농도로 포함된 배양액에서 48 시간 동안 처리한 후 인체 구강유상피암세포에 미치는 영향을 조사한 결과 syringic acid의 처리농도가 점점 증가할수록 대조군에 비하여 MTT와 XTT의 흡광도가 감소함으로써 세포독성이 증가한 것으로 나타났다. 특히, MTT assay에서는 syringic acid, 50 μM 의 이상에서, XTT assay의 경우는 100 μM 의 농도에서 유의한 흡광도의 감소를 보임으로서 강한 독성효과를 나타냈다 ($P < 0.05$). MTT 정량 분석은 세포의 생존율을 분석하는 분석방법의 하나로 사용되고 있으며 XTT 정량 분석은 세포의 부착능의 분석방법의 하나로 사용되고 있다 (Mosmann, 1983). 따라서 본 실험에 있어서 syringic acid가 인체구강유상피암세포에 대해 세포생존율의 감소와 세포부착능을 초래함으로써 세포독성을 나타냈음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 아마도 syringic acid가 세포내의 세포소기관을 손상시킴으로서 이에 상응한 효소의 활성을 억제하였을 가능성이 클 것으로 생각된다 (Sharma et al., 1994; Sakagami et al., 2000). 이러한 근거로는 MTT 정량이나 XTT 정량이 세포내의 효소활성을 분석하는 방법의 하나임을 감안할 때 이를 배제할 수는 없다 (Borenfreund et al., 1998).

본 실험에서는 더욱 자세한 syringic acid의 독성효과를 조사하기 위하여 MTT₅₀과 XTT₅₀인 IC₅₀ 값을 측정하기 위하여 100~500 μM 의 syringic acid가 각각의 농도로 포함된 배양액에서 인체구강유상피암세포를 48 시간 동안 처리한 후 MTT 및 XTT 정량 분석을 시행하여 조사하였다. 그 결과 MTT₅₀ 값은 282.3 μM 에서, XTT₅₀ 값은 418.8 μM 에서 각각 IC₅₀ 값이 나타났다. 이러한 결과는 Borenfreund et al. (1988)의 독성판정기준에 의하여 syringic acid는 인체구강유상피암세포에 대하여 중간독성 (midcytotoxicity)을 가지고 있는 것으로 나타났다. 즉, Borenfreund et al. (1998)은 모든 검

정물질의 독성효과를 IC₅₀ 값을 기준으로 정하였는데 IC₅₀ 값이 100 μM 이하이면 고독성으로 판정하였으며 100~1,000 μM 이면 중간독성으로, 1,000~2,000 μM 이면 저독성으로, 2,000 μM 이상이면 무독성으로 각각 판정하였다. 본 실험에서는 IC₅₀ 값이 100~1,000 μM 로 나타나 중간독성인 것으로 나타났다. 이러한 결과는 syringic acid가 암세포에 대하여 세포독성을 가지고 있으며 이는 항암작용이 있다는 것을 증명하고 있다 (Li et al., 1999; Sakagami et al., 2000). 그러나 syringic acid와 같은 페놀화합물들에 대한 정확한 항암작용에 대한 기전분석을 위해서는 보다 다양한 암세포들에 대한 분석과 또한 정상세포에 대한 독성효과 및 화합물성분의 약리활성이 작용하는 정확한 세포부위의 분석에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.

REFERENCES

- Borenfreund E, Babichi H, Matin-Alcuacil N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assay. The neutral red(NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol In Vitro*. 1988. 2: 1-8.
- De Heredia JB, Torregrosa J, Dominguez JR, Peres JA. Kinetic model for phenolic compound oxidation by Fenton's reagent. *Chemosphere* 2001. 45: 85-90.
- Ferguson LR. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat Res*. 2001. 18: 89-111.
- Goldberg DM, Hoffman B, Yang J, Soleas GJ. Phenolic constituents, furans, and total antioxidant status of distilled spirits. *J Agric Food Chem*. 1999. 47: 3978-3985.
- Heilmann J, Calis I, Kirmizibekmez H, Schuhly W, Harput S, Sticher O. Radical scavenger activity of phenylethanoid glycosides in FMLP stimulated human polymorphonuclear leukocytes: structure-activity relationships. *Planta Med*. 2000. 66: 746-748.
- Isuzugawa K, Ogihara Y, Inoue M. Different generation of inhibitors against gallic acid-induced apoptosis produces different sensitivity to gallic acid. *Biol Pharm Bull*. 2001. 24: 249-253.
- Kawada M, Ohno Y, Ri Y, Ikoma T, Yuugetu H, Asai T, Watanabe M, Yasuda N, Akao S, Takemura G, Minatoguchi S, Gotoh K, Fujiwara H, Fukuda K. Anti-tumor effect of gallic acid on IL-2 lung cancer cells transplanted in mice. *Anticancer Drugs* 2001. 12: 847-852.
- Kolodziej H, Kayser O, Kiderlen AF, Ito H, Hatano T, Yoshida T,

- Foo LY. Antileishmanial activity of hydrolyzable tannins and their modulatory effects on nitric oxide and tumour necrosis factor-alpha release in macrophages in vitro. *Planta Med.* 2001. 67: 825-832.
- Li Z, Inou M, Nose M, Kojima K, Sakaguchi N, Isuzugawa K, Takeda T, Ogihara Y. Metabolic fate of gallic acid orally administered to rats. *Biol Pharm Bull.* 1999. 22: 326-329.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assays for cellular growth and-survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983. 65: 55-63.
- Sakagami H, Jiang Y, Kusama K, Atsumi T, Ueha T, Toguchi M, Iwakura I, Satoh K, Ito H, Hatano T, Yoshida T. Cytotoxic activity of hydrolyzable tannins against human oral tumor cell lines--a possible mechanism. *Phytomedicine* 2000. 7: 39-47.
- Shahrzad S, Aoyagi K, Winter A, Koyama A, Bitsch I. Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. *J Nutr.* 2001. 131: 1207-1210.
- Sharma S, Jilka DS, Kelloff GJ, Vernon ES. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res.* 1994. 54: 5848-5855.
- Shim JS, Kang MH, Kim YH, Roh JK, Roberts C. Chemopreventive effects of green tea (*Camellia sinensis*) among cigarette smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1995. 4: 387-391.
- Xu L, Liu J, Min D, Wang S, Zhang Z, Guo D, Zheng K. Chemical constituents of *Conyza blinii* Levl. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 1988. 23: 293-295.
-