

## 벤조산과 관련 화합물의 구강암 세포주에 대한 세포독성효과

한두석 · 박윤규 · 강정일\* · 백승화\*\*,#

원광대학교 치과대학 구강해부학교실, \*대불대학교 물리치료학과,

\*\*원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과

(Received March 17, 2008; Revised June 23, 2008)

## The Cytotoxic Effect of Benzoic Acid and Related Compounds against Oral Cancer Cell Lines

Du Seok Han, Yeun Kju Park, Jeong Il Kang\* and Seung Hwa Baek\*\*,#

Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, and

\*\*Department of Herbal Resources, Professional School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

\*Department of Physical Therapy, Daebul University Youngam 526-702, Korea

**Abstract** — The cytotoxic effect of benzoic acid and related compounds on the growth of normal cell lines and human oral epithelioid cell line was evaluated by the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and 2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-caboxanilide (XTT) methods. 3,4,5-Trihydroxybenzoic acid decreased the cell viability of human oral epithelioid cells and the cell adhesion activity of human oral epithelioid cells. Under the light microscopy, 100  $\mu$ M 3,4,5-trihydroxybenzoic acid showed the highest cytotoxic activity. From these results, we can propose that 3,4,5-trihydroxybenzoic acid has a potential anticancer activity.

**Keywords** □ benzoic acid, cell viability, cell adhesion activity, cytotoxicity

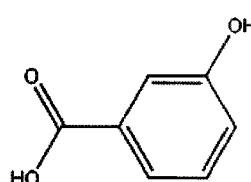
1990년대부터 항암제나 암세포전이 억제물질 또는 항산화물질을 사람이 일상생활에서 섭취하는 음식물로부터 찾아내려는 연구가 이루어지고 있으며 동시에 이들 물질을 구성하는 성분의 구조와 생리활성과의 관계를 밝히려는 연구도 계속되고 있다.<sup>1,3)</sup> Lshibashi 등<sup>4)</sup>은 lamellarin 유도체의 구조와 활성과의 관계에 관한 연구에서 암세포인 HeLa cell에 대한 lamellarin 유도체의 세포독성을 C-8과 C-20 위치에 수산기를 갖는 유도체가 강한 세포독성을 나타내나, C-13과 C-21 위치의 2개의 메톡시기가 세포독성에 덜 중요하다고 보고하였다. Lamellarin 유도체 중 C-8과 C-20 위치에 수산기를 갖는 유도체를 정상세포인 Vero 세포와 MDCK 세포에, 암종세포인 HeLa 세포와 XC 세포에 적용한 후 집락분석법(colony assay)을 이용하여, IC<sub>50</sub>을 결정한 결과 mitomycin C 보다 강한 세포독성이 나타났으나, 정상세포와 암세포에 나타내는 세포독성의 차이는 없었다고 보고하였다. 또한 정<sup>5)</sup>은 방향족 고리구조에 수산기, 카르복실기 하나와 메톡시기

하나가 결합된 vanillic acid를 정상세포와 암종세포에 각각 적용한 결과, vanillic acid는 암종세포에 선택적 세포독성이 있는 것으로 보고 하였으며, 한 등<sup>2)</sup>은 자연식물에 다량 함유되어 있는 페놀산 중 방향족 고리구조를 중심으로 수산기, 카르복실기 및 메톡시기가 서로 다르게 결합되어 있는 gallic acid, syringic acid, ferulic acid 및 pyrogallol을 정상세포인 인체 치은섬유모세포와 암종세포인 인체 피부흑색종세포에 적용한 후 세포독성을 측정한 결과, 카르복실기와 메톡시기가 없는 pyrogallol이 두 세포에 작용하는 세포독성은 차이가 없는 것으로 보고하였다. 김 등<sup>3)</sup>은 flavone 화합물 중 hydroxy치환기가 3개 또는 4개인 화합물은 hydroxy 치환기 수가 적은 화합물들에 비하여 상대적으로 우수한 항암효과를 보여 주었으며, 치환기의 종류 및 위치에 따른 현저한 변화는 관찰되지 않았다고 보고하였다. 페놀성 성분들은 건강세포보다 암종세포에 강한 세포독성을 나타내는 것으로 보고되고 있는데 Isuzugawa 등<sup>6)</sup>과 Inoue 등<sup>7,8)</sup>은 식물성 페놀산인 gallic acid는 흰쥐에서 분리한 간세포, 각질상피세포, 대식세포, 내피세포 및 섬유모세포 같은 정상세포보다 암종세포인 HeLa 세포, HL-60RG 세포, dRLH-84 세포 및 PLC/PRF 5 세포에 세포독성이 선택적으로 나타난다고 보고하였고 Sakagami 등<sup>9)</sup>도 수

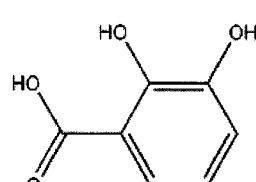
#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 063-850-6225 (팩스) 063-841-4893  
(E-mail) shbaek@wonkwang.ac.kr

용성 탄닌은 정상 인체 치은섬유모세포보다 인체 구강편평상피 암종세포와 타액선 상피암종세포에 더 강한 세포독성을 나타낸다고 보고하였으며 Furuya 등<sup>10)</sup>은 *camassia leichtlinii*에서 분리한 스테로이드성 사포닌(sterooidal saponins)은 정상 인체 치은섬유모세포보다 인체 구강편평상피암종세포에 더 강한 세포독성을 나타낸다고 보고하였다. Li 등<sup>11)</sup>과 Sakaguchi 등<sup>12)</sup>은 gallic acid가 건강세포보다 암종세포에 선택적으로 세포독성이 강하게 작용하는 기전을 밝히기 위하여 연구하였는데, gallic acid는 세포주기의 결과에 의하여 선택성을 나타내지 세포주기의 어느기에 영향을 주지 않으며, gallic acid의 구조의 변화 즉 폐놀성 수산기(hydroxyl radical)의 메틸화와 카르복실기(carboxyl radical)의 에스텔화는 세포독성을 분명히 감소시키며, 각종 세포에 대한 gallic acid의 신호전달로는 세포 내 칼슘 이온과 활성산소(ROS)에 의하여 변화하나, gallic acid에 의하여 유도되는 세포사 전달로는 세포에 따라 다르다고 보고하였다. 또한 암종세포를 간세포와 함께 배양하면 세포수가 유도되지 않으며, gallic acid에 저항하는 세포는 gallic acid의 세포독성에 대하여 자신을 보호하거나 저항물질을 생산할 것으로 추측하였다.

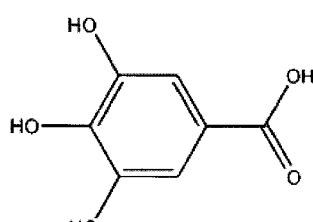
본 연구는 벤조산 고리 구조에 결합된 수산기 수와 세포독성의 관계를 밝히기 위한 목적으로, 3-hydroxybenzoic acid(3-HBA), 2,3-dihydroxybenzoic acid(2,3-DHBA) 및 3,4,5-trihydroxybenzoic acid(3,4,5-THBA, gallic acid)를 선정하여, 정상세포인 NIH3T3 섬유모 세포와 암세포인 인체 구강유상피 암종세포에 적용한 후 세포 생존율, 세포부착 저지능을 측정하였기에 보고하나이다.



3-Hydroxybenzoic acid



2,3-Dihydroxybenzoic acid



3,4,5-Trihydroxybenzoic acid

**Fig. 1 – Molecular structures of 3-hydroxybenzoic acid, 2,3-dihydroxybenzoic acid and 3,4,5-trihydroxybenzoic acid.**

## 실험 방법

### 시약

세포배양에 사용한 Minimum Essential Medium(MEM)과 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM) 및 RPMI 1640 배지, fetal bovine serum, penicillin, streptomycin, fungizone 시약은 Gibco/BRL(Grand Island, NY, USA)제이었으며, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma Chemical Co.) 정량과 2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-caboxanilide(XTT) 정량에 사용한 시약과 3-HBA, 2,3-DHBA, 3,4,5-THBA는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

### 실험기기

세포의 배양은 CO<sub>2</sub> incubator(Shellab Co., Cornelius, U.S.A.)를 사용하였으며, 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기(Marienfeld Co., Mergentheim, Germany)를 이용하였다. MTT 정량, XTT 정량에는 ELISA reader(Spectra max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, U.S.A.)를 사용하였다.

### 세포배양

3-HBA, 2,3-DHBA 및 3,4,5-THBA의 정상세포에 대한 세포독성과 암세포에 대한 세포독성을 측정하기 위하여, 원광대학교 의과대학 해부학교실에서 분양받은 NIH3T3 섬유모 세포(NIH3T3)는 MEM 배지에, 서울대학교 암연구소에서 분양받은 인체 구강유상피 암세포(KB)는 RPMI 1640 배지에 10% fetal bovine serum, penicillin(25 unit/ml) 및 fungizone을 첨가하여 사용하였다. 세포의 배양은 온도 37°C, 습도 95%, 탄산가스 농도 5%의 배양기(CO<sub>2</sub> incubator, Shellab Co., Cornelius, U.S.A.)를 사용하였다. 실험을 위하여, 일차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin-EDTA로 처리하여 세포를 분리한 후, Turk형 혈구계산기를 이용하여 세포수가 5×10<sup>4</sup> cells/ml가 되도록 세포부유액을 만들었다.

### MTT 정량분석법

Mosmann의 방법<sup>13)</sup>에 의하여, NIH3T3 섬유모 세포와 인체 구강유상피 암세포를 각 배양용기에 5×10<sup>4</sup> cells/ml 세포수를 넣고 24시간 배양 후, 3-HBA, 2,3-DHBA 및 3,4,5-THBA의 세포독성을 측정하기 위하여, 3-HBA, 2,3-DHBA 및 3,4,5-THBA을 각각 농도별(1, 25, 50 및 100 μM)로 첨가한 후, 48시간 배양한 후 분석 당일 조제한 MTT(Sigma Chemical Co.) 50 μg/ml가 포함된 배양액을 배양 후 배양액을 버리고, dimethylsulfoxide(DMSO)를 2 ml/well씩 넣어 5분간 실온 방치하여 MTT formazan을 용해한 후, 흡광도는 분광광도계 ELISA reader로

MTT의 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

### XTT 정량분석법

Laminin-coated plate는 laminin 1 mg을 PBS 2 ml에 용해하여 냉장고에 보관하면서, 필요시에 laminin의 농도(20 µg/ml)를 결정하여 찬 PBS 용액으로 희석하고, 이 용액을 24 well plate의 각 well에 200 µl씩 분주하여 하룻밤동안 건조시킨 뒤 PBS로 두 번 세척하여 3% BSA를 각 well에 200 µl씩 첨가해 잘 흔들어 준 다음 제거하고 PBS로 두 번 정도 세척하였다.

배양된 NIH3T3 섬유모 세포와 인체 구강유상피암 세포  $5 \times 10^4$  cells/ml 세포수를 laminin<sup>o</sup>로 coating한 배양용기에 넣고 24시간 배양한 후, MTT 정량분석법과 같은 방법으로 3-HBA, 2,3-DHBA 및 3,4,5-THBA을 넣고, 다시 48시간 배양한 후 배지는 조심스럽게 제거하고 PBS로 두 번 세척하였다. 여기에 XTT와 혼합하여 각 배양용기에 200 µl씩 주입하고, 4~6시간 동안 배양한 뒤 450 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

### IC<sub>50</sub> 결정

3-HBA, 2,3-DHBA 및 3,4,5-THBA의 IC<sub>50</sub> 결정은 배양중인 NIH3T3 섬유모 세포와 인체 구강유상피 암세포를 각 배양용기 당  $5 \times 10^4$  cells/ml 넣고, 24시간 배양 후 1, 25, 50, 100 µM의 3-HBA, 2,3-DHBA 및 3,4,5-THBA를 첨가하여, 48시간 배양한 후 MTT 및 XTT 정량을 하여 이를 각각에 대한 50% 억제농도인 IC<sub>50</sub>을 회귀방정식<sup>14)</sup>에 의해 구하였다.

### 통계처리

실험결과의 통계처리는 Students' t-test에 준하였고, 유의성 검정은 one way ANOVA t-test와 비교하였으며, p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

## 결 과

벤조산의 고리구조에 결합된 카르복실기와 수산기의 수와 위치에 따른 세포독성과 세포부착 저지능 관계를 연구하기 위하여, 방향족 고리구조에 카르복실기와 한 개의 수산기가 결합된 3-HBA, 카르복실기와 2개의 수산기가 결합된 2,3-DHBA, 카르복

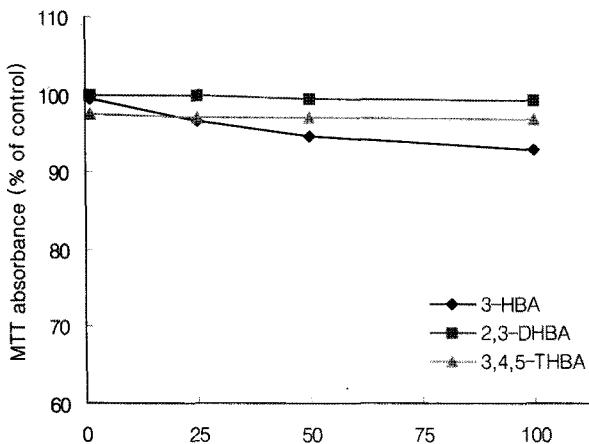
실기와 3개의 수산기가 결합된 3,4,5-THBA를 선정하여, 정상세포인 NIH3T3 섬유모 세포와 암세포인 인체 구강유상피 암종세포에 적용한 후, 세포 생존율과 세포부착 저지능에 대한, 3-HBA, 2,3-DHBA 및 3,4,5-THBA의 활성관계를 검토하였다. 3-HBA, 2,3-DHBA 및 3,4,5-THBA의 정상세포인 NIH3T3 섬유모 세포에 대한 MTT 흡광도는 방향족 고리구조에 카르복실기와 수산기의 수와 관계없이, 농도 의존성이 미약하게 감소하였으며, 세포독성은 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 3-HBA, 2,3-DHBA 및 3,4,5-THBA의 IC<sub>50</sub>의 측정값에서 얻은 연구결과에 의하면, 벤조산의 메타위치에 수산기가 있는 3-HBA(IC<sub>50</sub>, 1,385.0 µM)가 가장 높은 세포독성이 관찰되었으며, 벤조산의 수산기의 수가 가장 많은 3,4,5-THBA(IC<sub>50</sub>, 2552.4 µM)보다 약 1.8배 이상 세포독성이 높았으며, 벤조산에 두 개의 수산기가 올소-메타 위치에 있는 2,3-DHBA(IC<sub>50</sub>, 3,105.8 µM)의 활성보다는 약 2.2배로 강한 최소 억제농도를 관찰할 수가 있었다. 벤조산에 세 개의 수산기의 수가 있는 3,4,5-THBA은 최소 억제농도의 측정값은 2,3-DHBA의 최소억제농도보다 1.2배 높은 세포독성이 관찰되었다. NIH3T3 섬유모 세포의 IC<sub>50</sub> 값(3-HBA=1,385.0 µM, 2,3-DHBA=3,105.8 µM, 3,4,5-THBA=2552.4 µM)의 결과에 의하면, 저독성이나 무독성으로 판정되며,<sup>15)</sup> NIH3T3 섬유모 세포에 대한 최소 억제농도값은 3-HBA>3,4,5-THBA>2,3-DHBA의 순서로 감소하였다. 이와같은 연구결과에 의하면, NIH3T3 섬유모 세포에 대한 벤조산의 카르복실기와 수산기의 위치와 수에 따른 세포독성은 벤젠고리에 카르복실기와 수산기의 수소결합력에 의한 것으로 생각된다. 따라서 벤조산의 분자구조에서 카르복실기와 수산기의 위치와 수에 따른 세포독성 관계를 연구할 필요성이 요구된다(Table I과 Fig. 2).<sup>16)</sup>

3-HBA, 2,3-DHBA 및 3,4,5-THBA의 정상세포인 NIH3T3 섬유모세포에 대한 XTT 흡광도는 MTT 흡광도처럼, 방향족 고리구조에 카르복실기와 수산기의 수와 위치에 따라 활성과 농도 의존성이 미약하게 감소하였으며, 세포독성도 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 3-HBA, 2,3-DHBA 및 3,4,5-THBA의 IC<sub>50</sub>의 측정값에서 얻은 연구결과에 의하면, 벤조산의 메타위치에 수산기가 있는 3-HBA(IC<sub>50</sub>, 1,385.0 µM)가 가장 높은 세포부착 저지능이 관찰되었으며, 벤조산의 수산기의 수가 가장 많은 3,4,5-THBA(IC<sub>50</sub>, 2,445.6 µM)는 세포부착 저지능이 나타났으나,

Table I – Cytotoxic effect of 3-HBA, 2,3-DHBA and 3,4,5-THBA by the colorimetric method<sup>a</sup>

Cell line	MTT			XTT		
	3-HBA	2,3-DHBA	3,4,5-THBA	3-HBA	2,3-DHBA	3,4,5-THBA
NIH3T3	1,385.0	3,105.8	2,552.4	1,414.9	3,552.9	2,445.6
KB	323.1	260.7	168.4	366.0	299.5	216.6

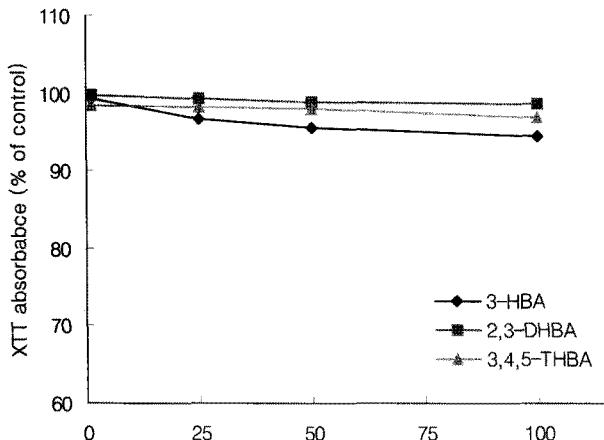
<sup>a</sup>3-HBA, 2,3-DHBA and 3,4,5-THBA was examined in four concentrations in triplicate experiments. <sup>b</sup>IC<sub>50</sub> represents the concentration of a 3-HBA, 2,3-DHBA, 3,4,5-THBA required for 50% inhibition of cell growth.



**Fig. 2** – Cytotoxic effect of 3-HBA, 2,3-DHBA and 3,4,5-THBA by the MTT method on NIH3T3 fibroblasts. The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments.

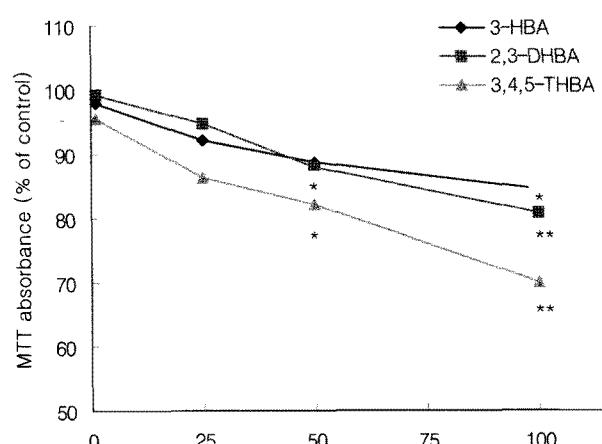
수산기가 올소-메타위치에 있는 2,3-DHBA( $IC_{50}$ , 3,552.9  $\mu$ M)의 활성보다는 약 2.5배로 높게 세포부착 저지능을 관찰할 수가 있었으며, 3-HBA 보다 1.7배의 낮은 세포부착 저지능이 나타났다. NIH3T3 섬유모 세포에 대한 세포부착 저지능은 최소 억제농도 값이 3-HBA>3,4,5-THBA>2,3-DHBA의 순서로 증가하였다. 이와같은 연구결과에 의하면, 정상세포인 NIH3T3 섬유모 세포에 대한 XTT 흡광도는 MTT 흡광도처럼, 분자구조와 수산기의 위치와 수에 따라, 유사한 활성을 관찰할 수가 있었다. 벤조산의 분자구조에서 카르복실기와 수산기의 위치와 수에 따른 세포부착 저지능 관계를 연구할 가치가 있다고 사료된다(Table I과 Fig. 3).<sup>16)</sup>

3-HBA, 2,3-DHBA 및 3,4,5-THBA의 암세포인 인체 구강유상피 암종세포에 대한 MTT 흡광도는 NIH3T3 섬유모 세포에



**Fig. 3** – Cell adhesion ability of 3-HBA, 2,3-DHBA and 3,4,5-THBA by the XTT method on NIH3T3. The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments.

대한 MTT 흡광도보다, 농도 의존적으로 세포독성이 감소하였으며, 벤조산의 고리구조에 카르복실기와 수산기의 수에 따라, 농도 의존성이 활성이 증가하였으며, 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었다. 100  $\mu$ M 3-HBA의 인체 구강유상피 암종세포에 대한 세포독성은 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었으며( $p<0.05$ ), 3-HBA의 세포독성의 최소억제농도( $IC_{50}$ , 323.1  $\mu$ M)는 NIH3T3 섬유모 세포의 최소억제농도( $IC_{50}$ , 1,385.0  $\mu$ M)에 비하여, 약 4.3 배의 높은 세포활성이 관찰되었다. 2,3-DHBA의 인체 구강유상피 암종세포에 대한 세포독성은 100  $\mu$ M 2,3-DHBA( $p<0.01$ )에서 통계적으로 유의한 차이가 있었으며, 2,3-DHBA의 인체 구강유상피 암종세포의 세포독성( $IC_{50}$ , 260.7  $\mu$ M)은 NIH3T3 섬유모 세포의 최소 억제농도( $IC_{50}$ , 3,105.8  $\mu$ M)에 비하여, 약 12배의 높은 세포독성이 관찰되었다. 벤조산의 수산기의 위치와 수가 가장 많은 3,4,5-THBA의 MTT 흡광도는 다른 벤조산의 세포독성보다 농도증가에 따라, 84.4%, 80.9% 및 70.1%로 세포에 대한 억제효과가 관찰되었다. 3,4,5-THBA의 인체 구강유상피 암종세포의 세포의 최소억제농도( $IC_{50}$ , 168.4  $\mu$ M)은 NIH3T3 섬유모 세포의 최소억제농도( $IC_{50}$ , 3,105.8  $\mu$ M)에 비하여, 약 18.5배의 가장 높은 세포독성이 관찰되었다. 이러한 연구결과는 암세포의 종류와 벤조산의 카르복실기와 수산기의 위치와 수와 더불어 수소결합력에 따라, 세포독성이 증가하는 것으로 사료된다. NIH3T3 섬유모 세포의 최소억제농도와는 다르게, 인체 구강유상피 암종세포에 대한 최소 억제농도값은 3-HBA>2,3-DHBA>3,4,5-THBA의 감소순서로 세포에 대한 억제효과는 벤조산의 카르복실기와 수산기의 위치와 수의 증가가 세포독성에 많은 영향을 미치는 것으로 생각된다. 이와 같은 연구결과는, NIH3T3 섬유모 세포의 벤조산의 카르복실기와 수산기의 위치와 수에 대한 세포독성과 다르게, 인체 구강유상피 암종세포의 세포 생존율은 벤



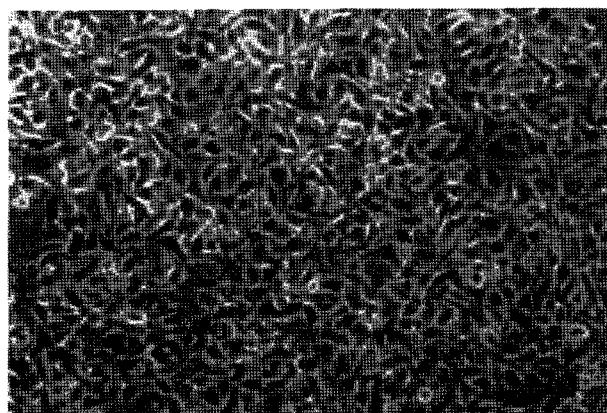
**Fig. 4** – Cytotoxic effect of 3-HBA, 2,3-DHBA and 3,4,5-THBA by the MTT method on KB. The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: \* $p<0.05$  \*\* $p<0.01$  (Students' t-test).

조산의 카르복실기와 수산기의 위치와 수에 많은 영향을 관찰할 수가 있었다. 앞으로 벤조산의 분자구조에서 카르복실기와 수산기의 위치와 수에 따른, 암세포주에 대한 세포독성의 활성관계를 연구할 필요성이 요구된다(Table I과 Fig. 4).<sup>16)</sup>

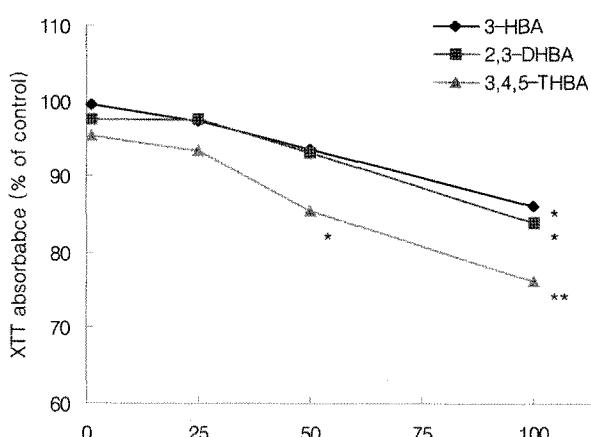
3-HBA, 2,3-DHBA 및 3,4,5-THBA의 인체 구강유상피 암종세포에 대한 XTT 흡광도는 MTT 흡광도처럼, 농도 의존적으로 감소하였으나, 벤젠 고리구조에 카르복실기와 수산기의 수와 위치에 따라, 농도 의존성이 증가하였으며, 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었다. 3-HBA, 2,3-DHBA 및 3,4,5-THBA의 세포부착 저지능에 대한 연구결과에 의하면, 벤조산 유도체의 100 μM 농도에서 통계적으로 유의성이 검증되었다. 100 μM 농도에서 3-HBA, 2,3-DHBA 및 3,4,5-THBA의 XTT 흡광도에 대한 세포부착 저지능은 벤조산의 위치보다는 수산기 수의 증가에 따라, 각각 86.0%, 83.9% 및 76.2%로 감소하였다. 인체 구강유상피 암종세포에 대한 세포부착 저지능에 대한 활성은 벤조산의 메타위치에 수산기가 있는 3-HBA( $IC_{50}$ , 366.0 μM)가 가장 낮은 활성이 관찰되었으나, NIH3T3 섬유모세포에 대한 세포부착 저지능에 비교하여, 세포부착 저지능의 활성이 3.9배 정도로 높게 나타났다. 그리고 벤조산의 올소-메타위치에 2개의 수산기를 갖고 있는 2,3-DHBA( $IC_{50}$ , 299.5 μM)의 활성은 NIH3T3 섬유모세포에 비해, 약 11.8배 정도로 높게 세포부착 저지능을 관찰할 수가 있었으며, 벤조산에 수산기의 수가 가장 많은 3,4,5-THBA( $IC_{50}$ , 216.6 μM)는 세포부착 저지능이 NIH3T3 섬유모 세포에 대한 세포부착 저지능보다 11.3배 정도로 가장 높게 활성이 관찰되었다. 인체 구강유상피 암종세포에 대한 세포부착 저지능에 대한 활성은 NIH3T3 섬유모 세포에 대한 세포부착 저지능의 최소 억제농도값과 다르게, 3-HBA>2,3-DHBA>3,4,5-THBA의  $IC_{50}$  측정값의 순서로 감소하였다. 이러한 연구결과는, NIH3T3 섬유모 세

포에 대한 XTT 흡광도와는 다르게, 벤조산의 카르복실기와 수산기의 위치와 수에 따라 세포부착 저지능의 영향을 줄 수가 있다고 사료되어, 벤조산의 분자구조와 세포부착 저지능에 따른 활성관계는 연구할 가치가 있다고 사료된다(Table I과 Fig. 5).<sup>16)</sup>

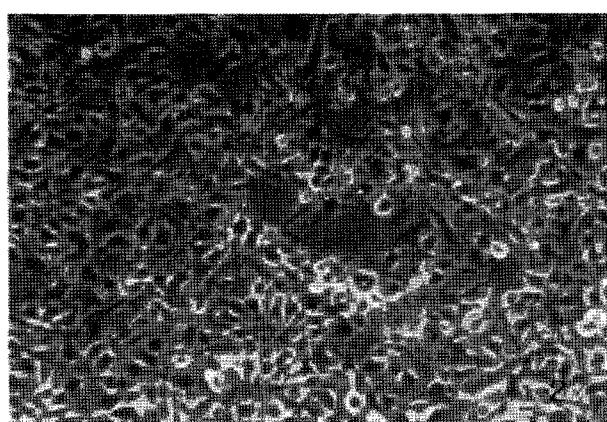
정상세포인 NIH3T3 섬유모 세포와 암종세포인 인체 구강상피 암종세포는 24 Well multidish에  $5 \times 10^4$  세포수를 넣고, 24시간 배양하면 배양용기 바닥에 뚜렷한 핵을 갖는 방추형세포가 단층을 이루며, 48시간 배양하면 여러 형태의 세포들이 층을 이룬다(Photos 1과 2). 세포의 형태학적 관찰에서 NIH3T3 섬유모 세포에 3,4,5-THBA를 농도별로 증가하면서, 배양하면 농도의 증가에 따라 세포의 형태와 수에 변화가 관찰되었으며, 인체 구강유상피 암종세포에 3,4,5-THBA를 첨가하여 배양하면, 농도의 증가에 따라 세포의 퇴행성 변화와 세포수의 많이 감소되었으며



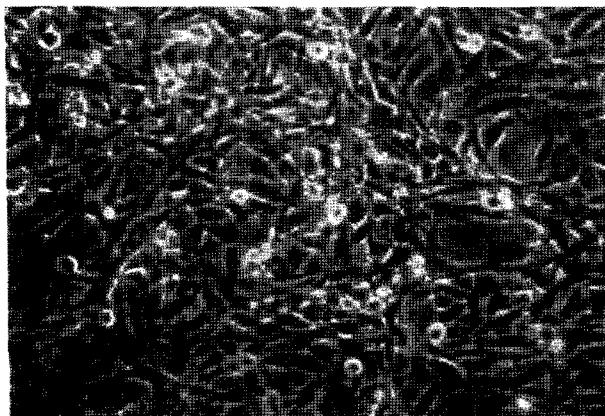
**Photo 1** – Inverted photomicrograph of KB cells treated with MTT for an additional 3 hrs after incubation in unmodified medium (control) for 2 days  $\times 100$ . Most cells had abundant cytoplaem and cytoplasmic process (1).



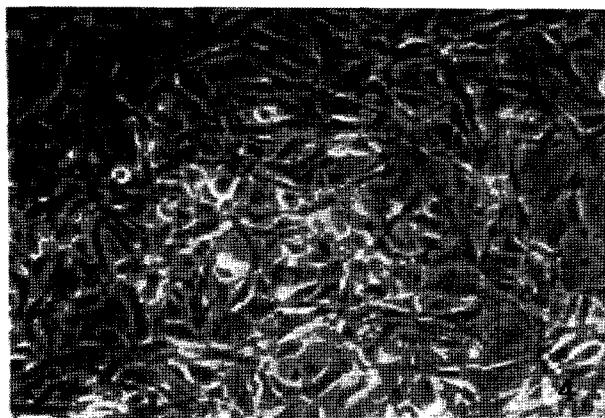
**Fig. 5** – Cell adhesion ability of 3-HBA, 2,3-DHBA and 3,4,5-THBA by the XTT method on KB. The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: \* $p<0.05$  \*\* $p<0.01$  (Students' t-test).



**Photo 2** – Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts treated with MTT method for an additional 3 hrs after incubation in unmodified medium (control) for 2 days  $\times 100$ . Most cells had abundant cytoplasm and cytoplasmic process (2).



**Photo 3** – Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts treated with MTT for an additional 3 hrs after incubation in 50  $\mu\text{M}$  3,4,5-THBA containing medium for 2 days  $\times 100$ . Most cells were formed cell cluster and number of cells were decreased (3).



**Photo 4** – Inverted photomicrograph of KB cells treated with MTT for an additional 3 hrs after incubation in 50  $\mu\text{M}$  3,4,5-THBA ( $\times 100$ ) containing medium for 2 days  $\times 100$ . Most cells were formed cell cluster and number of cells were decreased (4).

(Photos 3과 4), 세포의 퇴행성 변화와 세포수의 감소는 인체 구강유상피 암종세포>NIH3T3 섬유모 세포 순서로 관찰되었으며, 벤조산 유도체에 대한 인체 구강유상피 암종세포에 변화를 일으키는 정도는 3-HBA>2,3-DHBA>3,4,5-THBA 감소 순서로 세포수의 감소가 증가되었다. 이와 같은 결과는 3-HBA, 2,3-DHBA 와 3,4,5-THBA는 정상세포보다 인체 구강유상피 암종세포에 세포독성을 벤조산 유도체의 카르복실기와 수산기의 수와 위치에 따라, 세포의 형태학적 변화에 많은 영향을 미치는 것으로 관찰되었다.

## 고 찰

본 연구에서는 벤조산의 카르복실기와 수산기의 수와 위치가

생리활성에 어떤 관계가 있는지 밝히기 위하여, 3-HBA, 2,3-DHBA 및 3,4,5-THBA를 선정하여, 정상세포인 NIH3T3 섬유모 세포와 암종세포인 인체 구강유상피 암종세포에 적용한 후, 세포 생존율과 세포부착 저지능을 측정한 결과에 의하면, NIH3T3 섬유모 세포에 대한 세포 생존율에서의 3-HBA( $\text{IC}_{50}$ , 1,385.0  $\mu\text{M}$ )은 저독성이 관찰되었으며, 2,3-DHBA 및 3,4,5-THBA의  $\text{IC}_{50}$ 은 각각 3,105.8  $\mu\text{M}$  및 2,552.4  $\mu\text{M}$ 로 무독성으로 관찰되었다.<sup>15)</sup> 세포부착 저지능에서의 3-HBA, 2,3-DHBA 및 3,4,5-THBA의  $\text{IC}_{50}$ 은 각각 1,414.9  $\mu\text{M}$ , 3,552.9  $\mu\text{M}$  및 2,445.6  $\mu\text{M}$ 의 측정값으로 관찰되었다. 인체 구강유상피 암종세포에 대한 세포 생존율과 세포부착 저지능은 농도의 증가에 따라 활성이 감소하였으며, 50  $\mu\text{M}$  농도와 100  $\mu\text{M}$  농도에서 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 세포 생존율의 경우에는 벤조산의 수산기의 위치와 수의 증가에 따라, 3-HBA, 2,3-DHBA 및 3,4,5-THBA의  $\text{IC}_{50}$ 은 각각 323.1  $\mu\text{M}$ , 260.7  $\mu\text{M}$  및 168.4  $\mu\text{M}$  측정값에 의한 세포독성이 증가하였으며, 세포부착 저지능에서도 세포 생존율의 경우처럼, 수산기의 위치와 수의 증가에 따라,  $\text{IC}_{50}$ 은 각각 366.0  $\mu\text{M}$ , 299.5  $\mu\text{M}$  및 216.6  $\mu\text{M}$ 로 활성이 증가하였다. 벤조산에 3,4,5위치에 수산기가 결합된 3,4,5-THBA( $\text{IC}_{50}$ , 216.6  $\mu\text{M}$ )는 1번위치의 카르복실기의 산성( $\text{H}^+$ )능력에 의한 세포독성과 3,4,5위치의 3개 수산기의 낮은 산성( $\text{H}^+$ )능력에 기인한다고 생각된다. 벤조산의 수산기의 위치와 수의 증가에 따라, 세포 생존율과 세포부착 저지능은 3-HBA >2,3-DHBA>3,4,5-THBA 순서로 활성이 검색되었다.<sup>16)</sup> 이러한 연구결과는 김 등<sup>3)</sup>이 flavone 화합물 중 수산기의 수가 많은 화합물이 수산기의 수가 적은 화합물에 비하여, 상대적으로 암종세포에 대한 항암효과가 우수하다고 보고한 내용과 일치하였으며, 전<sup>17)</sup>이 수산기가 결합되지 않은 벤조산과 2,3-DHBA 및 2,6-DHBA를 암종세포인 인체 피부흑색 종세포와 인체 구강유상피 암종세포에 적용하여 세포독성을 측정한 결과, 수산기가 결합되지 않은 벤조산보다 2개의 수산기가 결합된 2,3-DHBA와 2,6-DHBA가 세포독성이 강하다는 보고와도 일치하였다. 방향족 화합물의 분자구조에 카르복실기, 수산기등 다양한 관능기가 결합하고 있어, 앞으로 다양한 관능기들이 결합되고 있는 방향족 화합물의 분자구조에 따른 세포독성과 세포부착 저지능 관계를 연구할 계획이다.

## 결 론

3-HBA, 2,3-DHBA 및 3,4,5-THBA의 정상세포인 NIH3T3 섬유모 세포에 대한 세포 생존율과 세포부착 저지능은 방향족 고리구조에 카르복실기와 수산기의 수와 관계없이, 농도 의존적으로 감소하였으며, 통계적으로도 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 3-HBA, 2,3-DHBA 및 3,4,5-THBA의 암세포인 인체 구강유상피 암종세포에 대한 세포 생존율과 세포부착 저지능은 농도 의존적

으로 감소하였으며, 3-HBA, 2,3-DHBA 및 3,4,5-THBA는 50  $\mu\text{M}(\phi<0.05)$  농도와 100  $\mu\text{M}(\phi<0.01)$  농도에서 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 3-HBA, 2,3-DHBA 및 3,4,5-THBA의 MTT와 XTT 분석에 의한 IC<sub>50</sub>은 인체 구강유상피 암종세포에서 3-HBA>2,3-DHBA>3,4,5-THBA 순이었다. 이상의 연구결과에 의하면, 벤조산의 방향족 고리구조에 결합된 카르복실기와 수산기의 위치와 수에 따른 세포독성과 세포부착 저지능 관계에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

### 감사의 말씀

본 연구는 2008년도 원광대학교 교비연구비의 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사를 드린다.

### 문 헌

- 1) Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. : Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 933 (1996).
- 2) 한두석, 오상걸, 오은상 : 페놀산의 구조가 암세포에 대한 세포독성에 미치는 영향. *한국독성학회지* **19**, 45 (2003).
- 3) 김정숙, 최연희, 서지희, 이정원, 김성기, 최상운, 강종성, 김영균, 김성훈, 김영섭, 유시용 : 천연 유리 Flavonoid 화합물들의 암세포성장 저해효과. *한국생약학회지* **35**, 164 (2004).
- 4) Ishibashi, F., Tanabe, S., Oda, T. and Iwao, M. : Synthesis and structure-activity relationship study of lamellarin derivatives. *J. Nat. Prod.* **65**, 500 (2002).
- 5) 정종철 : Vanillic acid의 구조와 세포의 활성 및 부착과의 관계에 관한 연구. 원광대학교 대학원 석사학위 논문 (2005).
- 6) Isuzugawa, K., Ogihara, Y. and Inoue, M. : Different generation of inhibitors against gallic acid-induced apoptosis produces different sensitivity to gallic acid. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 249 (2001).
- 7) Inoue, M., Suzuki, R., Koide, T., Sakaguchi, N., Ogihara, Y. and

- Yabu, Y. : Antitoxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60RG cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, 898 (1994).
- 8) Inoue, M., Suzuki, R., Sakaguchi, N., Li, Z., Takeda, T., Ogihara, Y., Jiang, B. and Chen, Y. : Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 1526 (1995).
- 9) Sakagami, H., Jiang, Y., Kusama, K., Atsumi, T., Ueha, T., Toguchi, M., Iwakura, I., Satoh, K., Ito, H., Hatano, T. and Yoshida, T. : Cytotoxic activity of hydrolyzable tannins against human oral tumor cell lines-A possible mechanism. *Phytomed.* **7**, 39 (2000).
- 10) Furuya, S., Takayama, F., Mimaki, Y., Sashida, Y., Satoh, K. and Sakagami, H. : Cytotoxic activity of saponins from *Camassia leichtlinii* against human oral tumor cell lines. *Anticancer Res.* **21**, 959 (2001).
- 11) Li, Z., Inoue, M., Nose, M., Kojima, K., Sakaguchi, N., Isuzugawa, K., Takeda, T. and Ogihara, Y. : Metabolic fate of gallic acid orally administered to rats. *Biol. Pharm. Bull.* **22**, 326 (1999).
- 12) Sakaguchi, N., Inoue, M. and Ogihara, Y. : Reactive oxygen species and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , common signals for apoptosis induced by gallic acid. *Biochem. Pharmacol.* **55**, 1973 (1998).
- 13) Mosmann, T. : Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55 (1983).
- 14) 채영암, 구자옥, 서학수, 이영만 : 기초생물통계학 제 9장 직선회귀. 학문사, 서울 pp. 179-198 (1991).
- 15) Borenfreund, E., Babichi, H. and Matin-Alcuacil, N. : Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assay. The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol. In Vitro* **2**, 1 (1988).
- 16) Han, D. S., Chun, J. W., Jeon, S. W. and Baek, S. H. : The inhibitory effect of ferulic acid and related phenolic compounds against cancer cell lines. *J. Pharm. Soc. Korea* **49**, 365 (2005).
- 17) 전주원 : 벤조산과 벤조산 유도체 2,3-DHBA와 2,6-DHBA의 암세포주에 대한 선택적 세포독성, 원광대학교 대학원 박사학위 논문 (2004).