

한국산 생약으로부터 항암물질의 개발(제6보).
금은화 Ethyl Acetate 가용성 분획의
인체 구강유상피암종세포에 미치는 세포독성작용

한두석, 백경현, 김영옥,¹ 최규은,¹ 곽정숙,² 백승화^{1*}

원광대학교 치과대학 구강해부학교실, ¹자연과학대학 화학과, ²목포전문대학 치 위생과

Development of Anticancer Agents from Korean Medicinal
Plants. Part 6. Cytotoxic Activity of the Ethyl Acetate
Soluble Fraction of *Lonicerae flos* against Human
Oral Epitheloid Carcinoma Cells

Du Seok Han, Kyong Hyun Baek, Young Ok Kim,¹ Kyw Eun Choi,¹
Jung Suk Kwag,² and Seung Hwa Baek^{1*}

*Department of Oral Anatomy, School of Dentistry; ¹Department of Chemistry,
College of Natural Sciences, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea; and
²Department of Dental Hygenic, Mokpo Junior College, Mokpo 530-730, Korea*

Abstract—This study was carried out to develop antitumor agents based on effects of the ethyl acetate soluble fraction of the methanolic extract of *Lonicerae flos* on human oral epitheloid carcinoma cells. Human oral epitheloid carcinoma cells were cultured in RPMI-1640 media containing 10% fetal bovine serum, antibiotic, and fungizone. After incubation for 24 hrs, the cells were treated with A, B, C, D, and E fractions for 48 hrs under the same condition. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide), NR (Neutral red) and SRB (Sulforhodamine B protein) assay were performed. The light microscopic findings were observed by inverted microscope. In MTT assay, fraction B was shown significant antitumor activity ($P<0.001$), fraction E was shown significant antitumor activities ($P<0.05$), but the other fractions were not shown. In NR assay, fraction B was shown significant antitumor activity ($P<0.001$). In SRB assay, fractions B was shown significant antitumor activities ($P<0.01$), fractions A and D were shown significant antitumor activities ($P<0.05$), but the other fractions were not shown. In light microscopy, the fraction B of the ethyl acetate soluble fraction of the methanolic extract of *Lonicerae flos* showed the highest antitumor activity. These findings suggested that fraction B possessed the most antitumor agent.

Key words—*Lonicerae flos*; MTT assay; NR assay; SRB assay; antitumor activity.

*교신저자 : Fax 0653-841-4893

금은화(*Lonicerae flos*)는 인동과(Caprifoliaceae)에 속하는 인동덩굴(*Lonicerae japonica* Thumb)의 꽃으로¹⁾ 한방에서는 이뇨, 해독, 화농증 및 종양의 치료제로 사용되어 왔으며, 정혈, 해독에 유효하다고 기록되어 있다.²⁾ 민간약으로 유행성 이하선염, 생선중독이나 버섯중독, 당뇨병 등에 금은화를 달여서 차처럼 계속 마시면 효과가 있다고 하였다.^{3,4)} 강 등⁵⁾은 금은화의 methanol추출액이 수종의 그람양성 및 그람 음성균에 항균작용이 있고, 손상된 간에 치유효과가 있으며, 항염작용이 있다고 보고 하였으며, 금은화의 methanol추출액은 독성이 거의 없는 안전한 생약이라고 하였다. 정 등⁶⁾도 금은화의 ethyl acetate분획이 세포분열 및 세포성장장에 관여하여 그 작용을 촉진시키는 것으로 보고하였고, 또한 항돌연변이 원성을 일으킨다고 보고 하였다. 한편 Rim 등⁷⁾은 금은화의 ethanol추출액이 항암작용이 있다고 보고하였다. 금은화의 독성에 관한 연구로는 강⁵⁾이 금은화 추출물을 생쥐에 Kg당 1.000 mg~3.000 mg까지 투여한 후 72시간 관찰하였으나 모두 죽지 않아 독성이 매우 약한 것으로 보고하였으며, 한 등⁸⁾은 금은화에 물과 유기용매(ether, ethyl acetate 및 hexane)를 사용하여 추출한 추출물을 흰쥐의 섬유모세포에 적용하여 세포독성을 조사한 결과 물 분획에서만 독성이 있었을 뿐 유기용매로 추출한 추출물에서는 독성이 약하였다고 보고하였다. 최근에 황⁹⁾은 금은화의 phenol성 성분을 단리(isolation)하여 5종의 인체암세포(A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF 498 및 HCT 15)에 적용하여 quercetin에서 항암활성이 있는 것으로 보고한 바 있으나 이 보고에서는 금은화에서 phenol성 성분만을 보고 하였고, 항암활성 실험은 MTT분석법만을 사용하였으므로 더 많은 성분의 분리와 다양한 항암활성시험을 통한 1차검색이 필요하며, 구강암세포에 대한 연구는 없는 실정이다.

이에 본 연구는 독성이 적은 것으로 알려진 금은화에서 인체 구강유상피암종세포에 항암활성이 있는 물질을 찾아내기 위한 일환으로 ethyl acetate 분획에서 5종의 소분획을 만들어 재현성이 높고 자동화가 가능하여 대량검색이 용이한 MTT 정량분석법, NR 정량분석법 및 SRB 정량분석법을 이용하여 항암활성을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료-본 실험에서 사용한 금은화는 1996년 7월 충남 금산군 경희한약상에서 구입하여 외부형태를 비교 조사하여 확인 후 사용하였다. 실험에 사용된 식물체는 원광대학교 자연과학대학 천연물화학교실에 보관되어 있다.

시약 및 기기-추출 및 분리에 사용된 methanol, *n*-hexane, chloroform, *n*-butanol, H₂O는 증류 정제하여 사용하였다. 분석시 사용한 thin layer chromatography(TLC)는 silicagel plate(0.25 mm, polygram sil N-HR/UV₂₅₄, E. Merck)를 사용하였다. Flash chromatography 사용시 glass column(6 cm×1.3 m), silica gel(Kieselgel 60, 230~400 mesh) 및 fraction collector(Gilson FC 204)를 사용하여 분리하였다.

세포의 배양은 CO₂ incubator(Shellab Co., USA)를 사용하였고, 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기를 사용하였으며, 현미경은 도립현미경(Inverted Microscope, Olympus)을 사용하였다. MTT정량 분석법, NR정량 분석법 및 SRB정량 분석법은 ELISA reader (ETY-96, Japan)를 사용하였다.

추출 및 분획-1996년 7월 충남 금산군 경희한약상에서 구입하여 그늘에서 말린 금은화를 정선한 후, 조말하여 약 600 g을 평량하여 수용상에서 methanol을 3배량 가하여 3시간씩 환류하여 추출한 다음, 이 추출액을 여지로 여과하고, 여액을 감압농축하여, 흑말 메탄올 추출액 76.0 g(12.6%)을 얻었다. 이것을 물에 현탁한 후, *n*-hexane으로 수회 반복 추출하고, 추출액을 무수항초로 탈수시키고 추출액을 여과 후, 감압농축시켜서 *n*-hexane 추출물 13.6 g을 얻었다. 계속하여 chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol로 순차적으로 추출하고, 위의 방법에 따라, 용매를 감압농축하여 chloroform추출물 3.7 g, ethyl acetate 추출물 6.0 g, *n*-butanol 추출물 6.0 g과 잔류하는 물층엑스 30.0 g을 얻었다.

시료의 처리-조제한 시료는 즉시 4℃ 냉장고에 저장하였다가, 사용직전에 배지로 희석하여 10⁻⁴ mg/ml 농도를 실험에 사용하였다.

세포배양-금은화의 에틸 아세테이트 소분획의 항암작용을 측정하기 위하여, 서울대학교 암연구소에서 부양 받은 인체 구강유상피암종 세포는 RPMI-

1640(Gibco, USA)에 10.0% fetal bovine serum (Gibco, USA)과 penicillin G(25 unit/ml), streptomycin(25 µg/ml)를 첨가하여 사용하였다. 세포의 배양은 온도 37°C, 습도 95.0%, 탄산가스 농도 5.0%(CO₂ incubator, Shellab, USA)를 사용하였다. 실험을 위하여 일차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin으로 처리하여, Turk형 혈구계산기를 이용하여 세포수가 2×10⁴ cells/ml가 되도록 세포부유액을 만들었다.

MTT정량 분석법 - Mosmann의 방법¹⁰⁾에 의하여, 세포를 금은화 메탄올 추출물의 에틸 아세테이트 분획과 에틸 아세테이트 소분획이 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 분석 당일 조제한 MTT (Sigma) 50 µg/ml가 포함된 배양액을 well당 1.0 ml씩 넣어 3시간 배양하였다. 배양후 배양액을 버리고, dimethylsulfoxide(DMSO)를 2.0 ml/well씩 넣어 5분간 실온방치하여 MTT formazan을 용해한 후, ELISA reader로 MTT의 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

NR정량 분석법 - Borenfreund와 Puermer의 방법¹¹⁾에 의하여 세포를 배양용기당 2.0×10⁴ cells/ml이 되도록 24 well multidish에 분주하여 24시간 배양 후, 에틸 아세테이트 소분획이 포함된 배양액으로 교환하고, 48시간 동안 배양한 다음 50 µg/ml의 neutral red(Sigma)가 포함된 배양액을 37°C 어두운 곳에서 overnight 시킨 후, well당 1 ml씩 넣어 3시간 동안 배양하였다. 배양 완료후 배양액을 버리고 phosphate buffered saline(PBS)으로 2~3회 세척하여 1.0% formaldehyde-1.0% CaCl₂를 넣어 실온에 방치하여 3시간 동안 용해소체 내에 축적된 NR을 용출하였다. 용출된 NR의 흡광도를 ELISA reader(550 nm)로 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

SRB정량 분석법 - Skehan 등의 방법¹²⁾에 따라, 세포를 금은화 메탄올 추출물의 에틸 아세테이트 분획과 에틸 아세테이트 소분획이 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 배양액을 버리고 5회 세척한 후, 0.4% sulforhodamine B를 200 µl씩 첨가하여 1시간 동안 실온에 방치한 다음, 1.0% acetic acid로 5회 세척하고 완전히 건조하였다. 10 mM Tris base로 결합된 protein stain을 녹인 후, ELISA reader측정하여 대조군과 비교하였다.

세포의 광학현미경적 관찰 - 광학현미경으로 세포를 관찰하기 위하여 인체 구강상피암종 세포는 MTT정량 분석법, NR정량 분석법 및 SRB정량 분석법을 하기 전에 도립현미경(Inverted microscope, Olympus)으로 관찰하고 사진을 촬영하였다.

통계처리 - 모든 실험결과는 평균치와 표준오차를 계산하였고, 대조군과 실험군간의 차이는 Student's t-test를 사용하여, P-value가 0.05 미만일때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

인체의 구강상피암으로부터 수립된 인체 구강상피암종세포주에 대한 항암 후보물질인 금은화의 ethyl acetate분획의 약효여부를 측정하기 위하여 민감하고 안정적이면서도 실험조작이 간편한 능률적인 생물활성 검색시스템인 MTT정량 분석법, NR정량 분석법 및 SRB정량 분석법과 광학현미경적 관찰을 실시하여 항암활성을 측정하였다. 임 등⁷⁾은 금은화 에탄올 추출물을 항암작용이 있다고 보고하였기에, 금은화 메탄올 추출물을 용매에 의한 계통분획하였으며, 계통분획방법은 금은화(600 g)를 메탄올로 추출하여 추출물 76.0 g(12.7%)을 얻었다. 이를 헥산, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 부탄올 및 물가용부로 분획하여 각각 13.6 g(17.9%), 3.7 g(4.9%), 6.0 g(7.9%), 6.0 g(7.9%) 및 30.0 g(39.5%)을 얻었다. 여기서 헥산과 물분획물의 수율이 많은 것으로 보아 극성이 적은 헥산과 극성이 큰 물에 많이 이행됨을 알 수 있다.

에틸 아세테이트층에서 얻은 분획을 silica gel이 충전된 칼럼(6 cm×1.3 m)을 사용하여 subfraction A-E를 얻었으며, MeOH:CHCl₃/10:90로 solvent 용리조건을 사용하였다. 각각의 subfraction은 단파장과 장파장에서 TLC spots의 수로 fraction을 나누었다. TLC 사용자 MeOH:CHCl₃(1:9)을 이동상으로 사용하였으며, 각각 분리된 점적을 각종 이동상으로 이차원 전개하여 점적수를 결정하였다. Fraction B은 대부분 장파장에서 밝은 형광을 나타냈다(Table I).

본 실험에서는 인체 구강상피암세포에 항암활성이 유의하게 나타났던,^{6,7)} 에틸 아세테이트 분획에서 미지의 성분이 함유되어 있는 5종의 소분획을 조

Table I. Flash chromatography of ethyl acetate soluble fraction of the methanolic extract of *Lonicerae flos* at 10^{-4} mg/ml concentration

Fraction	Tube No.	Yield (mg)	Rf values ^{a)}			
A	1-54	80	0.77, 0.73, 0.66, 0.64			
B	55-94	280	0.62, 0.57, 0.53, 0.46			
C	108-186	590	0.50, 0.46, 0.45, 0.44, 0.41, 0.33, 0.31			
D	187-327	370	0.28, 0.26, 0.22, 0.20			
E	328-443	870	0.15, 0.13, 0.08, 0.06			

^{a)} Mobile phase: MeOH:CHCl₃/10:90

제한 후, 인체 구강유상피암종 세포에 적용하여 세포 기관의 활성을 MTT정량 NR정량 및 SRB정량 분석법을 이용하여 실험한 결과는 Table II, III, IV와 같다.

여러 보고에서 건강조직과 세포에 대한 독성이 약하거나 없는 것으로 알려진 금은화로부터 ethyl acetate분획을 소분획으로 만들어 인체 구강유상피암종세포에 적용하여 MTT량을 측정된 결과는 Table II과 같다. 미지의 물질인 소분획 B에서 항암활성이 가장 큰 것으로(P<0.001) 나타났으며, 소분획 E에서도 유의한 항암효과가 있었고, 소분획 A와 C 및 D에서는 인체 구강유상피암종세포에 대한 유의한 항암활성효과는 없었다(P>0.05).

MTT정량 분석법에 적용한 ethyl acetate분획을 소분획으로 제조하여 인체 구강유상피암종세포에 적용하여 NR량을 측정된 결과는 Table III과 같다. NR정량 분석법에 있어서도 소분획 B에서 인체 구

Table II. The effects of the ethyl acetate soluble fraction of the methanolic extract of *Lonicerae flos* on the production of MTT formazan crystal on human oral epitheloid carcinoma cells at 10^{-4} mg/ml concentration

Groups	MTT quantity	
	Mean±S.D. ^{a)}	% of control
control	1.76±0.04	100.0
Fr. A	1.68±0.04	95.8
Fr. B	0.68±0.14	38.3***
Fr. C	1.61±0.17	91.9
Fr. D	1.66±0.15	94.5
Fr. E	1.63±0.06	93.1*

^{a)}The values represent the mean±S.D. of triplicate. Significantly different from the control group, *P<0.05, ***P<0.001

Table III. The effects of the ethyl acetate soluble fraction of the methanolic extract of *Lonicerae flos* on the NR production on human oral epitheloid carcinoma cells at 10^{-4} mg/ml concentration

Groups	NR uptake ability	
	Mean±S.D. ^{a)}	% of control
control	1.92±0.03	100.0
Fr. A	1.80±0.06	93.8*
Fr. B	0.42±0.03	22.0***
Fr. C	1.85±0.03	96.2
Fr. D	0.91±0.23	47.2**
Fr. E	1.86±0.03	96.7

^{a)}The values represent the mean±S.D. of triplicate. Significantly different from the control group, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

강유상피암종세포에 대하여 가장 항암활성이 큰 것으로 나타났고, 소분획 D와 E에서 유의(P<0.01)한 항암효과가 나타났으며, 소분획 A에서도 항암효과가 있었으며(P<0.05) 소분획 C에서는 MTT정량에서와 같이 유의성이 없었다(P>0.05).

MTT정량 분석법에 적용한 ethyl acetate 분획을 소분획하여 인체 구강유상피암종세포에 적용하여 SRB량을 측정된 결과는 Table IV과 같다. 소분획 B에서 인체 구강유상피암종세포에 대하여 유의한 항암활성효과가 나타났고(P<0.01), 소분획 A와 D에서 유의한 (P<0.05) 항암효과가 나타났으며 소분획 C와 E에서 유의성이 없었다(P>0.05).

위의 3가지 검색시스템을 이용하여 얻은 결과에서 소분획 B는 모든 검색에서 인체 구강유상피암종세포에 대하여 유의성 있는 항암활성을 나타냈다 (Fig. 2).

Table IV. The effects of the ethyl acetate soluble fraction of the methanolic extract of *Lonicerae flos* on the production of SRB on human oral epitheloid carcinoma cell at 10^{-4} mg/ml concentration

Groups	SRB quantity	
	Mean±S.D. ^{a)}	% of control
control	1.89±0.31	100.0
Fr. A	1.53±0.12	80.8*
Fr. B	1.23±0.36	65.0**
Fr. C	1.79±0.09	94.9
Fr. D	1.60±0.04	84.4*
Fr. E	1.79±0.08	95.0

^{a)}The values represent the mean±S.D. of triplicate. Significantly different from the control group, *P<0.05, **P<0.01.

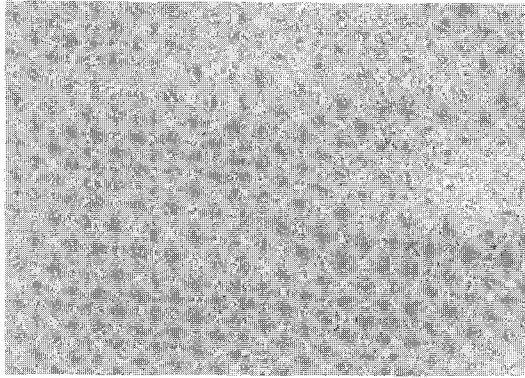


Fig. 1. Inverted photomicrograph of human oral epitheloid carcinoma cells after incubation in unmodified medium (control) for 2 days ($\times 200$). Most cells had abundant cytoplasm and formed round shape.

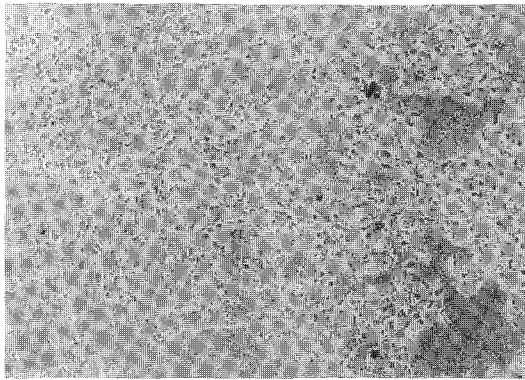


Fig. 2. Inverted photomicrograph of human oral epitheloid carcinoma cells after incubation in the medium containing 10^4 mg/ml concentration of ethyl acetate B fraction for 2 days ($\times 200$). Most cells were shrank and number of cells were decreased.

육안으로 관찰할 수 없는 ELISA reader에 의한 측정치를 확인하기 위하여 인체 구강유상피암종세포를 광학현미경적으로 관찰한 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 소분획 B에서 세포수의 감소와 세포형태의 변화가 가장 심하였게 관찰되었다.

본 연구에서는 금은화의 ethyl acetate분획으로부터 미지의 성분인 분획 5종을 만들어 인체 구강유상피암종세포에 대한 항암활성을 MTT정량 분석법, NR정량 분석법 및 SRB정량 분석법으로 측정한 결과, 소분획 B는 MTT정량 분석법과 NR정량 분석법에서 항암활성이 유의성 있게 나타났고, SRB정량에

서도 항암활성이 통계학적으로 유의하게 나타나 정등⁶⁾과 황⁹⁾의 결과와 일치하였으나 항돌연변이 원성을 일으키는 기전이나 항암활성을 나타내는 성이 같은 것인지에 대하여는 확실하지 않다. 세포의 광학현미경적 조건에서도 천연물로부터 분리한 추출물 소분획 및 성분을 인체 구강유상피암종세포에 적용하여 관찰한 한,^{13,14)} 박,¹⁵⁾ 이 등¹⁶⁾의 결과와 일치하였는데, ethyl acetate 분획으로부터 분리한 소분획 B에서 세포수의 감소와 세포의 위축으로 인한 세포질의 감소와 세포크기의 감소가 뚜렷하였다.

이에 소분획 B에 항암활성 물질이 함유되어 있을 것으로 판단되어 앞으로 소분획 B에서 항암활성에 대한 효과가 뚜렷하므로 이 화합물에 대한 분광화학적 방법으로 분자구조를 규명하는 노력을 계속할 계획이다.

결 론

독성에 의한 부작용이 적고 항암활성이 강한 물질을 개발하기 위하여 금은화로부터 분리한 ethyl acetate 분획을 소분획으로 인체 구강유상피암종세포에 적용하여 항암활성을 측정하였다. 인체 구강유상피암종세포는 RPMI-1640배지에 배양하였고, 항암활성 측정은 MTT정량 분석법, NR정량 분석법 및 SRB정량 분석법을 이용하였으며, 세포의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 도립현미경에 의한 광학현미경적 관찰을 실시하였다. 본 연구에서 추정된 결과는 다음과 같다.

1. MTT정량 분석시 소분획 B에서 항암활성이 가장 유의 ($P < 0.001$)하였고, 소분획 E에서 항암활성이 나타났으나, 소분획 A와 C 및 D에서는 통계학적으로 유의한 항암활성이 유의성이 없었다($P > 0.05$).
2. NR정량 분석시에 있어서도 소분획 B에서 통계학적으로 가장 유의($P < 0.001$)한 항암활성이 나타났고, 소분획 D에서 유의($P < 0.01$)한 항암활성이 나타났으며, 소분획 A에서는 유의($P < 0.05$)한 결과가 나타났으나 소분획 C로 유의성이 없었다.
3. SRB정량 분석에서는 소분획 B에서 유의($P < 0.01$)한 결과가 나타났고, 분획 A와 D는 유의($P < 0.05$)한 결과가 나타났으나 소분획 C와 E는 유의성이 없었다.
4. 세포의 광학현미경적으로 관찰한 결과는 소분

획 B에서 세포수의 감소와 세포 형태의 변화가 가장 심하였고, 소분획 D에서도 세포수의 감소의 세포형태의 변화가 관찰되었다.

이상의 결과에서 금은화 ethyl acetate분획 중에서 분리된 소분획 B에 항암활성물질이 많이 함유되어 있는 것으로 나타났다.

사 사

이 논문은 원광대학교 교비의 일부지원에 의해서 연구되었으며, 이에 감사한다.

인용문헌

- 정진섭, 김재갑 (1984) 원색천연약물대사전 상권. 112. 남산당, 서울.
- 陳在仁 (1982) 圓說韓方醫學大辭典 (中國藥學大典) I, 160. 構談社.
- 송주택 (1983) 한국자원식물, 982. 미도문화사, 서울.
- 이창복 (1983) 대한식물도감, 709. 향문사, 서울.
- 강옥희 (1983) 금은화의 약리작용에 관한 연구. 우석대학교 석사학위논문.
- 정규찬, 권동린, 백석환, 김성한, 장현욱 (1988) 금은화 (*Lonicerae flos*)의 ethyl acetate분획이 돌연변이원성에 미치는 영향. 대한약학회지 32: 328-333.
- Rim, B. M., Rim, C. W., Choi, J. Y., Chung, Y. S. and Jeong, H. G. (1992) Effects of *Lonicera Japonica* extract as a biological response modifier. *Environ. Mut. Car.* 12: 45-54.
- 한두석, 한종현, 백승화, 김일광 (1993) 금은화 추출물의 세포독성에 관한 연구. 원광한의학 3: 23-32.
- 황윤정 (1994) 주엽나무잎 및 금은화의 phenol성 성분. 충북대학교 석사학위 논문.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63.
- Borenfreund, E and Puerner, J. A. (1984) A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/Nr-90). *J. Tissue Culture Meth.* 9: 7-9.
- Skehan, P., Storeng, S., Studiero, D., Monke, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bodesh, H., Kenny, S. and Boyd, M. R. (1990) New colorimetric cytotoxicity Assay for Anticancer-drug screening. *Natl. Cancer Inst.* 82: 1107-1112.
- 한두석 (1995) 알로에가 사람 구강유상피암종세포에 미치는 항암효과. 원대논문집 30: 351-360.
- 한두석, 정규호 (1996) 녹차씨 추출물의 항암활성과 세포독성. 대한구강해부학 회지 21: 297-307.
- 박정희 (1997) 소엽의 메탄올 분획이 인체 구강유상피암종세포에 미치는 항암 효과. 원광대학교 석사학위논문.
- 이영옥 (1997) Cannabigerol이 인체 구강유상피암종세포와 인체피부암세포에 미치는 항암효과. 원광대학교 석사학위논문.

(1998년 2월 14일 접수)