

도라지(*Platycodon grandiflorum* DC) 추출 성분의 암세포 증식 억제효과

이지영 · 황우익* · 임승택

고려대학교 자연자원대학원, 식품가공핵심기술연구센터,

*고려대학교 의과대학 생화학교실

Effect of *Platycodon grandiflorum* DC Extract on the Growth of Cancer Cell Lines

Ji-Young Lee, Woo-Ik Hwang* and Seung-Taik Lim

Graduate School of Natural Resources, and Center for Advanced Food Science and Technology, Korea University

*Department of Biochemistry, Medical College, Korea University

Abstract

To investigate the cytotoxic effect of *Platycodon grandiflorum* DC, petroleum ether extract of *Platycodon grandiflorum* DC was partially purified by a silica gel column chromatography. Among several fractions, fraction D which was obtained under the elution with a 7:3 mixture of petroleum ether and ethyl ether, showed patent cytotoxicity against mouse leukemia cell line (L1210), human rectum cancer cell line (HRT-18) and human colon cancer cell line (HCT-48).

Key words: antitumor activity, *Platycodon grandiflorum* DC, petroleum ether extract

서 론

현대인의 암은 90% 이상이 물리적 환경 혹은 화학 물질에 노출됨으로서 발생되며 이러한 요인 중 40~60%는 식이와 관련된다고 보고 있다⁽¹⁾. 이와 관련하여 최근 식이와 관련된 암의 원인물질을 검색하는 연구가 활발히 진행되고 있을 뿐 아니라 일상에서 섭취하는 식품 중에서 항암제로 이용하기 위한 물질이 탐구되고 있다⁽²⁾. 현재 임상에서 널리 사용되고 있는 항암제의 대부분은 합성 물질들로 부작용이 심하여 문제가 되고 있다. 이로 인해 최근 세계적으로 부작용이 적으면서 유효한 항암제를 개발하기 위해 천연산물을 대상으로 항암성 테스트를 시도하고 있다^(3,4).

우리나라에도 약 100여종의 산채류가 알려져 있으나 이중 도라지, 더덕, 쥐나물, 달래, 쓴바귀, 두릅 등 24종류가 채취 또는 재배되어 식용으로 이용되고 있다⁽⁵⁾. 현 등⁽⁶⁾은 일부 약용식물 및 식용식물의 추출물의 항암효과에 관한 연구를 보고한 바 있으며 중국이나 일본에서도 항암성 산채에 관한 연구가 활발히 진행되고 있

는데 이것은 산채류에 각종 알카로이드, 탄닌, 사포닌, 배당체 등이 많이 함유되어 있어 특수한 생리작용을 나타내므로 이런 가능성성이 높은 것으로 보여진다⁽⁷⁾. 특히 국내산채류 중 도라지(*Platycodon grandiflorum* DC)는 초롱꽃과(Campanulaceae)에 속하는 다년생초로서 한국, 일본 및 중국의 산간지방에서 야생한다⁽⁸⁾. 또한 이것은 일반식용으로 널리 이용되고 있는 산채식품이며 triterpenoid계 사포닌과 당질, 섬유질을 함유하고 있으며 한방에서 약재로 사용되기도 하였다⁽⁹⁾.

이⁽¹⁰⁾에 의하면 천연에 존재하는 도라지는 진정, 해열, 진통작용을 가지며 항염증 작용이 있고 위궤양에 대한 방어 및 치유작용을 가지고 있으며 특히 항궤양과 혈압강하의 목적으로 임상 응용의 가능성을 제시한 바 있다. 장 등⁽¹¹⁾과 김⁽¹²⁾은 도라지의 사포닌은 인삼의 사포닌과 같이 가수분해가 어렵고 식물체의 세포액 중에 용해되어 있으나 물리적, 화학적 방법으로 아직 규명되지 않았다고 보고하였다.

이와 같이 도라지의 성분 중에서 일종의 사포닌이 존재한다는 것이 확인되었으며 특히, 항암제로 널리 알려져 있는 인삼의 주된 약리 작용은 주로 사포닌계 성분에 의한 것으로 보고되었다. 최근에 항돌연변이에 대

한 도라지의 연구에 의하면 서 등⁽¹³⁾은 식용식물의 항변이원성에 관한 연구에서 70% 에탄올로 추출한 도라지의 천연 성분 중에는 mitomycin C가 유발하는 변이원성을 억제하는 물질이 존재할 가능성이 높다고 보고하였다. 특히 동양 한방에서 생약제 중 항암약초로 알려진 것은 150여종이나 되는데 그 중 우리나라 한방에서 항암 및 항세균제로서 통계적으로 가장 많이 처방되어 온 생약제는 약 10여종이라고 보고된 바 있다⁽¹⁴⁾.

이와 같은 관점에서 황^(15~17)은 각종 생약제 및 식품의 항암성을 수종 암세포를 대상으로 실험한바 있고 Sato 등⁽¹⁸⁾도 이들 생약제에 대한 항암성을 규명하여 부착용이 적은 항암제 개발 가능성을 제시하고자 인체 조직 배양을 이용하여 생약제의 항암성을 연구(screen)한 바 있다.

따라서 항암 물질로 도라지를 이용할 수 있는지에 대한 기초자료 및 식품 산업에서 산채류를 이용한 가능성 식품으로의 발전 가능성을 밝히고자 본 연구에서는 도라지의 유효성분을 추출하여 mouse DBA/2 strain 유래의 백혈병성 임파모세포 및 인체 장암세포에 대한 증식 억제 효과를 살펴 보았다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용한 도라지는 경북 영주산을 경동시장에서 구입하여 건조 분말화 한 후 실험용 재료로 사용하였다. 인체 장암세포의 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle 배지이며 mouse DBA/2 strain 유래한 백혈병성 임파모세포의 배양액 Fischer's 배지와 말혈청(horse serum), 송아지혈청(fetal bovine serum), trypsin-EDTA 등은 GIBCO사 (Grand Island Biologic Co. NY U.S.A) 제품을 사용하였고 실리카겔 크로마토그라피에 사용한 silicic acid는 Bio-sil A 100 mesh로 Bio-rad사 제품을 사용하였다.

사용 암세포

본 실험에 사용한 암세포는 인체장암세포로 직장암세포인 HRT-18과 결장암세포인 HCT-48로서 미국 켈리포니아대학에서 분양 받아 본 연구실에서 배양해 온 것이며 mouse DBA/2 strain 유래의 백혈병성 임파모세포는 L1210으로서 일본 Osaka대학 미생물병연구소로부터 분양 받아 실험실에서 배양하여 사용하였다.

암세포 배양

Mouse DBA/2 strain 유래의 백혈병성 임파모세포인

L1210은 Fischer와 Sartorelli법⁽¹⁹⁾에 의하여 배양하였다. 즉, 말혈청을 10% 함유한 Fischer's 배지에 암세포를 일정량씩 첨가하여 16×25 mm 크기의 파이렉스 시험관에서 5 mL씩 분배한 후 37°C 항온기에서 수평을 유지시켜 배양하였다. 그리고 인체 장암세포인 HRT-18과 HCT-48은 5% 송아지혈청 및 항생제(antibiotic-antimycotic)를 첨가한 배지(DMEM)를 배양액으로 하여 플라스크 또는 35 mm 페트리접시에 이식시킨 후 CO₂ 농도가 5%로 유지되는 CO₂ 항온기에서 배양하여 실험에 사용하였다^(20,21). 이를 용기에 암세포가 약 90% 포화상태(4×10^5 cells/mL 정도)로 증식되면 완충식염수(phosphate buffered saline)로 세척하고 0.05% trypsin-EDTA를 1 mL 넣고 10분간 항온기에서 분리시켜 새 배지에 계대 배양하였다.

암세포의 배가시간(doubling time) 측정

L1210 암세포는 시험관에 2×10^4 cells/mL이 되도록 분배한 다음 37°C 항온기 내에서 수평을 유지시켜 배양하면서 배양시간별로 살아있는 암세포수를 세포수 측정기로 측정하였다^(22,23). 한편 인체 장암세포의 배가 시간은 각 암세포를 약 $3\sim 4 \times 10^4$ cells/3 mL가 되도록 이식시킨 후 부착 증식되는 암세포를 24시간 간격으로 트립신을 처리하여 분리한 후 세포수 측정기로 각 페트리접시의 세포수를 측정하고 이를 도시하여 그 증식 곡선으로부터 세포수가 2배로 증식되는데 소요되는 시간을 산출하였다.

일반 성분 분석

수분은 105°C 상압 가열 전조법에 의해서, 조지방은 soxhlet 추출기에서 에틸에테르용매로, 조단백질은 마이크로킬달(micro-kjeldahl)법을 사용하여 질소를 정량하고⁽²⁴⁾ 질소 계수 6.25를 곱해 주었고, 조회분은 550~600°C 전식회화법으로, 조섬유는 A.O.A.C.법⁽²⁵⁾으로 정량 하였다. 탄수화물은 100에서 수분, 조지방, 조단백, 조회분, 조섬유의 분석치를 뺀 값으로 하였다.

도라지의 유효 성분 추출

수용성 추출물: 도라지(50 g)에 중류수를 1,000 mL 첨가한 후 90~100°C 사이에서 3시간 끓인 것을 여과하여 총 부피가 200 mL 되게 중류수로 맞춘 뒤 이액을 30분간 원심 분리한 후 그 상층액을 멀균기로 멀균(121°C, 20분)하여 시료로 사용하였다⁽²⁶⁾. 전조중량을 측정하고자 총량 200 mL 중 1 mL을 취해 105°C 전조법으로 전조중량을 측정하였다.

석유에테르 추출물: 도라지(300 g)를 석유에테르(3,000

mL)을 용매로 실온에서 3일간 추출하여 상층액만 취해 0.22 μm 여과자로 여과하여, 진공농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축시키고, 질소가스를 이용하여 용매를 완전히 날린 뒤, 건조 중량을 측정하고, 실험시에는 소량의 무수에탄올에 녹여 필요한 농도로 배양액에 희석하여 사용하였다^[26].

암세포 증식 억제효과 측정

도라지 추출 성분의 암세포 증식 억제효과를 측정하였다. mouse DBA/2 strain 유래한 백혈병성 임파모세포의 경우에는 각각의 추출물이 농도별로 함유된 배지에 세포를 2×10^4 cells/mL 이 되도록 첨가한 후 시험관에 배분하여 37°C에서 배양하면서 배양시간별, 추출물 농도별(0.1~0.3 mg/mL)로 각군의 세포수를 세포수 측정기로 측정하여 대조군(추출물을 넣지 않은 군)과 비교하였다. 인체 암세포의 경우는 T-75 플라스크에서 배양한 HRT-18와 HCT-48의 암세포를 트립신 처리하여 분리한 후 배양액으로 희석하고 35 mm 페트리접시에 각 3 mL씩 분배 이식시킨 후 24시간 배양하였다. 각 암세포가 접시에 부착 증식되어 세포수가 약 $4\sim5 \times 10^4$ cells/3 mL 되었을 때 접시내의 배양액을 각각의 추출 성분이 농도별(0.25~2 mg/mL)로 함유된 배양액으로 교체한 후 24 내지 72시간 배양하면서 일정시간에 각 접시에서 증식된 암세포를 트립신 처리하여 분리하고 식염수(0.9% NaCl)에 희석하여 세포수 측정기로 각 군의 세포수를 측정하였다. 이때 3개의 페트리접시의 값을 측정하여 평균을 구하였다. 대조군은 실험군에서 각각의 추출액 첨가량에 해당되는 양의 중류수 또는 무수알코올(0.2% 미만)을 첨가하여 동일한 조건에서 측정하였고 대조군의 세포 수를 기준 하여 다음 식에 의하여 각각의 추출물 첨가 배양군들의 세포증식 억제 또는 사멸율을 산출하였다.

$$\text{증식율}(\%) =$$

$$\frac{\text{실험군의 배양시간별 증식세포수} - \text{출발시 세포수}}{\text{대조군의 배양시간별 증식세포수} - \text{출발시 세포수}} \times 100$$

$$\text{사멸율}(\%) =$$

$$\frac{\text{실험군의 배양시간별 증식세포수} - \text{출발시 세포수}}{\text{출발시 세포수}} \times 100$$

석유에테르 추출물의 분획

석유에테르 5 mL에 도라지 석유에테르 추출성분(0.50 g)을 녹여 실리카겔 컬럼(2.5 × 30 cm)에 투여 하였다.

순수석유에테르, 석유에테르: 에틸에테르(9 : 1, v/v), 석유에테르 : 에틸에테르(8 : 2, v/v), 석유에테르 : 에틸에테르(7 : 3, v/v)를 각각 175 mL씩 홀려 각 단계별로 분획을 회수 하였다^[27,28]. 이렇게 모은 각 단계의 분획을 차례로 A, B, C와 D로 하였다.

컬럼 크로마토그라피에서 분리된 성분의 조성을 실리카겔 얇은막 크로마토그라피를 사용하여 살펴보았다^[28]. 이때 전개 용매로는 석유에테르 : 에틸에테르 : 아세트산(90 : 10 : 1)를 혼합한 용매를 사용했다. 전개가 끝나면 실온에서 완전히 말리고 30% 황산 용액을 골고루 분무 후 120°C에서 5분 정도 발색시켰다.

암세포 형태의 조직학적 관찰 및 크기 분포 측정

위와 같이 준비된 세포 배양액에 도라지 석유에테르 추출물을 컬럼 크로마토그라피에서 얻은 활성 성분인 각 분획 A, B, C와 D를 일정한 농도(0.3 mg/mL)로 첨가하고 HCT-48을 24시간부터 72시간까지 배양하면서 실험군과 대조군의 세포 모양의 변화를 현미경으로 관찰하여 세포증식 억제현상을 비교하였다^[29,30]. 또한 도라지 석유에테르 추출물의 각 분획 성분을 HCT-48세포에 첨가하여 배양하면서 시간별로 대조군과 비교해 암세포 크기 분포에 미치는 영향을 세포 크기 분포 측정기(size distribution analyzer)를 이용하여 확인하였다.

결과 및 고찰

암세포의 배가시간(doubling time)

본 연구에서 사용한 mouse DBA/2 strain 유래의 백혈병성 임파모세포인 L1210의 배가시간은 약 12시간으로 Fischer and Chu^[31]의 보고와 일치했고 인체 장암 세포인 HRT-18와 HCT-48은 22~24시간으로 Tsao와 Kim^[32]의 보고와 일치되어 정상적으로 증식되고 있음을 알 수 있었다.

일반 성분 함량

도라지는 12.84%의 수분을 함유하고 있었고 총 당이 56.82%로 가장 많이 함유되어 있었으며 다음 조성

Table 1. Proximate composition of the *Platycodon grandiflorum* D.C

	Components (%)				
	Moisture	Crude fat	Crude protein	Crude fiber	Total ash
<i>Platycodon grandiflorum</i> D.C	12.84	1.28	0.83	23.42	4.81
					56.82

유, 회분, 조지방, 조단백질 순으로 함유되어 있었다 (Table 1).

도라지 추출성분에 대한 L1210, HRT-18, HCT-48 세포 증식 억제효과

Mouse DBA/2 strain 유래의 백혈병성 임파모세포인 L1210에 도라지의 석유에테르 추출물과 수용성 추출물을 첨가한 배양액에서 24, 48 및 72시간 배양 후 증식곡선은 Fig. 1과 같다. 즉 출발세포수 2.3×10^4 cells/mL이던 것이 24, 48 및 72시간 배양시 대조군은 각각 7.3×10^4 , 26.0×10^4 및 54.0×10^4 cells/mL로 배양시간 경과에 따라 점차 증식 되는 반면 석유에테르 추출물 첨가시에는 감소하였다. 도라지 수용성 추출물을 각각 배양액 mL당 0.1 mg, 0.2 mg 및 0.3 mg 첨가 배양시 배양시간별 증식율이 대조군과 큰 차이가 없었으나 도라지 석유에테르 추출물의 경우 0.1 mg/mL 첨가 배양시에는 24, 48 및 72시간에 각각 -57%, -30% 및 4% 증식되었고 0.2 mg/mL 첨가군은 각각 -64%, -73% 및 -64%로 증식이 억제되었다. 따라서 L1210의 경우 도라지의 수용성 성분에 비해 석유에테르 추출물이 증식 억제효과가 뛰어남을 보였다.

인체 직장암세포인 HRT-18에 도라지 추출물을 농도별로 첨가한 배양액에서 24내지 72시간 배양한 증식곡선은 Fig. 2에 표시한 바와 같다. 수용성 추출물을 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL 및 1 mg/mL 첨가 배양시 수용성 추출물 경우 1 mg/mL 첨가 군은 거의 변화가 없었으나 석유에테르 추출물 1 mg/mL 첨가 군은 각각 21%, 8% 및 6%로 증식하여 48시간 이상 배양시 수용성 추출물의 증식율보다 현저하게 감소되었다.

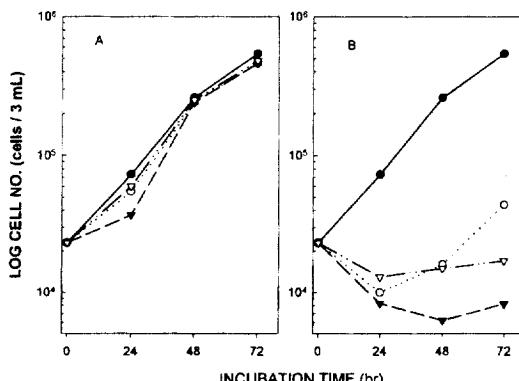


Fig. 1. Effect of *Platycodon grandiflorum* DC extracts on the growth of L1210 cells. A: water extract. B: petroleum ether extract. ●—●: CONTROL, ○··○: 100 µg/mL, ▼—▼: 200 µg/mL, ▽—▽: 300 µg/mL

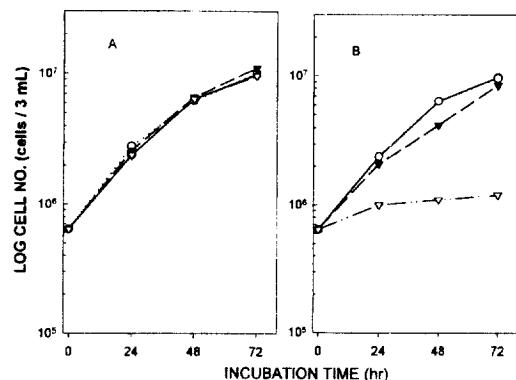


Fig. 2. Effect of *Platycodon grandiflorum* DC extracts on the growth of HRT-18 cells. A: water extract. B: petroleum ether extract. ●—●: CONTROL, ○··○: 0.25 µg/mL, ▼—▼: 0.5 µg/mL, ▽—▽: 1 µg/mL

인체 결장암세포인 HCT-48에 각 추출물을 농도별로 첨가한 배양액에서 24 내지 72시간 배양후 비교실험 결과는 Fig. 3과 같다. 수용성 추출물을 첨가 배양시 대조군과 비교해 효과가 없었다. 그러나 석유에테르 추출물 2 mg/mL 첨가 군은 각각 -90%, -96% 및 -98%로 세포증식 억제효과가 높았다. 인삼 및 다른 생약제들 역시 수용성 추출물보다 석유에테르 추출물이 더 효과적인 항암효과를 나타낸다고 보고되었다^(33,35).

이상의 결과로 보아 도라지 석유에테르 추출물 성분 중에 인체 장암세포인 HRT-18, HCT-48과 mouse DBA/2 strain 유래의 백혈병성 임파모세포인 L1210의 증식을 억제시키는 작용이 있는 것으로 평가된다.

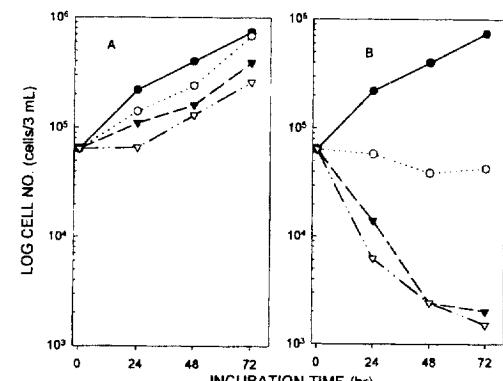


Fig. 3. Effect of *Platycodon grandiflorum* DC extracts on the growth of HRT-48 cells. A: water extract. B: petroleum ether extract. ●—●: CONTROL, ○··○: 1 µg/mL, ▼—▼: 1.5 µg/mL, ▽—▽: 2 µg/mL

각종 항암제의 암세포 사멸작용의 유형을 살펴보면 첫째, 그 약제의 농도에 의존하는 경우로 mitomycin C와 같이 단시간에 세포가 사멸되어 시간이 경과되어도 세포생존률이 일정치 이하로 감소하지 않는 경우 고 둘째는 작용시간에 의존하는 경우로 농도보다는 시간에 따라 세포사멸 작용이 커지는 경우며 셋째는 농도와 시간 동시 의존성으로 고농도에서는 단시간에, 저농도에서는 시간경과에 따라 사멸작용이 비례되는 등으로 대별할 수 있다. 따라서 본 실험의 결과는 셋째 경우에 해당 되는 것으로 예측된다.

컬럼 크로마토그라피 분획의 L1210과 HCT-48 세포 증식 억제효과

석유에테르 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그라피에 통과시켜 얻은 네개의 분획을 가지고 암세포 증식 억제효과를 측정한 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

분획 A는 배양시간 24내지 72시간에 따라 효과가 거의 없었고 분획 C의 경우 0.3 mg/mL 첨가군은 각각 -70%, -57% 및 -70%의 증식억제를 나타내었다. 분획 D의 경우는 C보다 적은 효과를 나타냈으나 전반적으로 크게 차이가 없었다. 이와 같이 석유에테르 추출물

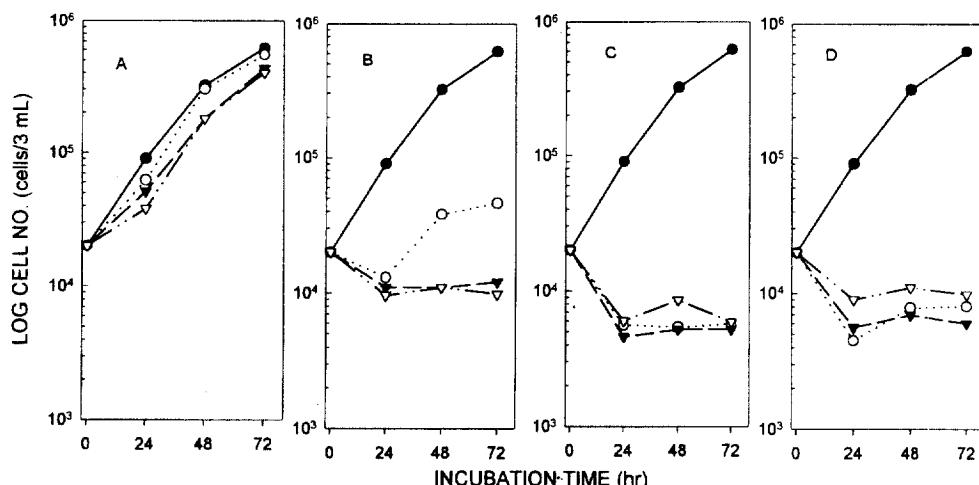


Fig. 4. Growth curves of L1210 cells in the culture medium containing the *Platycodon grandiflorum* DC fractions extracted through silica gel chromatography by solvents differed in the petroleum ether(P)-ethyl ether(E) ratio. A: (P:E=10:1), B: (P:E=9:1), C: (P:E=8:2), D: (P:E=7:3). ●—●: CONTROL, ○—○: 100 µg/mL, ▼—▼: 200 µg/mL, ▽—▽: 300 µg/mL

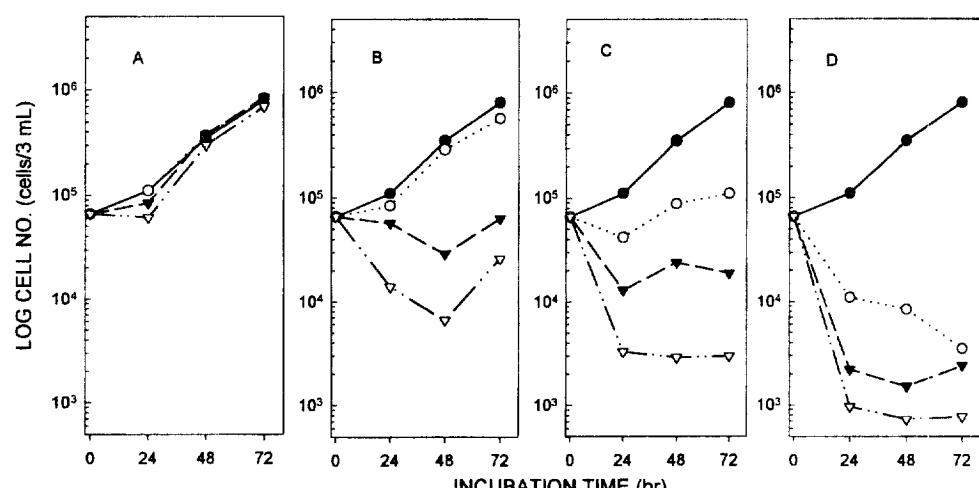


Fig. 5. Growth curves of HCT-48 cells in the culture medium containing the *Platycodon grandiflorum* DC fractions extracted through silica gel chromatography by solvents differed in the petroleum ether(P)-ethyl ether(E) ratio. A: (P:E=10:1), B: (P:E=9:1), C: (P:E=8:2), D: (P:E=7:3). ●—●: CONTROL, ○—○: 300 µg/mL, ▼—▼: 600 µg/mL, ▽—▽: 1200 µg/mL

을 분리한 결과 분획 A, B 보다는 에틸 에테르의 함량이 높은 분획 C, D에서 강한 효과를 나타내었다.

컬럼 크로마토그라피를 이용해 얻은 네개의 분획을 가지고 인체 결장암세포의 증식 억제효과를 측정한 결과 Fig. 5에 나타내었다. 각각의 처리농도는 0.3 mg/mL, 0.6 mg/mL 및 12 mg/mL로 첨가 실험하였다. 이 때 분획 A는 대조군에 비해 효과가 거의 없었고 분획 D의 경우는 12 mg/mL 첨가군은 모두 -99%의 사멸율을 나타내었다. 여기서는 분획 C보다 D가 효과가 훨씬 높게 나타났다. 따라서 분획 A, B 보다는 C, D에서 효과적이었으며 그 중 인체 결장암의 경우는 D가 현저한 억제효과를 나타내었다. D의 경우보다 에틸에테르 함량이 높은 6:4와 5:5 (석유에테르:에틸에테르) 그리고 순수 에틸에테르로 추출하여 비교실험을 하였는데, 에틸에테르만으로 추출한 것은 효과가 거의 없었으며 6:4와 D용액(7:3)이 거의 비슷했고 5:5는 효과가 미약했다. 따라서 석유에테르와 에틸에테르의

혼합비율이 6:4 또는 7:3이 가장 적합한 추출용매라고 할 수 있다.

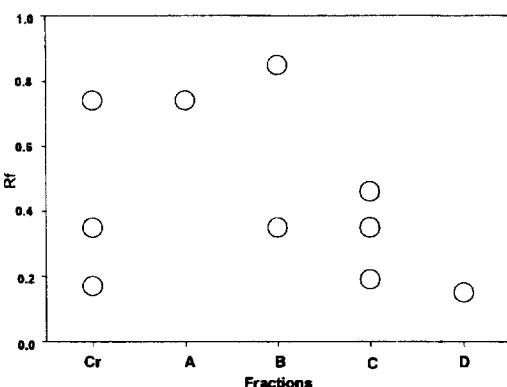


Fig. 6. Silica-gel thin layer chromatograms of crude petroleum ether extract(Cr) and fractions separated by silica gel column chromatography.

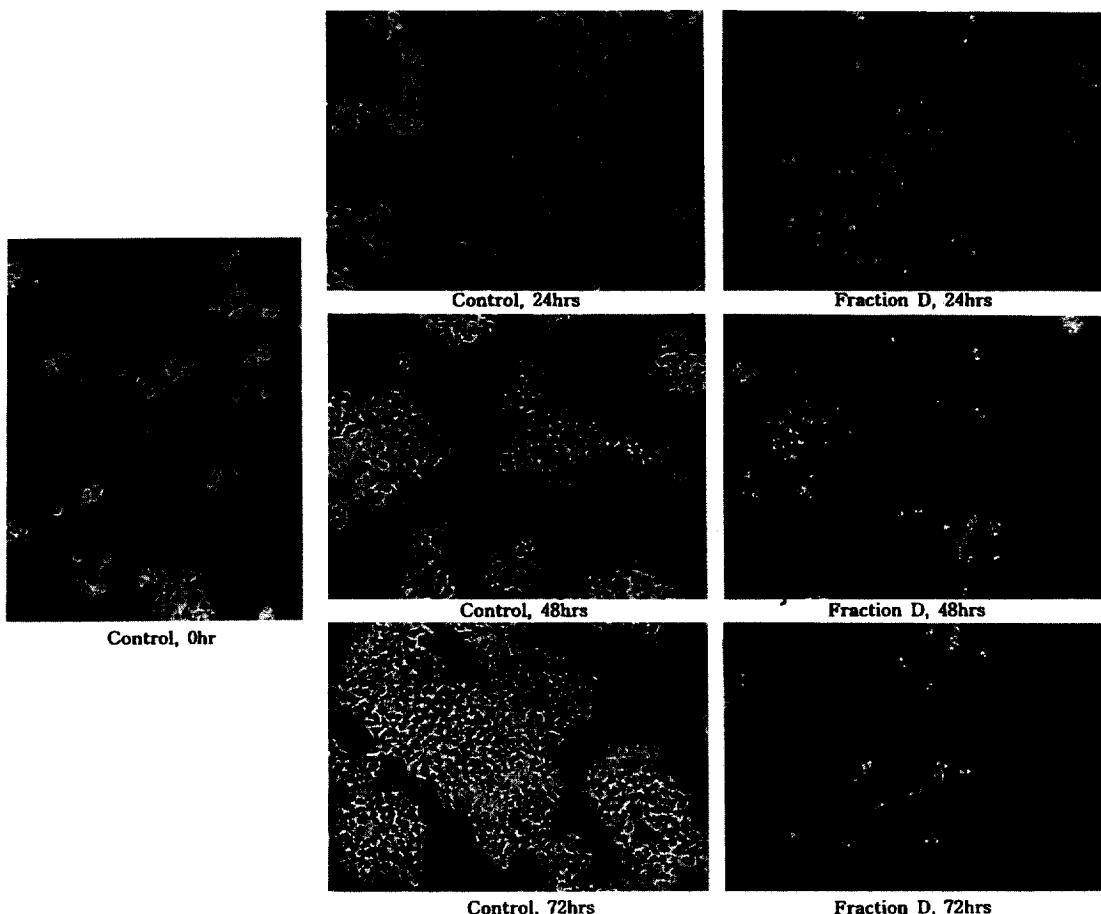


Fig. 7. Photomicrographs of HCT-48 cells incubated with and without (control) fraction D (0.3 mg/mL) of *Platycodon grandiflorum* DC from silica gel column chromatography.

이와 같은 현상은 본 실험에 사용한 암세포의 기원이나 특성의 차이 때문에 나타나는 결과인 것으로 믿어 진다. 도라지 석유에테르 추출물의 효과가 L1210, HRT-18, HCT-48등의 암세포에 거의 같은 경향으로 나타남을 알 수 있고 또 석유에테르 추출물 중 활성성분은 실리카겔 컬럼 크로마토그라피에서 석유에테르: 에틸에테르 7:3용매로 추출하므로 현저히 정제됨을 알 수 있었다. 이는 황⁽³⁶⁾ 등의 보고에서도 인삼 석유에테르 추출물에서도 동일한 용매분획의 활성이 높았다는 보고와 일치하는 결과를 나타내었다. 도라지의 석유에테르 추출물과 분획 D (7:3)의 활성을 비교해보면 분획 D의 활성이 높았다. 이같은 현상은 활성물질이 분획 D에 더 많이 포함되어 있는 것으로 사료된다.

얇은막 크로마토그라피 분석

석유에테르 추출물과 실리카겔 컬럼 크로마토그라피에서 얻은 각 분획(A, B, C 및 D)을 가지고 TLC를 수행한 결과 Fig. 6과 같이 구성 성분이 분리되었다.

암세포증식억제에서 가장 활성이 좋은 분획인 D는 TLC 상에서 Rf 값이 0.15인 1개의 점(spot)으로 분리되었다. 이와 유사한 물질이 분획 crude extract와 C에서 발견되었는데 이들은 비슷한 물질이라 생각되어진다. 따라서 이를 토대로 앞으로 이 점(spot)에 해당하는 물질을 정제하여 정확한 화학 구조분석이 필요할 것이다.

HCT-48 세포 형태에 미치는 효과

도라지 석유에테르 추출물로부터 얻은 활성 성분이 암세포의 형태 변화에 미치는 영향을 보기 위해 컬럼 크로마토그라피 분획 D를 0.3 mg/mL로 인체 결장암 세포인 HCT-48 세포 배양액에 첨가하여 72시간 동안 배양하면서 현미경 상으로 관찰한 결과는 Fig. 7과 같다. 72시간 까지의 대조군 세포들은(A1-4) 모두 배양 시간이 경과함에 따라 정상적으로 증식 되었음을 볼 수 있었으나 도라지의 석유에테르 추출물로부터 얻은 활성 성분 D를 넣고 배양한 경우 세포에 손상을 주어 증식이 억제 되었음을 볼 수 있었고 죽은 세포들이 바닥에서 떨어진 상태를 관찰할 수 있었다.

각 분획이 암세포에 미치는 크기분포 관찰

배양시간별로 세포의 크기분포를 세포 크기분포 측정기(size distribution analyzer)로 측정한 결과, 대조군의 경우 24시간에는 5~20 cubic micron에 분포하던것이 48시간에는 10~40 cubic micron으로 분포가 옮겨감을 보였다(Fig. 8). 시간이 흐르면서 세포의 상태가

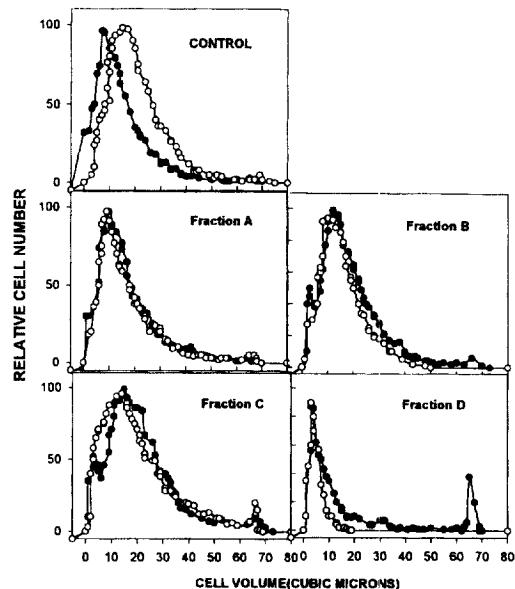


Fig. 8. Size distribution curves of HCT-48 cells incubated with and without the fractions separated by silica gel column chromatography. ●—●: 24 hrs, ○—○: 48 hrs

좋아 적당한 크기의 세포가 많아진다는 것을 나타낸다. 각 분획을 0.3 mg/mL이 되게 첨가한 결과 대조군에 비해 분획 A, B, C는 시간이 경과함에 따라 차이가 없었으나 D의 경우는 대조군에 비해 크게 차이를 나타냈다(Fig. 8). Fig. 9은 활성 성분인 분획 D와 대조군의 48시간 배양한 후 세포 크기 변화를 비교하여 나타낸 것으로 정상적인 세포인 대조군에 비해 세포의 크기가 많이 줄어 들어 활성성이 세포에 손상을 끼쳤다는 것을 알 수 있었다.

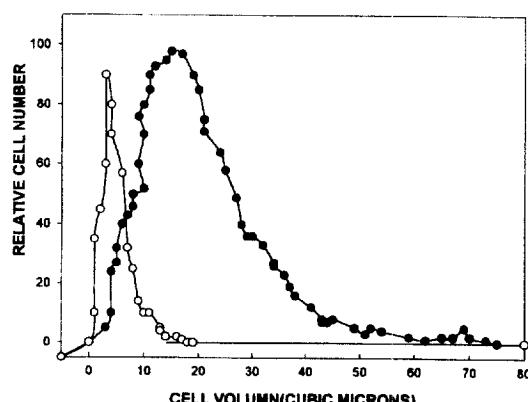


Fig. 9. Peaks of size distribution curves of HCT-48 cells incubated with and without fraction D for 48 hours. ●—●: CONTROL, ○—○: Fraction D

이상의 결과를 종합해 보면 도라지 석유에테르에 추출된 유효성분이 인체장암세포와 mouse DBA/2 strain 유래의 백혈병성 임파모세포의 증식억제에 효과적이었다고 할 수 있겠다. 그 중에서도 컬럼 크로마토그라피에서 얻은 분획 중 석유에테르와 에틸에테르가 7:3 혼합된 분획이 가장 효과적이라는 결과를 얻었다.

따라서 앞으로 이를 바탕으로 항암활성을 나타내는 주요성분의 정체 및 구조분석 연구가 필요하며 동물 실험에서의 독성 및 여러 실험을 함께 비교 검토해야 할 것이다.

요 약

도라지의 물과 석유에테르 추출물의 세포 증식 억제효과를 mouse DBA/2 strain 유래의 백혈병성 임파모세포인 L1210과 인체 결장 암세포인 HCT-48 및 직장암세포인 HRT-18를 대상으로 분석하였다. 수용성 추출물보다는 석유에텔 추출물이 모든 항암세포에 대하여 현저히 높은 항암효과를 나타내었다. 도라지 석유에테르 추출물을 실리카겔 컬럼크로마토그라피에서 석유에테르과 에틸에테르 혼합율(7:3)로 얻은 분획은 더욱 높은 활성을 나타냈으며 L1210에서는 0.3 mg/mL, HCT-48는 1.2 mg/mL의 농도에서 대조군에 비해 -99%, -55%의 증식억제효과를 보였다.

감사의 글

본 논문은 CAFST의 지원으로 출판되었습니다(CAFST Journal No. 97019).

문 헌

- Doll, R. and Peto, R.: The cause of cancer; quantitative estimate of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.*, **66**, 119 (1981)
- Miyazaki, T. and Nishijima, M.: Structural examination of a water soluble antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.*, **29**(12), p.3611-3616 (1981)
- King, M.L.: Screening study on Taiwan plants for antitumor activity. *Cancer chemotherapy reports part 2*, p.4 (1974)
- Ha, Y.L. and Michael, W.P.: Naturally-occurring novel anticarcinogens: conjugated dienoic derivatives of linoleic acid (CLA) (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **20**(4), 401 (1991)
- Hwang, E.H.: A survey on availability of wild vegetables (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **20**(5), 440 (1991)
- Hyun, J.W., Lim, K.H., Shin, J.E., Sung, M.S., Won, Y.J., Kim, Y.S., Kang, S.S., Chang, I.M., Woo, W.S. and Paik, W.H.: Antineoplastic effect of extracts from traditional medicinal plants and various plants (in Korean). *Kor. J. Pharmacogn.*, **25**(2), 171 (1994)
- Kim, Y.D. and Yang, W.M.: Studies on the components of wild vegetables in Korea (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **15**(4), 10 (1986)
- Lim, K.H.: A Medicinal Phytology (the details). Dong Myoung Sa, p.281 (1971)
- Lee, S.I.: Chinese Pharmaceutics. Soo Seo Won, p.129 (1981)
- Lee, E.B.: Pharmacological studies on *Platycodon grandiflorum* (in Korean). *Kor. J. Phamacongn.*, **5**, 49 (1974)
- Jang, J.G., Lee, K.S., Kwon, D.W., Nam, K.Y. and Choi, J.H.: Study on the changes of saponin contents in relation to root age of panax ginseng (in Korean). *Korean J. Food & Nutrition*, **12**(1), 37 (1983)
- Kim, J.Y. and Staba, E.J.: Saponins and sapogenins from American ginseng plants Kor (in Korean). *J. Pharmacogn.*, **4**(4), 193 (1973)
- Seo, J.S., Lee, Y.W., Suh, N.J. and Chang, I.M.: Assay of antimutagenic activities of vegetable plants (in Korean). *Kor. J. Pharmacogn.*, **21**(1), 88 (1990)
- Cha, S.M.: A statistical evaluation of their frequencies of appearance in oriental medicine formularies (in Korean). *Kor. J. Pharmacogn.*, **8**(1), 1 (1977)
- Hwang, W.I.: A study on the growth inhibition of human colon cancer cells by eucommia leaf extract (in Korean). *Korean J. Food & Nutrition*, **5**(1), 13 (1992)
- Lee, C.S., Ju, J.S. and Hwang, W.I.: The inhibitory effect of water extracts of the trichosanthes semen and sinapis semen against some cancer cells growing (in Korean). *Korea University Medical Journal*, **20**(1), 39 (1983)
- Lee, T.H., Paik, J.M. and Hwang, W.I.: Effect of prunus mume extract on the growth rate of animal leukemic cells (L1210, P388) and human colon cancer cells (HRT-18, HCT-48, HT-29) (in Korean). *Korea University Medical Journal*, **25**(1), 365 (1988)
- Sato, A., Nakano, Y. and Taguchi, T.: Antitumor activity of crude drugs with human tissue culture screening. *Proc. Symp. Wakan-Yaku*, **12**, 56 (1979)
- Fisher, G.A. and Sartorelli, A.G.: Development maintenance and assay of drug resistance. *Meth. in Med. Res.*, **10**, p.247 (1964)
- Goldburg, E., Nitowsky, H. and Colowick, S.: The role of glycolysis in the growth of tumor cells. *J. Biol. Chem.*, **240**, 2791 (1965)
- Jakoby, W.B. and Pastan, I.H.: Methods in Enzymology Vol. VIII. Cell Culture, Academic Press, New York, p. 132 (1979)
- Isove, N.N., Senn, J.S., III, J.E. and McCulloch, E.A.: Colony formation by normal and leukemic human marrow cells in culture effect of conditional medium from human leucocytes. *Blood*, **37**, 1 (1971)
- Hayflick, L. and Moorhead, P.: The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, **25**, 585 (1961)
- Ju, H. K. and Park, C.K.: Food Analysis. You-Lim Moon-Hwa Sa, Seoul (1990)
- A.O.A.C.: Official Methods of Analysis. 14th ed., As-

- sociation of official analytical chemists, Washington, D.C., p.249 (1984)
26. Hwang, W.I., Cha, S.M. and Lee, S.Y.: Determination of antitumor effects of extracts from Korean medicinal plants on cancer cells (L5178Y) (in Korean). *Korean Biochem. J.*, **13**(1), 25 (1980)
27. Kuksis, A.: Lipid Chromatographic Analysis. Dekker Inc., **1**, p.239 (1967)
28. Kates, M.: Techniques of Lipidology. North-Holland Publishing Company, p.431 (1972)
29. Clerk G.: Staining Procedures. 4th ed., Williams & Wilkins, p.46 (1981)
30. Kim, K.S., Paik, J.M. and Hwang, W.I.: Determination of antitumor effects of extracts from Korean medicinal plants on cancer cells (in Korean). *Korea University Medical Journal*, **25**, 759 (1988)
31. Fischer G.A. and Chu, M.Y.: The incorporation of 3H-cytosine arabinoside and its effect on murine leukemia cells(L5178Y). *Biochem. Pharmacol.*, **17**, 753 (1968)
32. Tsao, D., Shi, Z.R., Wong, A. and Kim, Y.S.: Effect of sodium butyrate on carcinoembryonic antigen production by human colonic adenocarcinoma cells in culture. *Cancer Research*, **43**, 1217 (1983).
33. Hwang, W.I. and Sohn, J.W.: Comparative study on the cytotoxic activities of red ginseng of Korea and China (in Korean). *Korean J. Ginseng Sci.*, **17**(3), 196 (1993)
34. Lee, S.H. and Hwang, W.I.: Inhibitory effect of petroleum ether extract of panax ginseng root against growth human cancer cells (in Korean). *Korean J. Ginseng Sci.*, **10**(2), 345 (1986)
35. Lee, H.S. and Hwang, W.I.: A study on antitumor effect of *Scirpus Maritimus* (in Korean). *Korea University Medical Journal*, **31**(3) (1994)
36. Hwang, W.I. and Cha, S.M.: A cytotoxic activity of extract of panax ginseng root against some cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Proc. of 2nd Ginseng Symposium, (1978)

(1997년 9월 11일 접수)