J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.
27(5), 987~992(1998)

한국식품영양과학회지

곰취 추출물의 세포독성 효과

함승시† · 이상영 · 오덕환 · 정성원 · 김상헌* · 정차권** · 강일준**

강원대학교 식품생명공학부
*강원대학교 농기계공학과
**한림대학교 식품영양학과

Cytotoxicity of *Ligularia fischeri* Extracts

**Seung-Shi Ham†, Sang-Young Lee, Deog-Hwan Oh, Sung-Won Jung
Sang-Heon Kim*, Cha-Kweon Jeong** and Il-Joon Kang****

Division of Food and Biotechnology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea
**Dept. of Agricultural Machinery Engineering, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea*
***Dept. of Food Science and Nutrition, Hallym University, Chunchon 200-701, Korea*

Abstract

This study was investigated to observe the cytotoxicity effect of *Ligularia fischeri* extracts against cancer cell lines including human lung carcinoma(A549), human cervix epitheloid carcinoma(HeLa) and human hepatocellular carcinoma(HepG2) using SRB(sulforhodamine B) method. The ethanol and methanol extracts of 1μg/μl showed approximately 79.2% and 86.4% cytotoxicity effects on HepG2 cell line and the ethyl acetate fraction fractionated from ethanol extracts showed the strongest cytotoxicity effect with 94% inhibition. The inhibitory effect of ethanol extract on HeLa cell line was somewhat low with 50~56% inhibition, but ethyl acetate fraction showed higher cytotoxicity effect with 91% and 91.9% inhibition on the HeLa and A549 cell line. On the contrary, the ethanol and methanol extracts showed the lower inhibition effects on the normal liver cell, WRL68, compared to human cancer cell lines.

Key words: *Ligularia fischeri*, cytotoxicity, SRB, HepG2, HeLa, A549

서 론

최근 인간이 섭취하고 있는 식품이나 자연계에 존재하고 있는 식물체로부터 생리활성 기능을 나타내는 물질을 찾아내어 각종 질병의 예방이나 치료를 위한 신의약품의 소재개발을 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다(1-4). 특히 항암제 개발분야에서는 이런 노력이 더욱 활발한데 그 이유는 기존의 항암제들이 치료의 한계를 가지고 있기 때문이다. 근래에는 일반 채소류를 포함하여 야생 식물자원들에 대한 활성성분의 검출에 대하여 활발한 연구를 수행하고 있는 추세며 외국의 경우 식품의 기능성 규명 및 활성 성분을 식품에 응용할 목적으로 세부 전문 분야별로 체계적이고 장기적인 시도를 하고 있다(5). 과채류와 산채류의 경우 폴리페놀류 및 식이섬유가 돌연변이원의 대사적 산화를 억제하거나 변이원 자체를 불활성화시켜 항돌연변이 활성을 나타낼 뿐만 아니라(6) 항산화활성, 인간 암세포에 대한 세포독성효과 그리고 소동물 실험에서의 유전독성 억제활성 및 종양억제작용을 나타내는 것으로 보고되고 있다. Ham 등(7)은 20종류의 산채류 추출물에 대하여 benzo(α)pyrene, 2-AF 그리고 Trp-P-1을 이용하여 산야초 종류에 따른 항돌연변이성을 검토하였으며 Han 등(8,9)은 쑥, 돌미나리, 두릅, 돌나물, 도라지의 생즙에 대한 항돌연변이성 실험결과 2-AF에 비해 Trp-P-1에서 강한 억제활성을 인정하였을 뿐만 아니라 2-AF의 억제기작에 대해서도 언급하였다. Ham 등(10,11)은 컴프리의 생즙과 가열즙의 MNNG, benzo(α)pyrene, Trp-P-1 등의 변이원에 대한 억제활성실험에서 가열즙의 경우 Trp-P-1에 대하여 높은 항돌연변이효과가 있음을 보고하였고 인간 간암세포인 HepG2, Hep3B, 그리

†To whom all correspondence should be addressed

고 PLC/PRF/5를 이용한 컴프리 추출물의 세포독성 실험에서 Insulin-like growth factor Ⅱ(IGF- Ⅱ) 유전자의 분화억제효과도 밝힌 바 있다. 한편 더위지기쑥(인진쑥) 추출물의 항돌연변이성 및 세포독성 실험결과에서도 강한 항돌연변이성이 인정되었으며 폐암세포인 A549와 유방암 세포인 MCF7, 섬유육종암세포인 HT-1080 그리고 위암세포인 KATO Ⅲ에 대한 세포독성 실험에서 에탄올 추출물이 가장 강한 세포독성을 나타낸 것으로 보고하였다(12). 또한 수리취 메탄올추출물의 소핵실험에서 benzo(α)pyrene에 의한 유전독성억제효과가 있음을 밝힌 바 있다(13).

본 연구는 산채류 중에서 일반적으로 널리 이용되고 있을 뿐만 아니라 최근에 와서 재배농가가 늘어나고 있는 곰취에 대하여 생리적 기능을 밝히고 곰취를 원료로 한 가공제품 개발을 위한 기초 자료를 얻기 위하여 곰취 추출물들의 각종 암세포에 대한 세포독성효과를 검토하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시료의 추출 및 분획

실험에 사용된 곰취(*Ligularia fischeri*)는 1997년 5월 경상북도 청송에서 재배한 것을 구입하여 깨끗한 물로 씻은 후 동결건조하여 가늘게 세절한 후 -30°C 냉동고에 보관하면서 사용하였다. 추출에 적합하도록 세절 및 분쇄하여 환류냉각기를 부착시킨 플라스크에 시료 중량에 대하여 각각 10배의 에탄올, 메탄올 그리고 물을 첨가하여 50°C 수욕상에서 12시간씩 3회 반복 추출하였고 상온에서 에탄올을 넣고 열을 가하지 않은 상태로 얻은 추출물을 비가열 추출물(non-heating extract)로 하였다. 곰취의 생리활성이 높은 부분에서 활성 성분의 특성을 검토하기 위하여 Fig. 1과 같이 헥산, 초산에틸 그리고 물층으로 분획하여 분획물을 감압 농축한 후 동결건조하여 각각의 시료로 사용하였다.

세포주 및 배양

실험에 사용한 세포주인 human lung carcinoma(A549), human cervix epitheloid carcinoma(HeLa)와 human hepatocellular carcinoma(HepG2)는 Korea cell line bank(KCLB)로부터 구입하였다. A549는 RPMI 1640배지, HeLa, HepG2는 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM)배지에서 10% fetal bovine serum (FBS)으로 적응시켜 배양시켰다.

SRB assay

SRB(sulforhodamine B)분석(14)은 세포 단백질염색을 이용하여 세포 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 10%의 fetal bovine serum과 각각의 세포들(A549, HeLa, HepG2)을 함유하는 RPMI 1640이나 DMEM배지를 100μl씩 각 well에 첨가하였다. 이것을 24시간 동안 배양(37°C, 5% CO_2)시킨 후 추출물들을 각각 12.5, 25, 50, 100μg/well씩 첨가하여 다시 48시간 배양시켰다. 그 후 상등액을 aspirator로 조심스럽게 제거하고 차가운 10% trichloroacetic acid(TCA)를 100μl씩 첨가하여 1시간 동안 4°C에서 방치하였다. TCA와 배지 등을 제거하기 위하여 증류수로 5번 정도 헹구고 plate를 건조시킨 후 1% acetic acid에 녹인 0.4% SRB용액을 100μl를 첨가해 30분 동안 염색시킨 후 결합하지 않은 SRB염색액을 제거하기 위하여 1% 초산용액으로 4번 정도 헹구었다. 건조기에서 건조된 plate는 10mM Tris buffer(pH 10.5) 100μl로 염색제를 충분히 녹인 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

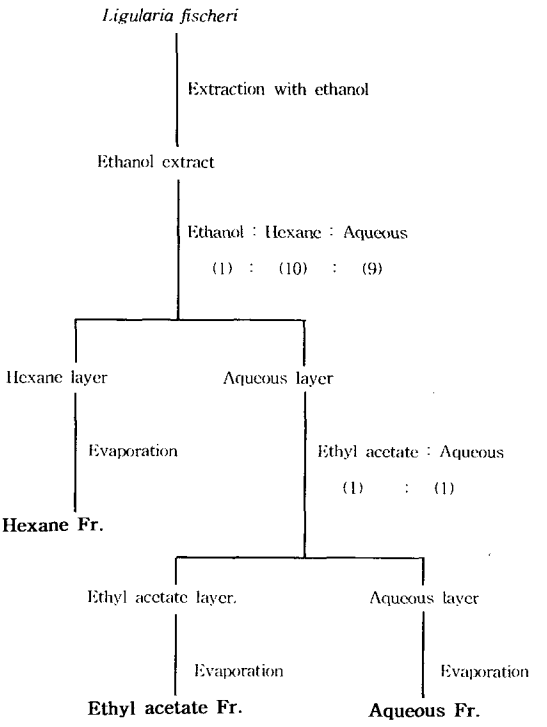

Fig. 1. Scheme of fraction of *Ligularia fischeri* ethanol extract.

결과 및 고찰

곰취 에탄올, 메탄올, 물 및 비가열추출물의 세포독성

암 유발 초기단계에서 돌연변이가 매우 중요한 작용을 하고 대부분의 발암물질이 돌연변이원이라는 공통점은 항돌연변이성을 나타내는 물질이 항암활성을 가

질 수 있다는 것을 의미한다. 따라서 본 논문에서는 인간 암세포에 대한 직접적인 효과를 실험하였다. Fig. 2에서와 같이 인간 간암세포인 HepG2에 대한 곰취 추출물들의 억제효과는 1㎕/㎕의 농도에서 에탄올 추출물의 경우 79.2%, 메탄올 추출물의 경우 86.4%, 물 추출물의 경우 87.5% 그리고 비가열 추출물의 경우 57.4%의 억제율을 나타내었다. 한편, Lee(15)는 개미취(*Aster tataricus*) 에탄올 추출물에 대한 세포독성 실험결과 간암세포주의 하나인 Hep3B에서 동일농도 투여로 83%까지 암세포 독성효과를 보였으며 참취(*Aster scaber*)에탄올 추출물에서는 71%의 독성효과를 나타내었다. Fig. 3은 인간 자궁암세포인 Hela에 대한 억제효과로서 1㎍/㎕의 농도에서 네가지 시료 모두 50~56% 정도의 억제활성을 보임으로서 간암세포에서 보다 낮은 활성을 보였다. Fig. 4는 폐암세포인 A549에 대한 곰취 추출물의 억제활성으로서 동일 농도에서 에탄올, 메탄올, 물 그리고 비가열 추출물 순으로 각각 87.6%, 91.4%, 86.4% 및 54.9%의 억제활성을 나타내었다. 동일한 폐암세포에서 다른 연구결과에 따르면 1㎍/㎕의 농도에서 개미취(*Aster tataricus*) 에탄올 추출물에서는 79%까지 암세포 독성효과를 보였으며 참취(*Aster scaber*) 에탄올 추출물은 69.5%의 독성효과를 나타내었다(15). Ham 등(16)의 더위지기 에탄올 추출물에 대한 세포독성실험에서도 A549에 대하여 에탄올 추출물을 50㎍/ml 첨가하였을 때 89%의 강한 암세포 성장 억제 효과를 보였다. 한편 Kim 등(17)은 솔잎 에탄올 추출물들에 대한 폐암세포 독성실험에서도 1㎍/㎕ 첨가시 잣나무 추출물이 85.99%, 적송 추출물 78.45%, 리기다 추출물 77.59%

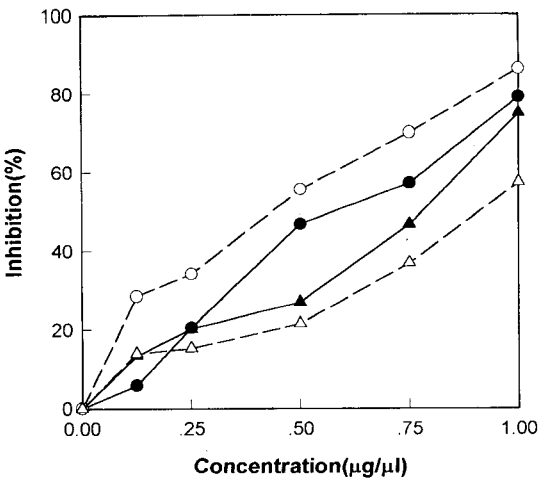

Fig. 2. Inhibitiory effects of *Ligularia fischeri* extracts on HepG2(Human hepatocellular carcinoma cell)
—●— Ethanol, —○— Methanol,
—▲— Water, —△— Non-heating

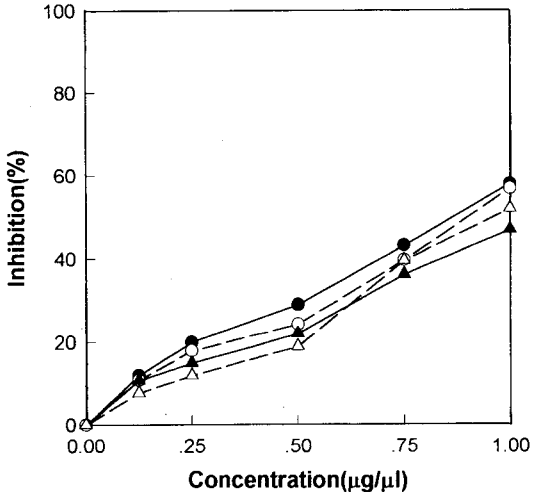

Fig. 3. Inhibitory effects of *Ligularia fischeri* extracts on Hela(Epitheloid carcinoma, cervix, Human).
—●— Ethanol, —○— Methanol,
—▲— Water, —△— Non-heating

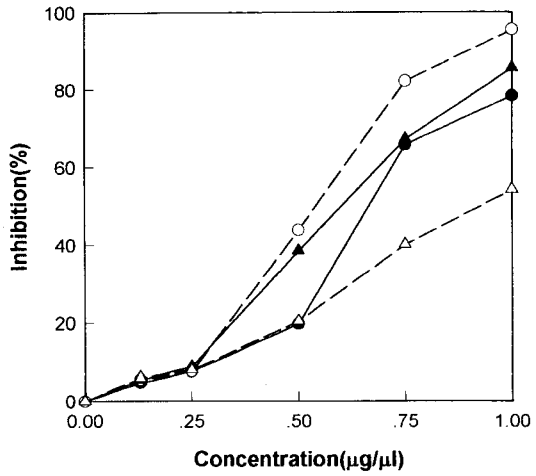

Fig. 4. Inhibition effects of *Ligularia fischeri* extracts on A549(Human lung carcinoma cell).
—●— Ethanol, —○— Methanol,
—▲— Water, —△— Non-heating

그리고 곰솔 추출물이 66.38%의 비교적 높은 세포독성을 나타내었다. 이상에서와 같이 자궁암세포를 제외한 간암세포와 폐암세포에 대하여 곰취 추출물의 비가열 추출물을 제외하고는 비교적 높은 억제활성을 나타내었다. 그러므로 간암세포에 대한 높은 억제활성을 토대로 인간 정상 간세포인 WRL68에 동일한 농도로 첨가한 경우의 세포독성을 Fig. 5에 나타내었다. 그 결과 에탄올 추출물과 물 추출물의 경우 10% 미만의 세포독성을 나타낸 반면 비가열 추출물과 메탄올 추출물의 경우 각각 21~15%의 간세포 생육을 억제하였다.

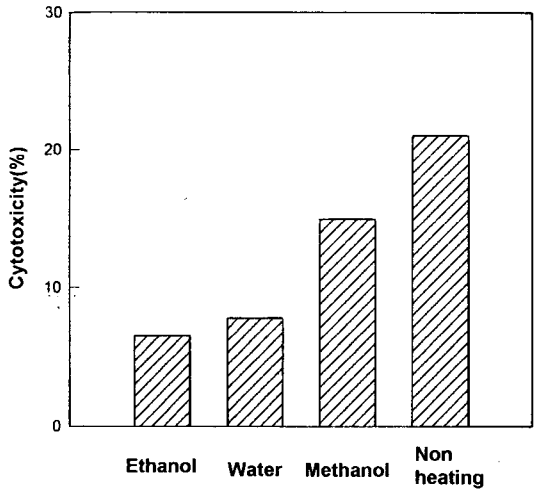

Fig. 5. Cytotoxicity of *Ligularia fischeri* extracts(1g/L) on WRL68(Human normal liver cell).

일반적으로 곰취 에탄올추출물의 경우 다른 용매 추출물보다 가장 낮은 세포 독성을 보이고 또한 암세포에 대한 억제율을 감안하여 에탄올 추출물을 더욱 분획하여 각 용매분획물에 대한 세포독성실험을 실시하였다.

곰취 에탄올추출물로부터 얻은 분획물의 항암효과

곰취 에탄올 추출물로부터 얻은 핵산, 초산에틸 및 물분획물의 항암효과는 조추출한 시료와 동일한 방법으로 암세포에 대하여 실시하였다. Fig. 6은 인간 간암

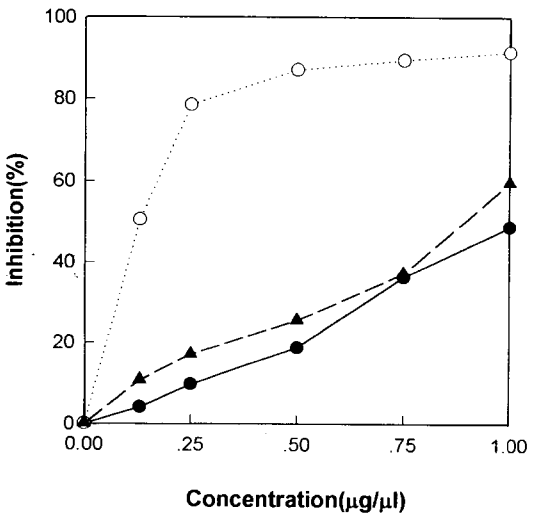

Fig. 6. Inhibition effects of each fraction from the ethanol extracts of *Ligularia fischeri* on HepG2 (Human hepatocellular carcinoma cell).
—●— Hexane Fr., —○— Ethyl acetate Fr.,
—▲— Aqueous Fr.

세포인 HepG2에 대한 억제활성으로서 1μg/μl의 농도에서 핵산분획물의 경우에는 49.5%, 물분획물의 경우 60% 그리고 초산에틸분획물의 경우에는 94%의 높은 억제활성을 나타내었다. Fig. 7는 인간 자궁암세포인 Hela에 대한 억제효과로서 1μg/μl의 농도에서 초산에틸 추출물의 경우 81.1%, 물분획물은 80% 그리고 핵산 추출물은 68.9%의 억제활성을 보였다. 또한 Fig. 8은 폐암세포인 A549에 대한 각 분획물의 억제활성을 나타낸 것으로서 동일 농도에서 초산에틸 추출물이 91.9%,

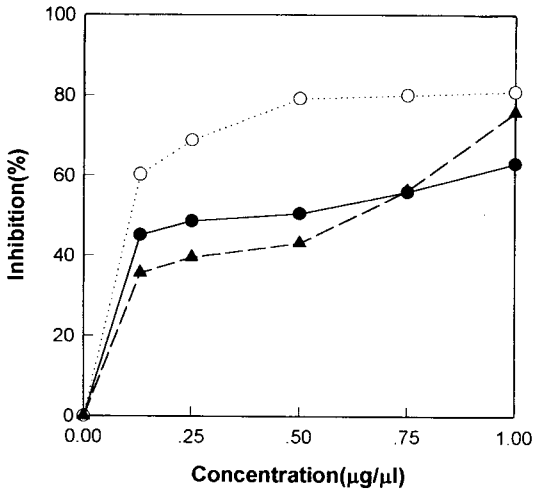

Fig. 7. Inhibition effects of each fraction from the ethanol extracts of *Ligularia fischeri* on Hela(Epitheloid carcinoma, cervix, Human).
—●— Hexane Fr., —○— Ethyl acetate Fr.,
—▲— Aqueous Fr.

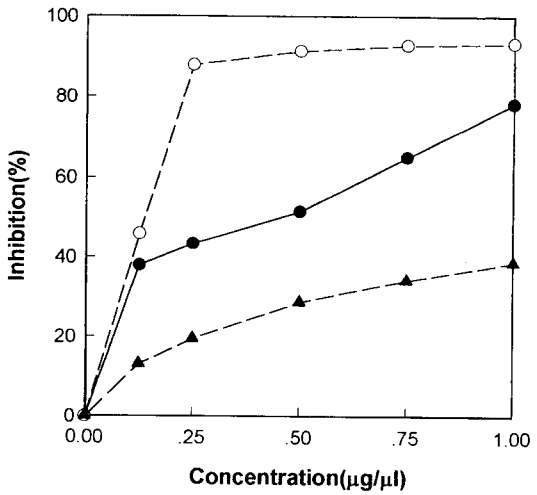

Fig. 8. Inhibition effects of each fraction from the ethanol extracts of *Ligularia fischeri* on A549 (Human lung carcinoma cell).
—●— Hexane Fr., —○— Ethyl acetate Fr.,
—▲— Aqueous Fr.

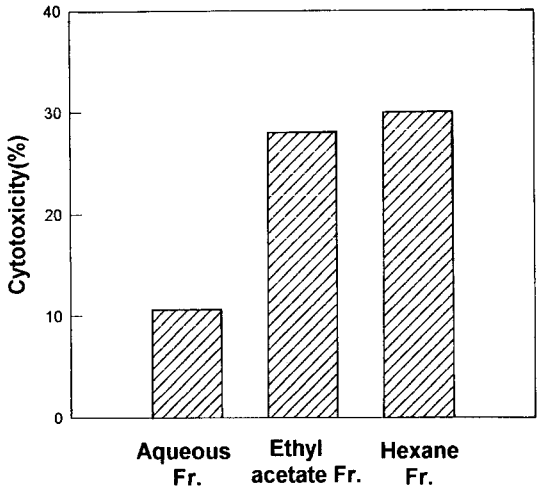

Fig. 9. Cytotoxicity of each fraction from the ethanol extracts(1g/L) of *Ligularia fischeri* on WRL68 (Human normal liver cell).

핵산 추출물이 78.4% 그리고 물 추출물은 38.8%로 나타났다.

위에서 언급한 바와 같이 초산에틸층이 가장 높은 활성을 보이므로서 암세포에 대한 억제활성이 다른 분획물들에 비하여 탁월한 것으로 나타났다. 그리고 Fig. 9은 이러한 암세포들에 대한 높은 활성을 토대로 정상 간세포인 WRL68을 이용하여 그 세포독성을 실험한 결과 1μg/μl의 농도에서 핵산분획물의 경우 30%, 초산에틸 분획물의 경우 28%, 그리고 물 분획물의 경우 10.6%의 세포독성을 나타내었다. 가장 높은 억제활성을 나타내었던 초산에틸 분획물이 30% 미만의 세포독성을 나타냄으로서 높은 억제활성이 세포독성에서 기인한 것이 아님을 알 수 있었다.

요 약

인간암세포를 이용한 항암활성을 측정하기 위하여 Ames test에서 비교적 높은 활성을 나타낸 에탄올과 메탄올 추출물을 1μg/μl의 농도로 HepG2 세포에 첨가한 결과 각각 79.2%와 86.4%의 항암활성을 나타내었고 에탄올 추출물로부터 다시 분획한 용매분획물의 경우에서는 동일 농도에서 초산에틸 분획물이 94%로 가장 높은 억제활성을 나타내었다. 자궁암세포인 HeLa 세포에 대한 에탄올 추출물의 활성은 50~56%의 비교적 낮은 억제활성을 나타내었으나 분획물의 경우 초산에틸 분획물이 91%의 높은 억제활성을 나타내었다. 폐암세포인 A549에 대해서도 역시 91.9%의 높은 세포독성 억제효과를 나타내었다. 대조구로서 정상 간세포인 WRL68에 곰취 추출물을 처리한 결과 높은 억제활성을 보여준 에탄올과 메탄올 추출물들은 비교적 낮은 세포독성 활성을 나타내었다. 분획물의 경우에도 역시 높은 세포독성을 나타내었던 초산에틸 분획물에서도 낮은 세포독성을 나타내었기 때문에 암세포에 대한 높은 억제활성이 세포독성에 기인한 것이 아님을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 교육부 농업과학분야 학술연구조성비에 의해 수행된 연구의 일부이며 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C. G. and Posner, G. H. : An anticarcinogenic protective enzyme from broccoli. *Pro. Natl. Acad. Sci.*, **89**, 2399(1992)
2. Tsuneo, K., Masayuki, K., Katsuhiro, A. and Shuhach, K. : Adsorption of pyrolysate mutagen by vegetable fibers. *Mutation Res.*, **141**, 149(1984)
3. Tsuneo, K., Kazuyoshi, M. and Tadashi, I. : Antimutagenic action of vegetable factors on the mutagenic principle of tryptophane pyrolysate. *Mutation Res.*, **53**, 351(1978)
4. Kim, J. O., Kim, Y. S., Lee, J. H., Kim, M. N., Rhee, S. H., Moon, S. H. and Park, K. Y. : Antimutagenic effect of the major volatile compounds identified from Mugwort. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **21**, 308(1992)
5. Human, B. F. : Designing manipulating foods to promote health. *Inform*, **4**, 344(1993)
6. Ham, S. S., Oh, D. H., Hong, J. K. and Lee, J. H. : Antimutagenic effects of juices from edible Korean wild herbs. *J. Food Sci. Nutr.*, **2**, 155(1997)
7. Ham, S. S., Han, H. S., Choi, K. P. and Oh, D. H. : Inhibitory effects of *Synurus deltoides* extracts on the mutagenesis induced by various mutagens. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **26**, 528(1997)
8. Han, K. S., Ham, S. S., Jeong, E. H. and Lee, H. K. : Antimutagenic effects of the edible mountain herb juices against Trp-P-1 and 2-AF. *Kor. J. Food Hygiene*, **7**, 161(1992)
9. Han, K. S., Cheong, E. H., Ham, S. S., Shin, T. H., Lee, T. S. and Lee, H. K. : Antimutagenicity of small water dropwort juice on the microbial mutagenicity induced by 2-aminofluorene. *Kor. J. Food Hygiene*, **8**, 225(1993)
10. Ham, S. S., Park, G. G., Park, Y. H. and Park, W. B. : Antimutagenic effect of extracts of comfrey. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **21**, 539(1992)
11. Ham, S. S., Choi, K. G., Lee, Y. M., Lee, Y. I., Yoon, J. W., Kim, S. J., Park, Y. H. and Lee, D. S. : Inhibition of hepatocellular carcinoma cell growth by the extract of *Symphytum officinale* L. and the possible mechanisms for this inhibition. *J. Food Sci. Nutr.*, **2**,

236(1997)
12. Ham, S. S., Chung, C. K., Lee, J. H., Choi, K. P., Jung, S. W. and Kim, E. J. : Antimutagenicity and cytotoxicity of *Artemisia iwayomogi* Kitamura extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**, 157(1998)
13. Ham, S. S., Han, H. S., Choi, K. P. and Oh, D. H. : Antigenotoxic effects of *Synurus deltoides* extract on benzo[α]pyrene induced mutagenesis. *J. Food Sci. Nutr.*, **2**, 162(1997)
14. Martin, A. and Martin, C. : Comparision of 5 microplate colorimetric assay for *in vitro* cytotoxicity testing and cell proliferation assats. *Cytotechnology*, **11**, 49(1997)
15. Lee, S. H. : Studies on antimutagenicity and cytotoxicity of edible mountain herbs extracts. *M. S. Thesis*, Kangwon Univ.(1998)
16. Ham, S. S., Chung, C. K., Lee, J. H., Choi, K. P., Jung, S. W. and Kim, E, J. : Antimutagenicity and cytotoxicity of *Artemisia iwayomogi* Kitamura extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**, 158(1998)
17. Kim, E. J., Jung, S. W., Choi, K. P. and Ham, S. S. : Cytotoxic effect of the pine needle extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **30**, 213(1998)

(1998년 5월 18일 접수)