

한국산 생약으로 부터 항암물질의 개발 (제7보). 소엽의 Chloroform 가용성 분획이 인체 구강유상피암종세포에 미치는 세포독성작용

한두석 · 김영일 · 최규은¹ · 광정숙² · 백승화^{1*}

원광대학교 치과대학 구강해부학교실, ¹자연과학대학 화학과, ²목포전문대학 치위생과
(1997. 12. 14 접수)

Development of Anticancer Agents from Korean Medicinal Plants. Part 7. Cytotoxic Activity of the Chloroform Soluble Fraction of *Perilla frutescens* Against Human Oral Epitheloid Carcinoma Cells.

Du Seok Han, Young Il Kim, Kyw Eun Choi¹, Jung Suk Kwag² 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

²Department of Dental Hygenic, Mokpo Junior College, Mokpo 530-730, Korea.

ABSTRACT : In the present study, we have evaluated cytotoxic effects of the chloroform soluble fraction of the methanolic extract of *Perilla frutescens* in human oral epitheloid carcinoma cells. The light microscopic study showed morphological changes of the treated cells. Cell membrane damaging activity was measured by the lactate dehydrogenase (LDH) assay and disruptions in cell organelles were determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), neutral red (NR) and sulforhodamine protein B (SRB) of colorimetric assay. These results suggest that *Perilla frutescens* retains a potential antitumor activity.

Key words : *Perilla frutescens*, MTT assay, NR assay, SRB assay, LDH assay, Antitumor activity.

서 론

최근에 차조기가 다수 자생하고 있는 일본에서 차조기의 잎(蘇葉), 종자(蘇子) 및 줄기에서 얻어진 물질들로 부터 항암활성 성분을 찾는데 많은 연구가 이루어지고 있다. Narisawa 등(1994)은 차조기에서 추출한 차조기유(perilla oil)를 암컷 F344 흰쥐에 적용하여 결장암(colon cancer)의 발병률을 조사하였는데, Omega-3 PUFA alpha-linolenic acid가 다량 함유된 차조기유를 흰쥐에 먹이면 32%의 결장암 발병률을 나타내지만 차조기유를 먹이지 않으면 67%의 발병률을 나타냄으로 총 식이지방(total dietary fat)의 25%정도인 비교적 소량의 차조기유는 결장암의 발병률을 효과적으로 억제할 수 있다고 보고하였고,

Nakayama 등(1993)도 alpha-linolenic acid가 풍부한 차조기유는 암발생(tumor development)을 억제한다고 보고하였으며, Okuyama(1992)는 차조기유가 암발생을 억제할 뿐만 아니라 알러지성 과민반응, thrombotic tendency, 졸증, 고혈압 및 노화에도 유익한 것으로 보고하였다. Shell(1973)의 보고에 의하면 세포에 영향을 미치는 물질들은 1차적으로 세포막을 손상시키는 것으로 보고하였고, Narisawa 등(1991)에 의하여 혈청, 결장점막지방산의 구성 및 혈장내 prostaglandin E2수치는 식이성지방의 지방산 구성에 직접 영향을 미칠 수 있고, 식이성 차조기유의 암발생억제효과는 결장상피세포막의 인지질(membrane phospholipid)내의 지방산의 구성성분에 변화를 일으키므로서 결장점막의 감수성을 감소시키는 결과라고 하였

*To whom comerspondence should be addressed.

으며, Imaoka 등 (1994)은 소엽 추출물을 생쥐의 복강내에 주사하면 Anti-DNP IgE항체 생산을 현저히 억제한다고 보고하고 있어 소엽 추출물은 IgE항체의 생산을 돕는 것으로 알려져 있다. 국내에서도 차조기와 유사한 식물인 들깨 잎에서 페놀산인 caffeic acid 와 chlorogenic acid를 성분으로 분석하였으며(김태희, 1971), caffeic acid esters는 흰쥐의 결장암의 발병을 효과적으로 억제한다고 보고하였다.

한 등은 소엽추출물의 세포독성과 피부암세포(skin melanoma cell)에 대한 항암활성의 조사에서 소엽의 메탄올 추출물이 세포독성은 약하고 항암활성은 강하다고 보고 하였으며(한두석, 1994), 소엽의 메탄올 분획을 피부암세포에 적용하여 항암활성을 조사한 결과, 클로로포름 분획에서 유의한 항암효과가 나타났다고 보고한(한두석, 1994)바 있고. 소엽의 메탄올 추출물을 인체 구강유상피암종세포에 적용하여 항암활성을 조사한 결과, 물분획과 부탄올분획에서 유의한 항암효과가 나타났다고 보고하였다(박정희, 1996). 이에 본 연구는 소엽의 클로로포름분획에서 분리한 5종류의 분획을 인체 구강유상피암종세포에 적용, 항암활성을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 소엽은 1994년 충남 논산시 광석면에서 구입하여 외부형태를 비교 조사하여 확인 후 사용하였다. 실험에 사용된 식물체는 원광대학교 자연과학대학 천연물화학 교실에 보관되어 있다.

검액조제

1994년 충남 논산시 광석면에서 구입하여 그늘에서 말린 소엽을 정선하고 조말하여 약 500 g을 평량한 후 수용상에서 MeOH을 3배량 가하여 3시간씩 환류하여 추출한 다음, 이 추출액을 여과지로 여과하고 여액을 감압농축하여 흑말 메탄올 추출액 57.93 g(11.6%)을 얻었다. 이것을 물에 현탁한 후, n-hexane으로 수회 반복 추출하고 추출액을 무수망초로 탈수시키고 추출액을 여과한 후 감압농축시켜서 n-hexane추출물 15.19 g을 얻었다. 계속하여 chloroform, ethyl acetate, n-butanol로 순차적으로 추출하고 위의 방법에 따라 용매를 감압농축하여 chloroform추출물 7.84 g, ethyl acetate추출물 3.56 g, n-butanol추출물 4.57 g과 잔류하는 물추출물 14.67 g을 얻었다.

시약

세포배양에 사용한 RPMI-1640, fetal bovine serum, penicillin G, streptomycin, fungizone시약은 Gibco제 GR급이었으며, LDH정량, MTT정량, NR정량 및 SRB정량에 사용한 시약

은 Sigma사에서 구입하였다. 증류수는 3차 증류하여 사용하였다.

실험기기

세포의 배양은 CO₂ incubator(Shellab Co., USA)를 사용하였고, 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기를 사용하였으며, 현미경은 도립현미경(Inverted Microscope, Olympus)을 사용하였다. LDH정량, MTT정량, NR정량 및 SRB정량은 ELISA reader(Spectra Max 250, U.S.A)를 사용하였다.

실험방법

시료의 처리

조제한 시료는 즉시 4°C냉장고에 저장하였다가 사용직전에 배지로 희석하여 10⁻⁴ mg/ml농도를 실험에 사용하였다.

세포배양

소엽의 메탄올 추출물에 대한 클로로포름 소분획의 항암작용을 측정하기 위하여 서울대학교 암연구소에서 분양 받은 인체 구강유상피암종세포(ATCC No, OCL17)를 사용하였다. 인체 구강유상피암종세포는 RPMI-1640(Gibco, U.S.A)에 10% fetal bovine serum(Gibco, U.S.A)과 penicillin G(25 unit/ml), streptomycin(25 µg/ml)를 첨가하여 사용하였다. 각 세포의 배양은 온도 37°C, 습도 95%, 탄산가스 농도 5%의 배양기(CO₂ incubator, Shellab, U.S.A)를 사용하였다. 실험을 위하여 일차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin으로 처리하여, Turk형 혈구계산기를 이용하여 세포수가 2×10⁴ cell/ml가 되도록 세포 부유액을 만들었다.

LDH정량 분석법

세포를 각각의 클로로포름 소분획이 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 배양액으로 유출된 LDH의 활성측정은 변형된 Takahshi등의 방법(1987)에 따랐다. 즉 LDH측정 Kit (Atron lab., Japan)의 효소기질액 1.0 ml을 직경 10 mm인 tube(Palcon)에 넣은 후, 여기에 검체인 배양액을 넣어 잘 혼합하여 37°C에서 10분 동안 반응시켰다. 10분 후에 희석반응 정지액을 3.0 ml씩 넣어 잘 혼합한 후, 570 nm에서 측정하여 대조군과 비교하였다. 이때 효소활성은 reduced nicotinamide adenine dinucleotide(NADH)의 산화량으로 표시하였다.

MTT정량 분석법

Mosmann의 방법(1983)에 의하여, 세포를 소엽의 메탄올 추출물에 대한 클로로포름 소분획이 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 분석 당일 조제한 MTT(Sigma) 50 µg/ml가 포함된 배양액을 well당 1 ml씩 넣어 3시간 배양하였다. 배양후 배양액을 버리고, dimethylsulfoxide(DMSO)를 2 ml/well씩 넣어 5분간 실온방치하여 MTT formazan을 용해한 후, ELISA reader로 MTT의 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

NR정량 분석법

Borenfreund와 Puerner의 방법(1984)에 의하여 세포를 배양 용기당 2.0×10^4 cell/ml이 되도록 24 well multidish 에 분주하여 24시간 배양 후, 소엽의 메탄올 추출물에 대한 클로로포름 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% formaldehyde-1% CaCl₂를 넣어 실온에 방치하여 3시간동안 용해소체내에 축적된 NR을 용출하였다. 용출된 NR의 흡광도를 ELISA reader(550 nm)로 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

SRB정량 분석법

Skehan et al.의 방법(1990)에 따라 세포를 소엽의 메탄올추출물에 대한 클로로포름 소분획이 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 배양액을 버리고 5회 세척한 후 0.4% sulforhodamine B protein(SRB)를 200 µl씩 첨가하여 1시간 동안 실온에 방치한 다음 1% acetic acid로 5회 세척하고 완전히 건조하였다. 10 mM Tris base로 결합된 protein stain을 녹인 후 ELISA reader 측정하여 대조군과 비교하였다.

세포의 광학현미경적 관찰

광학현미경으로 세포를 관찰하기 위하여 인체 구강유상피암세포는 LDH정량, MTT정량, NR정량 및 SRB정량을 하기 전에 도립현미경(Inverted microscope, Olympus)으로 관찰하고 사진을 촬영하였다.

통계처리

실험결과와 통계처리는 Student's t-test에 준하였고, P-value가 0.05이하일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

인체에 사용할 때 독성에 의한 부작용이 적고, 항암작용이 강한 항암제를 한국산 생약으로부터 개발하기 위한 일환으로 한 등 (한두석, 1994)은 소엽을 물과 유기용매로 추출하여 얻은 추출물로 세포독성실험과 마우스의 피부암에 대한 소엽 추출물의 항암효과를 분석한 결과, 용매에 의한 추출물 실험에서 독성이 적고, 항암작용이 강했던 메탄올 추출물과 독성이 강하고 항암작용도 강했던 에테르 추출물에 대하여 보고한 바 있다. 한 등 (한두석, 1994)은 소엽의 메탄올과 에테르 추출물을 계통분획하여 분획한 5종의 분획을 인체피부암세포에 미치는 항암효과를 측정하기 위하여 세포수의 산정, MTT정량, LDH활성 및 세포형태를 관찰한 결과 클로로포름 분획에서 유의한 항암효과를 보고한 바 있다. 이와 같은 결과에 따라 소

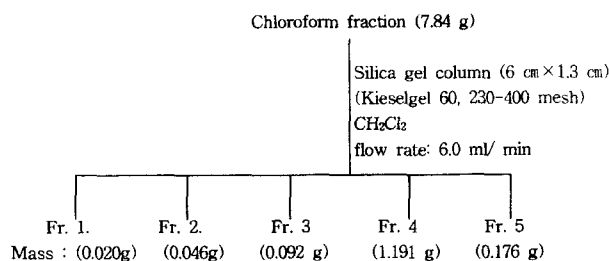


Fig. 1. Fractionation of the chloroform soluble fraction of *Perilla frutescens*.

엽 메탄올 추출물을 계통분획하였으며, 계통분획방법은 소엽 (500 g)을 메탄올로 추출하여 추출물 57.93 g(11.6%)을 얻었다. 소엽 메탄올 추출물을 물과 유기용매 가용부로 분획하여 각각 분획량을 얻었다. 여기서 헥산과 물분획물의 수율이 많은 것으로 보아 극성이 적은 헥산과 극성이 큰 물에 많이 이행됨을 알 수 있다.

소엽의 메탄올 추출물의 클로로포름 분획에서 인체 구강유상피암세포에 항암활성이 있어 클로로포름 분획을 silica gel을 사용하여 Flash chromatography 법으로 CH₂Cl₂를 이동상으로 사용하여 5개의 Fraction을 얻었다(그림 1, 표 1).

Chloroform층에서 얻은 추출물을 silica gel을 사용하는 column (6 cm x 1.3 m)을 사용하여 5개의 fraction을 얻었으며, 이동상은 CH₂Cl₂를 사용하였고 각각의 fraction은 short and long wavelength와 Iodine chamber에서 TLC spots의 수로 fraction을 나누었다. TLC plates는 Kieselgel 60 F254, Schichtdicke 0.2 mm(Merck 5554)를 사용하였다. Fr. 1은 노란색의 색조를 띠었고 Fraction 3은 oil같이 흐르는 추출물로 TLC 상에서 강한 spots을 나타내었다. 분획한 Fr. 1-5를 사용하여 인체 구강유상피암세포에 대한 MTT정량과 SRB정량분석법을 실시하였다.

항암활성측정

Table 1. Flash chromatography of chloroform soluble compounds of the methanolic extract of leaves of *Perilla frutescens*^a

Fraction	Tube No.	Yield (g)	Number of spots in TLC ^c
1	1- 6	0.020	2
2	7-15	0.046	3
3	16-30	0.092	4
4	31-60	1.191	3
5	61-80	0.176	6

^aAll fractions were treated at 10⁻⁴ mg/ml concentration

^bMobile phase: CH₂Cl₂

Table 2. The LDH absorbance of each fraction of *Perilla frutescens* on human oral epitheloid carcinoma cells^a

Group	LDH quantity	
	Mean ± S.D. ^b	% of control
Control	168.0 ± 6.7	100.0
Fr. 1	220.0 ± 42.4	130.9
Fr. 2	198.0 ± 33.3	117.8
Fr. 3	201.0 ± 48.2	119.6
Fr. 4	333.5 ± 89.6**	198.5
Fr. 5	283.8 ± 72.5**	168.9

^aAll fractions were tested at 10⁻⁴ mg/ml concentration.

^bThe values represent the Mean ± S.D. of triplicate. Significantly different from the control: **P<0.01.

세포독성이 거의 없는 것으로 밝혀진 소엽의 메탄올 추출물 중 인체 피부암세포에 항암활성이 있는 것으로 보고된 클로로포름 분획에서 다시 5종의 분획을 제조하였다. 각 분획을 10⁻⁴ mg/ml 농도로 조절하여 인체 구강유상피암종세포에 적용하여 항암활성 측정에 주로 사용하고 있는 검색법(Screening test)인 LDH정량, MTT정량, NR정량 및 SRB정량을 실시한 결과는

Table 3. The MTT absorbance of each fraction of *Perilla frutescens* on human oral epitheloid carcinoma cells^a

Group	MTT quantity	
	Mean ± S.D. ^b	% of control
Control	3.54 ± 0.47	100.0
Fr. 1	3.77 ± 0.28	106.4
Fr. 2	3.54 ± 0.50	99.8
Fr. 3	3.20 ± 0.32	90.4
Fr. 4	1.85 ± 0.11**	52.2
Fr. 5	2.16 ± 0.35**	61.0

^aAll fractions were tested at 10⁻⁴ mg/ml concentration.

^bThe values represent the Mean ± S.D. of triplicate. Significantly different from the control, **P<0.01.

Table 4. The NR uptake ability of each fraction of *Perilla frutescens* on human oral epitheloid carcinoma cells^a

Group	NR quantity	
	Mean ± S.D. ^b	% of control
Control	2.48 ± 0.08	100.0
Fr. 1	2.38 ± 0.13	96.3
Fr. 2	2.41 ± 0.17	97.2
Fr. 3	2.39 ± 0.11	76.4
Fr. 4	1.85 ± 0.11**	76.6
Fr. 5	1.99 ± 0.15*	80.5

^aAll fractions were tested at 10⁻⁴ mg/ml concentration

^bThe values represent the Mean ± S.D. of triplicate.

Significantly different from the control group, *P<0.05, **P<0.01

Table 5. The SRB absorbance of each *Perilla frutescens* on human oral epitheloid carcinoma cells^a

Group	SRB quantity	
	Mean ± S.D. ^b	% of control
Control	3.09 ± 0.01	100.0
Fr. 1	3.05 ± 0.10*	98.8
Fr. 2	3.02 ± 0.03*	97.7
Fr. 3	3.06 ± 0.02	99.1
Fr. 4	2.96 ± 0.01***	95.9
Fr. 5	2.93 ± 0.03***	94.9

^aAll fractions were tested at 10⁻⁴ mg/ml concentration.

^bThe values represent the Mean ± S.D. of triplicate. Significantly different from the control: *P<0.05, ***P<0.001.

Table 2, 3, 4, 5과 같다.

Table 2에서 보는 바와같이, 소엽의 클로로포름 분획중 Fr. 4와 Fr. 5의 분획에서 LDH량이 유의하게 증가하여 인체 구강유상피암종세포의 세포막을 심하게 손상시킴을 알 수 있었으나, Fr. 1, Fr. 2와 Fr. 3은 LDH량에서 약간 증가만을 나타내었다.

Table 3에서 보는 바와같이, MTT정량에서도 LDH정량 분석법에서와 같이, Fr. 4와 Fr. 5 분획에서 MTT량이 약 52~61% 유의하게 감소하여, 인체 구강유상피암종세포내 사립체(mitochondria)의 활성에 영향을 미치는 것을 알 수 있었으나, Fr. 1, Fr. 2와 Fr. 3의 MTT량은 유의하게 감소하지 않았다. 따라서 Fr. 4에서 인체 구강 유상피암종세포에 대한 항암활성이 가장 낮게 나타난 것으로 보아 인체 구강 유상피암종세포에 유의한 항암물질이 포함되어 있으리라 사료된다.

Table 4에서 보는 바와같이, NR정량에서도 LDH정량과 MTT정량 분석법에서와 같이, Fr. 4와 Fr. 5분획에서 NR량이 약 77~81% 유의하게 감소하여 인체 구강유상피암종세포의 용해소체(lysosome)의 활성을 현저히 저해한다는 것을 알 수 있었으나, Fr. 1, Fr. 2와 Fr. 3의 NR량은 유의하게 감소하지 않았다.

Table 5에서 보는 바와같이, SRB정량에서도 Fr. 1분획과 Fr. 2분획에서 SRB량이 유의(P<0.05)하게 감소하였으나, SRB정량에서도 LDH정량, NR정량과 MTT정량 분석법에서와 같이, Fr. 4와 Fr. 5분획에서는 MTT량이 감소하여 유의성(P<0.001)이 있었는데, 이는 인체 구강유상피암종세포에서 단백질합성이 억제됨을 의미하며, Fr. 3분획은 SRB량이 유의하게 감소하지 않았다.

세포의 광학현미경적 관찰

대조군에 있어서는 배양 후 24시간째부터 well 바닥에 단층(monolayer)을 이룬 다양한 형태의 세포들이 부착되어 있었으며(Fig. 2), Fr. 1분획과 Fr. 2분획에서는 세포의 형태는 대조군

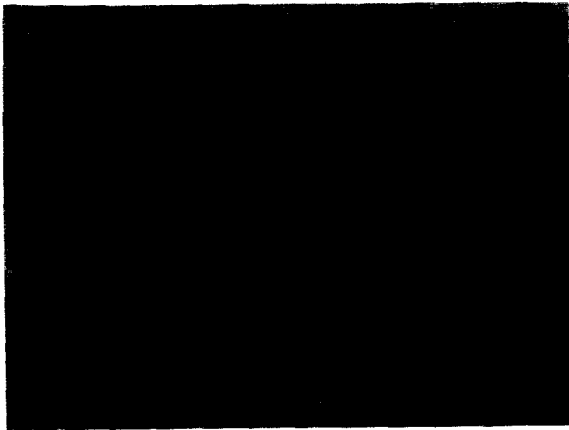


Fig. 2. Inverted photomicrograph of human oral epitheloid carcinoma cells after incubation in unmodified medium (control) for 3 days $\times 200$. Most cells had abundant cytoplasm and formed round shape.

과 유사하였으나 세포수의 감소를 나타냈다. Fr. 4와 Fr. 5분획 (Fig. 2와 3)에서는 세포의 형태가 원형으로 변하였고 세포들이 세포괴를 형성하였으며, 세포수도 현저히 감소하였다. Fr. 3분획은 대조군의 세포와 거의 유사하였다.

한 등 (한두석, 1996)은 소엽에서 분리한 추출액이 NIH 3T3 섬유모세포와 생쥐의 피부암세포에 미치는 세포독성과 항암작용에 대하여 보고하였다. 5종의 소엽 추출액을 NIH 3T3 섬유모세포와 생쥐피부암세포에 적용하여 생존세포율과 MTT 정량을 실시한 결과 메탄올 추출액은 세포독성이 약하고 항암작용이 강한 것으로 보고하였고, 한 등 (한두석, 1994)은 세포독성이 적고 항암작용이 강한 메탄올 추출액과 세포독성이 강

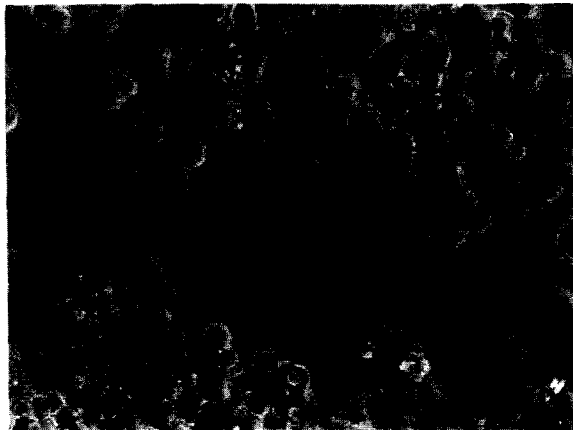


Fig. 3. Inverted photomicrograph of human oral epitheloid carcinoma cells after incubation in the medium containing 10^{-4} mg/ml concentration of chloroform 4 fraction for 3 days $\times 200$. Most cells were shown degenerative and formed cell cluster.

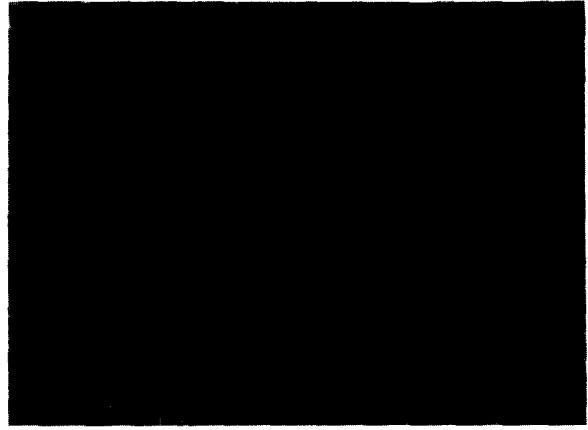


Fig. 4. Inverted photomicrograph of human oral epitheloid carcinoma cells after incubation in the medium containing 10^{-4} mg/ml concentration of chloroform 5 fraction for 3 days $\times 200$. Most cells were shown degenerative and formed cell cluster.

하고 항암작용도 강한 메탄올 추출액에서 각각 5종류의 용매 분획을 조제하여 인체 피부암세포에 적용하여 세포수 생존율, MTT정량 및 LDH정량을 실시한 결과 클로로포름 분획에서 항암활성이 유의하게 나타난 것으로 보고하였다. 박 (박정희, 1996)은 메탄올 추출액에서 분리한 5종의 용매 분획을 인체 구강유상피암종세포에 적용하여 MTT정량, NR정량 및 SRB정량을 실시한 결과 부탄올 분획과 물분획에서 항암활성이 유의하게 나타나고 클로로포름 분획에서는 항암활성이 없는 것으로 보고하였으나 한 등 (한두석, 1994)의 보고와 일치하지 않는 기전에 대하여는 암세포가 다른 이유 이외에는 그 기전을 규명하지 못하고 있다.

본 실험에서는 일차적으로 인체피부암세포에 항암활성이 유의하게 나타났던 클로로포름 분획에서 미지의 성분이 함유되어 있는 5종의 분획을 조제한 후 인체 구강유상피암종세포에 적용하여 세포소기관 활성을 측정하였다. Shell(1973)의 보고에 의하면 세포에 영향을 미치는 물질 등은 1차적으로 세포막을 손상시킨다고 보고하였고, 식이성 차조기유의 암발생억제 효과는 결장상피세포막의 인지질(membrane phospholipid) 내의 지방산의 구성성분에 변화를 일으키므로서 결장점막의 감수성을 감소시키는 결과라고 보고(Narisawa, 1991)하였는데 본 실험의 분획 Fr. 4와 Fr. 5도 인체 구강유상피암종세포의 세포막에 심한 손상을 가하므로서 LDH량이 유의하게 증가시켰을 것으로 생각되며 한 등 (한두석, 1994), 박 (박인성, 1996)의 보고에서도 LDH량이 증가하였다. MTT정량, NR정량 및 SRB정량은 세포내 소기관의 활성을 측정하여 각종 화학물질의 세포독성을 일차적으로 검정하는데 이용되는 방법으로 분광광도계를 이용하여 정량적으로 세포독성을 비교할 수 있는

편리한 방법이다. 어떤 물질에 독성이 있으면 세포내 소기관
의 활성은 떨어지게 되고 세포내 소기관에 함유되어 있는 각
종 효소의 양은 감소하게 된다. 소엽의 클로로포름 분획에서
분리한 5종의 분획중 분획 Fr. 4와 Fr. 5은 MTT량, NR량 및
SRB량을 유의하게 감소시켰으므로 인체 구강유상피암종세포
의 활성을 저해하는 물질이 함유되어 있는 것으로 생각된다.

세포의 형태학적 관찰에서도 분획 Fr. 4와 Fr. 5은 대조군에
비하여 세포수의 감소와 세포의 형태변화 및 세포의 응집과사
가 관찰되어 인체 구강유상피암종세포는 이들 분획내에 함유
되어 있는 물질에 의하여 영향을 받아 퇴행성 변화가 일어나
는 것으로 판단되며 카드뮴과 같은 독성물질에 의하여 일어나
는 변화와 일치하였다(박인성 등, 1995, 한두석 등, 1994).

앞으로 메탄올 추출액에서 분리한 부탄올분획과 물분획에
서도 분획을 조제하여 유사한 실험을 계속할 것이며 이들 분
획중 항암활성이 있는 분획을 찾아내어 분획내에 들어 있는
항암물질을 개발할 계획이다.

결 론

독성에 의한 부작용이 적고 항암활성이 강한 화학물질을 개
발하기 위하여 소엽의 메탄올추출물에서 분리한 클로로포름
분획을 다시 분획하여 5종의 미지의 소분획을 조제하였다. 각
종 분획은 인체 구강유상피암종세포에 적용한 후 LDH정량,
MTT정량, NR정량 및 SRB정량분석법으로 분석하고 세포의
활성을 측정하였으며, 도립현미경에 의한 광학현미경적 관찰
을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 5종의 클로로포름분획 중 소분획 Fr. 4와 Fr. 5은 LDH량
을 유의하게 증가시켰다.
2. MTT정량과 NR정량 분석에서도 소분획 Fr. 4와 Fr. 5은
MTT량과 NR량을 유의하게 감소시켰다.
3. SRB정량 분석에서는 소분획 Fr. 1과 Fr. 2에서 SRB량을
유의($P < 0.05$)하게 감소시켰으나 소분획 Fr. 4와 Fr. 5에서는
SRB량을 보다 유의($P < 0.001$)하게 감소시켰다.
4. 소분획 Fr. 4와 Fr. 5을 처리한 군에서는 세포의 수를 감
소하고, 형태가 원형으로 변화하였으며, 세포들의 응집이 관찰
되었다.

감사의 글

이 논문은 원광대학교 교비의 일부지원에 의해서 연구되었
으며, 이에 감사한다.

참고문헌

- Borenfreund, E and Puerner, J. A., (1984): A simple quan-
titative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity
assays (HTD/Nr-90). *Tissue Culture Meth.*, **9**, 7-9.
- Imaoka K., Ushijima H., Inouye S., Takahashi T., Kojima Y.,
(1984): Effects of *Celosia argentea* and *Cucurbita mos-
chata* extracts on anti-DNP IgE antibody production in
mice. *Alerugi-Japanese Journal of Allergology*, **43**, 652-
659.
- Mosmann, T., (1984): Rapid colorimetric assays for cellular
growth and survival; application of proliferation and
citotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63.
- Narisawa T., Fukaura Y., Yazawa K., Iahikawa C., Isoda Y.,
Nishizawa Y., (1994): Colon cancer prevention with a
small amount of dietary oil high in alpha-linolenic acid in
an animal model. *Cancer*, **73**, 2069-2075.
- Nakayama M., Ju J. R., Sugano M., Hirose N., Ueki T., Doi
F., Eynard A. R., (1993): Effect of dietary fat and cho-
lesterol on dimethylbenz (a) -anthracene-induced mam-
mary tumorigenesis in Sprague-Dawley rats, *Anticancer
Res.*, **13**, 691-698.
- Narisawa T., Takahashi M., Koranage H., Yamazaki Y., Koy-
ama H., Fukaura Y., Nishizawa Y., Kotsygal M., Isoda Y.,
(1991): Inhibitory effect of dietary perilla oil rich in the n-
3 polyunsaturated fatty acid alpha-linolenic acid on colon
carcinogenesis in rats, *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 1089-1096.
- Okuyama H., (1991): Minimum requirements of n-3 and n-6
essential fatty acids for the function of the central nervous
system and for the prevention of chronic disease, *Proc.
Soc. Exp. Biol. Med.* **200**, 174-176.
- Shell, W. E., (1973): Early estimation of myocardial
infarction. *Clin. Invest.*, **52**, 2579-2584.
- 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. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**,
1107-1112.
- Takahashi K., Fujita Y., Mayumi T., Hama, T. and Kishi, T.,
(1990): Effect of adriamycin cultured mouse embryo myo-
cardial cells. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 326-334.
- 박인성, 유현경, 김영옥, 곽정숙, 백승화, 한두석, (1995): 한
국산 생약으로부터 해독물질의 개발 (제7보), 금은화 메
탄올 분획의 카드뮴세포독성에 대한 해독 효과. *대한구
강해부학회지*, **19**, 167-177.
- 한두석, 백승화, 곽정숙, (1996): 카드뮴 (Cd)으로 처리한 흰
쥐 섬유모세포와 신경 아교세포에서 chlorogenic acid의
수복효과. *대한구강해부학회지*, **20**, 79-89.
- 한두석, 백승화, (1996): 카드뮴 (Cd)의 세포독성에 대한
tannic acid의 해독효과. *대한구강해부학회지*, **20**, 65-77.