

Clonogenic Assay를 이용한 *Aloe arborescens*와 *Aloe vera* 용매 추출물의 종양세포 억제효과의 비교

홍희선¹, 이경호, 김정환, 강희곤², 조좌형³, 김창한*

건국대학교 동물자원연구센터, ¹카톨릭대학교 의과대학 의과학연구원,

²서울시 보건환경연구원, ³국립의산대학 식품공업과

The Comparative of Inhibitory Effect of Various Solvent Extracts from *Aloe arborescens* and *Aloe vera* on Tumor Cell Lines Using Clonogenic Assay

Hee-Sun Hong¹, Keyong-Ho Lee, Jeong-Hwan Kim, Hee-Gon Kang²,
Choa-Hyoung Cho³ and Chang-Han Kim*

Animal Resources Research Center, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea;

¹*The Clinical Research Institute of Catholic Medical Center, Seoul 150-713, Korea;*

²*Seoul Public Health and Environment Research Institute, Seoul 138-701, Korea;*

³*Department of Food Engineering, Iksan National College, Iksan 570-752, Korea*

Abstract - The solvent extracts from *Aloe arborescens* and *Aloe vera* were randomly screened for inhibitory effects on the growth of tumor cell lines. In case of *Aloe vera* extracts, butyl alcohol extract and ethyl alcohol extract showed antitumor activity at 100 µg/ml on lung cell lines(A427, Sk-mes-1, Calu-3 and 3LL). In *Aloe arborescens* extracts, butyl alcohol extract and ethyl alcohol extract exerted high activity at 100 µg/ml on breast cell line(Hs-578T) and lung cell line(Sk-mes-1), respectively. The solvent extracts from *Aloe vera* exerted antitumor activity broadly on various tumor cell lines. In contract, the solvent extracts from *Aloe arborescens* exerted specific antitumorcity on a few tumor cell lines.

Key words - *Aloe arborescens*; *Aloe vera*; clonogenic assay; solvent extract.

Aloe는 약 200여종이 있으며, 이 중 몇 종류는 민간요법을 통해 약리 효능을 인정받아 왔으며, 실질적으로 많은 연구를 통해 그 효과가 입증되고 있다. 1960년대 이후로 aloe의 약리효능을 나타내는 물질을 상업적으로 개발하는 것에 대한 보고를 계기로 화학적 성분 검사, 약리작용 및 의약자원으로서의 이용법에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다¹⁾.

Aloe의 약리작용은 *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 정균작용으로 백선증에 대한 치료효과²⁾ 및 *Mycobacterium tuberculosis*에 대한 aloeresin의 가

수분해 물질 중의 하나인 *p-coumaric acid*가 정균효과를 나타낸다.³⁾ 또한, aloe 성분중에는 화상과 절상에서의 염증유발원인 bradykinin을 분해하는 효소가 포함되어 있으며⁴⁾, 이러한 성분은 유종, 창상, 열창상에 대한 치료효과를 나타내며^{5,6)}, 위액분비에 관계가 있는 histamine 탈탄산 효소와 방향성 아미노산 탈탄산 효소의 활성을 저해하는 물질을 포함하고 있는 것으로 연구결과가 보고되었다.⁷⁾

면역학적 측면으로의 aloe는 혈청 단백질의 반응에 보조 물질로 작용하며^{8,9)} 숙주세포의 면역작용에 보체로 작용하여 제압효과를 나타내며¹⁰⁾, Soeda 등

*교신저자 : Fax 02-3436-0266

는 aloe로부터 분리, 정제해 낸 aloemycin이 *in vivo* 실험에서 Ehrlich carcinoma와 sarcoma 180에 대해 항암활성을 나타냈음을 보고하였다.^{11~14)}

따라서 본 연구에서는 *Aloe vera*와 *Aloe arborescens*의 동결 건조 분말을 여러 가지 용매를 이용하여 추출하였으며, aloe 용매추출물들이 직접적으로 종양세포의 증식 억제 효능이 있는가를 지금까지는 보고된 바 없는 인체 각 부위별 여러 종양세포주와 동물세포주에 대하여 *in vivo*에서의 항종양 효과와의 상관관계가 매우 높은 clonogenic assay¹⁵⁾을 이용하여 검토하였다.

실험방법

재료 - 본 실험에 사용한 알로에는 김정문 알로에(주)과학기술연구소로부터 공급받은 *Aloe vera*와 *Aloe arborescens* 잎의 동결건조 분말을 4°C로 보관하면서 사용하였다. *Aloe vera*와 *Aloe arborescens*의 순수동결건조분말의 제조과정은 생잎을 수확 후 물로 세척하여 이물질을 제거한다. 제거 후 박피를 하여 젤을 초과기를 이용하여 입자크기 0.5~1.0 cm의 이하로 분쇄하여 채반을 이용하여 걸렀다. 채반을 통한 분쇄된 젤을 수분함량 5%이하가 되도록 동결건조하여 곱게 분쇄하였다. 위와 같은 제조과정을 거친 순수동결건조분말(1g/kg gel of fresh leaves)을 냉장보관하면서 실험에 사용하였다.

종양세포주 - 본 실험에 사용한 종양세포는 Raji(human lymphoma), A427, Calu-3, Sk-mes-1, Sklu-1(human lung carcinoma), SF-188(human brain carcinoma), WiDr(human colon carcinoma), Caki-2(human kidney carcinoma), HEp-2(human larnyx carcinoma), SNU-1(human stomach carcinoma), Hs-578T(human breast carcinoma), HEC-1B(human endometrial adenocarcinoma), HEp-G2(human hepatocellular carcinoma), KB(human oral epidermoid carcinoma) 및 Farrow(human melanoma)와 같은 인간의 종양세포 15주와 S180(mouse sarcoma), 3LL(lewis lung carcinoma) 및 P388(mouse leukemia)와 같은 동물의 종양세포 3주를 사용하였다.

종양세포의 배양 - 각 종양세포의 배양에 이용된 배지로는 Raji, SNU-1, Farrow는 10% FBS를 함유한 RPMI 1640 배지를, A427, SF-188, HEC-1B는 10% FBS, 1% sodium pyruvate, 1% non

essential amino acid를 함유한 Eagle's MEM (이하 EMEM) 배지를 사용하였으며, Calu-3, Sk-mes-1, Sklu-1은 10% FBS, 1% sodium pyruvate, 1% non-essential amino acid, 1% penicillin/streptomycin, 1% MEM vitamin 및 1% glutamine을 함유한 EMEM 배지를, KB, S 180, HEp-2는 10% FBS를 함유한 EMEM 배지를, HEp-G2와 WiDr는 10% FBS와 1% non-essential amino acid를 함유한 EMEM 배지를 각각 사용하였다. 3LL은 10% FBS를 함유한 Dulbecco's MEM(이하 DMEM) 배지를, Hs-578T는 10 µg/ml insulin과 10% FBS를 함유한 DMEM 배지를, Caki-2는 10% FBS를 함유한 McCoy's 5A 배지를 각각 사용하였다. 배지는 GIBCOBRL (Gaithersburg, MD USA)에서 구입하였으며, FBS는 JRH(USA)에서 구입하였다.

Aloe 성분의 추출 - *Aloe arborescens*와 *Aloe vera* 분말 50 g에 대하여 각각의 추출용매 ethyl acetate(EtOAc), n-butyl alcohol (n-BuOH), ethyl alcohol(EtOH), 냉수 및 열수(80°C의 물)을 각각 1,000 ml 씩을 이용하여 3시간동안 추출한 후, 여과지(Toyo No.6)로 여과한 다음 여과액을 감압농축하여 각각을 종양세포 증식억제 시료로 사용하였다.

Clonogenic assay - In vitro 활성 측정을 위한 검색법은 Hamberger와 Salmon의 방법¹⁶⁾에 따라 실시하였다. 즉, 직경 35 mm의 조직배양용 petri dish에 6.6 mg/ml L-asparagin 0.6 ml, 50 mg/ml DEAE dextran 0.3 ml 및 3% tryptic soy broth 10 ml이 혼합된 Enriched McCoy's 5A 배지에 agar를 0.5%가 되게 하여 1 ml씩 주입한 히층을 CO₂ incubator에 24시간 보존한 후 사용하였다. 상층은 0.3% agar를 함유하는 알로에 추출물과 각 종양세포를 일정 농도로 현탁한 double-enriched CMRL배지(1.5% L-asparagin 함유) 1 ml를 주입시켜 고정시킨 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 14~16일째의 평판에서 50 µm 이상의 크기를 나타내는 colony를 도립현미경 (Model CK, Olympus, Japan)을 사용하여 계수하였다.

시료의 처리는 평판을 조제하기 전 종양세포 부유액에 시료를 첨가하는 연속 노출법을 사용하였다. 종양세포에 대한 감수성은 시료처리 평판과 비처리 평판에 나타난 colony 수를 비교하여 생존율을 %로 나타냈으며, 생존율이 30% 이하일 때를 암세포 증식억제 효과가 있는 것으로 판단하였다.¹⁷⁾

Table I. Yield of organic and aqueous soluble extracts of the pure powder concentrates(50g) of *Aloe vera* and *Aloe arborescence*

Solvent	Weight(g)		Yield(%)	
	<i>A. vera</i>	<i>A. arborescence</i>	<i>A. vera</i>	<i>A. arborescence</i>
Ethyl acetate	0.167	0.130	0.34	0.26
n-butanol	0.171	0.152	0.35	0.34
Ethanol	22.400	20.120	44.80	40.24
Water	11.100	12.000	22.20	24.00
Water(80°C)	12.334	14.510	24.67	29.02

결과 및 고찰

*Aloe vera*와 *Aloe arborescens* 순수 동결 건조 분말을 몇 가지 유기용매 및 물로 추출한 결과는 Table I과 같다. *Aloe vera*와 *Aloe arborescens*의 상온에서 ethyl alcohol로 추출한 후, 감압농축 하여 ethyl alcohol추출물 각각 22.400 g(44.80%)과 20.120 g (40.24%)을 얻었다. 같은 방법으로 ethyl acetate추출물 0.167 g(0.34%)와 0.130 g (0.26%), n-butyl alcohol 추출물 0.171 g(0.35%)와 0.152 g (0.34%), 상온물추출물 11.100 g(22.20%)와 12.000 g (24.00%) 및 80°C 물추출물 12.334 g(24.67%)와 14.510 g (29.02%)을 얻었다. 수율은 ethyl alcohol과 물에서 가장 추출량이 많았다.

*Aloe vera*와 *Aloe arborescens* 순수 동결 건조 분말을 여러 가지 추출용매를 이용한 추출물의 종양세포 증식억제 효과를 검토한 결과는 Table II와 같다.

Ethyl acetate에 의해 추출된 *Aloe arborescens*와 *Aloe vera*의 추출물은 100 µg/ml의 단일농도에서 Hs-578T에 대하여 37과 40%의 생존율을 나타내어 낮은 종양세포 증식억제 효과를 나타내었고 나머지 종양세포주에 대해서는 증식억제 효과가 낮았다.

Butyl alcohol에 의해 추출된 *Aloe vera*의 추출물은 100 µg/ml의 단일농도에서 Sk-mes-1, Calu-3, Hs-578T, Farrow 및 3LL에 대해서 각각 22, 25, 30, 16 및 17%의 생존율을 나타내어 높은 종양세포 증식억제 효과를 나타내었다. *Aloe arborescens*의 추출물은 Hs-578T에 대해서 26%의 생존율을 나타내었을 뿐, 나머지 종양세포주들에 대해서는 증식억제 효과가 낮게 나타났다.

Ethyl alcohol에 의한 *Aloe vera*의 추출물은 100 µg/ml의 단일농도에서 A427, Sk-mes-1, SF-188 및 Farrow에 대해서 각각 18, 25, 26 및 22%의 생존

율을 나타내어 높은 종양세포 증식억제 효과를 나타내었다. *Aloe arborescens*의 추출물은 Sk-mes-1에 대해서 26%의 생존율을 나타내었고, Hs-578T에 대해서 53%의 높은 생존율을 나타내었다.

냉수 및 열수에 의한 두 종의 알로에 추출물은 모든 종양세포주에 대해서 증식억제 효과가 나타나지 않았다.

*Aloe vera*와 *Aloe arborescens* 추출물이 종양세포 증식억제에 미치는 영향을 조사한 결과, 대체적으로 *Aloe arborescens*보다 *Aloe vera*가 종양세포 증식억제 효능이 광범위한 것으로 나타났다. *Aloe vera*의 경우, butyl alcohol과 ethyl alcohol 추출물 100 µg/ml에서 두 추출물 모두 Sk-mes-1과 Farrow에 대해서 종양세포 증식억제 효과를 나타내었고, 주로 Sk-mes-1을 비롯해서 A427, Calu-3과 3LL 같은 폐암세포주에 대해서 활성을 나타냈다.

*Aloe arborescens*의 경우, butyl alcohol 추출물에서 18 종류의 종양세포주 중에서 Hs-578T에 대해서만 종양세포 증식억제 효과가 나타났고, ethyl alcohol 추출물에서는 Sk-mes-1에 대해서만 효과가 나타났다. 따라서 *Aloe arborescens*의 경우는 여러 가지 유기용매 추출물에 따라서 종양세포 증식억제 효과가 특이적으로 나타나는 것으로 사료된다.

추출용매에 따른 aloe 추출물의 종양세포 증식억제 효과로는 butyl alcohol과 ethyl alcohol에서만 특이적으로 폐암세포와 흑색종양세포에서 증식억제 효과를 나타내었고, ethyl acetate와 물로 추출한 경우는 종양세포 증식억제 효과가 잘 나타나지 않았다. Iaso Y. 등(1993)에 의하면 *Aloe vera*의 acetone 및 물 추출물에서 수종(edema), 육아종(granuloma) 등에 세포독성을 나타냈다고 보고하였다.¹⁸⁾ 또한 Yagi A. 등(1977)에 의하면 *Aloe arborescens*의 hot water 추출물로부터 분리한 aloe mannan의

Table II. Effect of 100 µg/ml of organic and aqueous soluble extracts from *Aloe arborescence* and *Aloe vera* on various tumor cell lines

Cell lines	<i>Aloe arborescence</i>					<i>Aloe vera</i>				
	EtOAc	BuOH	EtOH	Water	Water(80°C)	EtOAc	BuOH	EtOH	Water	Water(80°C)
Raji	96	95	95	100	90	100	95	92	87	88
A427	81	100	100	87	100	76	48	18*	81	73
Sk-lu-1	90	89	81	100	98	98	41	88	98	98
Sk-mes-1	92	90	26*	75	92	67	22*	25*	79	74
Calu-3	51	64	83	84	75	76	25*	49	85	91
SF-188	85	62	39	54	62	60	57	26*	79	63
WiDr	93	72	83	85	94	70	86	65	95	90
Caki-2	65	67	77	66	72	78	39	39	45	46
HEp-2	86	62	97	64	64	89	64	96	66	67
SNU-1	76	66	53	91	91	58	53	42	87	82
Hs-578T	37	26*	53	72	46	40	30*	77	76	87
HEC-1B	84	80	64	100	92	60	79	74	100	90
HEp-G2	81	91	93	100	98	84	68	78	90	87
KB	94	89	37	90	93	99	87	44	90	72
Farrow	71	39	56	100	98	93	16*	22*	96	62
S180	78	89	66	44	70	49	77	51	74	77
3LL	74	36	94	51	62	62	17*	53	52	60
P388	75	75	46	82	84	70	53	53	63	77

*: Sensitive, i.e., % survival \leq 30%, data are means from three separated experiments.

S180에 대해 저해효과를 나타냈다고 보고하였으나¹⁹⁾, 본 실험결과에서는 S180에 대한 hot water 추출물의 증양세포 증식억제 효과는 생존율 70%로 아주 미약하였고, 냉수 추출물에서는 생존율 44% 정도로 미약한 활성을 나타내어 본 실험의 검색법에서는 증양세포 증식억제 효과가 인정되지 않았다.

현재까지 aloe로부터의 항종양 효과는 물과 ethyl alcohol 추출물로부터 얻어진 물질에서 주로 증양세포 억제물질이 얻어졌다.²⁰⁻²³⁾ 본 연구에서도 ethyl alcohol 추출 조건에서 *Aloe vera*가 여러 증양세포에 대해서 증식억제 효과를 나타내었고, *Aloe arborescens*에서는 Sk-mes-1에 대해서만 증식억제 효과를 나타내었다. *Aloe vera*의 butyl alcohol 추출물에서도 Calu-3, Sk-mes-1, 3LL와 같은 폐암세포주와 Farrow 흑색종양 및 Hs-578T 유방암세포주에 대해 활성을 나타내었고, *Aloe arborescens*로부터는 Hs-578T에 대해서만 활성을 나타내었다.

본 연구 결과로 aloe의 종에 따라서 항종양 효과를 나타내는 성분의 차이가 있는 것으로 사료되며, 또한 추출 조건에 따라서도 추출성분에 따라서 항종

양 활성의 차이가 생기는 것으로 사료되며 추출량과 추출물의 항종양 활성의 차이는 발견할 수 없었다.

인용문헌

- Henry, R. (1979) An updated review of *Aloe vera*. *Cosmetics and Toiletries* 94: 42.
- 添田 百枝, 大友 道子, 青梅美 惠子(1966) Cape Aloe의抗菌および抗真菌作用に關する研究. 日本細菌學雜誌 21: 609-614.
- Fujita, K., Teraira, R. and Nagatsu, T. (1976) Bradykininase activity of aloe extracts. *Biochem. Pharmacology* 25: 205.
- Yagi, A. Harada, N., Yamada, H., Iwadare, S. and Nishioka, I. (1982) Antibradykinin active material in *Aloe saponaria*. *J. Pharm. Sci.* 71: 1172-1175.
- 新保 正府, 龜田 省司, 常田 文彦 (1976) 抗炎症外用劑. 特許出願公開, 昭和 53, 5919.
- 龜山 省司, 林 達男, 寺山 泰郎, 新保 正府, 絲川

- 秀治 (1980) キダチアロエの創傷治癒作用について. 日本薬学会100年會(東京)講演 要旨集
7. Yamamoto, I. (1970) Aloe ulcinの化學的性狀と histamine 合成酵素抑制. *J. Med. Soc. Toho, Japan* 17: 361-364.
 8. Fujita, K., Suzuki, I., Ochiai, J., Shinpo, K., Inoue S. and Saito, H. (1978) Specific reaction of Aloe extract with serum proteins of various animals. *Experientia* 34: 523-524.
 9. Suzuki, I., Saito, H., Inoue, S., Migita, S. and Takahashi, T. (1979) Purification and Characterization of two lectins from Aloe arborescens Mill. *J. Biochem.* 85: 163-171.
 10. 嵯峨均, 龜山 省司 (1981) アロエからの生理活性作用を有する物質の製造方法. 公開特許公報(日本國 特許廳), 昭和 56 - 114302.
 11. 添田 百枝 (1969) Cape Aloeの抗腫瘍性に關する研究. *J. Med. Soc. Toho, Japan* 16: 365-369.
 12. Soeda, M. (1965) Studies on antitumor activity of soedomycin, a new antitumor agent I. Inactivation effect on CAE and antitumor effect on Ehrlich ascities tumor and sarcoma 180 of mice. *Nippon Acta Radiol.* 26: 1483-1491.
 13. Soeda, M. (1965) Studies on antitumor activity of soedomycin, a new antitumor agent II. Antitumor effect on Ehrlich ascites tumor and Yoshida sarcoma, and an outline of clinical application to human patients with carcinoma. *Nippon Acta Radiol.* 26: 1492-1501.
 14. Danhoff, I. E. and McAnally, B. H. (1983) Stabilized Aloe vera : Effect on human skin cells. *D & CI*, 105-106.
 15. Von Hoff, D. D., Clark, G. M., Stogdill, B. J., Sarosdy, M. F., O'Brien, M. T., Casper, J. T., Mattox, D. E., Page, C. P., Cruz, A. B. and Sandbach, J. F. (1983) Prpspective clinical trial of a human tumor cloning system. *Cancer Res.* 43: 1926-1931.
 16. Hamburger, A. W. and Salmon, S. E. (1977) Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197: 461.
 17. Clark, G. M. and Von Hoff, D. D. (1984) Quality control of a multicenter human tumor cloning system: The southwest oncology group experience. In Salmon, S. E., Trent, J. M., Hu-man tumor cloning, 255-265. Grune & Stratton, Inc., New York.
 18. Yamaguchi, I., Mega, N. and Sanada, H. (1993) Components of the gel of Aloe vera (L.) Burm. f.. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57(8): 1350-1352.
 19. Yagi, A., Makino, K., Nishioka, I. and Kuchino, Y. (1977) Aloe mannan, polysaccharide, from Aloe arborescens var. Natalensis. *Planta Medica* 31: 17-20.
 20. Suzuki, L., Saito, H., Inoue, S., Migita, S. and Takahshi, T. (1979) Purification and characterization of two lectins from Aloe arborescens Mill. *J. Biochem.* 85: 163-171.
 21. Wintera W. D., Benavides, R., Clause, W. J. (1989) Effects of Aloe extracts on human normal and tumor cells in vitro. *Economic Botany* 35: 89-95.
 22. Yoshimoto R., Kondoh, N., Isawa, M. and Hamuro, J. (1987) Plant lectin, ATF 1011, on the tumor cell surface augments tumor-specific immunity through activation of T cells specific for the lectin. *Cancer Immunol. Immunother.* 25: 25-30.
 23. Zhang, L. and Tizard, I. R. (1996) Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan ;the major carbohydrate fraction from Aloe vera gel. *Immunopharmacology* 35: 119-128.

(1999년 7월 18일 접수)