

닥나무(*Broussonetia kazinoki*) 추출물의 항암효과에 관한 연구

민경진 · 정승희 · 구성자
경희대학교 식품영양학과

Studies on the Anticancer Effect of *Broussonetia kazinoki* Extracts

Kyung-Jin Min, Seung-Hee Choung and Sung-Ja Koo

Department of Food and Nutrition, Kyunghee University

Abstract

The anticancer effect of the bark of *Broussonetia kazinoki* root extracts (hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, aqueous) were studied. The cytotoxicity by MTT assay and inhibitory effect on the growth of sarcoma 180 cells were tested in vitro. The reduction rate of the tumor formation and spleen/body weight rate on BALB/c mouse were tested in vivo. From the tests, each fraction showed the cytotoxic effect against the sarcoma 180 cells. In addition, as the concentration of the fractions increased, cytotoxic effect tendency increased as well. The cytotoxic rate of the hexane, chloroform, ethylacetate, butanol and aqueous fractions showed by 58.7%, 40.1%, 75.7%, 52.6% and 62.7% respectively after testing by MTT assay system. And sarcoma 180 cells were incubated for 6 days at 37°C with various concentrations of each fraction. As the incubation days go on, the number of cells increased, while the inhibition rate on the growth of sarcoma 180 cells were decreased. Especially the ethylacetate fraction at the concentration of 1.0 mg/ml strongly inhibited the growth of sarcoma 180 cells by 74% compared with the control for a day 37°C. The hexane, chloroform, ethylacetate, butanol and aqueous fractions inhibited on the growth of sarcoma 180 cells by 31%, 19%, 60%, 30% and 42% respectively, when sarcoma 180 cells has been incubated for 6 days at 37°C. The each fraction exhibited the antitumor effect in vivo. The ethylacetate fraction reduced the tumor formation by 41% compared with the control, when sarcoma 180 cells were injected subcutaneously into the left groin of BALB/c mice. Also spleen/body weight rate of ethylacetate fraction was increased by 2.10% compared with the control (1.08%). And it is considered that there would be no toxic effect caused by each fraction of body weight and organ as there was on more changes in mouse' weight compared with the control.

Key words: *Broussonetia kazinoki* extract, antitumor effect, MTT assay, cytotoxicity, sarcoma 180 cell

I. 서 론

현대 사회에서 암이 발생하는 원인은 유전적 요인보다 환경적 요인이 더 큰 비중을 차지하고 있으며 특히 식생활에서 오는 발암율은 환경적 요인의 36%로서 매우 높다^{1,3)}. 식이중에는 발암 인자 및 항발암 인자가 동시에 함유될 뿐만 아니라 이들 성분들이 암 발생을 촉진시키거나 억제하기도 한다. 최근에는 암의 발생과 전이, 암세포의 생리, 암의 진단과 치료에 대한 연구와 함께 식품을 비롯한 항암 효과를 지니는 물질 검색을 통하여 새로운 암 치료제가 개발되고 있다. 한방과 전통적 민간요법에 이용되는 항암약제와 식이요법을 통하여 천연물로부터 면역기능을 상승시키고 암세포에만 작용하는 항암제 개발 연구가 최근 활발하다.

닥나무(*Broussonetia kazinoki* Siebold)는 우리나라 전

역의 산간지방에서 야생 또는 재배된다. 뽕나무과에 속하는 낙엽 활엽 관목으로 그 열매는 저실자(楮實子)라고 하는데 맛이 달며 붉은색으로 딸기와 모양이 비슷하고 9월에 익는다. 눈을 밝게 하며 이뇨 작용과 부종, 기운을 북돋아주는데 효과가 있다고 하여 한방재료로 널리 이용되어 왔다⁴⁾. 최근에는 저실지에서 추출한 단백질 분해효소의 특성과 휘발성 향기 성분과 지방산 조성에 관한 연구가 보고되었다^{5,6)}.

본 연구에서는 닥나무 추출물의 닥나무 뿌리 껍질 성분 항암 활성을 확인하여 암 예방 및 치료제나 기능성 식품을 개발하는데 기초 자료를 얻고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 추출 및 분획

닥나무(*Broussonetia kazinoki*)는 전북 전주시에서 구입하여 잎, 줄기 및 뿌리 껍질을 세척하여 그늘에서 말린 후 자르고 중량(잎: 165 g 줄기: 156 g 뿌리: 204 g)의 2배 80% methanol을 첨가하고 상온에서 72시간 동안 추출하여 methanol 추출물을 얻었다. 이 과정을 3회 반복하고 여기에서 얻은 methanol 추출물을 회전식 진공 농축기를 이용하여 농축한 후 methanol extract로 하였다. Methanol로 추출하여 얻은 농축물을 용매의 극성에 따라 분획하였다. 즉, hexane, methanol, water를 10:1:9의 비율로 혼합하여 분획여두에서 분획후 감압 농축하여 hexane 분획물을 얻었다. 또 그 잔여물을 분획여두에서 다시 chloroform, ethylacetate, butanol로 분획하고 마지막 남은 잔여물로부터 aqueous 분획물을 얻었다.

2. 세포주 및 배양⁷⁾

실험에 사용한 세포주는 mouse 육종 세포(sarcoma 180)로 한국세포주은행(서울의과대학 소속)으로부터 분양받아 배양하면서 실험에 사용하였다. Sarcoma 180 암세포는 10%의 FBS가 함유된 DMEM을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 암세포는 격일로 refeeding하고 4일마다 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

3. MTT assay⁸⁻¹⁰⁾

세포주에 대한 시료의 세포독성 정도는 단시간에 대량 검색이 가능한 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] colorimetric assay 방법으로 실험하였다. 10% FBS를 첨가한 sarcoma 180(1.5×10⁶ cells/ml) cell이 포함된 DMEM 배지를 96 well plate에 well당 100 μl씩 접종하였다. 그리고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 30분간 preincubation한 후 닥나무 뿌리 껍질 methanol 추출물로부터 얻은 분획물들을 1.0, 0.5, 0.1, 0.05 mg/ml 농도로 조정하여 각 well에 100 μl씩 접종하였다. 48시간 배양한 후 MTT 시약 50 μl를 각각 첨가하고 MTT가 생존 암세포의 효소작용에 의해 환원되도록 한다. 4시간 후 원심분리(450×g, 10 min)하여 30 μl 정도만 남기고 상등액은 제거하였다. 각 well에 DMSO 100 μl를 첨가하여 formazan이 용해되도록 한 후 microplate reader로 O.D 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 MTT가 세포에 의해 formazan(blue)으로 분해된 양을 나타내고 따라서 각 well의 viable cell수와 비례하며 cytotoxicity index(%)로 나타내었다.

4. 암세포 증식억제 실험¹¹⁻¹³⁾

암세포 배양 방법과 동일하게 배양하여 원심분리한 후 집적된 암세포를 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 24 well plate에 4×10⁴ cells/ml 농도로 seeding하여 24시간 동안 배양하였다. 암세포가 plate에 부착되었음을 확인한 후 시료를 media에 첨가하여 1.0, 0.5, 0.1, 0.05 mg/ml 농도로 조정한 후 이틀에 한번씩 교체하면서 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 1, 2, 3일 그리고 배양 6일 후에 증식된 세포를 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 분리하여 각 세포수를 hemocytometer로 측정하여 대조군과 비교하여 암세포 증식억제 효과를 관찰하였다.

5. 암세포의 형태학적 관찰

Sarcoma 180 cell의 형태적인 관찰을 위해 암세포 증식억제 실험 방법과 동일하게 하여 배양 6일 후에 암세포의 모양을 inverted microscope로 관찰하였다.

6. Mouse를 이용한 in vivo 항암실험

(1) 실험동물 및 종양세포

실험동물은 25 g 내외의 수컷 BALB/c mouse를 대한 실험동물 사육장에서 공급받아 실험에 사용하였다. 복수암이 유발된 BALB/c mouse의 복강내에서 sarcoma 180 세포를 복수와 함께 취하고 saline과 함께 원심분리(1500 rpm, 5 min)하여 종양세포를 분리하였다. 분리된 세포를 다시 saline에 세척하고 재차 원심분리하여 상등액을 제거한 후 sarcoma 180 세포수를 1.0×10⁷ cells/ml 이 되도록 종양세포를 부유시켜 0.1 ml씩 복강주사하여 이식 보존하면서 실험에 사용하였다.

(2) 고형암 성장저지 실험¹⁴⁾

실험동물을 각 군당 8마리씩 실험실에서 계대배양한 종양세포 부유액 0.2 ml/(2.0×10⁶ cells/mouse)씩을 실험동물의 왼쪽 서혜부(left groin)에 피하 이식한 후 24시간 후부터 14일간 매일 1회씩 멸균된 생리 식염수를 사용하여 조제한 시료 용액을 1.0 mg/kg으로 복강투여하였다. 종양세포 이식 21일째에 치사시키고 생성된 고형암을 적출하여 그 무게를 측정하고 다음 식에 따라 종양 성장저지 백분율(tumor growth inhibition ratio; I.R. %)을 계산하였다.

$$I.R. (\%) = \frac{C_w - T_w}{C_w} \times 100$$

Cw: 대조군의 평균 종양 무게

Tw: 시료투여군의 평균 종양 무게

(3) 비장 장기의 중량변화

고형암 성장저지 실험과 동일하게 하며 종양세포 이식 21일째에 mouse를 치사시키고 체중을 측정후 체중에

대한 비장의 비율을 계산하였다.

7. 분획물들의 천연물 예지시험¹⁵⁾

Alkaloid, Phenol성 물질, flavonoid, tannin은 일반 정성 분석법에 의하여 실험하였고 당은 Bertrand법, 배당체 및 탄수화물은 Molish 반응으로 확인하였다.

8. 통계분석

모든 실험결과와 통계처리는 SAS 통계 프로그램을 이용하여 분석하였으며, 그 결과는 표준오차와 함께 평균값으로 표시하였다. 대조군과 각 시료로부터 얻은 실험자료 간의 유의성은 general linear model(GLM)의 Duncan's multiple range test를 이용하여 p<0.05에서 검증하였다¹⁶⁾.

III. 결과 및 고찰

1. 세포독성 효과

닥나무의 잎, 줄기 및 뿌리 껍질 methanol 추출물(잎; 7.38 g 줄기; 6.36 g 뿌리; 7.89 g)의 MTT assay 실험 결과는 잎, 줄기 및 뿌리 껍질 methanol 추출물을 0.1, 1.0, 5.0 mg/ml 농도로 했을 때 잎은 70.3%, 68.1%, 78.7%였고 줄기는 67.0%, 72.8%, 87.1%를 나타냈으며 뿌리 껍질은 81.1%, 97.7%, 136.7%의 세포독성 효과를 보였다. 따라서 세포독성 효과가 가장 큰 닥나무 뿌리 껍질 methanol 추출물로부터 용매 극성에 따라 분획한 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, aqueous 분획물들을 세포독성 실험에 이용하였다.

각 분획물들의 시료의 농도를 1.0, 0.5, 0.1, 0.05 mg/ml로 희석하였으며 Fig. 1에서 보는 바와 같이 용량의존적인 세포독성을 나타내었다. Ethylacetate층의 농도 1.0 mg/ml에서 75.7%의 가장 높은 세포독성 효과를 나타냈으며 그 다음은 aqueous, hexane, butanol, chloroform층 순으로 각각 1.0 mg/ml 농도에서 62.7%, 58.7%, 52.6%, 40.1%의 효과를 보였다. 또한 ethylacetate 층은 0.1 mg/ml의 낮은 농도에서도 다른 분획물의 고농도 경우보다도 높은 효과(63.7%)를 나타내어 낮은 농도에서도 세포독성 효과가 뛰어난을 알 수 있었으므로 ethylacetate 층은 강한 세포독성 물질이 존재하는 것으로 추정된다.

2. 분획물들의 천연물 예지시험 결과

강한 세포독성을 나타낸 ethylacetate 층의 천연물 예지시험을 해 본 결과 배당체와 flavonoid 반응이 나타났으며, 또한 aqueous 층에서도 phenol성 물질, flavonoid 및 배당체 반응을 보였다. 이것은 이¹⁷⁾의 연구보고에서

닥나무 뿌리 껍질 methanol 추출물의 thin layer chromatography 분석 결과 flavonoid계 물질임을 밝힌 결과

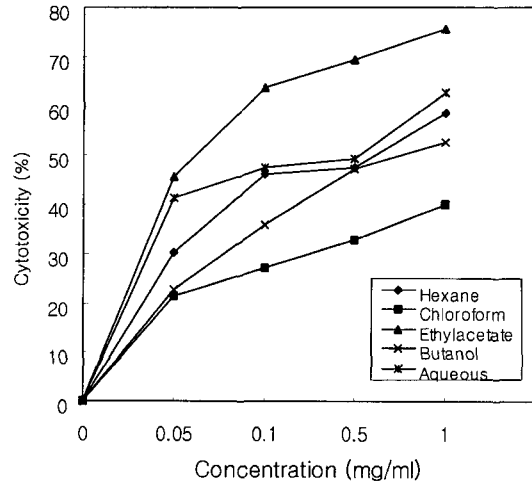


Fig. 1. Cytotoxicity of the each fraction of methanol extract from the bark of *Broussonetia kazinoki* root on MTT assay.

Table 1. Effects of the each fraction of methanol extract from the bark of *Broussonetia kazinoki* root on the growth of sarcoma 180 cells for 1 day of incubation at 37°C

Fraction	Concentration (mg/ml)	Cell number (×10 ⁴ cells/ml)	Inhibition (%)
Control*		12.3±3.5	
Hexane	0.05	10.6±1.5	14
	0.1	8.6±2.0	31
	0.5	7.0±1.0	44
	1.0	4.6±1.5	63
CHCl ₃	0.05	11.0±2.6	11
	0.1	9.0±2.6	27
	0.5	7.3±0.5	41
	1.0	5.0±1.0	60
EtOAc	0.05	6.0±1.0	52
	0.1	5.3±2.5	57
	0.5	4.0±1.0	68
	1.0	3.3±0.5	74
BuOH	0.05	9.6±3.5	22
	0.1	7.0±2.6	44
	0.5	4.6±0.5	63
	1.0	3.6±0.5	71
Aqueous	0.05	7.3±3.2	41
	0.1	5.6±1.5	55
	0.5	4.3±1.5	66
	1.0	3.3±1.1	74

*4×10⁴ cells/ml were seeding.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Cell number of each fraction}}{\text{Cell number of control}}\right) \times 100.$$

와도 동일한 해석이 가능하다. 그러므로 천연물 예지시험 결과 세포독성 효과를 보이는 물질은 배당체와 flavonoid로 추정되며 이들 물질의 동정 및 기전 확립 연구가 보충되어야 할 것으로 사료된다.

3. 암세포 증식억제 효과

Sarcoma 180 cell에 닳나무 뿌리 껍질 methanol 추출물로부터 얻은 분획물들을 1.0, 0.5, 0.1, 0.05 mg/ml 농도로 첨가하여 암세포 성장에 미치는 효과를 관찰하여 본 결과 농도에 의존하여 암세포 증식억제 효과가 증가되었다. 시료 1.0 mg/ml 농도로 첨가하여 1일 배양 후 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, aqueous 층은 각각 63%, 60%, 74%, 71%, 74%의 암세포 증식억제 효과를 나타내었으며(Table 1), 2일 배양 후에는 각각 44%, 40%, 66%, 60%, 62%의 암세포 증식억제 효과를(Table 2), 3일 배양 후에는 각각 30%, 32%, 62%, 57%, 60%(Table 3), 6일 배양 후에는 각각 31%, 19%, 60%, 30%, 42%의 억제 효과를 나타내었다(Table 4).

초기 세포수 4×10^4 cells/ml로 1일간 배양 후 대조군

의 경우 12.3×10^4 cells/ml로 증식한 반면, ethylacetate 층을 1.0 mg/ml 농도로 첨가한 결과 3.3×10^4 cells/ml로 증식하여 74%로 가장 많이 억제되었다. 시료를 첨가하여 6일동안 배양했을 때 암세포 증식은 증가하였고, 시료 첨가시 1일 배양 후 암세포 증식억제 효과가 가장 많이 현저하게 나타났다. 이것은 시료의 첨가가 초기의 암세포 배양 억제에 영향을 크게 미치며, 배양일이 증가할수록 암세포 증식억제 정도는 감소함을 알 수 있었으며, 김¹⁸⁾에 의한 보고에서 밀버섯의 HeLa cell 증식에 미치는 영향은 1일, 2일, 3일 배양 후에 암세포 증식율이 감소하였다는 연구결과와 동일한 경향이다.

Fig. 2는 닳나무 뿌리 껍질 methanol 추출물로부터 얻은 분획물이 sarcoma 180 세포주의 형태학적 변화에 미치는 영향을 살펴보기 위해 inverted microscope로 세포 모양을 관찰한 것으로 대조군은 암세포가 조밀하게 증식되었으나 시료를 1.0 mg/ml 농도로 첨가한 경우는 세포의 결속력이 감소되어 세포 주위가 흐트러지고 세포가 사멸된 것을 관찰할 수 있었다. 그 중 ethylacetate 층은 대조군에 비해 세포수가 크게 감소되어 암세포 증식억제 효과가 가장 큰 것으로 확인할 수 있었다.

Table 2. Effects of the each fraction of methanol extract from the bark of *Broussonetia kazinoki* root on the growth of sarcoma 180 cells for 2 day of incubation at 37°C

Fraction	Concentration (mg/ml)	Cell number ($\times 10^4$ cells/ml)	Inhibition (%)
Control*		27.6 \pm 12.4	
Hexane	0.05	26.0 \pm 3.0	6
	0.1	24.3 \pm 3.5	12
	0.5	19.6 \pm 2.5	29
	1.0	15.6 \pm 1.5	44
CHCl ₃	0.05	25.3 \pm 4.5	9
	0.1	25.0 \pm 5.5	10
	0.5	23.0 \pm 8.7	17
	1.0	16.6 \pm 0.5	40
EtOAc	0.05	17.6 \pm 2.5	37
	0.1	15.3 \pm 3.2	45
	0.5	12.0 \pm 2.6	57
	1.0	9.6 \pm 0.5	66
BuOH	0.05	23.0 \pm 2.6	17
	0.1	21.0 \pm 4.0	24
	0.5	13.6 \pm 2.0	51
	1.0	11.3 \pm 1.5	60
Aqueous	0.05	21.3 \pm 3.5	23
	0.1	17.6 \pm 4.0	37
	0.5	13.3 \pm 4.5	52
	1.0	10.6 \pm 0.5	62

* 4×10^4 cells/ml were seeding.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Cell number of each fraction}}{\text{Cell number of control}}\right) \times 100.$$

Table 3. Effects of the each fraction of methanol extract from the bark of *Broussonetia kazinoki* root on the growth of sarcoma 180 cells for 3 day of incubation at 37°C

Fraction	Concentration (mg/ml)	Cell number ($\times 10^4$ cells/ml)	Inhibition (%)
Control*		58.6 \pm 12.6	
Hexane	0.05	53.0 \pm 7.9	10
	0.1	49.6 \pm 7.0	16
	0.5	44.3 \pm 4.9	25
	1.0	41.3 \pm 3.5	30
CHCl ₃	0.05	54.6 \pm 8.1	7
	0.1	52.0 \pm 9.5	12
	0.5	46.0 \pm 7.0	22
	1.0	40.3 \pm 7.2	32
EtOAc	0.05	32.0 \pm 5.5	46
	0.1	29.0 \pm 9.1	51
	0.5	25.0 \pm 3.4	58
	1.0	22.6 \pm 4.6	62
BuOH	0.05	40.3 \pm 10.6	32
	0.1	36.6 \pm 9.0	38
	0.5	28.6 \pm 6.0	52
	1.0	25.3 \pm 3.2	57
Aqueous	0.05	39.3 \pm 4.7	33
	0.1	35.6 \pm 5.6	40
	0.5	27.3 \pm 4.7	54
	1.0	24.0 \pm 2.0	60

* 4×10^4 cells/ml were seeding.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Cell number of each fraction}}{\text{Cell number of control}}\right) \times 100.$$

Table 4. Effects of the each fraction of methanol extract from the bark of *Broussonetia kazinoki* root on the growth of sarcoma 180 cells for 6 days of incubation at 37°C

Fraction	Concentration (mg/ml)	Cell number (×10 ⁴ cells/ml)	Inhibition (%)
Control*		161.6±9.8	
Hexane	0.05	149.3±27.0	8
	0.1	133.0±5.2	18
	0.5	123.6±13.3	24
	1.0	112.0±42.4	31
CHCl ₃	0.05	152.0±22.7	6
	0.1	147.0±29.8	10
	0.5	139.3±34.8	14
	1.0	132.3±52.6	19
EtOAc	0.05	107.6±43.7	34
	0.1	101.6±23.2	38
	0.5	94.6±49.5	42
	1.0	66.0±13.0	60
BuOH	0.05	133.0±40.2	18
	0.1	130.0±39.5	20
	0.5	121.0±54.1	26
	1.0	113.6±33.5	30
Aqueous	0.05	112.3±28.9	31
	0.1	107.3±26.5	34
	0.5	99.0±23.5	39
	1.0	94.0±7.0	42

*4×10⁴ cells/ml were seeding.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Cell number of each fraction}}{\text{Cell number of control}}\right) \times 100.$$

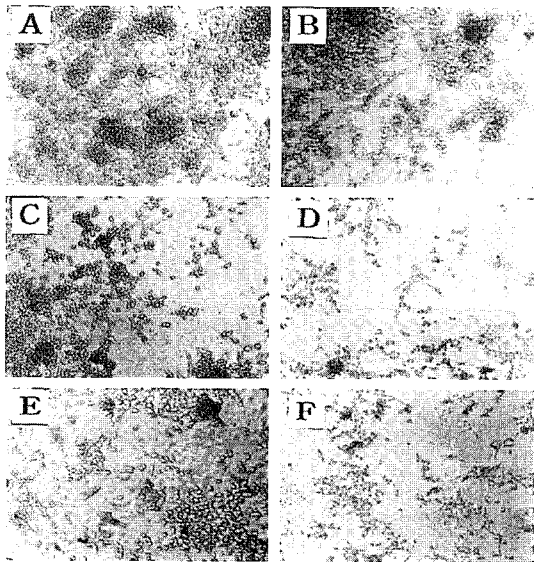


Fig. 2. Photomicrographs of sarcoma 180 cells incubated for 6 days at 37°C with or without fraction (1.0 mg/ml) of methanol extract from the bark of *Broussonetia kazinoki* root (×400).

A: Control, B: Hexane, C: Chloroform, D: Ethylacetate, E: Butanol, F: Aqueous.

Table 5. Antitumor activities of the each fraction (1.0 mg/kg) of methanol extract from the bark of *Broussonetia kazinoki* root in tumor bearing BALB/c mouse with sarcoma 180 cells

Fraction	Tumor weight (g)	Inhibition rate (%)
Control*	4.62±2.84 ^a	
Hexane	3.03±1.14 ^{ab}	34
CHCl ₃	3.06±1.19 ^{ab}	33
EtOAc	2.71±1.29 ^b	41
BuOH	3.40±0.67 ^{ab}	26
Aqueous	2.81±1.00 ^{ab}	39

*Physiological saline was treated.

Different alphabet means different value significantly at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

4. Mouse를 이용한 in vivo 항암 실험

(1) 고형암 성장저지 효과

Sarcoma 180 cell을 mouse에 이식한 후 14일 동안 시료를 1.0 mg/kg 농도로 투여하고 21일째 되는 날 mouse를 치사하여 종양을 분리해 무게를 측정하였다. Table 5에서 보는 바와 같이 대조군의 경우 종양 무게가 4.62 g인데 반해 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, aqueous 층을 투여한 경우는 종양 무게가 각각 3.03 g, 3.06 g, 2.71 g, 3.40 g, 2.81 g으로 ethylacetate 층과 aqueous 층에서 고형암 성장저지율이 각각 41%, 39%로 나타났다. 또한 대조군에 비해 시료 처리군의 mass 크기의 차이가 육안으로도 확인이 가능하였다. 김¹⁹⁾의 연구에서는 느릅나무로부터 열수 추출물(0.1 mg/kg), methanol 추출물(0.025 mg/kg) 그리고 ethylacetate 분획물(0.1 mg/kg)의 각각 92%, 87%, 87% 고형암 저지 효과를 보고하였다.

닥나무 뿌리 껍질 methanol 추출물로부터 얻은 분획물들은 in vivo에서도 in vitro와 같이 항암성을 나타내기는 하지만, 이것은 시료의 직접적인 종양 생성 억제나 시료의 세포독성에 의한 영향, 또는 TNF(Tumor Necrosis Factor)와 같은 물질을 유도하여 면역계의 메커니즘을 통해 고형암의 성장이 억제되었는지의 확인이 필요하므로 이를 위해서는 암의 전이에 대한 실험 등이 보충되어야 할 것이다.

한편 시료의 sarcoma 180 cell 고형암에 대한 항암 효과 실험시 mouse의 체중변화를 살펴본 결과는 Table 6과 같으며 대조군에 비해 시료 투여군의 체중변화는 큰 차이가 없으므로(p<0.05) 시료 추출물로 인한 체중 및 장기의 독성 문제는 없으리라 사료된다.

(2) 비장 장기의 중량 변화

면역 관련 장기 중 하나인 비장의 체중에 대한 중량 변화를 살펴본 결과는 Table 7과 같이 나타났다. Sarcoma

Table 6. Effects of the each fraction of methanol extract from the bark of *Broussonetia kazinoki* root on body weight BALB/c mouse with sarcoma 180 cells

Fraction	Body weight (g)			
	0 day	7 days	14 days	21 days
Control*	24.00±4.14 ^{ab}	28.87±6.57 ^{ab}	30.62±7.06 ^{ab}	32.42±7.99 ^{ab}
Hexane	22.50±2.77 ^{ab}	24.50±2.72 ^{bc}	26.50±3.50 ^{bc}	29.25±4.74 ^{bc}
CHCl ₃	21.12±3.31 ^b	22.25±3.77 ^c	24.00±3.70 ^c	26.75±5.94 ^{bc}
EtOAc	23.71±2.69 ^{ab}	30.65±2.42 ^a	30.66±3.72 ^{ab}	32.40±2.96 ^{ab}
BuOH	25.71±1.79 ^a	32.00±3.26 ^a	33.71±3.90 ^a	36.85±4.59 ^a
Aqueous	21.42±4.46 ^b	23.42±4.57 ^c	25.42±5.74 ^{bc}	26.85±6.30 ^{bc}

*Physiological saline was treated.

Different alphabet means different value significantly at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 7. Effects of the each fraction of methanol extract from the bark of *Broussonetia kazinoki* root on body weight and spleen index of BALB/c mouse with sarcoma 180 cells

Fraction	Body weight (g)	Spleen/body weight (%)
Control I*	25.00±3.21 ^c	1.09±0.48 ^b
Control II**	32.42±7.99 ^{ab}	1.08±0.40 ^b
Hexane	29.25±4.74 ^{bc}	0.94±0.48 ^b
CHCl ₃	26.75±5.94 ^{bc}	0.86±0.35 ^b
EtOAc	32.40±2.96 ^{ab}	2.10±0.56 ^a
BuOH	36.85±4.59 ^a	0.99±0.32 ^b
Aqueous	26.85±6.30 ^{bc}	0.99±0.28 ^b

*Physiological saline was treated without sarcoma 180 cells.

**Physiological saline was treated.

Different alphabet means different value significantly at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

180 cells을 투여하지 않은 상태에서 생리 식염수만을 투여한 경우(1.09%)와 sarcoma 180 cells을 투여한 상태에서 생리 식염수 투여(1.08%) 비교시 비장의 중량 변화는 큰 차이를 보이지 않았다. Ethylacetate 1.0 mg/kg 농도로 투여하였을 때 비장의 중량이 2.10%로 증가하였다.

두릅나무 butanol 추출물의 경우 100 mg/kg을 투여하였을 때 대조군에 비해 비장은 31%의 증가율을 나타내었고²⁰⁾ 감잎의 hexane, chloroform 층 및 감잎 탄닌을 0.5, 0.1, 0.1 mg/kg을 각각 투여하였을 때 비장의 중량이 대조군 0.61%에 비해 각각 0.71%, 0.76%, 0.78%의 증가함이 보고되었다²¹⁾. 또한 쑥의 acetone 분획물 투여시 비장은 대조군에 비해 유의적 증가를 나타냈음을 보고하였다²²⁾.

비장의 중량 증가는 체내의 이물질에 대한 방어작용을 담당하는 비장의 splenic macrophage 등²³⁾ 면역계에 관련된 세포들의 활성이 증가되었기 때문이라 추정되며, 따

라서 닥나무 추출물 ethylacetate 층은 면역계의 활성 증가와도 관련이 있다고 추측된다.

IV. 요약

닥나무 추출물의 항암효과를 검토하기 위하여 닥나무 뿌리 껍질 methanol 추출물로부터 얻은 분획물(hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, aqueous 층)들의 0.05~1.0 mg/ml 농도에 대해서 MTT assay를 통한 세포독성 측정 및 암세포 증식억제 효과를 in vitro로 검색하였고, in vivo에서 BALB/c mouse를 이용한 고형암 성장저지 실험 및 비장 장기 중량변화의 항암실험을 행하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 세포독성 실험에 의한 MTT assay 결과 모든 분획물들은 농도 의존성으로 효과가 나타났으며 1.0 mg/ml 농도에서 ethylacetate 층은 sarcoma 180 cell에 대하여 75.7%의 가장 높은 세포독성 효과를 나타내었고 그 다음 aqueous, hexane, butanol, chloroform 층 순으로 각각 62.7%, 58.7%, 52.6%, 40.1%의 효과를 보였다. 각 분획물들에 의한 sarcoma 180 cell의 증식억제 효과는 배양일(1, 2, 3, 6일)이 증가함에 따라 암세포수는 증가하였으며 처음 1일째에 암세포 증식억제가 가장 많이 되었다. 1.0 mg/ml 농도로 시료를 첨가하여 6일간 배양했을 때 ethylacetate 층은 60%의 억제율을 가장 현저한 활성을 보였고 aqueous(42%), hexane(31%), butanol(30%), chloroform(19%)층 순으로 암세포 증식억제를 나타내었다. 또한 암세포 증식에 대한 현미경 관찰을 해 본 결과 ethylacetate 층은 대조군에 비하여 암세포 증식억제 정도와 형태 변화가 두드러지게 나타났다. BALB/c mouse에서 sarcoma 180 cell에 대한 각 분획물들의 고형암 성장저지효과는 1.0 mg/kg으로 시료투여했을 때 ethylacetate 층은 대조군에 비하여 41%의 유의적인 저지율을 나타냈으며($p < 0.05$), 그 다음은 유의적이지는 않으나 aqueous 층 처리구가 39%의 저지율을 나타내었다. 비장의 체중에 대한 중량변화는 대조군의 경우 1.08%인데 비해, ethylacetate 층 처리군은 2.10%로 증가하였고 나머지 처리군에서는 대조군과 차이를 나타내지 않았다($p < 0.05$). 한편, mouse의 체중 변화는 대조군과 큰 차이가 없었으므로 시료 추출물로 인한 체중 및 장기의 독성 문제는 없을 것으로 사료된다. 이상의 연구 결과로 닥나무 뿌리 껍질 methanol 추출물로부터 얻은 분획물들 ethylacetate와 aqueous 층은 세포독성 효과와 암세포 성장억제 효과 및 고형암 성장 저지 효과가 크게 나타났으며, 체중에 대한 면역관련 장기인 비장의 중량증가로부터 면역계 활성과도 관계가 있을 것으로 사료된다. 따라서 닥나무 뿌리 껍질의 효능이 큰 분획물로부터 항

암활성 물질을 분리 정제하고 기전확립의 연구가 앞으로 더욱 보충되어야 할 것이며, 암예방을 위한 기능성 식품 및 치료제의 개발에 대한 가능성 확인을 본 연구를 통하여 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. 박현서, 이영순, 구성자, 한명주, 조여원: 식생활과 건강. 효일문화사, 262-265(1995).
2. Nagago, M. and Sugimura, T.: Carcinogenic factor in food with relevance to colon cancer development, *Mut. Res.*, **290**, 45-51(1993).
3. Ames, B.N. and Maron, D.M.: Revised method for the salmonella typhimurium mutagenicity test, *Mut. Res.*, **113**, 178-215(1983).
4. 육창수: 한국 약품식물 자원도감, 진명출판사, 78(1981).
5. 윤숙자, 오평수, 장명숙: 닥나무 열매에서 추출한 단백질 분해 효소의 특성에 관한 연구, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **22**(6), 803-806(1993).
6. 윤숙자, 변명우, 장명숙: 닥나무 열매의 휘발성 향기 성분과 지방산 조성에 관한 연구, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **23**(1), 130-136(1994).
7. Lee, Y.S., Kim, D.S., Ryu, B.H. and Lee, S.H.: Antitumor and immunomodulating Effects of Seaweeds toward sarcoma 180 cell, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **21**(5), 544-550(1992).
8. Barbara G. Campling, John Pym, Peter R. Galbraith and Susan P.C.: Cole, Use of the MTT assay for rapid determination of chemosensitivity of human leukemic blast cells, *Leukemia Res.*, **12**, 823-831(1988).
9. Carmichael, J., Mitchell, J.B., DeGraff, W.G., Gamson, J., Gazdar, A.F., Johnson, B.E., Glatstein, E. and Minna, J.D.: Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay, *Br. J. Cancer*, **57**, 540-547(1985).
10. Jae Gahb Park, Barnett S. Kramer, Seth M. Steinberg, James Carmichael, Jerry M. Collins, John D. Minna and Adi F. Gazdar: Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using tetrazolium based colorimetric assay, *Cancer Res.*, **47**: 5875-5879(1987).
11. Franceschi, R.T., James, W.M. and Zerlauth, G.: 1α , 25-dihydroxy vitamin D3 specific regulation of growth, morphology and fibronectin and a human osteosarcoma cell line, *J. Cell Physiol.*, **123**, 401(1985).
12. 손홍수, 황우익: 미늘 중 지용성 성분의 암세포 증식억제 효과 연구, *한국영양학회지*, **23**(2), 135(1990).
13. 이선미: 케일의 항돌연변이 및 항암효과와 기작연구, 부산대학교 대학원, 박사학위논문(1995).
14. 김문경: Sarcoma-180 투여 마우스에서 재래식 된장의 항암효과, 부산대학교대학원, 석사학위논문(1998).
15. 우원식: 천연물화학 연구법, 서울대학교 출판부, 13-14(1996).
16. Ronald, P. Cody, Jeffrey K. Smith: Applied statistics and the SAS Programming Language, Prentice-Hall, Inc., 150-180(1997).
17. 이해자: 닥나무와 음양곽 추출물의 항변이원성, 경희대학교대학원, 석사학위논문(1996).
18. 김숙희: 밀버섯의 항암성분에 관한 연구, 서울대학교대학원, 박사학위논문(1992).
19. 김기영: 느릅나무 근피의 항(발암) 효과, 부산대학교대학원, 석사학위논문(1997).
20. 김용규: 두릅나무 부탄올 추출물의 항암 및 면역활성에 미치는 영향, 경성대학교대학원, 석사학위논문(1993).
21. 문숙희: 감잎의 항돌연변이 및 항암효과, 부산대학교대학원, 박사학위논문(1993).
22. 황윤경: 쑥의 식유에틸 추출물의 항암효과, 고려대학교대학원, 박사학위논문(1994).
23. Ivan Roitt, Jonathan Brostoff and David Male: *Immunology*, 4th ed., Mosby(1996).

(1999년 4월 24일 접수)