

신장 상피세포주 A498을 이용한 대황(*Rheum undulatum* L.)추출물의 세포독성

나명석 · 진종언* · 조남철**

광주여자대학교 생명과학부, *동강대학 피부미용과, **동강대학 식품영양과

Cytotoxicity of Crude Extracts of *Rheum undulatum* L. with Human Kidney Epithelial Cell A498

Myung-Suk Ra, Jongeon Chin* and Namchul Cho**

Dept. of Life Sciences, Kwangju Women's University, Kwangju 506-713, Korea

*Dept. of Cosmetology and **Dept. of Food & Nutrition, Dongkang College, Kwangju 500-714, Korea

Abstracts

We have evaluated cytotoxic effects of four crude extracts of methylene chloride, ethyl acetate, butanol, water layer isolated *Rheum undulatum* in A498 cell line, human kidney epithelial cells. The cytotoxic evaluation was measured by colorimetric assay using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT), neutral red(NR) and sulforhodamine protein B(SRB). These results obtained are as follows : MTT, NR and SRB quantities were significantly decreased in cultured A498 cells treated four crude extracts by increased concentrations. The cell cytotoxic effect of crude extracts of butanol layer was more stronger than others layer. The values of MTT₅₀, NR₅₀, SRB₅₀ of crude extract of butanol layer and were measured both 0.63 mg/ml, 0.65 mg/ml, and 0.68 mg/ml, respectively and the values of water layer were 0.84 mg/ml, 0.82 mg/ml, and 0.80 mg/ml, respectively in cultured A498 cell line.

Key words : *Rheum undulatum*, cytotoxicity, MTT, NR, SRB.

서 론

최근 화학합성제의 약품에 대한 부작용이 증가됨에 따라 새로운 생리 활성물질을 찾아내는 많은 연구가 진행되고 있으며¹⁾ 또한, 식물체로부터 천연물질로부터 항암제나 항바이러스제와 같은 천연약제를 얻고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다^{2,3)}. 식물체로부터 생합성되는 천연물질 중 대부분은 식물자신에 있어서 필수적으로 사용되며 인간생활에 있어서 의약품제재나 살충제, 식품첨가제 등으로 이용되고 있다. 매년 식물에서 발견되는 새로운 화학구조를 갖는 신물질이 1,000여 가지 이상이며, 그 중 1/3정도가 다소간의 생물학적 활성을 갖고 있는 것으로 알려지고 있다⁴⁾.

대황(*Rheum undulatum* L.)은 아시아의 온대와 아열대지역에 서식하는 약용식물로 전통적으로 진정, 지혈, 구충, 항균, 항종양, 혈압강하 등에 효과가 알려져 있으며⁵⁾, 한방에서는 변비, 만성설사, 장염, 황달, 복막염, 담석증의 치료 등에 이용되고 있다^{6,7,8)}. 주요 성분으로는 glycosides rhein-8-monoglucoside, physcion monoglucoside, aloemodin monoglucoside, emodine monoglucoside, chrysophenol monoglucoside, sennoside, tannin, gallic acid, calechin 등이 분리 및 확인되고 있다.

본 연구에서는 한방에서 사용되는 약제인 대황(*Rheum undulatum* L.)을 시중에서 구입하여 약효성분에 대한 기초 조사의 일환으로 대황 추출물이 사람의 신장 상피세포주 A498에 미치는 세포독성을 조사

* Corresponding author : Namchul Cho

하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 대황(*Rheum undulatum* L.)은 광주시내 건재상에서 구입하여 감정 후 사용하였으며, 표본은 동강대학 식품영양과 식품분석실에 보관하였다.

2. 추출 및 분획

대황 400g을 세절한 후 methanol을 가하여 실온에서 1주일 동안 정치시킨 후 추출·여과하는 방법으로 3회 반복한 다음 이 여과액을 rotary vacuum evaporator(Eyela, Japan)를 이용하여 감압 농축하여 건조된 methanol extracts를 얻었다. 그리고 methanol extracts는 증류수를 첨가하여 현탁시킨 다음 유기용매 methylene chloride(dichloromethane, CH_2Cl_2), ethyl acetate, butanol 등을 순서대로 가하여 methylene chloride 층, ethyl acetate 층, butanol 층, water 층 등 4층으로 분획한 후 감압 농축하여 분말 형태로 얻었다.

3. Sample 제조

분말로 된 추출 및 분획물 100mg에 ethanol과 dimethyl sulfuroxide가 1:1로 혼합된 용매 1 ml씩 가하여 완전히 용해시킨 후 여과하여 세포독성 실험에 이용하였다.

4. 세포배양

본 실험에 사용된 세포주는 A498로 human kidney epithelial cell이다. 본 실험에 사용된 세포주는 한국 세포공급은행(Korea Cell L Bank, KCLB)으로부터 분주 받아 사용하였다. 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle's medium(DMEM, Gibco)에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco), antibiotics, fungizone을 혼합하여 사용하였다. 세포배양은 37°C, 5% CO_2 로 조정된 배양기(Forma Scientific, U.S.A)내에 배양하였으며, 배양액은 3일마다 교환하였다. 배양된 세포는 1x trypsin-EDTA(Gibco)로 부유시킨 후 0.4% trypan blue로 염색하여 hemocytometer로 세포수를 산정하였다.

5. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrasodium bromide(MTT) assay

Mosmann⁹⁾의 방법에 따라 A498 세포를 5×10^4 cells/well 이 되도록 96well plate에 분주하여 24시간 배양 후 여러 분액별 대황 추출물이 첨가된 배양액에서 다시 24시간 배양하였다. 배양 후 배양액을 버리고 MTT 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 포함된 배양액으로 교체한 후 다시 3시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 버리고 dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma, U.S.A)를 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 씩 넣어 5분간 실온 방치한 후 ELISA reader (Bio-Tek, Inc., U.S.A)로 570nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

6. Neutral red(NR) assay

Borenfreund와 Purener¹⁰⁾의 방법에 따라 A498 세포를 5×10^4 cells/well이 되도록 96 교체하였다. 24시간 동안 배양한 후 배양액을 제거하였다. 그 후 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 neutral red가 포함된 배양액으로 교체한 다음 배양기에서 3시간 동안 추가 배양하였다. 배양액을 버리고 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척한 후 1% formaldehyde-1% well plate에 분주하여 24시간 배양 후 여러 분액별 대황 추출물이 첨가된 배양액으로 CaCl_2 를 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ 씩 넣어 세포를 고정하였다. 세포를 고정한 후 1% glacial acetic acid-50% ethanol을 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ 씩 넣어 15분간 실온에 방치한 다음 흡광도를 ELISA reader(Bio-Tek, Inc., U.S.A)로 540nm에서 측정하여 대조군과 비교하였다.

7. Sulforhodamine B(SRB) assay

Skehan 등¹¹⁾의 방법에 따라 A498 세포를 5×10^4 cells/well이 되도록 96 well plate에 분주하여 24시간 배양 후 여러 분액별(1, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 대황 추출물이 첨가된 배양액으로 교체하였다. 그 후 각 well에 차가운 50% TCA를 50 μl 씩 넣어준 다음 4°C에서 1시간 방치하여 세포를 고정시키고 증류수로 여러 번 세척한 후 공기 중에 건조시켰다. 각 well에 0.4% SRB용액을 100 μl 씩 넣어 20~30분 동안 반응시킨 후 1% acetic acid로 세척 후 공기 중에서 건조시켰다. 고정세포에 염색되어 있는 SRB를 10 mM trizma base(pH 10.5)로 용출시켜 565nm에서 ELISA reader(Bio-Tek, Inc., U.S.A)로 측정하여 대조군과 비교하였다.

8. 통계처리

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

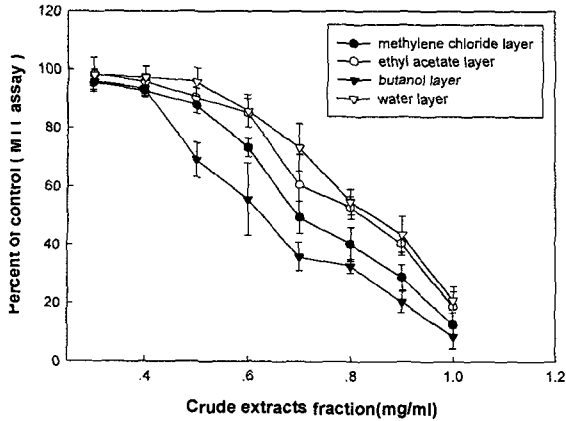


Fig. 1. Comparative 24 hrs cytotoxicity of each layer crude extracts towards human kidney epithelial cell A498 assessed with MTT assay. The data are presented as the arithmetic mean percent of the controls \pm S.D.

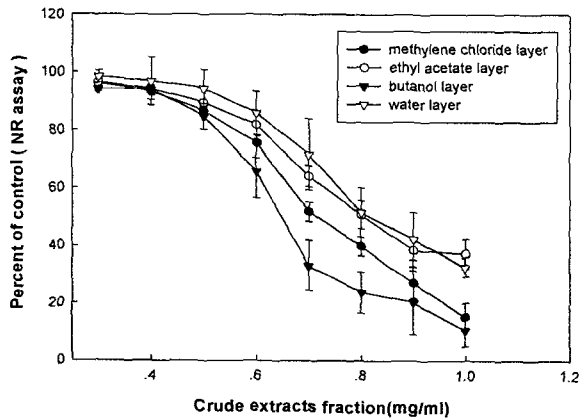


Fig. 2. Comparative 24hrs cytotoxicity of each layer crude extracts towards human kidney epithelial cell A498 assessed with NR assay. The data are presented as the arithmetic mean percent of the controls \pm S.D.

결과 및 고찰

18세기 이후 대황은 유럽, 아시아 전지역에서 만병 통치약으로 알려져 있고, 중국에서는 이미 전국시대의 산해경에 기재되어서 지금까지 명약으로 단방 또는 복합으로 약용되어 왔다. 이러한 대황은 전통적으로 진정, 지혈, 구충, 항균, 항종양, 혈압강하 등에 효과가 알려져 있으며, 한방에서는 변비, 만성설사, 장염, 황달, 복막염, 담석증의 치료 등에 이용되고 있다. 최근 여러 가지 천연물질로부터 생약제를 개발하기 위

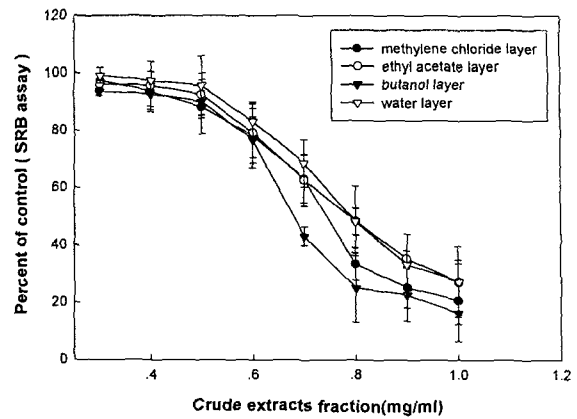


Fig. 3. Comparative 24 hrs cytotoxicity of each layer crude extracts towards human kidney epithelial cell A498 assessed with SRB assay. The data are presented as the arithmetic mean percent of the controls \pm S.D.

한 노력이 계속되고 있다.

본 실험은 전통적으로 한방에서 진정, 지혈, 담석증, 신장이상 등의 치료제로 사용되어지고 있는 대황을 시중에서 구입하여 추출방법에 따라 methylene chloride, ethyl acetate, butanol, water 등의 용매를 사용하여 추출물 분획을 얻었다. 얻어진 여러 층의 추출물 분획을 사람의 신장 상피세포로부터 얻어진 A498 세포주를 사용하여 1차적 세포독성검사법인 비색법을 통해 세포에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 1~3).

MTT 방법에 따라 용매별 추출물 분획을 여러 농도로 희석하여 A498세포주에 처리한 세포독성조사 결과는 Fig. 1과 같다. 용매 종류에 따라 얻어진 추출물 분획을 농도별로 세포에 처리하였을 때 세포에 미치는 영향은 약간의 차이를 보였는데 물을 용매로 사용하여 얻은 추출물이 가장 세포에 미치는 영향이 낮게 나타났다. 다음은 ethyl acetate와 methylene chloride를 용매로 한 추출물의 순이었고, butanol을 용매로 하여 얻은 추출물을 처리하였을 때 세포에 미치는 영향이 가장 크게 나타났는데 butanol 층의 경우 0.4mg/ml 이상의 농도처리시 세포에 미치는 영향이 다른 용매 추출물보다도 크게 나타났다. 이는 약제를 추출하는데 있어 추출물에 따라 세포에 미치는 독성이 있는 것으로 사료된다.

Borenfreund 등¹²⁾은 MTT와 NR의 흡광도를 비교하여 NR₅₀과 MTT₅₀농도를 기준으로 하여 NR₅₀, MTT₅₀ < 100 μ M일 때 고독성, 100 μ M < NR₅₀과 MTT₅₀ < 1,000 μ M일 때 중간독성, 1,000 μ M < NR₅₀과 MTT₅₀ < 2,000 μ M일 때 저독성, 2,500 μ M <

NR₅₀과 MTT₅₀일 때 무독성 등의 판정기준을 제시한 바 있다. 이러한 방법은 어떠한 물질을 세포에 처리하여 살아 있는 세포의 생존율을 확인하는 방법인데 흡광계수가 50%를 나타내는 농도를 NR₅₀, MTT₅₀으로 하여 세포에 미치는 물질의 독성을 비교평가 하는 방법이 많이 이용되고 있으며 *in vitro*에서 독성물질의 농도결정 및 독성판정에 가장 많이 이용하고 있는 방법이다. 이러한 방법에 따라 실험을 실시하여 본 결과 butanol을 용매로 하여 얻은 대황추출물의 경우 MTT₅₀이 0.63 mg/ml, methylene chloride을 용매로 사용하여 얻은 추출물의 경우 MTT₅₀이 0.70 mg/ml, ethyl acetate을 용매로 사용하여 추출물을 경우 MTT₅₀이 0.82 mg/ml, water를 용매로 사용하여 얻은 추출물의 경우 0.84mg/ml로 나타내었다. 이러한 결과에서도 각각의 용매로부터 얻은 대황 추출물 분액에 따라 A498 세포에 미치는 세포독성에서 차이를 나타내었다.

NR 방법에 의한 세포독성조사 결과는 Fig. 2와 같다. 4종류의 용매를 이용하여 얻은 대황 추출물 분액을 A498 세포주에 처리하여 얻은 세포독성 결과는 MTT의 결과와 유사하게 나타났다. 그리고 NR₅₀의 값의 경우 butanol을 용매로 사용하여 얻은 대황 추출물의 NR₅₀값은 0.65mg/ml이었고, methylene chloride를 용매로 사용하여 얻은 추출물의 경우 0.73mg/ml, ethyl acetate를 용매로 사용하여 얻은 추출물의 경우 0.81mg/ml, water를 용매로 사용하여 얻은 추출물의 경우 0.82mg/ml로 나타났는데 이러한 결과로 볼 때 세포에 미치는 용매별 차이는 있는 것으로 사료된다.

SRB 방법을 이용한 세포독성조사 결과는 Fig. 3과 같이 나타냈다. 4종류의 용매를 이용하여 얻은 대황 추출물 분액을 A498 세포에 처리한 결과는 MTT, NR처리의 결과와 유사하게 butanol, methylene chloride, ethyl acetate, water를 용매로 사용하여 얻은 추출물의 순으로 세포에 미치는 정도가 차이를 보였다. 그 차이는 각각의 용매로부터 얻은 추출물 분액 처리농도의 0.6mg/ml까지는 뚜렷하게 구별되지 않았고 그 이상의 농도에서 butanol이 가장 큰 독성을 나타냈으며 그 이상의 농도에서는 유사한 경향성을 나타내었다. butanol을 용매로 사용하여 얻은 대황추출물의 경우 SRB₅₀ 값은 0.68mg/ml이었고 methylene chloride의 경우 0.75mg/ml, ethyl acetate와 water의 경우 0.79mg/ml과 0.80mg/ml를 나타내었다.

각종 화학물질의 세포독성을 검정하는 방법으로 MTT 정량, NR 정량, SRB 정량법이 많이 사용되는데 이는 세포내 소기관의 활성을 비색방법을 이용하여

정량적으로 세포독성을 비교 측정하는 방법이다. MTT 정량법은 미토콘드리아의 succinate dehydrogenase의 활성도를 통해 세포독성을 측정할 수 있는 방법^{13,14})이고, NR 정량법은 lysosome에 대한 세포 소기관의 독성을 규명할 수 있는 방법^{10,15})인데 미국 국립 암연구소에서 항암제 등의 독성물질 검정을 위한 좋은 방법으로 제안한 바 있다¹⁶). SRB 정량법은 Lowry나 Bradford 방법처럼 총단백질을 단시간에 간단히 단백질을 정량할 수 있는 방법¹¹)이다.

위와 같은 방법을 이용하여 실험한 결과 methylene chloride, ethyl acetate, butanol, water을 용매로 하여 얻은 대황 추출물을 사람의 신장 상피세포인 A498 세포주에 처리하였을 경우 4가지 추출용매로 얻은 대황 추출물이 처리농도의 증가에 따라 세포에 미치는 영향이 차이를 나타내었다. 특히 butanol을 용매로 사용하여 얻은 대황 추출물이 다른 3가지 용매를 사용하여 얻은 대황 추출물 보다 세포에 미치는 영향이 크게 나타났으며 50%의 세포독성을 나타내는 결과 값(MTT₅₀, NR₅₀, SRB₅₀)의 비교에서도 차이를 나타내었다. 이러한 결과는 한 등¹⁷)이 인체 피부암세포에 적용하여 세포수 생존율, MTT 정량 및 LDH 정량을 실시한 결과와 비교할 때 메탄올, 에탄올, 클로로포름 층으로부터 얻은 추출액이 세포에 미치는 영향과 항암작용에 있어 차이를 보인다는 결과와 유사하였다. 따라서 추출시 사용하는 용매에 따라 세포에 미치는 영향이 다름을 확인할 수 있었다.

각각의 용매로부터 얻어진 대황 추출물을 세포에 처리하였을 경우 정량분석 방법에 따른 차이는 MTT 방법이 다른 분석방법보다 예민하게 나타났는데 이러한 실험에 사용하는 물질에 따라 분석방법에 차이를 보인 기 보고된 결과들과 일치하였다^{18,19}). 그리고 한 등¹⁷)의 클로로포름 분획에 따른 실험에서 항암활성이 분획별 차이가 있는 것으로 보고하였는데 이는 분획층에 따라 약효가 차이가 있음을 나타낸다.

따라서 본 실험에서도 분획층에 따른 약효는 차이가 있을 것으로 예상되므로 분획층에 따른 천연약제 물질에 대한 성분분석과 지속적인 세포 독성검사와 약효검사 및 작용기전에 관한 연구를 병행 실시하여 지속적인 천연약제물질을 개발에 필요한 기초 실험을 시행할 계획이다.

요 약

본 연구에서는 전통적으로 담석증, 신장치료 등의 한약제로 많이 사용하는 대황을 여러 용매를 사용하

여 얻은 대왕추출물 분액에 대한 세포독성을 여부를 MTT 정량법, NR 정량법, SRB 정량법을 이용하여 조사하였다.

1. 추출 용매 methylene chloride, ethyl acetate, butanol, water로부터 얻은 대왕추출물 모두 처리농도에 따라 세포에 미치는 영향이 증가하였다.

2. Butanol을 용매로 사용하여 얻은 대왕추출물 분액이 다른 3가지 용매로부터 얻은 대왕추출물보다 세포에 미치는 영향이 크게 나타났고 water를 용매로 사용하여 얻은 추출물이 A498 세포주에 미치는 영향이 가장 낮게 나타났다.

3. Butanol을 추출 용매로 하여 얻은 대왕추출물이 A498 세포주에 미치는 영향이 가장 컸는데 그 추출물에 대한 MTT₅₀, NR₅₀, SRB₅₀값은 각각 0.63mg/ml, 0.65mg/ml, 0.68mg/ml이었고, 가장 영향이 적은 water의 경우 MTT₅₀, NR₅₀, SRB₅₀값은 각각 0.84mg/ml, 0.82mg/ml, 0.80mg/ml이었다.

4. 정량방법 간의 대왕추출물에 대한 반응은 MTT 정량법이 가장 민감하게 나타났다.

참고문헌

- 허문영, 류재천 : Galangin의 유전독성 억제효과와 작용 기전. *한국 환경성독연변이·발암원학회지*, 18, 77~82 (1998).
- Serrano, A., Palacios, C., Roy, G., Cespon, C., Villar, M. L., Nocito, M. and Gonzalez-Porte, P. : Divivative of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation, *Arch. Bio-Chem. Biophys.*, 350, 49~54 (1998).
- Saxena, G., McCutchenon, A. R., Farmer, S., Towers, G.H. and Handcock, R. E. : Antimicrobiol constituents of *Rhus glabra*, *J. Ethnopharmacol.*, 42, 95~99 (1994).
- 김승경, 김영길, 이미경, 한중수, 이진하, 이현용, : 추출 용매에 따른 오갈피속 근피의 생리활성 기능 탐색 및 비교, *한국약용작물학회지*, 8, 21~28 (2000).
- 육창수 : 원색 *한국약용식물도감*, 아카데미서적, p.158 (1993).
- 육창수 : *한약학 II*, 동명사 p.206 (1992).
- 허준 : *국역증보동의보감*, 남산당, p.1204 (1981).
- 한대석 등 : *본초학*, 동명사, p.83 (1962).
- Mosmann, T. : Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55~63 (1983).
- Borenfreund, E. and Puerner, J. A. : A simple quantitative procedure using monolayer cultureds for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *Tissue Culture Method*, 9, 7~9 (1984).
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D. A., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D. T., Warren, J., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. R. : New colorimetric cytotoxic assay for anticancer drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 1107~1112 (1990).
- Borenfreund, E., Babich, H. and Martin-Alguacil, N. M. : Comparison of two *in vitro* cytotoxicity assay - The Neutral Red(NR) and Tetrazolium MTT tests, *Toxicol. in vitro*, 2, 1~6. (1988).
- Borenfreund, E. and Babich, H. : *in vitro* cytotoxicity of heavy metals, acrylamide and organotin salts to neural cells and fibroblasts. *Cell. Biol. Toxic.*, 3, 63~79 (1987).
- Borenfreund, E., H. Babich and Martin-Alguacil, N. : Rapid chemosensitivity assay with human normal and tumor cells *in vitro*. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 26, 1030~1034 (1990)
- Babich, H., Zuckerbraun, H. L., Barber, I. B., Babich, S. B. and Borenfreund, E. : Cytotoxicity of Sanguinarine chloride to cultured Human cells from oral tissue. *Pharmacol. & Toxicol.*, 78, 397~403 (1996).
- Carmichael J, Degraff, W. G, Gazdar, A. F, Minna, J. D. and Michell, J. B. : Evaluation of a tetrazoliumbased semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research*, 47, 936~942 (1987).
- 한두석, 김영일, 최규은,곽정숙, 백승화 : 한국산 생약으로부터 항암물질의 개발 (제7보). 소엽의 chloroform 가용성 분획이 인체 구강상피암종세포에 미치는 세포 독성작용. *한국 환경성독연변이·발암원학회지*, 18, 37~42 (1998).
- 한두석, 박승택, 백승화 : Epigallocatechin gallate의 인체 피부흑색종세포와 인체 구강유상피암종세포에 대한 성장억제효과, *한국 환경성독연변이·발암원학회지*, 18, 98~103 (1998).
- 한두석, 이명호, 최규은, 백승화 : 비색분석법에 의한 포고령 추출물의 항암평가, *한국 환경성독연변이·발암원학회지*, 18, 104~108 (1998).

(2000년 10월 16일 접수)