

## 농길리 메탄올 추출물의 세포독성

한두석, 정우영, 박명오, 신민교<sup>1</sup>, 오현주<sup>2</sup>, 백승화<sup>2</sup>

원광대학교 치과대학 구강해부학교실, 한의과대학 본초학교실<sup>1</sup>, 한의학전문대학원 한약자원개발학과<sup>2</sup>

### Cytotoxicity of the Methanol Extract of *Crataegia sibirica* L.

Du-Seok Han, Woo-Young Chung, Myung-Oh Park, Min-Kyo Shin,  
Hyun-Ju Oh<sup>2</sup> and Seung-Hwa, Baek<sup>2</sup>.

Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Department of Herbalogy, School of Oriental Medicine<sup>1</sup>  
and Department of Herbal Resources Development, Professional Graduate School of Oriental Medicine<sup>2</sup>,  
Wonkwang University

The cytotoxic activity of *Crataegia sibirica* on cultured NIH 3T3 fibroblasts and human oral epithelioid carcinoma cells (KB) were evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide (MTT) colorimetric method. These fractions of methanol extract of *Crataegia sibirica* showed inhibitory effect in vitro in the milligram range against KB cell lines. In general, the antitumor activities of these fractions were dose-dependent over the milligram range. The comparison of IC<sub>50</sub> values of these fractions in tumor cell lines showed that their susceptibility to these fractions decrease in the following order: Fr. 4 > Fr. 6 > Fr. 10 > Fr. 2 > Fr. 11 > Fr. 3 > Fr. 8 > Fr. 7 > Fr. 9 > Fr. 1 > Fr. 5 by the MTT assay. These fractions were tested for their cytotoxic effects on NIH 3T3 fibroblasts using MTT assay. They exhibited potent cytotoxic activities in vitro in the milligram range against NIH 3T3 fibroblasts. In general, the cytotoxic activities of these fractions were dose-dependent over the milligram range. The comparison of CD<sub>50</sub> values of these fractions in NIH 3T3 fibroblasts shows that their susceptibility to these fractions in decrease the following order: Fr. 10 > Fr. 9 > Fr. 2 = Fr. 4 > Fr. 8 > Fr. 11 > Fr. 1 = Fr. 7 > Fr. 3 > Fr. 5 = Fr. 6 by the MTT assay. These results suggests that fraction 5 has the most growth - inhibitory activity against KB cell lines.

**Key words:** Cytotoxic and antitumor activity, *Crataegia sibirica*, NIH 3T3 fibroblast, KB cells, MTT assay

## 서 론

최근 암 발생률은 산업의 급격한 발달, 지구 생태계 및 식생활 변화 등으로 과거에 비해 급격히 증가하고 있으나, 아직도 암의 발생기전이 불명확하여 난치성 질병으로 알려져 있다. 현재 사용되고 있는 의약품들은 효소제제나 백신 등

의 생물학적 제제 순수합성 의약품 및 천연물 유래의 의약품 등으로 크게 구분할 수 있는 데, 이 중 유전자, 효소, 백신등을 이용한 항암제는 실용단계에 있는 상태는 아니며, 화학요법에 의해 개발된 많은 항암제는 암의 종류에 따라 약리작용이 다양하고<sup>1,2)</sup>, 독성에 의한 부작용이 다양하게 나타나기 때문에 암 치료시 문제점으로

지적되고 있다<sup>1,2)</sup>. 또한 항암제는 암세포의 성장을 효과적으로 억제하기도 하지만, 때로는 정상 세포에 대하여 독성을 나타내기도 한다. 따라서 국내의 많은 학자들은 이 같은 독성의 작용기전을 밝히기 위하여 많은 연구를 수행하고 있으며<sup>3-8)</sup>, 근래에는 세포배양기술이 급격히 발달함에 따라 각종 세포를 배양한 후, 여러 독성물질을 투여함으로써 이들의 세포독성에 대한 기전을 세포수준에서 규명하려는 연구도 활발히 진행되고 있다. 그리고 항암제의 부작용을 최소화하고 치료효과를 높이기 위하여, 생약 및 천연물을 이용한 항암제의 개발이 지속적으로 시도되고 있다<sup>5-12)</sup>. 최근에 신 등<sup>13)</sup>은 농길리의 물 추출물이 NIH 3T3 세포에 대한 세포독성이 거의 없고, 인체 구강유상피암종세포에 대하여 항암활성이 좋은 약재로 보고한 바 있다.

농길리의 다양한 용도와 암종세포에 대한 세포독성이 보고된 문헌<sup>14-16)</sup>을 근거로 물과 몇 가지 유기용매로 농길리 메탄을 추출물의 분획을 조제하여 NIH 3T3 섬유모세포와 인체 구강유상피암종세포에 대한 세포독성을 측정하고, 세포의 광학현미경적 관찰을 실시하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에서 사용한 농길리는 1998년 경기도 양평군 용문면에서 채집 (N970811)하여, 외부 형태를 비교 조사하여 확인 후 사용하였다. 실험에 사용된 식물체는 원광대학교 한의학전문대학원 천연물학교실에 보관되어 있다.

### 2. 기기 및 시약

Thin layer chromatography (TLC)는 silica gel plate (0.25 mm, polygram sil N-HR/UV<sub>254</sub>,

E. Merck)를 octadecyl-functionalized silica gel (C18)는 Aldrich 제품을 사용하였고, 추출용매는 시약급을 재증류하여 사용하였다.

세포의 배양은 CO<sub>2</sub> incubator (Shellab Co., USA)를 사용하였고, 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기를 사용하였으며, 현미경은 도립현미경 (Inverted Microscope, Olympus, Japan)을 사용하였다. MTT 정량분석법은 ELISA reader (Spectra Max 250, USA)를 사용하였다. 농길리 추출에 사용한 methanol, *n*-hexane, chloroform, acetonitrile, H<sub>2</sub>O는 증류하여 사용하였으며, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, trypsin-EDTA 시약은 특급시약으로 Sigma에서 구입하여 사용하였다. 기타 시약은 일급시약을 사용하였다.

### 3. 추출방법

본 연구에 사용한 농길리는 경기도 양평군 용문면에서 채취한 것을 검정받아, 농길리 25 g을 500 ml 등근 플라스크에 메탄올 375 ml를 넣고, 상온에서 24시간 동안 추출하였다. 이와 같이 세 번 반복 추출하여 얻은 추출물을 0.4 μm 필터로 여과한 후, 여과액을 감압농축시킨 후 냉동건조하였다. 건조된 양은 메탄올 추출물 2.743 g을 얻었다. 농길리 추출물 2.5 g을 10 ml 등근 플라스크에 넣고, 메탄올 (3 ml)을 넣어 녹인 후, C18 (5 g)을 넣어 용매를 감압증류시키어 제거시킨다. Coating된 농길리 메탄올 추출물을 C18 (25 g)이 충전된 컬럼 크로마토그래피에 넣어 전개용매로 용리시키어 분획을 얻었다. 위의 방법에 따라 용매를 감압농축하여 분획 1, 1,483 mg, 분획 2, 58 mg, 분획 3, 58 mg, 분획 4, 113 mg, 분획 5, 68 mg, 분획 6, 304 mg, 분획 7, 65 mg, 분획 8, 11 mg, 분획 9, 15 mg, 분획 10, 25 mg, 분획 11, 18 mg을 얻었다.

### 4. 시료의 조제

조제한 시료는 즉시 4°C 냉장고에 저장하였다가, 사용직전에 에틸알콜로 동량희석하였다. 각각 1 : 1 (ml : g) 로 희석한 시료는 실험농도에 적합하도록 10배 serial dilution을 하여 10<sup>-1</sup> mg/ml에서 10<sup>-8</sup> mg/ml를 결정하여 10<sup>-2</sup> mg/ml에서 10<sup>-5</sup> mg/ml를 실험에 사용하였다.

### 5. 세포배양

농길리 메탄을 추출물을 분리한 분획의 세포독성을 측정하기 위하여, 원광대학교 의과대학 해부학교실에서 분양받은 NIH 3T3 섬유모세포는 EMEM배지에, 항암작용을 측정하기 위하여, 서울대학교 암연구소에서 분양 받은 인체 구강유상피암종세포 (ATCC No. OCL-17)는 RPMI-1640 배지 (Gibco, USA)에 10% fetal bovine serum (Gibco, USA)과 penicillin G (25 unit/ml) streptomycin (25 µg/ml)을 첨가하여 사용하였다. 세포의 배양은 온도 37 °C, 습도 95%, 탄산가스 농도 5% (CO<sub>2</sub> incubator, Shellab, USA)를 사용하였다. 실험을 위하여 일차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin으로 처리하여, Turk형 혈구계산기를 이용하여 세포수가 2 × 10<sup>4</sup> cells/ml 되도록 세포부유액을 만들었다.

### 6. MTT정량 분석법

Mosmann의 방법<sup>17)</sup>에 의하여, 세포를 농길리 메탄을 추출물을 분리한 분획이 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 분석 당일 조제한 MTT (Sigma) 50 µg/ml가 포함된 배양액을 well당 1 ml씩 넣어 3시간 배양하였다. 배양 후 배양액을 버리고, dimethylsulfoxide (DMSO)를 2 ml/well씩 넣어 5분간 실온 방치하여 MTT formazan을 용해한 후, ELISA reader (Spectra Max 250, USA)로 MTT의 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

### 7. 세포의 광학현미경적 관찰

살아있는 세포의 형태를 관찰하기 위하여 NIH 3T3 섬유모세포와 인체 구강유상피암종세포는 MTT정량분석을 하기전에 도립현미경으로 관찰하였다.

### 8. 통계처리

모든 실험결과는 평균치와 표준오차를 계산하였고, 대조군과 실험군간의 차이는 student's t-test를 사용하여, P-value가 0.05미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

## 결과 및 고찰

물과 유기용매를 사용하여 농길리 메탄을 추출물에서 분리한 분획 (Table I)을 NIH 3T3 섬유모세포와 인체 구강유상피암종세포에 적용한 후 세포독성검사에 다양하게 이용되고 있는 MTT 정량분석법을 이용하여 세포독성을 측정 한 결과는 Table II와 같다.

Table I의 농길리 메탄을 추출물에서 분리한 물분획인데 NIH 3T3 섬유모세포에 대한 MTT<sub>50</sub>은 0.038 mg/ml 농도이고, 인체 구강유상피암종 세포에 대한 MTT<sub>50</sub>은 0.042 mg/ml 농도이었다. 10<sup>-2</sup> mg/ml농도에서 NIH 3T3 섬유모세포의 대조군에 대한 MTT 흡광도는 78.9%까지 감소하였으나, 인체 유상피암종세포의 대조군에 대한 MTT흡광도는 82.5%까지 감소하는데 그쳤다.

**Table 1.** The antitumor activities of the fractions of the methanol extract of *Crotalaria sessiliflorae* L. on NIH 3T3 fibroblasts and human oral epithelioid carcinoma cells. Comparison of IC<sub>50</sub> for the fractions of the methanol extract of *Crotalaria sessiliflorae* L. by the MTT assay.

Fraction <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> (mg/ml) <sup>b</sup>										
	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr.4	Fr. 5	Fr. 6	Fr.7	Fr. 8	Fr. 9	Fr. 10	Fr. 11
Mobile Phase	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O: CH <sub>3</sub> CN (3 : 1)	H <sub>2</sub> O: CH <sub>3</sub> CN (1 : 1)	H <sub>2</sub> O: CH <sub>3</sub> CN (1 : 3)	CH <sub>3</sub> CN	CH <sub>3</sub> CN: CHCl <sub>3</sub> (1 : 1)	CHCl <sub>3</sub>	n-hexane	CHCl <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CN	CHCl <sub>3</sub>
Yield (mg)	1,483	58	58	113	68	304	65	11	15	25	18
NIH 3T3	0.038	0.079	0.024	0.079	0.000	0.000	0.038	0.070	0.089	0.131	0.039
KB	0.042	0.093	0.080	1.640	0.026	0.170	0.071	0.073	0.065	0.158	0.085

<sup>a)</sup> Each fraction was examined in four concentrations in triplicate experiments.

<sup>b)</sup> IC<sub>50</sub> represents the concentrations of a compound required for 50% inhibition of cell growth.

농길리 메탄올 추출물에 대한 이동상의 조건을 물과 아세트니트릴을 3 : 1로 혼합하여 분리한 분획으로서 MTT<sub>50</sub>은 NIH 3T3 섬유모세포에서 0.079 mg/ml 농도이었으며, 인체 구강유상피암종세포에서는 0.093 mg/ml의 분석값으로 나타났으므로, 건강세포에 대한 세포독성과 암종세포에 대한 세포독성이 10<sup>-2</sup> mg/ml 농도에서 대조군에 대한 MTT 흡광도의 감소현상은 유사하게 나타났다. 이동상의 조건을 물과 아세트니트릴을 1 : 1로 혼합하여 분리한 분획으로 NIH 3T3 섬유모세포에 대한 MTT<sub>50</sub>은 0.024 mg/ml 농도로 나타났으며, 인체 구강유상피암종세포에 대한 MTT<sub>50</sub>은 0.080 mg/ml 농도이었다. 건강세포인 NIH 3T3 섬유모세포에 대한 세포독성이 더 강한 것으로 판정되었다. 이동상의 조건을 물과 아세트니트릴을 1 ; 3으로 혼합하여 분리한 분획으로, NIH 3T3 섬유모세포에 대한 MTT<sub>50</sub>은 0.079 mg/ml농도로 나타났으며, 인체 구강유

상피암종세포에 대한 MTT<sub>50</sub>은 1.640 mg/ml 농도이었으며, 대조군에 대하여 건강세포인 NIH 3T3 섬유모세포와 인체 구강유상피암종세포에 대한 세포독성이 10<sup>-2</sup> mg/ml의 농도에서는 대조군에 대한 MTT 흡광도는 같은 분석값 (4.161 ± 0.000)으로 나타났다. 건강세포인 NIH 3T3 섬유모세포에 대한 세포독성이 더 강한 것으로 측정되었다. 이동상의 조건을 아세트니트릴을 이용하여 분리한 분획으로 NIH 3T3 섬유모세포에 대한 MTT 흡광도의 분석값은 대조군을 포함하여, 모든 농도에서 4.153±0.000 수치로 나타났으며, MTT<sub>50</sub>값은 0.000 mg/ml 농도로 세포독성이 없었으나, 인체 구강유상피암종세포에 대한 MTT<sub>50</sub>값은 0.026 mg/ml로 10<sup>-2</sup> mg/ml 농도에서 77.1 %까지 MTT 흡광도가 감소하였다. 이동상의 조건을 아세트니트릴과 클로로포름을 1 : 1로 혼합하여 분리한 분획으로, NIH 3T3 섬유모세포에 대한 MTT 흡광도의 분석값은 아세트니

트릴 이동상을 사용한 분획과 같은 분석값을 얻었으며,  $MTT_{50}$ 은 0.000 mg/ml 농도이었다. 인체 구강유상피암종세포에 대한  $MTT_{50}$ 은 0.170 mg/ml 농도였으며,  $10^{-2}$  mg/ml 농도에서도  $MTT$  흡광도의 분석값이  $2.845 \pm 0.022$  (95.0%)으로 인체 구강유상피암종세포에 대한 세포독성이 약한 것으로 측정되었다. 이동상의 조건을 클로로포름을 이용하여 분리한 분획으로, NIH 3T3 섬유모세포에 대한  $MTT_{50}$ 은 이동상을 몰로 용리하였을때와 같은 분석값으로 나타났으며, 인체 구강유상피암종세포에 대한  $MTT_{50}$ 은 0.071 mg/ml 농도로 건강세포에 대한 세포독성이 강한 것으로 판정되었다. 이동상의 조건을 헥산을 이용하여 분리한 분획으로, NIH 3T3 섬유모세포에 대한  $MTT_{50}$ 은 0.070 mg/ml 농도와, 인체 구강유상피암종세포에 대한  $MTT_{50}$ 은 0.073 mg/ml 농도로 나타났으며 건강세포인 NIH 3T3 섬유모세포와 인체 구강유상피암종세포에 대한 세포독성이 유사한 것으로 측정되었다. 이동상의 조건을 클로로포름을 사용하여 분리한 분획으로, NIH 3T3 섬유모세포에 대한  $MTT_{50}$ 은 0.089 mg/ml 농도와, 인체 구강유상피암종세포에 대한  $MTT_{50}$ 은 0.065 mg/ml 농도로 나타났으며, 인체 구강유상피암종세포에 대한 세포독성이 더 강한 것을 측정할 수 있었다. 이동상의 조건을 아세트니트릴을 사용하여 분리한 분획으로, NIH 3T3 섬유모세포에 대한  $MTT_{50}$ 은 0.131 mg/ml 농도이었으며, 인체 구강유상피암종세포에 대한  $MTT_{50}$ 은 0.158 mg/ml 농도로 건강세포인 NIH 3T3 섬유모세포에 대한 세포독성이 강한 것으로 측정되었다. 그러나  $10^{-2}$  mg/ml 농도에서는 대조군에 대한  $MTT$  흡광도의 분석값은 93%로 같은 측정치를 나타냈었다. 이동상의 조건을 클로로포름을 사용하여 분리한 분획으로, NIH 3T3 섬유모세포에 대한  $MTT_{50}$ 은 0.131 mg/ml 농도로 나타났으며, 인체 구강유상피암종세포에 대한  $MTT_{50}$ 은 0.158 mg/ml 농도로 건강세포인 NIH 3T3 섬유모세포에 대한 세포독성이 강한 것으로 측정되

었다 (Table 1).

그림 1에 의하면, 농길리 메탄을 추출물의 분획 3과 5는 다른 분획에 비하여 농도가 증가함에 따라 인체 구강유상피암종세포에 대한 세포의 성장억제율이 증가하였다.

그림 2에 의하면, 농길리 메탄을 추출물의 분획 5와 6은 다른 분획에 비교해보면, 농도의 증가에 따라 세포독성이 나타나지 않았으나, 다른 분획에서는 농도증가에 따른 세포의 독성이 증가함을 볼 수 있었다. 따라서 분획 5에 대한 생리활성물질을 규명할 필요가 있다고 사료된다.

일반적으로 농길리 메탄을 추출물의 분획에 대한 인체 구강유상피암종세포의 항암활성은 분획의 농도 ( $10^{-2} \sim 10^{-5}$  mg/ml)에 의존하여, 분획의 농도에 대한 NIH 3T3 섬유모세포의  $IC_{50}$ 값은 다음과 같은 순서로 감소한다.  $MTT$  분석방법에 의하면: Fr. 10 > Fr. 9 > Fr. 2 = Fr. 4 > Fr. 8 > Fr. 11 > Fr. 1 = Fr. 7 > Fr. 3 > Fr. 5 = Fr. 6 순서로 나타났다. 인체 구강유상피암종세포에 대한  $IC_{50}$ 값의 비교는  $MTT$  정량분석법에 의하면: Fr. 4 > Fr. 6 > Fr. 10 > Fr. 2 > Fr. 11 > Fr. 3 > Fr. 8 > Fr. 7 > Fr. 9 > Fr. 1 > Fr. 5 순서로 감소하였다. 농길리 메탄을 추출물의 분획 5는 인체 구강유상피암종세포에 대하여 가장 강한 세포의 성장억제효과를 보였으나, NIH 3T3 섬유모세포의 세포독성은  $IC_{50} = 0.000$  mg/ml 농도로 독성이 나타나지 않았다. 앞으로 농길리 메탄을 추출물의 분획 5를 크로마토그래피법을 이용하여 생리활성물질을 분리 및 분석하고자 한다 (Table 1).

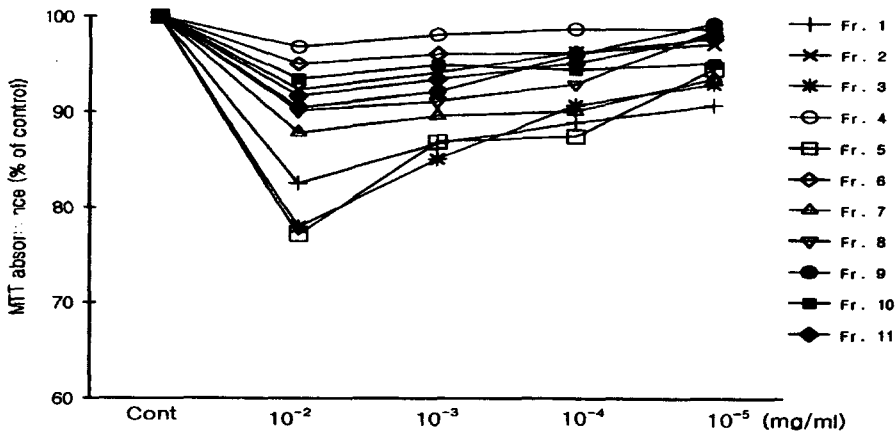


Fig. 1. *In vitro* antitumor activities of fractions of the methanol extract of *Crotalariae sessiliflorae* L. by the MTT assay. These fractions were serially diluted in RPMI-1640 with 10 % FBS and mixed with equal volume of KB cells ( $5 \times 10^4$  cells). The colorimetric assay was performed as described in materials and methods. Data are mean values of results obtained from four sets of experiments.

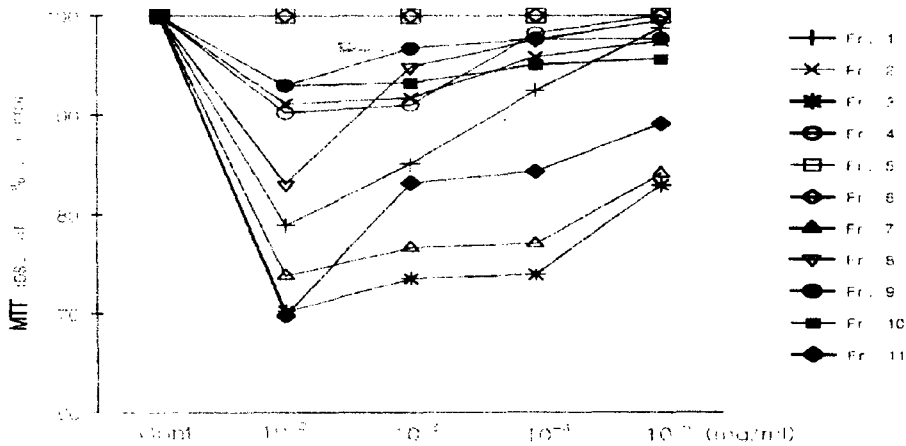


Fig. 2. *In vitro* cytotoxic effects of fractions of the methanol extract of *Crotalariae sessiliflorae* L. by the MTT assay. These fractions were serially diluted in RPMI-1640 with 10 % FBS and mixed with equal volume of NIH 3T3 fibroblasts ( $5 \times 10^4$  cells). The colorimetric assay was performed as described in materials and methods. Data are mean values of results obtained from four sets of experiments.

## 참고문헌

1. Gillman, A.G., Rall, T.W., Nies, A. and Talyor, P.: Goodman Gillman's: The Pharmacological Basis of Thrapeuties. Maxwell Macmillan, 18th, pp. 1202, 1991.
2. Hersh, E.M. and Ereish, E.T.: In Methods in Cancer Research, New York, Academic Press. pp. 335, 1986.
3. Yamazaki, M., Ueda, H., Fukda, K., Okamoto, M. and Yui, S.: Priming effects of vegetable Juice on endogeneous products of tumor necrosis factor. Biosci. Biotech. Biochem. 56, 149, 1992.
4. Takahashi, K., Fujita, Y., Mayumi, T., Hanma, T. and Kishi, T.: Effects of adriamycin cultured mouse embryo myocardial cells. Chem. Pharm. Bull. 35, 326-334, 1987.
5. Tompson, J. and Biggers, J.D.: Effects of inhibitors of protein synthesis on the development of preimplantation mouse embryos. Exp. Cell. Res. 41, 411-427, 1966
6. Molinaro, M., Siracusa, G. and Monesi, V.: Differential effects of metabolic inhibitors on early development in the mouse embryos at various stage of the cell cycle Exp. Cell. Res. 71, 261-264, 1972.
7. Ellem, K.O. and Gwatkin, R.B.L.: Patterns of nucleic acid synthesis in the early mouse embryos. Devel. Biol. 118, 311-330, 1968.
8. Cho, K.W. and Kwon, H.B.: Effects of progesterone and dibutyryl cyclic AMP on the RNA and protein synthesis of mouse oocytes and two cell embryos in vitro. Proc. Cell Natur. Sci. 1, 107-118, 1987.
9. Aburada, M.: Recent Advances in the Pharmacology of Kampo Medicine. pp. 275, 1988.
10. Kawamura, H., Takemoto, N., Maruyama, H., Komatsu, Y., Aburada, M. and Hosoya, E.: Recent Advances in the Pharmacology of Kampo Medicine. pp. 291, 1988.
11. Takemoto, N., Maruyama, H., Kawamura, H., Komatsu, Y., Aburada, M., Hosoya, E., Yamada, H., Klyohara, H. and Cyong, J. C.: Recent Advances in the Pharmacology of Kampo Medicine. pp. 345, 1988.
12. 한두석, 유현경, 백승화 : 소엽의 메탄올 분획이 피부암세포에 미치는 항암효과. 대한구강 해부학회지. 18, 19-26, 1994.
13. Shin, M.K., Song, M.J., Ryu, H.S., Han, D.S., Kang, K.U. and Baek, S.H.: Development of anticancer agents from Korean medicinal plants. Part 13. Studies on the cytotoxicity and antitumor activity of Herba Crotalariae sessiliflorae. Kor. J. Pharmacogn. 30: 130-136, 1999.
14. 신민교: 임상본초학, 도서출판 영림사, pp. 566-567, 1997.
15. 정보섭, 신민교: 도해향약 (도해) 대사전, 도서출판 영림사, pp. 676-675, 1990.
16. 중국약물대전편위원회: 중국약물대전, pp. 370, 1993
17. Mosmann, T: Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: Application of proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65, 55-63, 1983.