

## 소엽 Ethyl acetate 분획의 세포독성 평가

김성은, 천현자, 김일광<sup>1</sup>, 한두석<sup>2</sup>, 이현옥<sup>3</sup>, 안종웅<sup>4</sup>, 이미희<sup>5</sup>, 백승화  
원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, 1자연과학대학 화학과, 2치과대학 구강해부학교실, 3원광보건대학  
치위생과, 4한국화학연구소 화학물질 연구단, 5오시오 한의원

## Cytotoxic Evaluation of the Ethyl Acetate Soluble Fraction of *Perilla frutescens*

Sung-Eun Kim, Hyun-Ja Chun, Il-Kwang Kim<sup>1</sup>, Du-Seok Han<sup>2</sup>, Hyun-Ok Lee<sup>3</sup>, Jong-Woong Ahn<sup>4</sup>,  
Mee.-Hee Lee<sup>5</sup>, Seung-Hwa Baek

Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, 1 Department of Chemistry, College  
of Natural Sciences and 2 Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan 750-749,  
Korea, 3 Department of Oral Hygiene, Wonkwang Health Science, Iksan 750-570, Korea and 4 Korea Institute of  
Chemical Research, Natural Products Research Team, Daejeon 305-600, Korea. 5 Osio Oriental Medicine, Changwon  
641-111, Korea.

The Cytotoxic activity of the ethyl acetate soluble fraction of *Perilla frutescens* on human oral epithelioid carcinoma cell lines was evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) colorimetric method. The light microscopic study was carried out to observe the morphological changes of cultured human oral epithelioid carcinoma cell lines (KB). These results were obtained as follows ;

1. subfraction 1 of the ethyl acetate soluble fraction of *perilla frutescens* was shown significant cytotoxic activity ( $p < 0.001$ ) at 10-2 mg/ml concentration, this concentration was decreased the cytotoxic activity of 70.3% .
2. The comparison of IC<sub>50</sub> values of various subfractions in human oral epithelioid carcinoma cell lines was exhibited that their susceptibility to these subfractions decreased in the following order ; subfraction 5 > subfraction 4 > subfraction 3 > subfraction 2 > subfraction 1 by MTT assay. In light microscopy, the subfraction 1 of the ethyl acetate soluble fraction of *Perilla frutescens* showed the highest cytotoxic activity. These findings suggest that subfraction 1 possessed the most cytotoxic constituents.

**Key words:** *Perilla frutescens*, MTT assay, Cytotoxic activity, Human oral epithelioid carcinoma cell.

### 서론

차조기 앞인(1,2) 소엽 (*Perilla frutescens* Britton Var *Cripa Decaisne*)은 한방에서 발

한, 해열, 진통, 이뇨, 건위 등에 약리작용이 있고 거담제, 뇌질환, 혈액순환 촉진 등에 상용되기도 하며, *Furia* 3)과 *김4*)등은 향료, 조미료, 강장제, 식용색소 및 화장품 색소원료로 사용되며 *장 등5*)은 cyclodextrin과 essential oil (정

유)이 구강탈취제와 항 곰팡이 제재로 이용되기도 하며, Yamazaki 등6)은 소엽즙을 이용하여 다양한 실험을 수행하고 있으며, 박 등2)7)와 이 등8)은 염증성 피부질환 치료와 TNF (Tumor necrosis factor)에 영향을 미치며, 강한 항 돌연변이 효과 및 사람의 암세포 성장억제 효과가 큰 것으로 보고되었다.

한 등9)은 소엽에서 분리한 추출액이 NIH 3T3 섬유모세포와 생쥐의 피부암 세포에 미치는 세포독성과 항암작용에 대하여 보고하였다. 한 등10)은 세포독성이 적고 항암작용이 강한 메탄올 추출물과 세포독성이 강하고, 항암작용도 강한 에탄올 추출액에서 각각 5종류의 용매 분획을 조제하여, 인체피부암세포에 적용하여 세포수 생존율, MTT분석 및 LDH (lactate dehydrogenase)정량을 실시한 결과, 클로로포름 분획에서 항암활성이 유의하게 나타난 것으로 보고하였다. 최11)는 소엽의 다양한 용도와 약리효과를 근거로 독성이 작고, 항암작용이 강하게 나타난 자소엽의 메탄올 추출액에서 용매로 5종류의 분획을 만들어 이중 부탄올 가용층을 분획하여, 인체 구강유상피 암세포에 대한 항암작용을 측정하여 유의성 있는 결과를 보고한 바 있다. 따라서 본 연구는 세포독성효과의 1차 검색방법인 비색법중 가장 민감하고 안정적인 MTT분석법을 이용하여 세포독성을 평가하고자 하였다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 시료의 조제

본 실험에서 사용한 소엽은 1994년 충남 논산시 광석면에서 구입하여, 외부형태를 비교 조사하여 확인 후 사용하였다. 소엽 2,000 g을 평량하여 수용상에서 methanol을 3배가량 가하여 3시간 동안 환류하여 추출한 다음, 이 추출액을 여지로 여과하고, 여액을 감압농축하여,

메탄올 엑스 204.88 g을 얻었고, 이 메탄올 엑스를 물에 현탁한 후, n-hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, n-BuOH, H<sub>2</sub>O로 순차적으로 용매분획하였다. 이중 EtOAc 분획을 (8.1g) flash column chromatography 방법을 이용하여, ethyl acetate 와 n-hexane (gradient), ethyl acetate, MeOH로 용출시켜 TLC 확인 후, 5개의 분획을 얻었다(Fig.1). 이것을 4℃냉장고에 저장하였다가 사용직전에 생리식염수로 각각 1 : 1 (ml : mg) 동량희석하였으며 희석한 시료는 실험한 농도에 적합하도록 10배 serial dilution을 하여 10 ~ 10<sup>-2</sup> µg/ml 농도를 실험에 사용하였다. 사용된 시료는 원광대학교 한의학전문대학원 천연물학 교실에 보관되어있다.

### 2. 시약

RPMI1640, 10% fetal bovine serum, penicillin G (25 unit/ml) Gibco제 GR급이었으며, MTT정량에 사용한 시약은 Sigma사에서 구입하였고, silica gel (Kiesel gel 60 (Merck) 230-400 mesh), TLC plate (Kiesel gel 60F254 precoated plate (Merck) 0.25 mm), 발색시약은 5 : 10 : 85 = H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O를 사용하였다. 추출 및 분획용 용매는 EP급 용매를 재증류하여 사용하였으며 증류수는 3차 증류수를 사용하였다.

### 3. 실험기기

UV (254 nm, 365 nm), glass column (2.5 cm×70 cm)를 사용하였고, 세포의 배양은 CO<sub>2</sub> incubator (Shellab Co., USA)를 사용하였고, 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기를 사용하였으며, 현미경은 도립현미경 (Inverted Microscope, Olympus)을 사용하였다. MTT분석법은 ELISA reader (ETY-96, Japan)를 사용하였다.

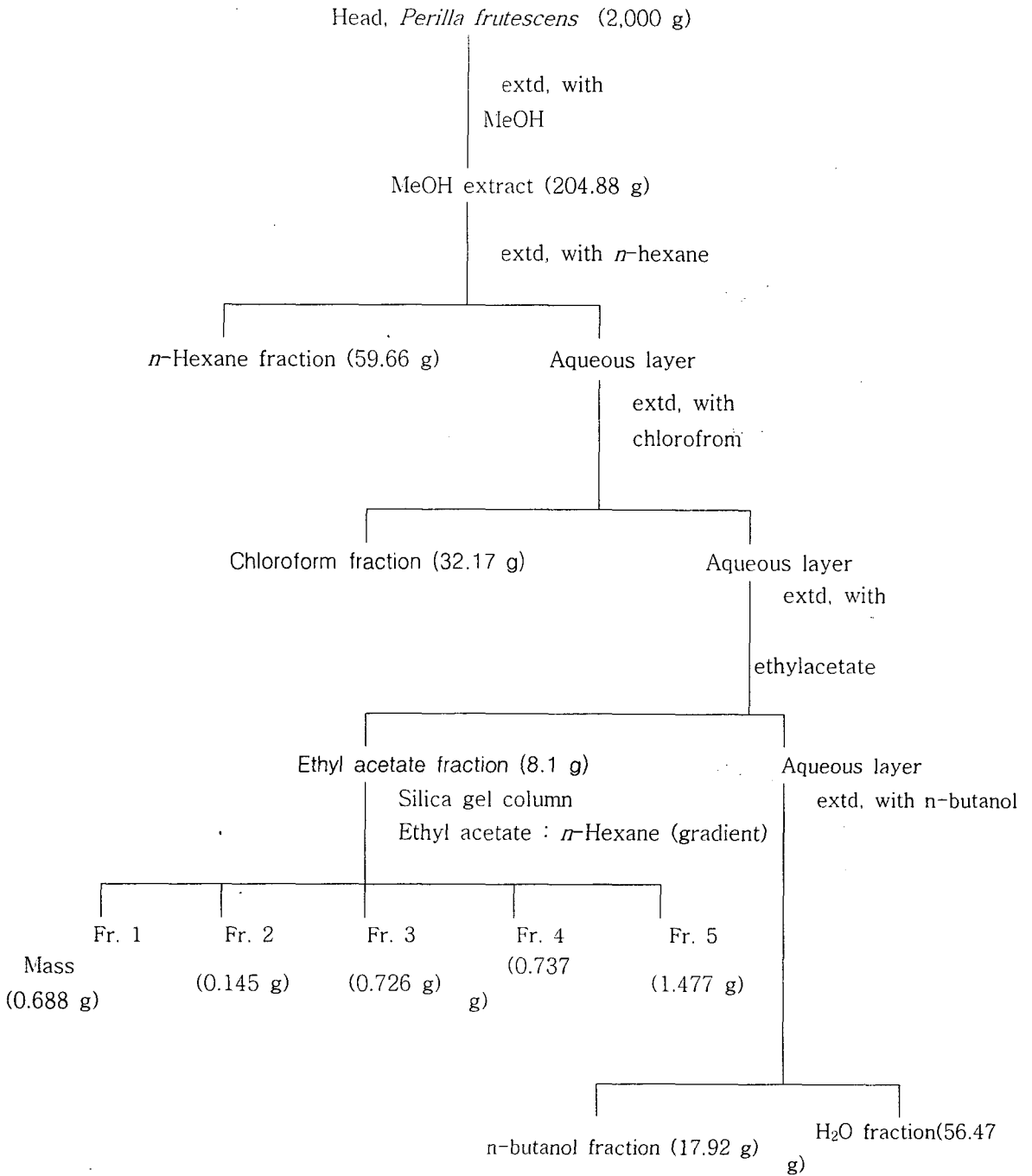


Fig. 1. Extraction and fractionation of head of *Perilla frutescens*

#### 4. 세포배양

인체 구강유상피 암세포(KB)는 RPMI1640 (Gibco, USA)에 10% fetal bovine serum (Gibco, USA)과 penicillin G (25 unit/ml)를 첨가하여 사용하였다. 세포의 배양은 온도 37°C, 습도 95%, 탄산가스 농도 5% (CO2 incubator, Shellab, USA)를 사용하였다. 실험을 위하여 일차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin으로 처리하여, Turk형 혈구계산기를 이용하여 세포수가  $2 \times 10^4$  cells/ml가 되도록 세포부유액을 만들었다.

#### 5. MTT 정량분석법

Mosmann의 방법<sup>12)</sup>에 의하여, 인체 구강유상피암종세포를 소엽 EtOAc 분획이 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 분석당일 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 실온 방치하여 MTT formazan을 용해한 후, ELISA reader로 MTT의 흡광도 510 nm를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

#### 6. 세포의 광학현미경적 관찰

광학현미경으로 세포를 관찰하기 위하여 인체 구강유상피암종세포를 48시간 배양한후, MTT 정량 하기 직전에 도립현미경으로 관찰하고 사진을 촬영하였다.

#### 7. 통계처리

대조군과 실험군간의 통계처리는 student's t-test에 준하였고, P-value가 0.05미만일 때

유의성이 있다고 판정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1. 소엽 에틸아세테이트 소분획의 분리 및 수득율

우리 연구팀에서는 소엽 메탄올 추출물을 여러 가지 유기용매로 분획한 후, 세포독성에 주로 사용되고 있는 검색법인 MTT분석법으로 구강유상피암종세포의 세포독성을 측정한 결과 유의성있는 결과를 얻었다.<sup>9,10)</sup> 따라서 이 메탄올 추출물을 순차적으로 용매 분획하였으며 이중 에틸 아세테이트 분획에서 silica gel이 충전된 칼럼 (2.5 cm × 70 cm)을 사용하여 소분획 1~5을 얻었다 용매로는 EtOAc : Hex (gradient)을 사용하였고, 각각의 소분획은 UV short and long wavelength에서 TLC spots의 수로 분획을 나누었다. TLC를 사용할 때 EtOAc : Hex (6 : 4) 와 CHCl<sub>3</sub> : MeOH (9 : 1)을 이동상으로 사용하였으며, 각각 분리된 점적수를 따라 결정하였다 (Table 1).

#### 2. 소엽의 에틸아세테이트 소분획이 KB 세포의 생존율에 미치는 영향

MTT측정법은 악성종양세포에 대한 화학물질들의 세포독성 내지는 증식정도를 발색의 차이에 의해 알아보는 방법으로 세포독성이나 증식에 미치는 영향을 빠르게 알아볼 수 있으며, 방사선 동위원소를 사용하지 않는다는 장점에 많이 이용되고 있다. MTT측정법은 세포 내에 있는 미토콘드리아 활성도를 알아봄으로써 세포의 독성정도를 알아보는 방법이다.

Table 1. Flash chromatography of ethyl acetate soluble compounds of the methanolic extract of leaves of *Perilla frutescens*<sup>a</sup>

Subfraction	Tube No	Yield (mg)	Rf values	Mobile phase
1	1	688	0.79	5 : 95 Ethyl acetate : Hexane
			0.75	
			0.81	
2	2-4	145	0.73	5 : 95 Ethyl acetate : Hexane
			0.65	
			0.71	
3	5-47	726	0.52	5 : 95, 7 : 93, 10 : 90, 15 : 85 Ethyl acetate : Hexane
			0.42	
			0.35	
4	48-73	737	0.71	15 : 85, 20 : 80 Ethyl acetate : Hexane
			0.83	20 : 80, 30 : 70, 50 : 50 Ethyl acetate : Hexane
5	74-108	1,477	0.67	100% Ethyl acetate
			0.63	100% Methanol

a All fractions were tested at 10 - 10<sup>-2</sup> µg/ml concentrations.

소엽의 에틸아세테이트 소분획이 인체 구강유상피암종세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 에틸 아세테이트의 5개분획을 실험직전에 생리식염수로 희석하여 10 ~ 10<sup>-2</sup> µg/ml 농도로 만든 후 각 농도별로 인체 구강유상피암종세포에 처리한 후 MTT 측정법을 이용하여 세포생존율을 관찰하였다. Fig. 2에서 보는 바와같이 소엽의 에틸아세테이트 소분획 1은 각 시료가 인체 구강유상피암종세포에 대하여, 10 µg/ml (p < 0.001) 농도에서는 세포수가 대조군의 70.3%로 세포생존율이 통계적으로 유의성 있게 감소하였으며, 다른 농도에서는 세포생존율의 변화가 나타나지 않았다. 즉 인체 구강유상피암종세포에 대한 소분획 1의 처리농도에 비례하여 농도의존적으로 세포독성효과의 증가는 나타나지 않았으며, MTT50은 17 µg/ml이었다. 단지, 10 µg/ml 농도에서만 구강유상피암종세포내 사립체의 활성화에 영향을 미치는 것으로 보아, 소엽의 에틸 아세테이트 소분획 1은 높은 농도에서 통계적으로 유의한 세포

독성효과를 나타내었다. 소엽의 에틸 아세테이트 소분획 2는 대조군에 비하여 각 시료가 인체 구강유상피암종세포에 대하여, 10 µg/ml (p < 0.001) 처리농도에서는 MTT량이 77.8%로 감소하였으나, 소엽의 에틸 아세테이트 소분획 1의 MTT량의 감소량 (70.3%) 보다 감소율이 적게 나타났으며 MTT50은 20 µg/ml 이었다. 소엽의 에틸 아세테이트 소분획 3은 각 시료가 인체 구강유상피암종세포에 대하여 10 µg/ml ~ 1 µg/ml (p < 0.001) 농도에서는 세포생존율이 대조군의 80% ~ 84.2%로 감소하여 통계적으로 유의성 있는 세포독성을 나타내었으나, 10<sup>-1</sup> µg/ml ~ 10<sup>-2</sup> µg/ml 농도에서는 98.2% ~ 99.0%로 감소하여 유의성 있는 세포독성을 보이지 않았다. 즉, 소분획 3의 농도가 증가함에 따라 인체 구강유상피암종세포에 대한 세포독성이 증가하였으며, MTT50은 27 µg/ml이었다. 소엽의 에틸 아세테이트 소분획 3의 10 µg/ml ~ 1 µg/ml 처리농도에서 인체 구강유상피암종세포내 사립체의 활성화에 영향을 미

치는 것을 볼 수 있었으며 10  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 인체 구강유상피암종세포에 대한 세포독성이 80.1%로 가장 높게 나타났다. 소엽의 에틸 아세테이트 소분획 4는 각 시료가 인체 구강유상피암종세포에 대하여 10  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.05$ ) 농도에서는 세포생존율이 대조군의 96.9%로 감소하여 통계적으로 유의성있는 세포독성이 나타났으나, 1  $\mu\text{g/ml}$  ~ 10-2  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 세포생존율이 97.2%에서 97.8%로 감소하였으나, 유의성있는 세포독성을 보이지는 않았다. 즉, 소엽의 에틸 아세테이트 소분획 4의 농도가 증가함에 따라 인체 구강유상피암종세포에 대한 세포독성이 증가하였으며 MTT50은 29  $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 소엽의 에틸 아세테이트 소분획 5는 각 시료가 인체 구강유상피암종세포에 대하여 10-2  $\mu\text{g/ml}$  처리농도와 1  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.001$ ) 처리농도에서는 세포생존율이 대조군의 91%로 소분획 3과 통계적으로 비슷하게 감소하여 유의성있는 세포독성이 나타났으나, 10-1  $\mu\text{g/ml}$  ~ 10-2  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 세포생존율이 94.2% ~ 99.4%로 감소하여, 소분획 3과 같이 유의성

있는 세포독성을 보이지 않았다. 즉, 소분획 5의 처리농도가 증가함에 따라 인체 구강유상피암종세포에 대한 세포독성이 증가하였으며 MTT50은 73  $\mu\text{g/ml}$ 으로 나타났다. MTT측정법으로 소엽의 에틸 아세테이트 분획의 인체 구강유상피암종세포에 대한 이들 에틸 아세테이트 분획의 50% 억제 농도효과에 대한 비교는 다음과 같은 순서로 구강유상피암종세포에 세포독성이 증가하였다. 소분획 5 (MTT50 = 73  $\mu\text{g/ml}$ ) < 소분획 4 (MTT50 = 29  $\mu\text{g/ml}$ ) < 소분획 3 (MTT50 = 27  $\mu\text{g/ml}$ ) < 소분획 2 (MTT50 = 20  $\mu\text{g/ml}$ ) < 소분획 1 (MTT50 = 17  $\mu\text{g/ml}$ ). 실험결과를 종합해보면 소엽의 에틸 아세테이트의 5개 소분획들이 인체 구강유상피암종세포의 세포독성에 미치는 영향을 비교해보면 소분획 1에서 가장 높은 세포독성을 나타냈으며 이 분획에서 구강암에 대한 세포독성을 보이는 생리물질이 존재할 가능성이 있으리라 사료되어 향후 소분획 1의 지속적인 분리 및 실험을 계속할 생각이다.

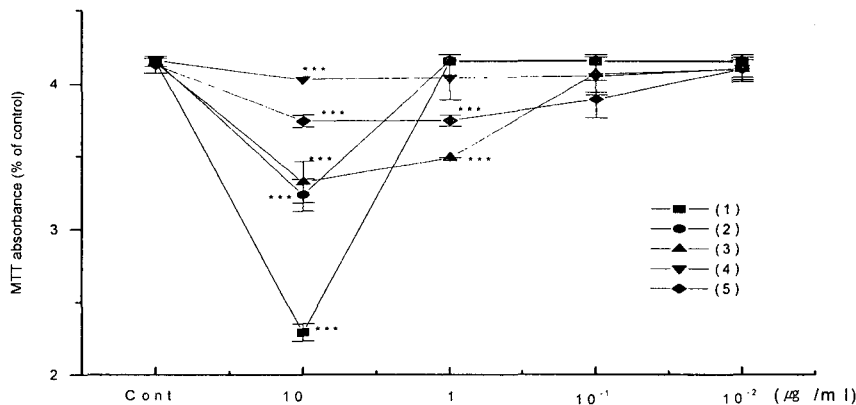


Fig. 2. In vitro antitumor activities of 1, 2, 3, 4 and 5 by MTT assay. These compounds were serially diluted in RPMI-1640 with 10% FBS and mixed with 10% FBS and mixed equal volume of KB cell lines ( $5 \times 10^4$  cells). The values represent the mean  $\pm$  standard deviations for four sets of experiments. Significantly different from the control value; \*\*\* $p < 0.001$ .

### 3. 소엽의 에틸아세테이트 소분획에 의한 KB세포의 형태학적 변화

인체 구강유상피 암종세포인 KB세포에 MTT측정법에서 가장 유의성있는 세포독성을 보이는 소엽의 에틸아세테이트 1소분획을 10  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리하고 48시간이 지난 후에 형태학적 변화를 광학현미경으로 대조군과 처리군을 비교하여 관찰하였다. 대조군의 경우에는

24시간 배양한 후에 well바닥에 뚜렷한 핵을 갖춘 방추형으로 빈틈없이 부착하고 있으며, 48시간 후에는 여러형태의 세포들이 층을 이루고 있었다 (Fig. 3) 그러나 소엽의 에틸아세테이트 1소분획의 처리군에 있어서는 인체 구강유상피 암종세포의 형태가 원형으로 변하였고, 세포들이 세포괴를 형성하였으며 세포수도 현저히 감소함을 관찰하였다(Fig. 4).

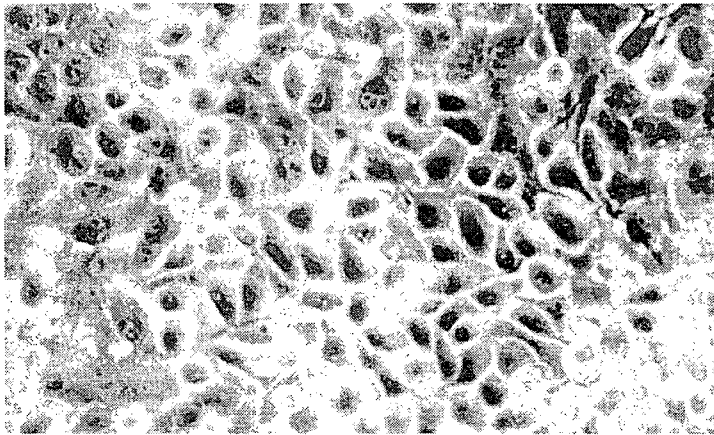


Fig. 3. An inverted photomicrograph of human oral epithelioid carcinoma cells after incubation in unmodified medium (control) for 2 days $\times$  200. Most cells had abundant cytoplasm and formed round shape.

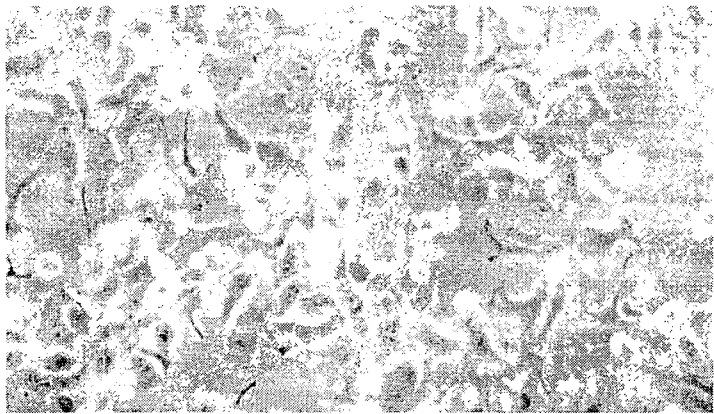


Fig. 4. An inverted photomicrograph of human oral epithelioid carcinoma cells after incubation in the medium containing 10  $\mu\text{g/ml}$  concentration of subfraction 1 for 2 days $\times$ 200. Most cells were shown degenerative and formed cell cluster.

## 결론

소엽의 에틸 아세테이트 5개소분획이 인체 구강유상피암종세포의 세포독성에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 각 분획을 인체 구강유상피암종세포에 처리한 후 혈구계산기에 의한 세포수 산정과 MTT측정 및 도립 현미경으로 세포의 formazan crystal 형태를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 소엽의 에틸아세테이트 소분획1은 10 µg/ml 농도에서만 세포독성이 나타났으며 세포생존율이 대조군의 70.3%로 통계적으로 유의성 (p < 0.001) 있는 가장 강한 세포독성을 나타냈다.

2. 소엽의 에틸 아세테이트 분획의 인체 구강유상피암종세포에 대한 이들 에틸 아세테이트 분획의 50% 억제농도효과에 대한 비교는 다음과 같은 순서로 세포독성이 증가하였다. 소분획 5 (MTT50 = 73 µg/ml) < 소분획 4 (MTT50 = 29 µg/ml) < 소분획 3 (MTT50 = 27 µg/ml) < 소분획 2 (MTT50 = 20 µg/ml) < 소분획 1 (MTT50 = 17 µg/ml).

소엽의 에틸 아세테이트 분획에 따른 세포수의 변화와 MTT측정에 의한 세포생존율을 종합하면 소분획1에서 인체 구강유상피암종세포의 세포독성효과가 가장 강하게 나타났다.

## 감사의 말씀

본 연구는 BK 21 사업지원과 일부 원광대학교의 교비에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. 문관심 : 약초의 성분과 이용, 일원서각, p. 517(1991).
2. 신민교 : 원색임상분초학, 남산당, p. 519(1986).
3. Furia, T.E. : Handbook of Food Additivos, CRC Press, Vol. II. (1980)

4. 김재길 : 천연물대사전, 남산당, p 172.(1984)
5. Jang, H.J., Park, J.Y. and Kim, Y.T : Volatile components of Perilla folium Kor. J. Food Sci. Technol. 23, 129,(1991).
6. a) Yamazaki, M., Ueda, H., Fukuda, K., Okamoto, M. and Yui, S.: Priming effects of vegetable juice on endogeneous production of tumor necrosis factors. Biosic. Biotech. Biochem. 56, 49.(1992).  
b) Yamazaki, M., Ueda, H. and Du, D. : Inhibition of perilla juice of tumor necrosis factor production. Biosi. Biochem. 56, 151-152(1992) .
7. 박건영, 이경임, 이숙희 : 녹황색 채소류의 들연변이유발 억제 및 AZ-521 위암세포의 성장 처해효과. 한국영양식량학회지. 21, 149-153(1992) .
8. 이경임, 박건영, 이숙희 : 아플라톡신 B1 과 4-NQO에 대한 녹황색 채소류의 항돌연변이 효과. 한국영양식량학회지. 21, 143-148(1992).
9. 한두석, 정병호, 유현경, 김영옥, 백승화 : 소엽의 세포독성 및 항암작용에 관한 연구. 한국 생약학회지. 25, 249-257(1994a).
10. 한두석, 유현경, 백승화 : 소엽의 메탄올 분획이 피부암세포에 미치는 항암효과. 대한 구강해부학회지. 18, 19-26(1994b).
11. 최규은 : 소엽으로부터 부탄올 분획의 분리 와 항암활성, 원광대학교 석사학위논문 (1997).
12. Mosmann, T. : Repid colorimetric assays for celluar growth and survival: application of proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods. 65, 55-63(1983).