

고삼 추출물의 암세포에 대한 세포독성

이현옥[†] · 전주연 · 이지연 · 김창희¹

원광보건대학 치위생과

¹신성대학 치위생과

Cytotoxicity on Cancer cells of the Extract of *Sophora flavescens* Ait.

Hyun-Ok Lee[†], Ju-Yeon Chun, Ji-Youn Lee and Chang-Hee Kim¹

Department of Dental Hygiene, Wonkwang Health Science College, Iksan-City 570-750, Korea

¹Department of Dental Hygiene, Shin-Sung College, Choongnam 343-861, Korea

ABSTRACT In this study, we investigated the cytotoxicity of ethyl acetate subfraction of *Sophora flavescens* Ait.(EASS) on cancer cells using MTT quantitative analysis. The EASS was cytotoxicity from the concentration of 6.25 g/ml to KB, B16, HeLa, and MCF-7 cancer cells and the cytotoxicity was significant, ($p < 0.05$) increased as the concentrations of EASS were increased, (12.5, 25, 50, 100 g/ml). The IC for KB, B16, HeLa, and MCF-7 were 56.58, 65.43, 83.95, and 106.65 g/ml, respectively. Conclusively, the EASS inhibited the growth of cancer cells and the order of potency of cytotoxicity was KB > B16 > HeLa > MCF-7.

Key words Cytotoxicity, *Sophora flavescens* Ait., Subfraction, MTT assay

서 론

암은 세포의 증식과 분화가 기본 규칙을 따르지 않을 때 일어나는 질병으로, 수 많은 연구에도 불구하고 아직 치료제 개발에는 어려움을 겪고 있다. 암의 발생기전에 관한 연구와 유전자를 이용한 항암제 및 백신의 개발 그리고 항암 화학제들이 다양하게 개발되고 있지만 유전자, 효소 백신을 이용한 항암제는 실험 단계에 있을 뿐 실용 단계에 있는 상태는 아니다. 화학요법에 의한 항암에는 암의 종류에 따라 약리작용이 다양하고^{1,2)}, 독성에 의한 부작용이 다양하게 나타나기 때문에 암치료시 문제점으로 지적되고 있다³⁾. 따라서 항암제의 부작용을 최소화하고 치료효과를 높이기 위하여 천연식물을 이용한 항암제의 개발이 시도되고 있으며, 그 예로 녹차잎에 존재하는 tea catechin의 일종인 Epigallocatechin gallate는 항 돌연변이 활성작용, 항균작용, 저 콜레스테롤작용, 항암작용(antitumor activity) 및 암예방작용(cancer preventive activity) 등이 밝혀졌다⁴⁾. 국내의 경우, 생약을 이용한 암세포의 성장 억제효과에 관한 연구 등이 보고되고 있다⁵⁻⁸⁾.

고삼(*Sophora flavescens* Ait.)은 콩과에 속하는 다년생 초본식물로 너삼이라고도 부르며 우리나라 전역에 자생한다. 고

삼은 본초로 성질은 차고 무독하며 강한 쓴맛을 지니고 있으며⁹⁾ 항부 정맥 등에 효능이 있다고 알려져 있다¹⁰⁾. 또한 한방에서는 황달, 간질, 해열, 이노, 진통, 구충제 내복용으로 쓰이고 있으며, 강장제로 민간 약제로 이용되어 왔고¹¹⁾, 최근에는 고삼의 항균효과에 관한 보고도 있다^{12,13)}.

본 연구에서는 고삼 에틸아세테이트 추출물을 이용하여 암 연구의 검색법으로 많이 이용되고 있는 MTT 정량분석법으로 세포독성을 관찰하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

고삼의 에틸 아세테이트추출물 3.0 g을 10 ml 등근 플라스크에 넣고, 에틸 아세테이트(3 ml)을 넣어 녹인 후, 실리카겔(6.0 g)을 넣어 용매를 감압증류시켜 제거시킨다. 이때 실리카 겔이 coating 된 고삼의 에틸 아세테이트 추출물을 실리카 겔(30.0 g)이 충전된 컬럼 크로마토그래피에 넣어 전개용매로 용리시켜 분획을 얻었다. 이동상의 조건이 60~90% ethyl acetate/hexane, 100% ethyl acetate, MeOH로 용리된 분획을 역상 크로마토그래피법으로 분리하여 6종류의 소분획을 얻었다. 이들 소분획 중에 이동상(H₂O:CH₃CN/1:3)의 조건으로 용리된 소분획을 실리카관 크로마토그래피법으로 4종류의 소분획을 얻었다. 이들 소분획은 MeOH:CHCl₃, MeOH의 이동상으로 구성되었으며, 이동상의 조건이 1:10, 3:10, MeOH:CHCl₃으로 용리된 양(275 mg)을 본 실험에 이용하였다(Fig. 1).

[†]Corresponding author

Tel: 063-840-1265

Fax: 063-840-1269

E-mail: holee@sky.wkhc.ac.kr

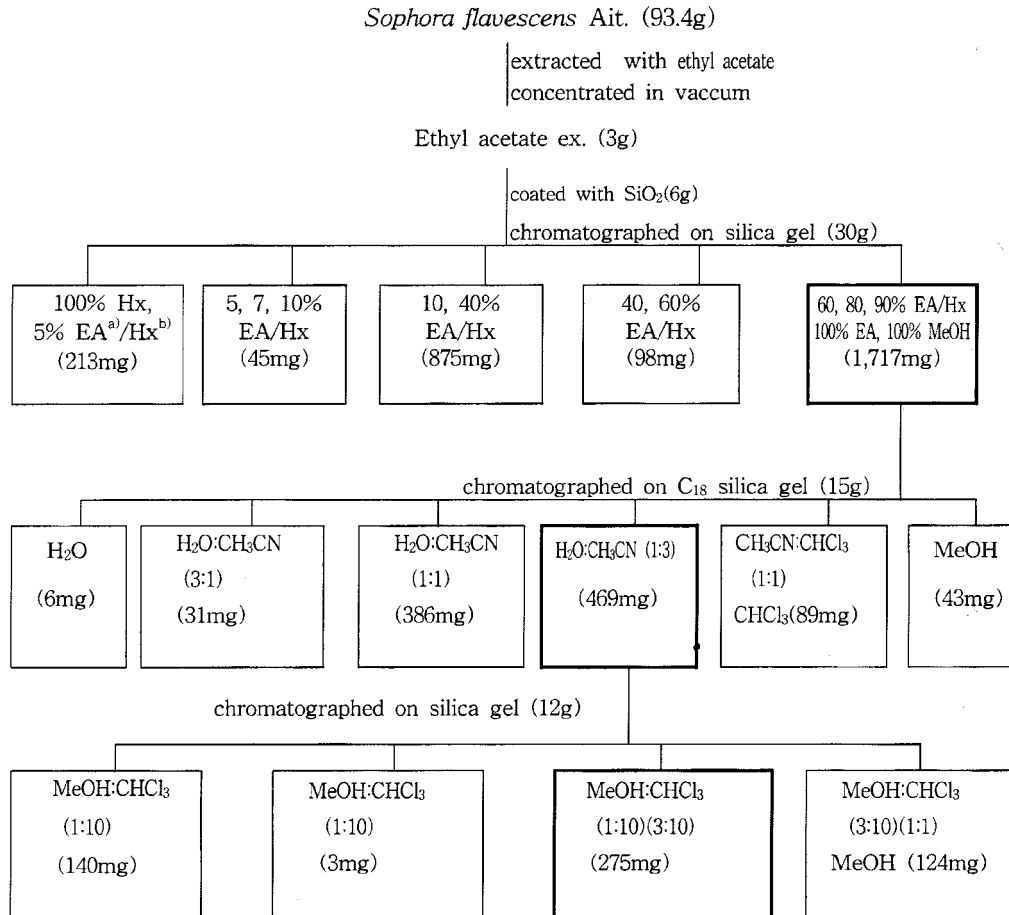


Fig. 1. Extraction and fractionation of *S. flavescens* Ait.

^{a)} ethyl acetate, ^{b)} hexane

2. 시료의 처리

조제한 시료는 즉시 4°C 냉장고에 보관하였고, 사용 직전에 10% DMSO에 희석하여 실험에 사용하였다.

3. 세포독성능 측정을 위한 세포주

세포독성능 측정을 위해 사용한 암세포는 인체의 구강유상피암세포(KB, ATCC OCL-17), 자궁경부암세포(HeLa, KCLB 1002), 유방암세포(MCF-7, KCLB 30022)와 mouse의 흑색종세포(B16, KCLB 8006)를 사용하였다.

4. 세포의 배양 배지

세포배양에 사용된 배지는 L-glutamine이 포함된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, USA)과 RPMI 1640(Gibco, USA)에 NaHCO₃을 혼합한 후, 3차 증류수에 녹인 다음 membrane filter(0.2 μm)로 여과한 후, 여액에 56 °C에서 30분간 inactivation 시킨 소의 태아 혈청 FBS를 전체 양의 1%가 되도록 혼합한 다음, 1N NaOH와 1N HCl을 사용하여 pH 7.2가 되도록 하였다.

5. 세포의 배양

세포활성을 측정하기 위하여 인체의 HeLa 세포, MCF-7 세포와 mouse의 B16 세포는 trypsin-EDTA(0.05% trypsin, 0.53

mM EDTA, Gibco, USA) 용액으로 처리하여 FBS(Fetal Bovine Serum, Gibco, USA)가 포함된 DMEM에서 배양하였으며, KB 세포는 RPMI 1640에 10% FBS와 Penicillin G(25 unit/m)을 첨가하여 배양하였다. 각 세포의 배양온도는 37°C, 습도 95%, 5%의 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

6. MTT 정량분석법

세포가 배양된 각 well에 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma, USA)가 포함된 배양액을 well 당 1 ml 씩 넣어 4시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양 후 반응을 정지시키기 위하여 배양액과 동량의 반응정지액(Isopropanol로 용해한 0.04 N HCl)을 넣고 MTT formazan을 용해한 후 ELISA(Spectra Max 250, Molecula Devices)에 의한 흡수파장 570 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 분석하였다.

7. 통계처리

실험결과와 통계처리는 각 세포에 대한 시료의 농도별 차이를 규명하기 위하여 일원분산분석(one-way ANOVA)을 시행하였다. 유의한 차이가 있을 때 Duncan 다중범위 검정으로 사후검정을 하였으며, 유의도 수준은 0.05로 하였고, 통계분석은 SPSS Win을 사용하였다. IC₅₀에 관한 통계처리는 Student's

t-test를 이용하였고, p-value가 0.05 이하일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

1. 고삼의 에틸 아세테이트 소분획의 인체 구강 유상피암 종세포(KB)에 대한 세포독성

고삼 에틸 아세테이트 소분획을 KB 세포에 대한 세포독성을 파악하기 위한 MTT 정량분석법에 의한 실험결과는 Table 1과 같다. 실험 결과, 모든 농도에서 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p < 0.001$). 농도별로 사후검정한 결과, 고삼 에틸 아세테이트 소분획의 농도가 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 부터 KB 세포의 성장을 억제하였으며, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지 시료의 농도가 증가할수록 KB 세포의 성장억제효과가 높게 나타났고, 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p < 0.05$). 시료의 농도가 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 KB 세포에 대한 세포독성이 가장 높게(76.1%) 나타났다. 시료를 0.0, 6.25, 12.5, 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 결과 KB 세포에 대한 성장율은 대조군과 비교할 때 비교율은 각각 100.0, 86.5, 75.2, 71.4, 49.7 및 23.9%로 나타났다. 즉, 고삼 에틸 아세테이트 소분획의 KB 세포에 대한 세포성장 억제율은 시료농도 6.25, 12.5, 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 13.5, 24.8, 28.6, 50.3 및 76.1%로 나타났다. 고삼 에틸 아세테이트 소분획의 모든 농도에서 KB 세포에 대하여 유의한 세포독성효과가 나타났으며, 농도가 증가할수록 인체 구강유상피암종 세포에 대한 세포독성은 높게 나타났고, IC_{50} 은 56.58 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 관찰되었다.

2. 고삼 에틸 아세테이트 소분획의 마우스 피부흑색종세포(B16)에 대한 세포독성

고삼 에틸 아세테이트 소분획의 B16 세포에 대한 세포독성을 파악하기 위한 MTT 정량분석법에 의한 실험결과는 Table 2와 같다. 실험결과, 모든 농도에서 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p < 0.001$). 농도별로 사후검정한 결과, 고삼 에틸 아세테이트 소분획의 농도가 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 부터 B16 세포의 성장

Table 1. The Cytotoxicity of the ethyl acetate soluble subfractions of *Sophora flavescens* Ait. by the MTT assay on human KB cells

Cell	KB Cells	
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Mean \pm S.D. ¹	% of control
Control	0.318 \pm 0.034	100.0
6.25	0.275 \pm 0.022 ^a	86.5
12.5	0.239 \pm 0.011 ^b	75.2
25	0.227 \pm 0.015 ^b	71.4
50	0.158 \pm 0.006 ^c	49.7
100	0.076 \pm 0.006 ^d	23.9
F	65.081	
p	0.000	
IC_{50}	56.59	

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA. ¹The values represent the mean \pm standard deviations for quadruplicates experiments. Means followed by the same letters are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test. F : F ratio, p : probability

Table 2. The Cytotoxicity of the ethyl acetate soluble subfractions of *Sophora flavescens* Ait. by the MTT assay on mouse B16 cells

Cell	B16 Cells	
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Mean \pm S.D. ¹	% of control
Control	0.403 \pm 0.012	100.0
6.25	0.384 \pm 0.007 ^a	95.3
12.5	0.300 \pm 0.016 ^b	74.4
25	0.246 \pm 0.007 ^c	61.0
50	0.165 \pm 0.021 ^d	40.9
100	0.124 \pm 0.008 ^c	30.5
F	200.870	
p	0.000	
IC_{50}	65.43	

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA. ¹The values represent the mean \pm standard deviations for quadruplicates experiments. Means followed by the same letters are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test. F : F ratio, p : probability

을 억제하였으며, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지 시료의 농도가 증가할수록 B16 세포의 성장억제효과가 나타났고, 유의한 차이가 있었다($p < 0.05$). 시료의 농도가 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 B16 세포에 대한 항암활성(69.5%)이 가장 높게 나타났지만, KB 세포에 대한 세포독성(76.1%)보다는 낮게 나타났다. 시료를 0.0, 6.25, 12.5, 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 결과 B16 세포에 대한 성장율은 대조군과 비교할 때, 비교율은 각각 100.0, 95.4, 74.4, 61.0, 40.9 및 30.5%로 나타났다. 즉, 고삼 에틸 아세테이트 소분획의 B16 세포에 대한 세포독성은 시료 농도 6.25, 12.5, 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 4.7, 25.6, 39.0, 59.1 및 69.48%로 마우스 B16 세포의 성장을 억제하였다. 고삼 에틸 아세테이트 소분획의 모든 농도에서 B16 세포에 대한 유의한 세포독성이 나타났으며, 농도가 증가할수록 세포독성은 높게 나타났고, IC_{50} 은 65.43 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 관찰되었다.

3. 고삼 에틸 아세테이트 소분획의 인체 자궁경부암세포(HeLa)에 대한 세포독성

고삼 에틸 아세테이트 소분획의 HeLa 세포에 대한 세포독성을 파악하기 위한 MTT 정량분석법에 의한 실험결과는 Table 3과 같다. 실험결과, 모든 농도에서 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p < 0.001$). 농도별로 사후검정한 결과, 고삼 에틸아세테이트 소분획의 농도가 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 부터 HeLa 세포의 성장을 억제하였으며, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지 시료의 농도가 증가할수록 세포의 성장억제효과가 나타났다. 시료의 농도가 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 HeLa 세포에 대한 세포독성(50.4%)이 가장 높게 나타났지만, KB 세포에 대한 세포독성(76.1%)이나 마우스 B16 세포의 세포독성(69.5%)보다 낮게 나타났다.

시료를 0.0, 6.25, 12.5, 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 결과 HeLa 세포에 대한 성장율은 대조군과 비교할 때, 비교율은 각각 100.0, 88.9, 86.6, 72.6, 56.1 및 49.6%로 나타났다. 즉, 고삼 에틸 아세테이트 소분획의 HeLa 세포에 대한 세포성장 억제율은 시료 농도 6.25, 12.5, 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 첨가시 각각 11.1, 13.4, 27.4, 43.9 및 50.4%

Table 3. The Cytotoxicity of the ethyl acetate soluble subfractions of *Sophora flavescens* Ait. by the MTT assay on HeLa cells

Cell	HeLa Cells		
	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Mean \pm S.D. ¹	% of control
Control		0.871 \pm 0.034	100.0
6.25		0.774 \pm 0.017 ^a	88.9
12.5		0.754 \pm 0.035 ^a	86.6
25		0.632 \pm 0.012 ^b	72.6
50		0.489 \pm 0.015 ^c	56.1
100		0.432 \pm 0.053 ^d	49.6
F		36.641	
p		0.000	
IC ₅₀		83.95	

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA. ¹The values represent the mean \pm standard deviations for quadruplicate experiments. Means followed by the same letters are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test. F : F ratio, p : probability

로 나타났다. 고삼 에틸 아세테이트 소분획의 모든 농도에서 HeLa 세포에 대한 유의한 세포독성이 나타났으며, 농도가 증가할수록 세포독성은 높게 나타났고, IC₅₀은 83.95 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 관찰되었다.

4. 고삼 에틸 아세테이트 소분획의 인체 유방암세포 (MCF-7) 에 대한 세포독성

고삼 에틸 아세테이트 소분획의 MCF-7 세포에 대한 세포독성을 파악하기 위한 MTT 정량분석법에 의한 실험결과 Table 4와 같다. 실험결과, 모든 농도에서 통계적으로 유의한 차이가 나타났다(p<0.05). 농도별로 사후검정한 결과, 고삼 에틸 아세테이트 소분획의 농도가 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 부터 MCF-7 세포의 성장을 억제하였으며, 100 $\mu\text{g/ml}$ 까지 농도가 증가할수록 세포의 성장억제효과가 나타났다. 시료의 농도가 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 MCF-7 세포에 대한 세포독성(41.3%)이 가장 높게

Table 4. The Cytotoxicity of the ethyl acetate soluble subfractions of *Sophora flavescens* Ait. by the MTT assay on MCF-7 cells

Cell	MCF-7 cells		
	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Mean \pm S.D. ¹	% of control
Control		0.848 \pm 0.004	100.0
6.25		0.790 \pm 0.005 ^a	93.5
12.5		0.755 \pm 0.011 ^b	89.0
25		0.712 \pm 0.010 ^c	83.9
50		0.545 \pm 0.011 ^d	64.2
100		0.498 \pm 0.009 ^e	58.7
F		440.120	
p		0.000	
IC ₅₀		106.6	

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA. ¹The values represent the mean \pm standard deviations for quadruplicate experiments. Means followed by the same letters are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test. F : F ratio, p : probability

나타났지만, 인체 KB 세포에 대한 세포독성(76.1%), 마우스 B16 세포의 세포독성(69.5%), 인체 HeLa 세포에 대한 세포독성(50.4%) 보다 낮게 나타났다. 시료를 6.25, 12.5, 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 결과 MCF-7 세포에 대한 성장율은 대조군과 비교할 때, 비교율은 각각 93.1, 89.0, 83.9, 64.2 및 58.7%로 나타났다. 즉, 고삼 에틸 아세테이트 소분획의 MCF-7에 대한 세포성장 억제율은 농도 6.25, 12.5, 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 6.9, 11.0, 16.1, 35.8 및 41.3%로 MCF-7 세포의 성장을 억제하였고, 고삼 에틸 아세테이트 소분획의 모든 농도에서 MCF-7 세포에 대한 유의한 세포독성이 나타났으며, 농도가 증가할수록 세포독성은 높게 나타났고, IC₅₀은 106.6 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 관찰되었다.

요 약

고삼 추출물의 암세포에 대한 세포독성을 파악하기 위하여 고삼의 에틸 아세테이트 소분획으로 MTT 정량분석을 실시하였다. 고삼의 에틸 아세테이트 소분획은 암세포인 KB 세포, B16 세포, HeLa 세포와 MCF-7 세포에 대하여 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 농도부터 세포독성이 나타났으며, 12.5, 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 까지 각각의 농도별로 세포독성은 증가하였고, 통계적으로 유의성이 인정되었다(p<0.05). KB 세포에 대한 IC₅₀은 56.58 $\mu\text{g/ml}$, B16 세포에 대한 IC₅₀은 65.43 $\mu\text{g/ml}$, HeLa 세포에 대한 IC₅₀은 83.95 $\mu\text{g/ml}$, MCF-7 세포에 대한 IC₅₀은 106.65 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다. 고삼의 에틸 아세테이트 소분획은 암세포의 성장을 억제하였고, 세포독성의 강도는 B16 세포, HeLa 세포, MCF-7 세포, KB 세포 순서로 높게 나타났다.

감사의 글

본 연구는 2002년도 원광보건대학 연구비 지원에 의하여 수행된 결과로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Gillman AG, Rall TW, Nies A, Taylor P: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Maxwell Macmillan, 18th, p.1202, 1991.
- Hersh EM, Ereish EJ: In Methods in Cancer Reseach. New York, Academic Press, p. 335, 1986.
- Chung YT, Park ST, Mun YJ, Kim JM, Choi MK, Han DS, Kim B: Cytotoxic effects of actinomycin D, adriamycin and puromycin in the developmental stage of early mouse embryos. J Wonkwang Medical Sci 3(1): 13-34, 1987.
- Valcic S, Timmermann BN, Alberts DS, Wachter GA, Krutzsch M, Wymer H, Guillen JM: Inhibitory effect of six green tea catechins and caffeine on the growth of four selected human tumor cell lines. Anticancer Drugs 7: 461-468, 1996.
- Liao SY, Umekita Y, Guo J, Kokontis JM, Hiipakka RA: Growth inhibition and regression of human prostate and breast tumors in athymic mice by tea epigallocatechin gallate. Cancer Lett 96: 239-243, 1995.
- Yamane T, Takahashi T, Kuwata K, Oya K, Inagake M, Kitao Y, Suganuma M, Fujiki H: Inhibition of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced carcinogenesis by (-)-epigallocatechin gallate in the rat glandular stomach. Cancer Res 55: 2018-2084, 1995.

7. Yosioka I, Nishimura T, Matsud A, Kitagawa I: Sponin and Sapogerol I. Seed sapogenols of *Thea sinensis* L. (1). Barringtonol C(=Theasapogenol B). Chem Pharm Bull 18: 1610-1620, 1970.
8. Yosioka I, Nishimura T, Matsude A, Kitagawa I: Saponin and Sapogerol, III. Seed sapogenols of *Thea sinensis* L. (3) Theasapogenol E and minor sapogenols. Chem Pharm Bull 19(6): 1186-1199, 1971.
9. 신민교: 임상본초학, 남산당. pp. 314-316, 1986.
10. Kee CH: The Pharmacology of Chinese Herbs. CRC Press, Inc p. 63, 1993.
11. 이현옥, 박남규, 정승일, 김윤철, 백승화: 고삼의 에틸 아세테이트 추출물로부터 항균물질의 분리. 약학회지 45(6): 587-590, 2001.
12. 조훈, 원성란, 양은영외 6인: 고삼추출물의 항균효과(I). 약학회지 43(4): 419-422, 1999.
13. 한지숙, 신동화: *Listeria monocytogenes*의 증식 억제에 미치는 빵나무 및 고삼 에탄올 추출물의 분획별 효과. 한국식품과학회지 26: 539, 1994.

(Received May 13, 2002; Accepted June 24, 2002)

