

# 산수유 클로로포름 추출물과 분획물의 암세포주에 대한 세포독성

양현옥<sup>2</sup> · 최원형<sup>1</sup> · 김용현 · 백승화<sup>1</sup> · 천현자\*

원광대학교 자연과학기술학부 · 원광대학교 한의학전문대학원, 1: 한약자원 개발학과, 2: 원광보건대학교 미용피부관리과

## Cytotoxicity Effects of Fraction and Chloroform Extracts from *Cornis fructus* on Cancer Cell Lines

Hyun Ok Yang<sup>2</sup>, Won Hyung Choi<sup>1</sup>, Young Hyun Kim, Seung Hwa Baek<sup>1</sup>, Hyun Ja Chun\*

*Division of Natural Science of Natural Sciences College,*

*1: Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University,*

*2: Department of Cosmetics, Wonkwang Health Science College*

*Cornis fructus* were extracted by successive extractions and then fractionated with chloroform extract to get active fractions. This study was performed to determine the cytotoxic effect of chloroform extract from *Cornis fructus* on NIH 3T3 fibroblasts and cancer cell lines using MTT assay. All extracts did not exhibit cytotoxicity in NIH 3T3 fibroblasts. Chloroform extract exhibited antitumor activity in A549, MDA-MB-123, B16 melanoma and SNU-C4 cells. Further fractionation with chloroform extract was performed to obtain effective fractions. 3 fraction showed the strongest cytotoxic effect against A549, MDA-MB-123, B16 melanoma and SNU-C4 cells. These results suggest that 3 fraction of the chloroform extract from *Cornis fructus* possessed bioactive material of antitumor agents.

**Key words :** *Corni fructus*, MTT assay, Cytotoxic effects

### 서 론

산수유(*Cornus Officinalis*)는 층층나무과(Cornaceae)에 속하는 낙엽 소관목으로 높이는 4m 정도이고, 잎은 타원형 또는 긴 타원형이며 길이는 5-7cm, 너비는 3-4.5 cm인데 선단은 좁고 뾰족하다. 핵과는 1.5cm 내외의 긴 타원형으로 털이 없고 성숙하면 적색이 되며 개화기는 5-6월이고 결실기는 8-10월이다.<sup>1)</sup> 생약 산수유는 가을에 익은 산수유 열매(Corni Fructus)를 따서 씨를 뽑아내고 건조한 것을 말하며 과실은 saponin, tannin, ursolic acid, gallic acid, malic acid 및 vitamin A를 함유하고 종자의 지방유는 palmitic acid, oleic acid, linolic acid 등을 함유하고 있다.<sup>2)</sup>

이러한 유효물질을 다량 함유하는 산수유는 옛부터 다뇨증, 요통, 이명, 폐결핵 등의 치료제로 사용되어 왔으며, 그 과실은 자양, 강장, 음위에 약효가 있고, 간경화, 신경에 좋으며, 이뇨작용

용, 혈압강화작용, 항암 및 항균작용이 있다고 한방자료에 기록되어 있다.<sup>3-4)</sup>

산수유에 대한 연구로는 산수유 종자의 렉틴성분<sup>5)</sup>, 산수유 열매의 화학성분,<sup>6)</sup> 산수유로부터 탄닌성분의 분리 및 구조결정<sup>7-8)</sup>, 산수유 종자의 항당뇨효과,<sup>9)</sup> 세포의 항산화 방어작용<sup>10)</sup>, 산수유의 ursolic acid 성분의 반응성 산소종 생성 증진 효과<sup>11)</sup>에 대하여 보고 되었으며, 항균 및 항암활성에 대한 연구<sup>12)</sup>도 보고 되었으나 미비한 상태이다. 본 연구에서는 다양한 세포주에 대한 산수유 클로로포름 추출물 및 분획물의 세포독성에 대한 영향을 조사하였기에 보고하는 바이다.

### 실험방법

#### 1. 시료의 추출 및 분획

실험에 사용한 산수유는 원광대학교 한의과대학 한방병원에서 구입하여 잘게 자른 후 용매에 용해시켜 상온에서 연속추출법으로 각 추출물을 얻었다. 이 중 chloroform 추출물 11.416g을

\* 교신저자 : 천현자, 익산시 신용동 344-2 원광대학교 자연과학기술학부

· E-mail : hjchun@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6918

· 접수 : 2004/08/16 · 수정 : 2004/09/14 · 채택 : 2004/10/06

다시 EtOAc 250ml에 녹인 후, silica gel 113g을 넣어 혼합시켜 균등하게 교반시킨 후 용매를 감압·증류시켜 silica gel에 coating시켰다. Coating된 chloroform 추출물을 silica gel 560g으로 충전된 column chromatography에 넣어 EtOAc와 MeOH로 용리시켰으며, 용리액을 TLC로 확인하고 이를 감압, 농축시켜 9개의 분획을 얻었다. 이 분획물을 TLC(0.25 mm, polygram sil N-HR/UV254, E. Merck)로 재확인하여 혼합하여 분획 1(294mg), 분획 2(236mg), 분획 3(433mg), 분획 4(64mg), 분획 5(139mg)를 얻었다. 시료는 즉시 4℃ 냉장고에 저장하였다가 사용 직전에 에틸 알콜로 1 : 1 (mg/ml) 비율로 희석하여 실험에 사용하였다.

2. 세포주 배양

본 실험에 사용된 세포주는 암세포로 피부 흑색종 세포주인 B16 melanoma세포와 폐암 세포주인 A549세포, 흉부암 세포주인 MDA-MB-231세포 결합암 세포주인 SNU-C4 와 SNU-C4 세포를 사용하였으며, 정상세포로는 NIH 3T3 섬유모세포를 서울대학교 세포주 은행에서 구입하여 계대 배양하면서 실험하였다. 세포배양은 CO<sub>2</sub>세포 배양기(37℃, 5% CO<sub>2</sub>)에서 10% fetal bovine serum (Gibco, USA)이 포함된 RPMI 1640 (Gibco, USA) 배지를 사용하였고, 여기에 penicillin G (25 unit/ml), streptomycin (25 µg/ml)를 첨가하여 사용하였다. 실험을 위하여 일차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin으로 처리하여, Turkig 형 혈구계산기를 이용하여 세포수가 2×10<sup>4</sup> cells/ml가 되도록 세포 부유액을 만들었다.

3. MTT정량분석법

암세포에 대한 세포독성 측정은 3-(4,5-dimethylthazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide (MTT)검정법<sup>13)</sup>에 의하여, 세포를 산수유 클로로포름 추출물로 처리한 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 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 통계처리

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

결과 및 고찰

1. 산수유의 클로로포름 추출물 및 분획물의 수득율

산수유 1.5 kg에 헥산을 넣고 상온에서 교반하여 세번 반복 추출하였다. 각 추출물을 0.4 µm 필터로 여과한 후, 여과액을 증류기로 35℃에서 감압 농축시킨 후 냉동 건조하여 물 추출물,

ethyl alcohol 추출물, chloroform 추출물, n-hexane 추출물 그리고 ethyl acetate 추출물 얻었으며 추출물의 수득율은 용매의 극성 정도에 따라 수득율이 증가됨을 관찰할 수 있었고 수득율은 시료의 건조중량에 대한 추출물 함량의 백분비로 하였다. 얻어진 chloroform 추출물 11.416g을 EtOAc 250ml에 녹인 후 감압·증류시켜 silica gel에 coating시켰으며, coating된 chloroform 추출물을 silica gel 560g으로 충전된 column chromatography에 넣어 EtOAc와 MeOH로 용리시켰으며, 용리액을 TLC로 확인하고 이를 감압, 농축시켜 각 분획을 얻었으며 분획물의 수득율은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Extraction yield of fractions and chloroform extract from *Cornis fructus*.

Fractions	Extraction Yield g (w/w. %)
Chloroform Extract	11.416 (0.8)
Chloroform Fr. 1	0.294 (2.6)
Chloroform Fr. 2	0.236 (2.1)
Chloroform Fr. 3	2.433 (21.3)
Chloroform Fr. 4	0.064 (0.6)
Chloroform Fr. 5	0.139 (1.2)

2. 산수유 클로로포름 추출물의 세포독성

연속 추출법으로 추출한 산수유의 클로로포름 추출물을 처리한 후 정상세포와 암세포주들의 in vitro 세포 생존율을 MTT 정량분석법을 이용하여 측정하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 정상 세포인 NIH 3T3 섬유모세포에 대하여 처리농도가 증가해도 세포 생존율이 거의 감소되지 않아 세포독성을 거의 관찰할 수 없었다. 이와 같이 정상세포인 NIH 3T3 섬유모세포에 추출물들을 350 µg/ml 농도까지 처리해도 세포독성이 관찰되지 않았으므로 추출물에 의한 약물의 독성을 가지지 않는 것으로 사료된다.

산수유 클로로포름 추출물의 암세포주들에 대한 세포 생존율을 측정해본 결과 MDA-MB 231세포주와 B16 melanoma 세포주, SNU-C4세포주 및 A549 세포주에서는 처리농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 서서히 감소함을 관찰할 수 있었다. 그러나 SNU-C1세포주의 경우에는 추출물의 농도가 증가됨에 따라 오히려 약간 증가하는 경향을 보였다. 따라서 암세포주인 MDA-MB 231세포주와 B16 melanoma 세포주, SNU-C4 세포주 및 A549 세포주에서 세포독성을 보이는 클로로포름 추출물의 생리활성을 보기 위하여 클로로포름 추출물을 분리, 분획한 후 분획 추출물을 분리하여 in vitro에서 암세포주의 생존율을 측정하였다.

3. 클로로포름 분획 추출물이 세포주들의 생존율에 미치는 영향

산수유의 클로로포름 추출물이 MDA-MB 231, A549, SNU-C4 및 B16 melanoma 세포주에서 세포독성을 보이므로 클로로포름 추출물의 생리활성을 보기 위하여 클로로포름 추출물을 분획한 후 분획 추출물을 분리하여 in vitro에서 세포의 생존율을 측정하였다.

1) A549세포의 생존율에 미치는 영향

폐의 상피성 종양에서 나온 인체 폐암세포인 A549세포에 대

한 산수유의 클로로포름 분획 추출물의 세포독성을 검색하기 위하여 A549세포에 분획 추출물들을 농도별로 처리한 후 MTT 정량분석법을 이용하여 세포독성을 관찰하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 MDA-MB-231세포에 대하여 1 분획물에서는 농도가 증가함에 따라 세포의 생존율이 약간 증가되는 경향을 관찰할 수 있었고 2와 4 분획물에서는 세포 생존율이 거의 감소하지 않아 세포독성을 거의 관찰할 수 없었다. 그러나 3과 5 분획물에서는 처리농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 감소되어 세포독성을 관찰할 수 있었다. 특히 3 분획물에서 농도가 증가함에 따라 생존율이 현저히 감소하여 큰 세포독성을 관찰할 수 있었다. 따라서 클로로포름의 3 분획물에 A549세포의 세포독성 생리활성 물질이 함유되어 있으리라 사료된다.

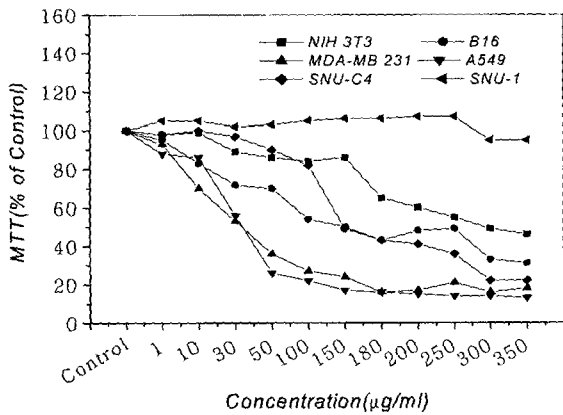


Fig. 1. Effect of Chloroform extract from Cornis Fructus on the viability of cell lines. The cells were cultured in the presence of various concentrations of Cornis Fructus for 48 h. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as % control and data were mean  $\pm$  S.E. of at least five determinations.

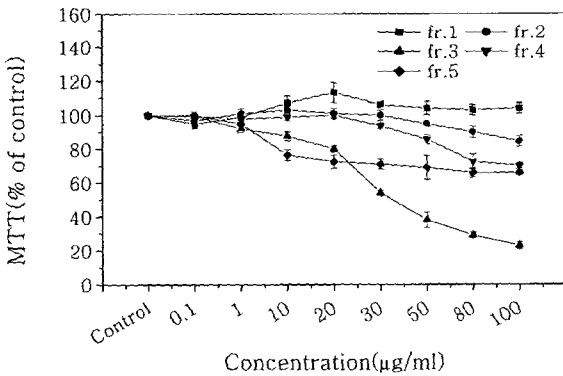


Fig. 2. Effects of Chloroform fractions from Cornis Fructus on the viability of A549 lung carcinoma cell line. The cells were cultured in the presence of various concentrations of Cornis Fructus for 48 h. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as % control and data were mean  $\pm$  S.E. of at least five determinations.

## 2) MDA-MB-231세포의 생존율에 미치는 영향

인체 흉부암 세포인 MDA-MB-231세포에 대한 산수유의 클로로포름 분획 추출물의 세포독성을 검색하기 위하여 MDA-MB-231세포에 분획추출물들을 농도별로 처리한 후 MTT 정량 분석법을 이용하여 세포독성을 관찰하였다. Fig. 3에서 보는 바

와 같이 MDA-MB-231세포에 대하여 1, 2, 4 분획물에서는 농도가 증가함에 따라 세포의 생존율의 변화를 관찰할 수 없었다. 5 분획물에서는 세포의 생존율이 약간 감소하여 세포독성이 약간 있음을 관찰할 수 있었다. 그리고 3 분획물에서도 농도가 증가함에 따라 세포독성을 보였으나 큰 세포독성을 관찰할 수는 없었다.

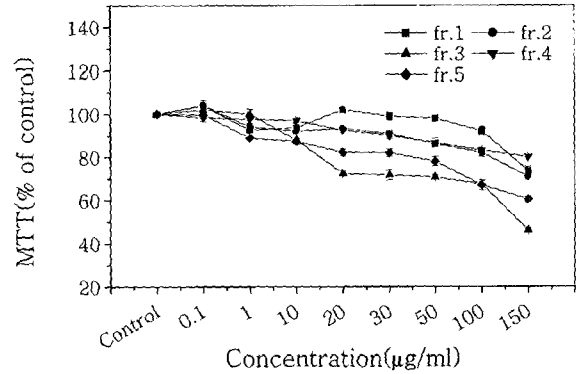


Fig. 3. Effects of Chloroform fractions from Cornis Fructus on the viability of MDA-MB-231 breast cell line. The cells were cultured in the presence of various concentrations of Cornis Fructus for 48 h. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as % control and data were mean  $\pm$  S.E. of at least five determinations.

## 3) B16 melanoma세포의 생존율에 미치는 영향

흑색종 피부암 세포인 B16 melanoma세포에 대한 산수유의 클로로포름 분획 추출물의 세포독성을 검색하기 위하여 B16 melanoma세포에 분획 추출물들을 농도별로 처리한 후 MTT 정량분석법을 이용하여 세포독성을 관찰한 결과 Fig. 2의 A549에서와 비슷한 경향을 나타내었다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 1과 2 분획물에서는 농도가 증가함에 따라 세포의 생존율이 약간 증가되는 경향을 관찰하였고 4와 5 분획물에서는 세포의 생존율이 약간 감소하여 세포독성이 있음을 관찰할 수 있었으나 세포독성은 미비하였다. 그러나 3 분획물에서는 농도가 증가함에 따라 세포의 생존율이 현저히 감소하여 큰 세포독성을 관찰할 수 있었다. 따라서 A549세포에서와 마찬가지로 클로로포름의 3 분획물에 B16세포의 세포독성 생리활성 물질이 함유되어 있으리라 사료된다.

## 4) SNU-C4세포의 생존율에 미치는 영향

결장암 세포인 SNU-C4 세포에 대한 클로로포름 분획 추출물의 세포독성을 검색하기 위하여 SNU-C4세포에 분획 추출물들을 농도별로 처리한 후 MTT 정량분석법을 이용하여 세포독성을 관찰하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 SNU-C4세포에 대하여 2, 4, 5 분획물들에서 농도가 증가함에 따라 세포의 생존율이 서서히 증가되는 경향을 관찰할 수 있었다. 1 분획물에서는 세포의 생존율이 거의 감소하지 않아 세포독성을 거의 관찰할 수 없었다. 그러나 3 분획물에서는 다른 암세포주들과 마찬가지로 SNU-C4세포에 대하여 농도가 증가함에 따라 세포의 생존율이 현저히 감소하여 큰 세포독성을 관찰할 수 있었다. 따라서 클로로포름의 3 분획물에 SNU-C4세포의 세포독성 생리활성 물질이 함유되어 있으리라 사료된다.

## 감사의 글

이 연구는 원광보건대학교 교내연구비로 수행되었으며, 이에 감사를 드립니다

## 참고문헌

1. 정진섭, 신민교 : 도해 생약대사전, 도서출판 영림사 pp. 448-449, 1998.
2. Yang, T. H., Liu, S. H. and Sun, M. H. : Constituents of the fruits of *Cornus officinalis*. Taiwan Yao Hsueh Tsa Chih. 22, 1, 1973.
3. Toheu, E. and Chiro, T. H. : Constituents of *Cornus officinalis*. Yakugaku Zasshi. 93, 30, 1973.
4. 김충섭, 박종희, 도상학 : 국내에 야생하는 특용식물자원의 이용을 위한 연구, 한국 과학기술연구소 BS E463(1), 1410, 1979.
5. Chung, S. R., Jeune, K. H., Park, S. Y. and Jang, S. J. : Toxicity and Lectins constituents from the seed of *Cornus officinalis*. Kor. J. Pharmacogn. 24(2), 177 1993.
6. Lee, Y. C., Kim, Y. E., Lee, B. Y. and Kim C. J. : Chemical compositions of *Corni fructus* and seperating properties of Its flesh by drying. Kor. J. Food Sci. Technol. 24(5), 447 1992.
7. Hatano, T., Ogawa, N., Kira, R. and Yasuhara, T. : Tannins of cornaceous Plants. I. Cornusins A, B and C, dimeric monomeric and trimeric hydrolyzable tannins from *Cornus officinalis*, and orientation of valoneoyl group in related tannins. Chem. Pharm. Bull. 37(8), 2083 1989.
8. Hatano, T., Yasuhara, T. and Okuda, T. : Tannins of cornaceous Plants. II. Cornusins D, E and F, new dimeric and trimeric hydrolyzable tannins from *Cornus officinalis*. Chem. Pharm. Bull. 37(10), 2665 1989.
9. Farag, R. S. : Antimicrobial activity of some egyptian spice essential oils. J. Food Prot. 52, 665 1989.
10. Peng, Q., Wei, Z. and Lau, B. H. : *Corni fructus* enhances endothelial cell antioxidant defenses. General Pharmacology. 31(2), 221. 1998.
11. Kim, D. K., Kwak, J. H., et al. : Component from *Cornus officinalis* enhances hydrogen per oxide generation from macrophages. Kor. J. Pharmacogn. 27(2), 101. 1996.
12. Seo, K. I., Lee, S. W. and Yang, K. H. : Antimicrobial and Antioxidative of *Corni fructus* extracts. Kor. J. Postharvest Sci. Technol. 6(1), 99. 1999.
13. Mosmann, T. : Rapid colorimetric assays for cellular growth and Survival; application of proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods. 65, 55 1983.

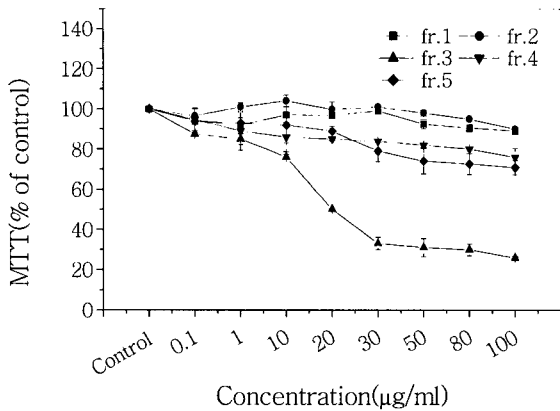


Fig. 4. Effects of Chloroform fractions from *Cornis Fructus* on the viability of B16 melanoma cell line. The cells were cultured in the presence of various concentrations of *Cornis Fructus* for 48 h. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as % control and data were mean  $\pm$  S.E. of at least five determinations

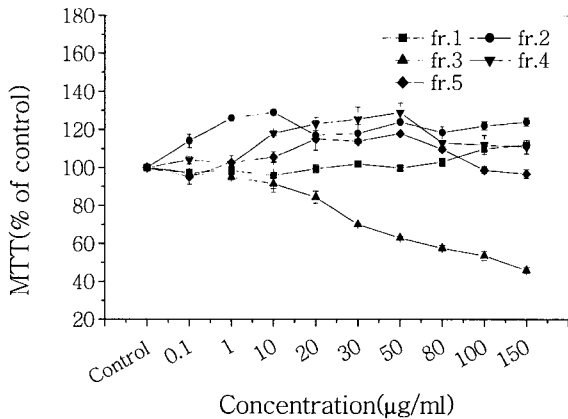


Fig. 5. Effects of Chloroform fractions from *Cornis Fructus* on the viability of SNU-C4 colorectal cell line. The cells were cultured in the presence of various concentrations of *Cornis Fructus* for 48 h. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as % control and data were mean  $\pm$  S.E. of at least five determinations

## 결 론

산수유(*Cornus Officinalis*)의 열매로부터 연속추출법을 사용하여 추출된 클로로포름 추출물 및 분획물에 대한 암세포주들의 세포 생존율 검색하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

세포독성을 조사한 클로로포름 추출물에서는 MDA-MB 231 과 B16 melanoma, SNU-C4 및 A549세포주에서 세포독성을 보였다. 다시 클로로포름 추출물을 분획하여 세포독성을 검색한 결과 산수유 분획 추출물중에 3 분획물이 모든 암세포주들에 대하여 가장 큰 세포독성을 보였다.

이것은 클로로포름 추출물의 3 분획물 중에 항암작용과 관련된 생리활성 물질이 함유되어 있으리라 사료된다.