

쑥부쟁이 분획물의 *in vitro* 암세포증식 억제 및 QR 유도효과

정복미^{1*} · 임상선¹ · 박윤자² · 배송자²

¹여수대학교 식품영양학과

²신라대학교 식품영양학과

Inhibitory Effects on Cell Survival and Quinone Reductase Induced Activity of *Aster yomena* Fractions on Human Cancer Cells

Bok-Mi Jung^{1*}, Sang-Sun Lim¹, Yun-Ja Park² and Song-Ja Bae²

¹Dept. Food Science and Nutrition, Yeosu National University, Yeosu 550-749, Korea

²Dept. Food and Nutrition, Silla University, Busan 617-736, Korea

Abstract

This study was performed to determine the inhibitory effects on cell survival and quinone reductase induced activity of *Aster yomena* (AY) on human cancer cells which, using methanol, was extracted and fractionated into five different solvent types: hexane (AYMH), ethylether (AYMEE), ethylacetate (AYMEA), butanol (AYMB) and aqueous (AYMA) partition layers. The experiment was conducted to determine cytotoxicity of various *Aster yomena* partition layers on HepG2, HeLa and MCF-7 cells by MTT assay. Among various partition layers of *Aster yomena*, AYMEE and AYMEA showed the strong cytotoxic effects on all cancer cell lines we used. The quinone reductase (QR) induced activity on HepG2 cells, AYMHE at a dose of 100 µg/mL was 2.46 times more effective compared to the control value of 1.0.

Key words: *Aster yomena*, cytotoxicity, quinone reductase, human cancer cell lines

서 론

암을 일으키는 원인은 정확히 알려져 있지 않으나 내적 요인과 외적요인으로 구분하며, 내적 요인으로는 유전인자, 면역학적 요인을 들 수 있고 외적요인으로는 화학물질, 방사선 및 바이러스 등을 들 수 있다. 또한 흡연, 비만, 식습관, 알코올 등 잘못된 생활습관의 원인으로 암이 발생하기도 한다(1). 암이 발병되어 진행이 계속될 경우 수술, 약물 처방 및 방사선치료 등을 통한 집중적 치료를 해야 하지만 이와 같은 약물 치료는 그 독성 등의 후유증을 배제할 수 없으므로 최근 항암 및 암예방 효능이 우수한 새로운 천연물 중에서 안전성 있는 약물개발이 절실히 요구되고 있다(2,3). 상용되고 있는 많은 식품 중에는 항 돌연변이 및 암을 예방하는 성분들이 많이 존재하는 것으로 알려져 있으며, 천연물을 추출한 생리활성물질에서 항암효능이 우수한 천연산물을 이용한 약물 개발이 국내에서도 활발하게 진행되고 있다(4-8).

우리들이 먹는 신선한 야채나 과일 중에는 발암과정을 억제하는 각종 유효 성분들이 많이 함유되어 있다. 특히, 녹황색 야채나 과일 중에 함유된 알파카로틴(α -carotene), 베타

카로틴(β -carotene) 이외에 리코펜(lycopene)이라고 하는 탄화 수소계의 카로티노이드는 강력한 항산화작용, 유해산소의 제거효과 등으로 암 예방효과와 관련이 있다고 추정되고 있다. 또 일반적으로 알려져 있는 국화과에 속하는 쑥, 쑥갓, 민들레 및 쑥부쟁이 등은 대표적인 식물로서 알려져 있으며(9), Lee 등(10)은 쑥의 물 추출물과 에테르 추출물의 항산화 효과를 연구한 결과 산속에 함유된 caffeic acid 등 항산화효력이 강한 성분이 많이 함유되어 있으며 항산화 효력이 좋다고 보고하였다. 또 쑥갓은 향이 독특하고 맛이 산뜻해서 날로 먹어도 좋고 나물로 해서 먹어도 좋으며 칼슘과 비타민 A, C와 B가 풍부하다고 알려져 옛날부터 위장병이나 신경성 질환에 좋다고 일컬어지고 있다(11-13). 우리나라의 산야에 널리 자생하고 있는 고들빼기는 오래 전부터 민간에서 식용뿐만 아니라 항염증 작용, 진경 및 수렴작용 등이 있다고 하였으며, 이에 관한 연구로는 Lim 등(14)에 의한 고콜레스테롤 혈중 개선효과와 Bae 등(15)에 의한 고들빼기 잎 추출물이 흰쥐의 사염화탄소에 의한 간 손상 예방효과 등이 있으며, Son 등(16)에 의한 알코올 투여 흰쥐의 지방대사와 간 기능 개선효과에 대한 연구 등이 있다. 민들레에 관한 연구로는 Kim 등(17)과 Cho 등(18)의 민들레 추출물의

*Corresponding author. E-mail: jbm@yosu.ac.kr
Phone: 82-61-659-3414, Fax: 82-61-659-3410

대사 개선효과에 관하여 연구를 하였다. 본 연구에 사용한 쑥부쟁이(*Aster yomena*, AY)는 국화과에 속하는 다년초로서 한국, 일본, 중국, 시베리아 등지에 널리 분포하며, 전국각지 산야지의 약간 습기 있는 곳에 흔히 자생한다. 쑥부쟁이는 어린순을 데쳐서 나물로 먹거나 기름에 볶아먹기도 하며, 잎에는 정유가 함유되어 있고, 비타민 C가 풍부하며, 그 외 생리활성 성분이 많이 함유되어 있다. 동의보감에서는 해열제, 이뇨제로 이용하며, 민간요법에서는 기침, 천식 등에 쓰이고 있으며, 잎에서 즙을 내어 벌레 물린 데에도 사용한다. 쑥부쟁이의 생리활성에 대한 연구는 전혀 없으므로, 본 연구는 쑥부쟁이를 사용하여 *in vitro*에서의 암세포 증식 억제효과와 암 예방 지표로 쓰이는 quinone reductase 유도활성에 대한 연구를 하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용된 쑥부쟁이는 2003년 5월 진주시내의 한 재래시장에서 구입하여 깨끗하게 손질하여 씻은 후 음건하였다. 암세포 증식 억제 실험에 사용된 시약 중 NP-40과 menadione은 Sigma사(St. Louis, USA) 제품을 사용하였고, flavin adenine dinucleotide (FAD), dicumarol 및 glucose-6-phosphate dehydrogenase는 Amresco사(USA) 제품을 구입하였으며, minimum essential medium(MEM), Dulbecco's Eagle modified medium(DMEM)과 phosphate buffered saline(PBS) 등은 Gibco-BRL(Grand Island Biologic Co., USA)에서 구입하였으며, 그 외 연구에 사용된 용매 및 시약은 특급을 사용하였다.

시료의 추출 및 분획물 제조

시료로 사용된 쑥부쟁이는 건조 후 분말화 하여 시료중량의 배의 메탄올을 첨가한 후 37°C에서 진탕한 후 4시간 동안 진탕하여 3회 반복 추출하고 회전식 진공농축기로 감압 농축시킨 후 동결 건조하여 쑥부쟁이의 methanol 추출물(AYM)을 얻고, 이 추출물을 각 용매별로 분획하여 hexane층(AY-MH), ethyl ether층(AYMEE), ethyl acetate층(AYMEA), butanol층(AYMB) 및 물층 분획물(AYMA)을 얻었다. 각 분획물을 감압 농축 후 동결 건조하여 시료로 사용하였다.

암세포 배양

본 실험에 사용한 암 세포주는 인체 간암 세포인 HepG2 (human hepatocellular carcinoma), 자궁경부암 세포인 HeLa (human cervix adenocarcinoma) 및 유방암 세포인 MCF-7 (human breast adenocarcinoma pleural effusion)로서 2003년 5월 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)에서 구입하였다. HepG2, HeLa 및 MCF-7 세포주는 DMEM medium에 10% fetal bovine serum(FBS) 100 mL와 1% 100 units/mL의 penicillin streptomycin 10 mL가 함유된 배지를

사용하여, 37°C 5% CO₂ incubator에서 monolayer로 배양하였다. 일주일에 3번 새로운 배지로 교환하고 7~8일 만에 PBS(Phosphate buffered saline) 세척한 후 0.25% trypsin-0.02% EDTA(Gibco BRL)을 사용하여 부착된 세포를 분리하였다. 집적된 암세포에 배지를 넣고 암세포가 골고루 분산되도록 피펫으로 잘 혼합하여 75 mL cell culture flask에 10 mL씩 일정량 분할하여 주입하고, 6~7일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

암세포 증식 억제 측정(cytotoxicity)

쑥부쟁이 추출 분획물의 암세포 증식억제 효과는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide를 사용하여 MTT assay로 행하였다. 각 세포주를 1×10⁵ cells/well의 농도로 맞추고 24 well에 각각 1 mL씩 첨가하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 용매 종류별 분획물을 각각 일정량의 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여서 100, 200, 300, 400 및 500 µg/mL의 농도로 첨가하였다. 48시간 동안 배양한 후 각 well에 PBS 완충액에 녹인 MTT 용액(3 mg/mL)을 100 µL씩 첨가하여 4시간 동안 다시 배양시킨 후, well 바닥에 형성된 formazan이 용해되지 않게 상등액을 제거하고 DMSO와 ethanol을 1:1로 혼합한 용액 1 mL를 첨가하여 천천히 녹인 후 UV-visible spectrophotometer를 이용하여 570 nm와 690 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 대조군 세포 수를 100%로 하였을 때의 상대적인 세포성장 억제율을 구하였다.

Quinone reductase(QR) 유도 활성 측정

QR생성 유도 효과는 Prochaska와 Santamaria의 방법(19)을 일부 변형하여 측정하였다. 즉 T-75 flask에서 배양 중인 HepG2 세포가 80%이상 증식하게 되면 24 well plate의 각 well에 1×10⁴ cells/mL가 되도록 HepG2세포를 분주하여, 37°C 5% CO₂ incubator에 24시간 동안 배양한 후 쑥부쟁이 추출물을 각각 DMSO에 녹여 40, 60, 80 및 100 µg/mL의 농도로 첨가하고 다시 24시간 동안 배양한 다음 배양액을 제거하였다. 배지가 제거된 각 well에 250 µL의 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 14 mM NaCl, 15 mM MgCl₂)를 혼합하여 well에 1 mM씩 첨가하여 5분 동안 반응시킨 후, 반응 정지 용액인 10.3 mM dicumarol, 0.5% pyridine, 5 mM potassium phosphate(pH 7.4) 혼합액을 250 µL씩 첨가하여 효소반응을 정지시키고 UV-visible spectrophotometer를 이용하여 610 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다. 그리고 단백질량은 동일한 set의 well plate에 대한 crystal violet 염색 방법으로 정량하였다.

결과 및 고찰

암세포 증식억제에 미치는 쑥부쟁이 분획물의 영향

간암세포주인 HepG2, 자궁경부암 세포주인 HeLa 및 유

방암 세포주인 MCF-7에 대한 쑥부쟁이 추출물 및 분획물의 암세포 증식억제 효과에 대한 실험 결과는 Fig. 1, 2 및 3과 같다.

Fig. 1은 인체 간암세포주인 HepG2에 용매별 각 시료 분획물을 100, 200, 300, 400 및 500 µg/mL씩 농도를 증가시키며 첨가하였을 때의 암세포 증식억제 효과를 나타낸 것이며, 200 µg/mL 첨가시부터 AYMEE, AYMEA 및 AYMB 층에서 높은 암세포 증식억제 효과가 나타났다. 즉, AYMEE를 가했을 경우 200 µg/mL 첨가했을 때 이미 94.5%의 높은 암세포 증식억제 효과를 보여 시료 농도 증가 시 유사한 수준의 암세포 증식억제 효과를 나타내었다. AYMEA의 경우 100 µg/mL을 첨가했을 때 73.9%의 높은 효과가 나타났으며, 200 µg/mL에서는 83.3%를 나타내어 농도 의존적으로 계속 높은 암세포 증식억제 효과를 나타내었고, AYMB의 경우 시료 농도 200 µg/mL를 첨가시 89.7%의 높은 암세포 증식억제 효과가 나타났으며 첨가 농도를 증가시켜도 대체적으로 그 효과가 유지되었다. 즉, 다섯 가지의 용매 분획 중 AYMEE, AYMEA 및 AYMB층에서 높은 암세포 증식억제 효과를 나타냈으며 hexane층인 AYMH에서는 300 µg/mL 시료 첨가농도에서부터 암세포 성장저지 효과가 좋았으며 최고 첨가 농도인 500 µg/mL에서는 AYM층과 같이 앞서의 세 분획층 AYMEE, AYMEA 및 AYMB층의 효과와 거의 같은 경향이였다. 자궁경부암세포주인 HeLa에 대한 실험 결과는 Fig. 2에 나타내었으며, Fig. 1의 HepG2 세포주에 대한 암세포 증식억제 효과와 매우 유사한 결과를 나타내었다. 즉, 시료 농도 200 µg/mL를 첨가했을 때 AYMEE, AYMEA 및 AYMB 분획물 모두에서 월등히 암세포 증식억제 효과가 나타났으며 평균 약 70%이상의 억제율을 보였다. 300 µg/mL

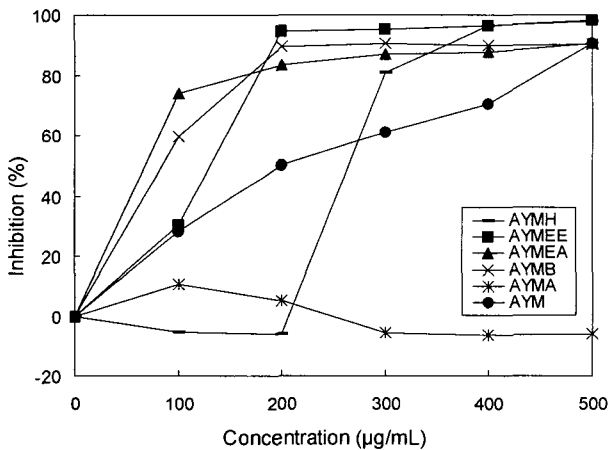


Fig. 1. Inhibitory effect on cell survival of the fractions from the methanol extract of *Aster yomena* on HepG2 cells. AYMH: Hexane partition layer of *Aster yomena*. AYMEE: Ethyl ether partition layer of *Aster yomena*. AYMEA: Ethyl acetate partition layer of *Aster yomena*. AYMB: Butanol partition layer of *Aster yomena*. AYMA: Aqueous partition layer of *Aster yomena*. AYM: Methanol partition layer of *Aster yomena*.

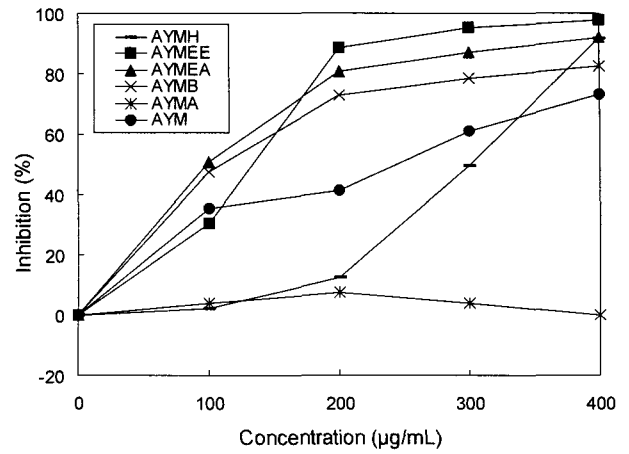


Fig. 2. Inhibitory effect on cell survival of the fractions from the methanol extract of *Aster yomena* on HeLa cells. Experimental groups: refer to Fig. 1.

를 첨가했을 때는 AYMEE에서 95.2%의 아주 높은 암세포 증식억제 효과를 나타내었고, AYMEA의 경우 87.3%, AYMB의 경우 78.4%이었으며 AYMH층의 경우는 낮은 시료 첨가 농도에서는 그 억제효과가 미약하였으나 시료 최고 첨가 농도인 500 µg/mL에서 AYMH층은 91.9%로 AYMEA층의 결과와 거의 유사하였다. Fig. 3은 유방암 세포주인 MCF-7의 결과이며, 이 경우에서도 HepG2와 HeLa 세포주의 결과와 비슷하게 나타났다. 즉 AYMA를 제외한 모든 분획층에서 농도의존적인 유사한 경향이였으며, AYMEE를 200 µg/mL를 첨가했을 때 이미 82.9%의 높은 암세포 증식억제 효과를 나타내었으며, 300 µg/mL 첨가의 경우 AYMEE는 93.9%, AYMEA는 92.1%의 암세포 증식 억제 효과를 나타내었다. 그 효과는 첨가농도를 500 µg/mL 증가시켜도 그대로 유지되었다. AYMB, AYM 및 AYMH의 경우도 낮은 농도에서는 그 효과가 약간 미약하였으나 최고 첨가 농도에서는 거의 유사한 결과를 나타내었다.

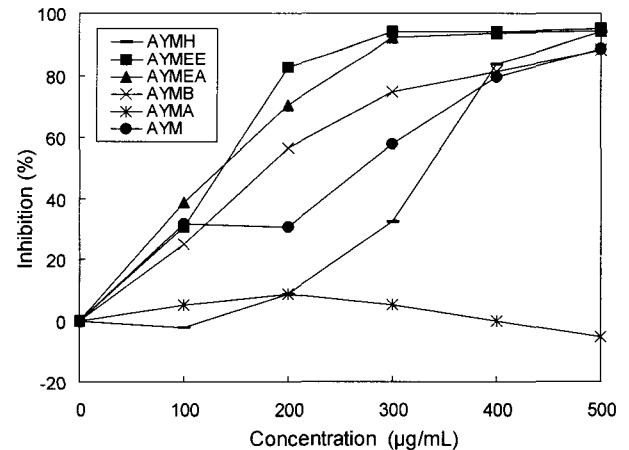


Fig. 3. Inhibitory effect on cell survival of the fractions from the methanol extract of *Aster yomena* on MCF-7 cells. Experimental groups: refer to Fig. 1.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 3종의 암세포주 HepG2, HeLa 및 MCF-7에 대하여 모두 AYMEE, AYMEA 및 AYMB층에서 높은 암세포 증식억제 효과를 나타내었다. Lee 등(20)은 국화과인 쑥갓잎에서 테르페노이드계 화합물을 분리하여 폐, 결장 등 3종의 인체의 암세포주에 대하여 비교적 강한 활성을 나타내었음을 보고하였는데 본 연구에서도 쑥부쟁이가 암세포 증식 억제 효과가 높게 나타나 암세포주의 종류는 다르나 국화과의 식물이 인체 암 세포주에 강한 활성이 있음을 확인할 수 있었다.

Quinone reductase 유도활성 효과

암예방지수로 사용되는 quinone reductase(QR) 유도효과 여부를 조사하기 위하여 쑥부쟁이 분획물의 암세포 증식억제 효과에 사용된 3종의 인체 암세포주 중 유일하게 quinone reductase를 가지고 있는 간암세포주인 HepG2를 사용하여 QR 유도 활성 효과를 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 즉, HepG2 세포주에 각각의 시료 분획물을 40, 60, 80 및 100 µg/mL의 농도로 첨가했을 때 쑥부쟁이의 hexane 분획층 AYMH에서 QR 효소 활성을 월등히 증가시키는 것으로 나타났다. 그 다음으로는 AYMEE층이었으며, 그 외의 분획층은 영향을 미치지 않았다. AYMH의 경우 용매 대조군을 1.0으로 하여 비교한 결과, 40, 60, 80 및 100 µg/mL의 시료 첨가 농도에서 각각 1.92, 2.31, 2.28 및 2.46으로 높은 QR 유도 활성효과를 나타내었으며, AYMEE의 경우 각각 1.25, 1.47, 1.71 및 1.88이었다.

이상의 결과로서 일반적으로 암예방 효과의 지수로 사용되는 QR 유도 활성효과는 쑥부쟁이 성분 중 비극성 친유성 성분이 녹아있는 hexane 분획층에 제일 많이 존재할 것으로 생각되며 ethyl ether 분획층에도 quinone reductase의 활성 유도 물질이 존재함으로써 쑥부쟁이의 비극성 용매에 녹아 있는 높은 생리활성 물질의 존재를 추정할 수 있었다.

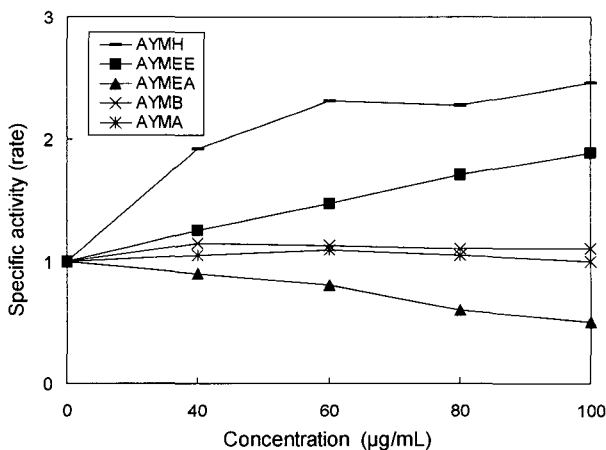


Fig. 4. Effect of the fractions from the methanol extract of *Aster yomena* on the induction of quinone reductase (QR) in HepG2 cells. Experimental groups: refer to Fig. 1.

요 약

본 연구는 약용 및 식용 식물로 사용되고 있는 쑥부쟁이 추출물과 분획물의 암세포 증식 억제 효과와 QR 유도 효과를 실험하였다. 쑥부쟁이의 metanol 추출 및 용매 분획물의 암세포 증식억제 효과를 MTT assay로 실험한 결과, 3종의 인체 암세포주, 간암세포주인 HepG2, 자궁경부암 세포주인 HeLa 및 유방암 세포주인 MCF-7에서 모두 쑥부쟁이의 ethyl ether 분획층인 AYMEE층과 ethyl acetate 분획층인 AYMEA층에서 암세포 성장 저지 효과가 제일 컸다. 특히 HepG2 세포주에서는 AYMEE를 200 µg/mL 첨가시켰을 때 94.5%의 암세포 증식 억제 효과가 나타났으며, 농도를 증가시킬수록 그 효과가 커져 500 µg/mL에서는 97.7%의 저지 효과를 보였다. MCF-7 세포주와 HeLa 세포주에서도 이와 비슷한 경향이였다. Butanol층인 AYMB와 메탄올층인 AYM에서는 대체적으로 낮은 농도에서는 효과가 약하였으나 300 µg/mL 이상에서는 높은 암세포 성장저지 효과를 보였다. HepG2 세포를 이용하여 암 예방 지수인 QR 유도 활성을 측정한 결과, 다른 분획층에 비해 비극성 용매층인 hexane 분획층, AYMH에서 QR 유도 활성을 증가시키는 경향이였다.

문 헌

- Kim TY. 2003. Lifestyle modification for cancer prevention. *Korean J Internal Medicine* 65: 136-140.
- Goodman GY, Yen YP, Cox TC, Crowlly J. 1987. Effect of verapamilon *in vitro* cytotoxicin and vinblastin in human tumor cell. *Cancer Res* 47: 2295-2311.
- Fish B. 1984. Clinical trials for the evaluation of cancer therapy. *Cancer Res* 54: 609-615.
- Choi SY, Cheigh MJ, Lee JJ, Kim HJ, Hong SS, Chung KS, Lee BK. 1999. Growth suppression effect of traditional fermented soybean paste on the various tumor cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 459-463.
- Ham SS, Han HS, Choi GP, Oh DH. 1997. Inhibitory effects of *synurus deltoids* extracts on the mutagenesis induced by various mutagens. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 528-533.
- Kim HJ, Han J, Yang EJ, Lee IS. 2000. Chemoprevention effect of *Polyzellus mutiplex*, a wild and edible mushroom. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 161-167.
- Ji JH, Kim MN, Chung CK, Ham SS. 2000. Antigenotoxic effects of *Phellinus lintens* and *Agaricus blazei* Murill extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 513-517.
- Cheng GC, Lee JY, Kim DC, Suh SO, Hwang WI. 2000. Inhibitory effect of *Salvia miltiorrhiza* extract on growth of some cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 726-731.
- Choi YJ. 1992. *Cultivation and use method of wild edible greens*. Oh Sung Press, Seoul.
- Lee KD, Kim JS, Bae JO, Youn HS. 1992. Antioxidative effectiveness of water extract and ether extract in wormwood (*Artemisia montana* Pampan). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 21: 17-22.
- Wills RBH, Wog AWK, Seriven FM, Greenfield H. 1984. Nutrients composition of chinese vegetables. *J Agric Food*

- Chem* 32: 413-416.
12. Gins VK, Kolesnikov PF, Trishin ME, Gins MS. 2000. Oxy-anthra quinones and flavonoids from *galandchrysanthemum*. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 36: 344-353.
 13. Yang SB. 1988. The effect of fertilization level, sowing distance and sowing date on the growth and quality of *Chrysanthemum coronarium* L. *MS thesis*. Korea University, Seoul, Korea.
 14. Lim SS, Jung HO, Jung BM. 1997. Effect of *Ixeris sonchifolia* H. on serum lipid metabolism in hyperlipidemic rats. *Korean J Nutr* 30: 889-895.
 15. Bae SJ, Kim NH, Koh JB, Roh SB, Jung BM. 1997. Effects of godulbaegi (*Ixeris Sonchifolia* H.) diets on enzyme activities of CCl₄-induced hepatotoxicity in rats. *Korean J Nutr* 30: 19-25.
 16. Son HS, Jung BM, Cha YS. 2001. Effects of *Ixeris sonchifolia* H. diet on lipid metabolism and liver function of rats administered with ethanol. *Korean J Nutr* 34: 493-498.
 17. Kim KH, Jeon HJ, Han YS. 1998. Screening of antimicrobial activity of the dandelion (*Taraxacum platycarpum*) extract. *Korean J Soc Food Cookery Sci* 14: 114-118.
 18. Cho SY, Oh YJ, Park JY, Lee MK, Kim MJ. 2003. Effect of dandelion (*Taraxacum officinale*) leaf extracts on hepatic antioxidative system in rats fed high cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 458-463.
 19. Prochaska HJ, Santamaria AB. 1988. Direct measurement of NAD(P)H: Quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: A screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal Biochem* 169: 328-336.
 20. Lee KB, Ha TJ, Lee BW, Lee JR, Lee J, Hwang SW, Cho DY, Nam SH. 2003. Natural products, organic chemistry: Isolation and identification of terpenoids from the leaf of *Chrysanthemum coronarium* L. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 46: 55-59.

(2004년 10월 13일 접수; 2004년 12월 21일 채택)