

국내산 장미꽃 추출물이 Chinese Hamster Ovary 세포 증식에 미치는 영향

조용식* · 전해경 · 박홍주 · 유병선¹

농업과학기술원 농촌자원개발연구소 농산물가공이용과, ¹경기대학교 자연과학부

Effect of Domestic Rose Flower Extracts on the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells

Yong Sik Cho*, Hye Kyung Chun, Hong Ju Park and Byung Sun Yoo¹

Division of Agriproduct Processing, Rural Resources Development Institute, National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon 441-850, Korea

¹Division of Natural Science, Gyonggi University, Suwon 443-760, Korea

Received November 3, 2006; Accepted April 11, 2007

The effects of rose flower extracts on the growth of CHO cells were examined. Rose flower extracts were prepared by solvent extraction with hexane, ethylacetate and ether from five domestic rose cultivar, *Rosa hybrida* L. cv. *Mihyang*, *Noeul*, *Redqueen*, *Whitelady* and *Pinklady*, respectively. The effects of rose flower extracts on the growth of CHO cells were measured using MTT colormetric assay and compared with control. Extracts of rose flowers showed stimulative effect or inhibitory effect on the growth of CHO cells depending on the kinds of solvent and concentration of extracts. Ether extracts of rose flower showed a more effective stimulative effect on the growth of CHO cells at the concentration of 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. These results suggest that rose flower has the simulating activity on the growth of CHO cells and a potential as new functional food source.

Key words: cell growth, CHO cells, *Rosa hybrida*, simulating activity, solvent extracts

서 론

최근 건강기능성을 보유한 천연물질 및 생약에 대한 관심이 높아지면서 식물자원으로부터 생리활성 물질의 탐색과 고부가가치의 식품소재 개발에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 대부분의 경우 식물체의 잎,¹⁾ 뿌리,²⁾ 열매³⁾가 대상으로 되고 있다. 꽃은 특유의 색과 향기 등으로 주로 관상용이나 민간요법에서는 약재로도 이용된 바 있어 꽃은 색소성분과 향기성분 외에도 생리활성 물질의 보고(寶庫)로서 주목해야 될 소재이다. 칙의 꽃을 건조시킨 갈화(葛花)는 음주 후 숙취현상을 경감하는 데 효능을 보이는데,⁴⁾ 갈화로부터 분리동정한 tectorigenin, glycitein, kaikasaponin III 등의 간 기능 보호효과가 보고⁵⁻⁷⁾되었으며 이 등⁸⁾은 상기한 성분들이 알코올 대사 관련 효소에 관여하여 해독작용에 영향을 준다고 하였다. 남 등⁹⁾은 산국에서 기능성 정유물질로서 sesquiterpenoid lactones을 분

리하여 항균효과를 보고하였고, 정 등¹⁰⁾은 진달래꽃에서 항산화 효과가 높은 3,5-O-dicaffeoylquinic acid, chlorogenic acid, caffeic acid 등을 분리하였다. 또한, 전 등¹¹⁾은 유채꽃, 칙꽃 그리고 장미꽃 중에서 장미꽃 추출물이 3T3-L1 fibroblast cell 성장 촉진효과가 가장 높았다고 하였다.

장미는 쌍떡잎식물의 장미과에 속하는 관목성의 화목(花木)으로 야생종과 이를 개량하여 육성한 원예종(*Rosa hybrida Hort.*)등 약 1만 5000여 종이 알려져 있다. 장미는 국화와 더불어 전체 절화 재배면적의 57%를 차지하는 비중이 높은 화훼작물이며 대부분이 관상용이고, 향료제조의 원료로서 일부사용되고 있다¹²⁾. 지금까지 장미에 대한 연구는 원예 산업의 특성으로 새로운 품종육성¹³⁾과 절화장미의 품질보전¹⁴⁾ 및 향기성분 분석¹⁵⁾분야가 초점이 되어 왔고 신 기능성 식품소재로서 장미꽃의 유용성분과 생리활성 구명에 관한 연구는 많지 않다. 특히, 수입된 장미품종을 대체할 목적으로 최근 국내에서 새로 육성된 장미의 생리활성 탐색에 관한 연구는 매우 미진한 실정이다. 본 연구는 국내에서 육성된 국산장미의 부가가치 향상과 천연 식품소재로서 가능성을 탐색하는 기초연구의 일환으로 Chinese Hamster Ovary(CHO) 세포를 이용하여 장미꽃 추출물이 동물 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하였다.

*Corresponding author
Tel: 82-31-299-0572; Fax: 82-31-299-0553
E-mail: yscho@rda.go.kr

재료 및 방법

시험재료. 국내에서 새로 육종된 5개의 장미 품종 미향, 노을, 레드퀸, 화이트레이디 및 핑크레이디는 농촌진흥청 원예연구소 포장에서 채취하여 꽃잎만을 분리하고 동결건조한 후 -20 °C 냉동고에 분말을 저장하면서 실험에 사용하였다.

추출물의 제조. 장미꽃 추출물은 soxhlet장치를 이용하여 제조하였다. 장미꽃 분말 10 g 내외를 원통여지에 넣고 둥근 플라스크에 hexane, ether, ethyl acetate를 200~300 ml 정도 채운 다음 80°C의 항온 수조 속에서 48시간 동안 환류 추출하였다. 얻어진 추출물은 감압농축하고 동결건조한 후 Dimethylsulphoxide (DMSO, Sigma Co. St. Louis, MO)로 다시 용해한 다음 CHO 세포에 첨가하기 직전에 DMEM 배지를 이용하여 5, 50, 500 µg/ml 농도로 희석하였으며, DMSO에 의한 효과를 최소화하기 위하여 DMSO의 최종농도가 0.1%를 넘지 않도록 하였다.

사용 세포 및 배양방법. 실험에 사용된 세포주는 Chinese Hamster Ovary(CHO) 세포를 사용하였다. 세포의 배양액은 DMEM(GIBCO Lab., Grand Island, NY)에 10% Fetal bovine serum(FBS)을 첨가하고, 페니실린(100 units/ml)과 스트렙토마이신(100 µg/ml)을 보충하여 만들었다. 세포는 5% CO₂로 조정된 배양기에서 37°C로 배양하였으며, 장미꽃 추출물을 첨가하기 전에 2일 동안 배양된 세포를 실험에 사용하였다.

세포 성장률의 측정. CHO 세포(DMEM media in 10% FBS)를 이용하여 P-100 dish에서 5 × 10⁵ cells/ml을 loading 한 후 2일 동안 배양한 다음 2 × 10⁶ cells/ml(viability 90% 이상)으로 하여 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay¹⁶⁾로 세포 성장률을 측정하였다. 기하급수적으로 성장하는 CHO 세포의 농도를 7 × 10⁵ cells/ml로 조정 한 다음 96 well microplate에 7 × 10⁴ cells/100 µl/well로 loading 하여 CO₂ incubator(5% CO₂, 37°C)에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액에 추출 용매별로 5, 50, 500 µg/ml 농도의 장미꽃 추출물을 10 µl씩 첨가하고 CO₂ incubator(5% CO₂, 37°C)에서 24시간 동안 배양한 후 흡인기로 상등액을 조심스럽게 제거하고 fresh medium으로 1회 세척한 후 5 µg/ml의 MTT가 포함된 medium을 100 µl씩 첨가하고 CO₂ incubator(5% CO₂, 37°C)에서 4시간 동안 더 배양한 다음 각 well에 formazan이 형성되면 isopropanol 혼합액 200 µl를(isopropanol 9.6 ml + 1 N HCl 0.4 ml; 최종 0.04 N HCl)를 첨가하여 formazan을 녹인 다음 595 nm에서 microplate reader(DENLEY, Japan)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

동물세포의 증식에 미치는 장미꽃 추출물의 직접적인 영향을 검토하고자 새로 육종된 장미 5개 품종(미향, 노을, 레드퀸, 화이트레이디 및 핑크레이디)으로부터 꽃잎만을 채취한 후 다른 연구¹¹⁾에서 생리활성 효과가 높은 것으로 나타난 hexane, ether, ethylacetate를 사용하여 추출물을 제조하고 CHO 세포를 이용하여 장미꽃 추출물이 동물세포의 증식에 미치는 영향을 MTT를 이용한 colormetric assay 방법으로 측정하였다.

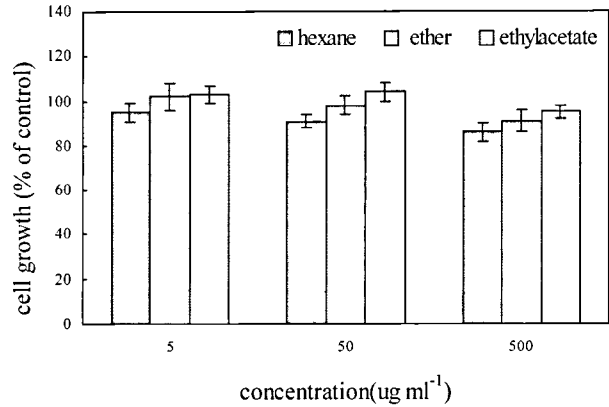


Fig. 1. Extraction solvent and dose dependent effect of flower extracts obtained from *Rosa hybrida L. cv. Mihyang* on the growth of CHO cells. Each values represents of the mean ± SD of triplicate plates.¹⁾

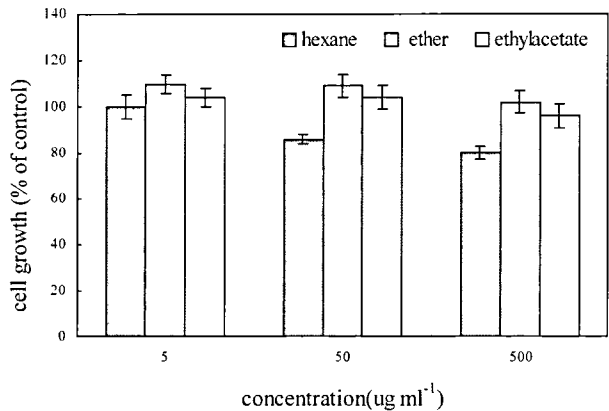


Fig. 2. Extraction solvent and dose dependent effect of flower extracts obtained from *Rosa hybrida L. cv. Noeul* on the growth of CHO cells.¹⁾

CHO 세포의 증식에 미치는 장미꽃 미향추출물의 효과는 Fig. 1과 같다. Ether와 ethylacetate 추출물을 5 µg/ml와 50 µg/ml 농도로 첨가한 경우 추출물을 첨가하지 않은 대조군에 비하여 세포수가 2~4%가 증가하였고, hexane 추출물과 500 µg/ml의 고 농도로 추출물을 처리한 경우 대조군에 비하여 세포수가 95% 이하 수준으로 감소하였다. Fig 2는 장미꽃 노을추출물이 CHO 세포의 증식에 미치는 영향을 나타낸 결과이다. Ether 추출물을 5 µg/ml와 50 µg/ml 농도로 첨가한 경우 세포수는 10% 증가하였으며, 같은 농도의 ethylacetate 추출물에서도 동일한 결과를 보였다. 이와는 달리 hexane 추출물의 경우 5 µg/ml의 농도에서는 세포생육에 영향이 없었으나, 50 µg/ml 이상의 농도에서는 세포수가 20% 정도 감소하였으며, 레드 퀸의 경우에서도 유사한 경향을 보였다(Fig. 3). 장미꽃 화이트레이디 추출물을 CHO 세포에 첨가하고 세포증식에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 5 µg/ml의 농도로 추출물을 첨가하였을 때 CHO 세포수는 ether, hexane, ethylacetate의 순으로 많았고 ether 추출물의 경우 대조군에 비하여 세포수가 12% 증가한 반면 50 µg/ml 이상의 농도에서는 추출용매의 종류에 관계없이 대조군 보다 세포수가 감소하였다. 다른 장미꽃과는 달리 핑크

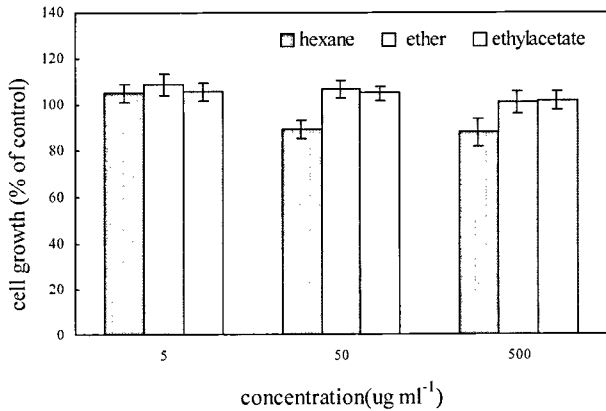


Fig. 3. Extraction solvent and dose dependent effect of flower extracts obtained from *Rosa hybrida L. cv. Redqueen* on the growth of CHO cells.¹⁾

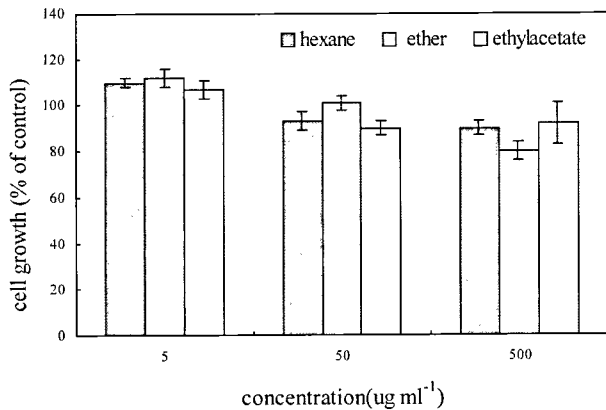


Fig. 4. Extraction solvent and dose dependent effect of flower extracts obtained from *Rosa hybrida L. cv. Whitelady* on the growth of CHO cells.¹⁾

레이디의 경우 CHO 세포의 생육은 추출용매에 따라 큰 차이를 보였는데, 5 µg/ml 농도에서 ether 추출물에서만 세포수가 8% 증가하였고 hexane과 ethylacetate 추출물은 시험된 모든 농도에서 대조군에 비하여 CHO 세포수가 감소하였다(Fig. 5).

국산 장미 추출물은 추출물의 첨가농도와 추출용매의 종류에 따라 CHO 세포의 생육에 영향을 주어 CHO 세포의 증식을 촉진하거나 생육을 억제하였으며, 품종에 따른 차이는 없었다. 식물에 함유된 화합물의 세포보호 작용은 생약연구의 경향으로 주로 항산화 작용과 관련이 있는 것으로 인식되고 있다¹⁷⁾. 따라서 장미꽃 추출물이 동물세포의 증식을 촉진하는 생리활성은 장미꽃이 가지는 항산화력과 깊은 관련이 있을 것으로 생각된다. 전 등¹⁸⁾은 장미꽃이 다른 꽃에 비하여 항산화지수가 높았고 하였고, Vander Jagt 등¹⁸⁾도 장미꽃의 높은 항산화력을 보고한 바 있다. 반면 장미꽃 추출물을 50 µg/ml 또는 500 µg/ml의 농도로 첨가한 경우에 CHO 세포의 생육은 억제되었는데, 이는 장미꽃에 함유된 화합물이 일정농도 이상에서 CHO 세포에 손상을 주어 세포의 사멸을 유도하는 독성효과로 추정된다. 이와 관련하여 이 등¹⁹⁾은 암세포에 쑥 추출물을 첨가한 경우 세포의 모양이 변형, 위축되고, 암세포의 크기와 분포가 현저하게 감소하는 세포 조직학적 해석을 제시한 바 있으며 Perez 등²⁰⁾

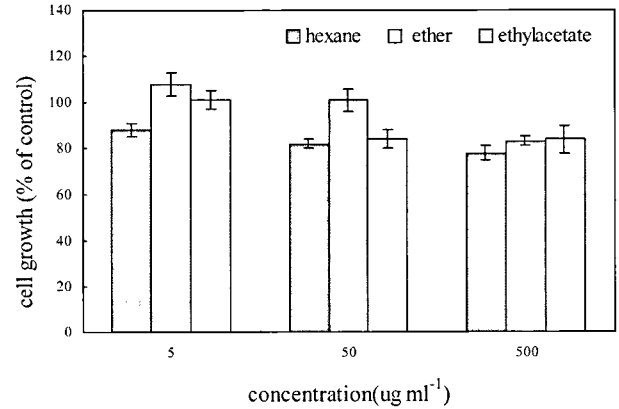


Fig. 5. Extraction solvent and dose dependent effect of flower extracts obtained from *Rosa hybrida L. cv. Pinklady* on the growth of CHO cells.¹⁾

도 *Calendula officinalis* 추출물은 일정농도 이상에서 rat liver cell의 생육을 저해한다고 하였다. 또한 장미꽃 추출물은 추출용매의 종류에 따라 CHO 세포의 생육에 차이를 보였으며, CHO 세포의 증식 촉진효과는 ether 추출물이 가장 효과적이었다. 이것은 국산장미의 꽃 속에 함유된 CHO 세포증식 촉진인자가 ether층으로 이행되었음을 의미하며, 이러한 결과는 ether로 추출한 장미꽃 추출물이 3T3-L1 fibroblast cell의 성장을 촉진하는 효과가 가장 높았다는 전 등¹¹⁾의 보고와도 잘 일치한다.

초 록

국내에서 새로 육성된 장미의 부가가치를 향상시키고 천연 식품소재로서 기능성을 탐색하는 기초연구의 일환으로 5개 장미 품종을 대상으로 유기용매 추출물을 제조하고 장미꽃 추출물이 CHO 세포의 생육에 미치는 영향을 MTT법으로 조사하였다. 장미 추출물들은 추출용매의 종류와 첨가농도에 따라 CHO 세포의 증식을 촉진하거나 생육을 억제하였으며 품종에 따른 차이는 없었다. Ether로 추출한 장미꽃 추출물을 5 µg/ml 농도로 첨가한 경우 대조군에 비하여 CHO 세포의 증식 촉진효과가 가장 높았다. 이러한 결과는 장미꽃은 CHO 세포의 증식을 조절하는 생리활성을 나타내며, 신 기능성 식품소재로서 활용하는 가능성을 시사한다.

Key words: 세포성장, CHO cell, 촉진활성, 유기용매 추출물, 장미

참고문헌

- Cai, Y. J., L. P. Ma, L. F. Hou, B. Zhou, L. Yang, and Z. L. Liu. (2002) Antioxidant effects of green tea polyphenols on free radical initiated peroxidation of rat liver microsomes. *Chemistry and Physics of Lipids*. **120**, 109-117.
- Chung, W. T., Lee, S. H., Cha, M. S., Sung, N. S., Hwang, B. and Lee, H. Y. (2001) Biological activities in roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **9**, 45-54.

3. HwangBo, H. S. and S. S. Ham. (2000) Antimutagenic and cytotoxic effects of *Aster scaber* root ethanol extract. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**, 1065-1070.
4. Kim, T. J. (1986) In *Korean resources plant*, Vol. *8, p.232. Seoul National University, Seoul.
5. Park, H. J., Park, J. H., Moon, J. O., Lee, K. T. and Jung, W. T. (1999) Isoflavone glycosides from the flower of *Pueraria lobata*. *Phytochemistry*, **51**, 147-151.
6. Lee, S.O., Woo, W. S., Woo, E. H. and Kim, K. S.(1989) Isoflavonoids of *Belamconda chinensis*. *Kor. J. Pharmacogn.* **20**, 219-222.
7. Kinjo, J., Aoki, K., Okawa, M., Shu, Y., aw Nohara, T., Nakajima, Y., Yamazaki, T., Nuho, Y. and Kurashige, T. (1999) HPLC profile analysis of hepato protective oleanene-glucuronides in *Pucranae Flos*. *Chem Pharm Bull.* **47**, 708-710.
8. Lee, J. S., Kim, N. Y., Lee, K. H., Kim, G S., Park, H. J., Choi, J. W. and Kim, S. H. (2000) Effects of flower of *Pueraria lobata* on lipid peroxidation and activities of alcohol metabolic enzymes in alcohol-treated rats. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* **29**, 935-942.
9. Chung, T. Y., Kim, M. A. and Jones, A. D. (1996) Antioxidative activity of phenolic acids isolated from jindalrae flower (*Rhododendron mucronulatum turzaninow*). *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **39**, 506-511.
10. Nam, S. H., Yang, M. S. (1995) Antibacterial activities of extracts from *Chrysanthemum boreale*. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, **38**, 269-272.
11. Chun, H. K., Choi, N. S., Park, S. Y. and Yoo B. S. (2004) Effect of edible flower extracts on antioxidative and biological activities. *Korean J. Community Living Science*, **15**, 67-76.
12. Lee, J. S. (2002) Measures to raise the competitiveness of Korean floricultural products, In *Proceedings of Agricultural Science Symposium*, p. 205, Seoul.
13. Kim, Jin Ki, Kim, Jeong Bu, Kim, Zhoo Hyeon (2002) Breeding of rose 'sabrina' with vigorous growth and pink color. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.*, **20**, 360-362.
14. Bang, C. S., Song, C. Y., Lee, J. S., Huh, K. Y. and Song, J. S. (1999) Effects of pretreatment and storage conditions on quality and vase life of cut 'Red Sandra' rose. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **17**, 762-764.
15. Kim, H. J., K. Kim, N. S. kim, and D. S. Lee. 2000. Determination of floral fragrances of *Rosa Hybrida* using solid phase trapping-solvent extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* **902**, 389-404
16. Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D. and Boyd, M. R. (1988) Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* **48**, 4827-4833.
17. Lee, K. T., Sohn, I. C., ng, E. A., Kim, D. H., Choi, S. K., Choi, J. W. and Park, H. J. (1999) Antioxidative and cytoprotective effects of isoflavones isolated from *Pueraria thunbergiana* flowers. *Yakhak Hoeji*, **43**, 736-742.
18. Vander Jagt, T. J., Ghattas, R., Vander Jagt, D. J., Crossey, M. and Glew, R. H. (2002) Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. *Life sciences*, **70**, 1035-1040.
19. Hwang, Y. K., Kim, D. C., Hwang, W. I. and Han, Y. B. (1998) Inhibitory effect of *Artemisia princeps Pampan.* extract on growth of cancer cell lines. *Korean J. Nutr.* **3**, 799-808.
20. Perez, C. J. I., Cruz, J. G., Licea, V. J. A., Arce P. E, Fattel, F. S., Villa, T. S. (2002) Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with diethylnitrosamine. *Toxicol. in Vitro.* **16**, 253-258.