

인체 전립선암세포에서 산수유 에탄올 추출물의 환경호르몬에 대한 방어효과

권승혁¹ · 권순재¹ · 김재용² · 박경욱¹ · 심기환³ · 서권일^{1*}

¹순천대학교 식품영양학과

²경북대학교 식품공학과

³경상대학교 대학원 응용생명과학부·농업생명과학연구원

Protective Effect of *Corni fructus* Ethanol Extracts Against Environmental Hormones in Human Prostate Cancer Cells

Seong-Hyuk Kwon¹, Soon-Jae Kwon¹, Jae-Yong Kim², Kyung-Wook Park¹,
Ki-Hwan Shim³, and Kwon-Il Seo^{1*}

¹Dept. of Food and Nutrition, Suncheon National University, Jeonnam 540-742, Korea

²Dept. of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

³Division of Applied Sciences, Graduate School, Institute of Agricultured & Life Sciences,
Gyeongsang National University, Gyeongnam 660-701, Korea

Abstract

Anti-proliferation effects of *Corni fructus* ethanol extracts were investigated in the RC58T/h/SA#4 cells treated with environmental hormones including dioxin and bisphenol A. The proliferation was decreased at the concentration over 500 µg/mL in the RC58T/h/SA#4 cells with ethanol extracts of various concentrations (1, 10, 100, 500, and 1000 µg/mL). The environmental hormones such as dioxin and bisphenol A increased the growth of RC58T/h/SA#4 cells in the charcoal-treated FBS (cFBS) medium. The proliferation was the highest at 1 nM and 0.1 µM for the tested dioxin and bisphenol A concentration, respectively. Ethanol extracts showed inhibition of the proliferation in a dose-dependent manner at the tested concentrations (10, 100, 300, and 500 µg/mL) in the RC58T/h/SA#4 cells treated with the environmental hormones. The anti-proliferation was the highest at 500 µg/mL concentration among the tested ethanol extracts.

Key words: *Corni fructus*, prostate cancer cells, cytotoxicity, environmental hormones

서 론

환경호르몬이란 독성이 있는 유해 화학물질 중 생체의 호르몬 기능에 변화를 일으키는 물질로서 체내에서 호르몬 생산, 분비, 대사, 결합 및 배설 등에 작용하여 교란을 유발하는 외인성 물질을 총칭한다(1). 이들 화학물질들은 생체 내에서 에스트로겐과 같은 호르몬 작용을 흉내 내어 인체의 생식 및 성 발달 과정 파괴, 면역기능 저하, 피부질환, 정자 감소증, 유방암 및 전립선암과 같은 호르몬 관련 암을 유발하는 등 인간의 건강에 심각한 피해를 주고 있는 것으로 알려져 있다(2). 최근에 환경호르몬 중 dioxin, bisphenol A 등이 대표적인 물질로 알려져 있으며, dioxin은 합성된 화합물중 독성이 가장 강한 화합물로서, 다른 환경호르몬보다 극소량으로도 치명적인 독성을 야기할 수 있다고 보고되고 있다(1). 또한 bisphenol A는 일회용 식품용기, 일회용 음료 캔 및 식품캔, 치과 재료에 사용되는 폴리카보네이트 수지 구성

물로서, 폴리카보네이트 수지로 이루어진 플라스크를 고온, 고압 멸균을 수행할 때 bisphenol A가 용출되어 인체에 영향을 미친다고 보고되고 있다(3).

한편 산수유(*Cornus officinalis*)는 예로부터 다뇨증, 요통, 이명, 폐결핵 등의 치료제로 사용되어 왔으며, 그 과실은 자양, 강장, 음위, 이조에 약효가 있고, 간경화, 신경에 좋고, 이노작용, 혈압강하작용, 항암 및 항균작용이 있다고 한방자료에 기록되어 있다(4). 최근 산수유의 생리활성에 관한 연구로는 산수유 종자의 항당뇨효과(5), 물 추출물의 항히스타민 효과(6), 납에 의한 조직손상 억제(7), 부종억제효과(8), 정자 운동성 증가에 미치는 효과(9), 항산화 효과(10,11), 항암 효과(12), 항균효과(13), 티로시나아제 저해작용(14) 등이 보고되고 있다.

최근 환경 화학물질들이 암과 같은 질환을 일으키는 원인이 될 수 있다는 점에서 그 중요성이 대두됨에 따라 환경호르몬에 관한 연구가 진행되고 있으나, 아직은 이에 대한 체

*Corresponding author. E-mail: seoki@sunchon.ac.kr
Phone: 82-61-750-3655, Fax: 82-61-752-3657

계적인 연구가 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 이전의 본 연구결과(15)에서 암세포의 성장을 억제하였던 산수유 에탄올 추출물이 dioxin 및 bisphenol A와 같은 환경호르몬에 의해 유도된 인체 전립선암세포(RC58T/h/SA#4) 증식에 대한 억제 효과에 영향을 미치는지를 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 추출

본 실험에 사용된 산수유는 2007년 10월에 전남 구례군에서 수확하여 씨를 제거한 건조과실로서 분쇄시킨 후 10 g 당 80% 에탄올을 200 mL 비율로 첨가하여 65°C에서 3시간 동안 3회 열수추출하고 여과하였다. 이 여과액을 회전식 압축기(EYELA, Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 감압농축한 후, 4°C 냉장고에서 보관하면서 각종 생리활성 실험을 위한 시료로 사용하였다.

FBS 내의 Steroid hormones 제거

Serum에 포함된 estrogen의 활성을 최소화하기 위하여 FBS에 5% charcoal을 처리하여 55°C에서 30분 동안 교반한 후 3,000 rpm, 4°C, 20분간 원심분리 하여 상등액을 취하였고, 이를 2회 반복하여 얻은 상등액을 0.45 µm micro filter로 여과하여 cFBS(charcoal treatment FBS)를 얻은 후 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

RC58T/h/SA#4 세포의 배양

본 실험에 사용한 암세포주인 RC58T/h/SA#4는 Center for Prostate Disease Research(Department of Surgery, Uniformed Services University of Health Sciences, Bethesda, USA)에서 분양받아 37°C, 5% CO₂ incubator에서 계대 배양하여 실험에 사용하였으며, 이때 사용된 배지는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)으로 10% FBS(Fetal Bovine Serum)를 첨가한 후 실험에 사용하였다. Monolayer로 자란 암세포주를 0.25% trypsin-EDTA 시약으로 처리하여 single cell로 만든 후 최종 농도가 1×10⁴ cells/mL 되도록 희석하여 96 well plate에 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 혈청에 함유된 세포증식인자를 제거한 charcoal 처리 FBS를 1% 함유한 phenol free DMEM 배지를 well에 첨가하고 세포를 37°C, 5% CO₂ incubator에서 10분간 안정화 시켰다.

암세포 증식 억제능 측정

Dioxin, bisphenol A 및 산수유 에탄올 추출물을 농도별로 첨가하여 72시간 반응시킨 RC58T/h/SA#4 세포의 배양액을 제거하고 각 well에 차가운 12% TCA(trichloroacetic acid)를 100 µL 첨가하고 4°C에서 1시간 세포를 고정시켰다. TCA를 버린 후 well을 세척하고 1% acetic acid에 0.4%의 농도로 준비한 SRB(sulfurhodamine)용액을 50 µL 첨가하

여 세포를 1시간 동안 염색하였다. 염색 종료 후 1% acetic acid로 well을 세척한 후 차가운 10 mM Tris buffer 100 µL를 첨가하여 SRB를 녹였다. 상등액 50 µL를 96 well plate에 옮겨 microplate reader(multiscan plus, Titertek, Helsinki, Finland)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

암세포의 형태학적 관찰

전립선암(RC58T/h/SA#4) 세포에 환경호르몬(dioxin, bisphenol A) 및 산수유 에탄올 추출물(500 µg/mL)을 처리하여 72시간 반응시킨 후 위상차 현미경(DM IL LED, Leica, Wetzlar, Germany)을 이용하여 대조군과 시료처리군의 형태학적 변화를 비교 관찰하였다.

통계처리

실험결과는 3반복에 대한 평균 및 표준편차로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 실험군간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's *t*-test를 이용하였다.

결과 및 고찰

산수유 에탄올 추출물의 전립선 암세포 성장에 대한 억제효과

산수유 에탄올 추출물이 전립선 암세포인 RC58T/h/SA#4 성장을 억제하는지를 조사하기 위하여 산수유 에탄올추출물을 1, 10, 100, 500, 1000 µg/mL의 농도로 처리하여 72시간 배양시킨 후 전립선 암세포의 성장정도를 측정한 결과 농도 의존적으로 암세포성장을 억제하였으며, 500 µg/mL 농도 이상에서는 80% 이상의 높은 암세포 성장 억제 효과를 나타내었다(Fig. 1). Kim 등(12)은 산수유로부터 분리된 물질을 폐암세포주(A549) 및 유방암세포주(MCF-7)에 100 µg/mL 농도로 처리한 결과 이들 암세포 성장을 90% 이상 억제하였다고 보고한 바 있다.

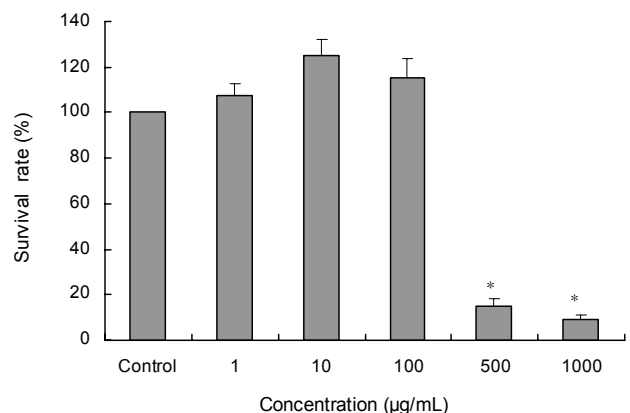


Fig. 1. Cell growth inhibition effects in the RC58T/h/SA#4 cells treated with *Corni fructus* ethanol extracts for 24 hr by SRB assay. Data values were expressed as mean±SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with the control at **p*<0.05 by Student's *t*-test.

따라서 이전의 연구 결과와 본 실험의 결과를 종합하여 볼 때 산수유에는 암세포 성장을 억제하는 물질들이 함유되어 있음을 확인할 수 있었다.

전립선 암세포(RC58T/h/SA#4)의 증식에 대한 환경호르몬의 영향

환경호르몬의 농도를 결정하기 위해서 dioxin과 bisphenol A(BPA)의 농도를 각각 0~1 nM 과 0~1 μM 의 농도를 1% cFBS를 첨가한 배지에 처리하여 72시간 배양한 후 세포의 증식을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 즉 이들 환경호르몬은(dioxin, BPA) 농도 의존적으로 RC58T/h/SA#4의 증식을 증가시켰으며, dioxin과 bisphenol A는 각각 1 nM, 0.1 μM 농도에서 전립선암세포의 성장을 가장 높게 유도하였다.

Park 등(16)은 인체 유방암 세포인 MCF-7 세포에 bisphenol A를 첨가한 후 증식 정도를 측정한 결과 0.1 μM 의 농도에서 암세포 증식을 유도하였다고 보고한 바 있다.

따라서 환경호르몬들이 호르몬 의존 암세포인 유방암 및 전립선 암세포의 증식을 유도하는 것을 확인할 수 있었으며,

후후 환경호르몬들이 암세포의 성장을 유도하는 기전에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 사료된다.

환경호르몬에 의해 유도된 RC58T/h/SA#4 세포의 증식에 대한 산수유 에탄올 추출물의 억제효과

인체 전립선 암세포인 RC58T/h/SA#4에 dioxin 및 bisphenol A를 호르몬을 제거한 배지(cFBS)에 각각 1 nM과 0.1 μM의 농도로 처리하여 전립선암세포의 증식을 유도시킨 후 산수유 에탄올 추출물을 10, 100, 300 및 500 μg/mL 농도로 처리하여 72시간 동안 배양시켜 그 생존율을 관찰한 결과는 Fig. 3, 4와 같다. 즉 dioxin을 처리한 군은 대조군에 비하여 암세포의 성장이 증가하는 것을 확인하였다. 반면에 산수유 에탄올 추출물 첨가 시 농도 의존적으로 암세포 성장을 억제하였으며, 300, 500 μg/mL 농도에서는 각각 41%, 59% 정도의 억제율을 나타내어 산수유 에탄올 추출물이 dioxin에 의한 전립선 암세포 성장을 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 3). 또한 bisphenol A를 처리한 군도 dioxin을 처리한 실험군과 유사한 경향을 나타내었으며, 300, 500 μg/mL의 농도에서 약 40% 이상의 생존율을 보여 환경호르몬에 의해 유도된 전립선암세포 성장을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

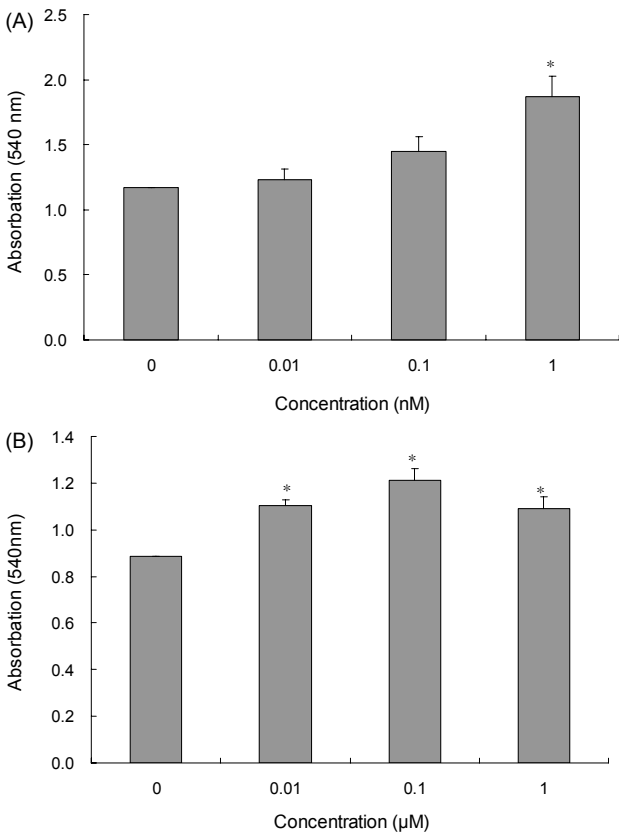


Fig. 2. Effect of environment hormone on the proliferation of RC58T/h/SA#4 cells. The cells were treated with dioxin (0.01~1 nM) (A) or bisphenol A (0.01~1 μM) (B) for 72 hr. Cell growth inhibition was measured using the SRB assay. Data values were expressed as mean±SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with the control (1% cFBS) at *p<0.05 by Student's *t*-test.

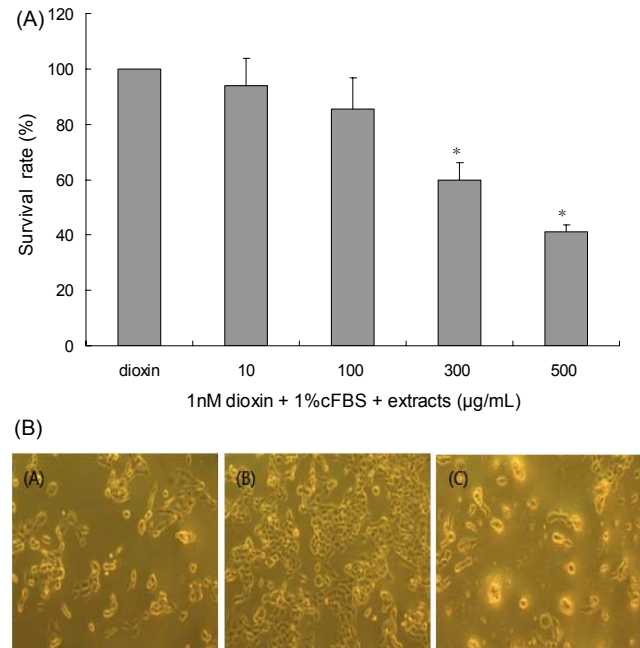


Fig. 3. Effects of *Corni fructus* ethanol extracts on dioxin-induced proliferation in the RC58T/h/SA#4 cells. A: RC58T/h/SA#4 cells were treated with *Corni fructus* ethanol extracts in presence of dioxin for 72 hr, and the cell growth inhibition was measured using the SRB assay. B: Phase-contrast micrographs (×200) of RC58T/h/SA#4 cells treated with *Corni fructus* ethanol extracts in the presence of 1% cFBS and 1 nM dioxin. (A) Control (1% cFBS), (B) dioxin (1 nM), (C) dioxin (1 nM)+*Corni fructus* ethanol extracts (500 μg/mL). Data values were expressed as mean±SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with the control (1% cFBS) at *p<0.05 by Student's *t*-test.

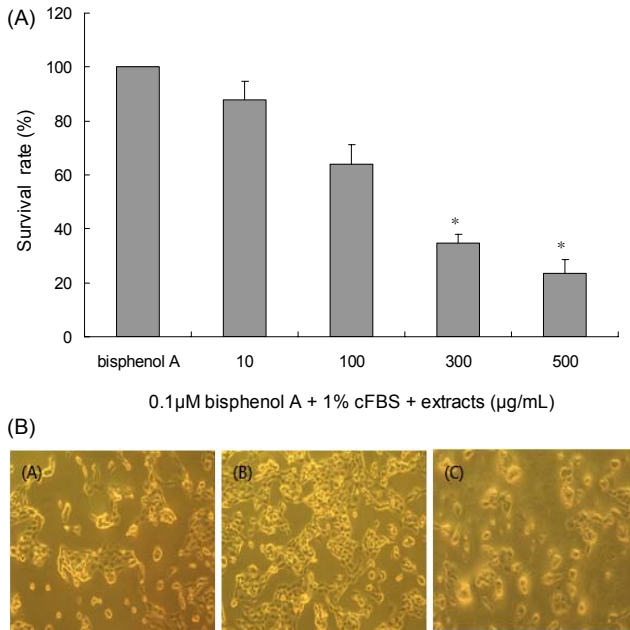


Fig. 4. Effects of *Corni fructus* ethanol extracts on bisphenol A-induced proliferation in the RC58T/h/SA#4 cells. A: RC58T/h/SA#4 cells were treated with *Corni fructus* ethanol extracts in presence of bisphenol A for 72 hr, and the cell growth inhibition was measured using the SRB assay. B: Phase-contrast micrographs ($\times 200$) of RC58T/h/SA#4 cells treated with *Corni fructus* ethanol extracts in the presence of 1% cFBS and 0.1 μ M bisphenol A. (A) Control (1% cFBS), (B) bisphenol A (0.1 μ M), (C) bisphenol A (0.1 μ M) + *Corni fructus* ethanol extracts (500 μ g/mL). Data values were expressed as mean \pm SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with the control (1% cFBS) at $*p < 0.05$ by Student's *t*-test.

Park 등(16)은 인체 유방암 세포인 MCF-7 세포에 환경호르몬인 bisphenol A 0.1 μ M을 처리하여 증식을 유도시킨 후 당귀의 주요 생리활성 물질인 decursin을 처리한 결과 1 μ g/mL 이상에서 대조군에 비하여 환경호르몬에 의해 유도된 유방암세포의 증식을 억제하였다고 보고하였다. 따라서 항암 활성을 가지는 천연물질들이 환경호르몬에 의해 유도되는 암세포 성장을 억제하는 것을 확인할 수 있었으며, 앞으로 환경호르몬에 의한 인체 피해를 줄이기 위해서 생리활성들이 입증된 천연물들을 활용해야 할 것으로 생각된다.

요 약

산수유 에탄올 추출물이 환경호르몬인 dioxin 및 bisphenol A(BPA)에 의해 유도된 인체 전립선 암세포인 RC58T/h/SA#4(prostate epithelial primary cancer cell lines)의 성장을 억제하는지를 조사하였다. 즉 산수유 에탄올 추출물을 10, 100, 300 및 500 μ g/mL 농도로 RC58T/h/SA#4에 처리했을 시 500 μ g/mL 농도 이상에서 높은 성장 억제율을 나타내었으며, dioxin과 bisphenol A를 다양한 농도로 처리한 결과 각각 1 nM, 0.1 μ M 농도에서 가장 높은

전립선암세포 증식을 유도하였다. 한편 환경호르몬(dioxin, BPA)에 의해 RC58T/h/SA#4의 증식을 유도시킨 후 산수유 에탄올 추출물을 10, 100, 300 및 500 μ g/mL 농도로 처리한 결과 대조군에 비하여 산수유 에탄올 추출물 500 μ g/mL 농도에서 그 억제율이 가장 높았다.

문 헌

- Poland A, Knutson JC. 1982. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 22: 517-554.
- Banerjee SK, Banerjee S, Li SA, Li JJ. 1994. Induction of chromosome aberrations in Syrian hamster renal cortical cells by various estrogens. *Mutat Res* 311: 191-197.
- Lee SM, Choi HK, Yu GH. 2003. Effect of bisphenol A, non-ylphenol, pentachlorophenol on the proliferation of MCF-7 and PC-3 cells. *Korean J Biotechnol Bioeng* 18: 424-428.
- Seo KI, Lee SW, Yang KH. 1999. Antimicrobial and anti-oxidative activities of *Corni fructus* extracts. *Korean J Postharvest Sci Technol* 6: 99-103.
- Park YK, Whang WK, Kim HL. 1995. The antidiabetic effects of extracts from *Cornus officinalis* seed. *Chung-Ang J Pharm Sci* 9: 5-11.
- Seo YB, Kil GJ, Lee YK, Lee YC. 2002. Study on the effects of *Corni fructus* about the anti-allergic action. *Korean J Herboogy* 1: 1-17.
- Han SH, Shin MK, Lee SB. 2003. Effects of extracts of shanshuyu (*Cornus officinalis* Sieb). *Korean J Food Culture* 18: 544-550.
- Won DH, Cho JH, Kim HS, Ko JH, Lee J, Park SA, Lee HJ, Yook CS, Kim IH, Won BP. 1996. Studies on the analysis of *Corni fructus* and its preparation. *The Annual Report KFDA* 1: 197-201.
- Jeng H, Wu CM, Su SJ, Chang WC. 1997. A substance isolated from *Cornus officinalis* enhances the motility of human sperm. *Am J Chinese Med* 25: 301-306.
- Kim YE, Lee YC, Kim HK, Kim CJ. 1997. Antioxidative effect of ethanol fraction for several Korean medicinal plant hot water extracts. *Korean J Food Nutr* 2: 141-144.
- Kim OK. 2005. Antidiabetic and antioxidative effects of *Corni fructus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Oil Chem Soc* 22: 157-167.
- Kim BH, Park KU, Kim JY, Jeong IY, Yang GH, Cho YS, Lee ST, Seo KI. 2004. Purification and characterization of anticarcinogenic compound from *Corni fructus*. *Korean J Food Sci Technol* 36: 1001-1007.
- Kim YD, Kim HK, Kim KJ. 2003. Antimicrobial activity of solvent fraction from *Cornus officinalis*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 829-832.
- Fukushima M, Kimura S. 1989. Studies on cosmetic ingredients from crude druge (I). *Shoyakugaku Zasshi* 43: 142-147.
- Kwon SH, Yang HS, Kim JY, Park KW, Shon MY, Kang KS, Shim KH, Seo KI. 2009. Biological activities of ethanol extract from *Corni fructus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 287-291.
- Park KW, Choi SR, Yang HS, Cho HW, Kang KS, Seo KI. 2007. Anti-proliferation effects of decursin from *Angelica gigas* Nakai in the MCF-7 cells treated with environmental hormones. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 825-831.

(2009년 4월 6일 접수; 2009년 5월 22일 채택)