

3,4,5-Trihydroxybenzoic Acid와 관련 화합물의 구강암 세포주에 대한 세포독성효과

한두석¹⁾ · 이재숙²⁾ · 강정일³⁾ · 백승화⁴⁾*

¹⁾원광대학교 치과대학 구강해부학교실, ²⁾광주여자대학교 미용과학과, ³⁾대불대학교 물리치료학과,

⁴⁾원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과

The Cytotoxic Effect of 3,4,5-Trihydroxybenzoic Acid and Related Compounds against Oral Cancer Cell Lines

Du Seok Han,¹⁾ Jae Sug Lee,²⁾ Jeong Il Kang³⁾ & Seung Hwa Baek⁴⁾*

¹⁾Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea.

²⁾Department of Beauty Science, Kwangju Women's University, Kwangju 506-713, Korea.

³⁾Department of Physical Therapy, Daebul University Youngam, 526-702, Korea.

⁴⁾Department of Herbal Resources, Professional School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea.

Abstract

Objectives : In order to evaluate the cytotoxicity of 3,4,5-trihydroxybenzoic acid and related compounds on the growth of normal cell lines and human oral epithelioid cell line, cell viability, cell adhesion ability, and morphological changes of cells were examined.

Methods : We measured the cytotoxicity of 3,4,5-trihydroxybenzoic acid and related compounds with 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide-[MTT], and 2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium -5-carboxanilide-[XTT) methods.

Results : The cytotoxicity of 3,4,5-trihydroxybenzoic acid(IC₅₀, 2,552.40 μM) was low according to the toxic criteria. Cytotoxic effect of 3,4,5-trihydroxybenzoic acid and related compounds against IC₅₀ value in cell morphology increased in a concentration-dependent manner. In light microscopy, 100 μM 3,4,5-trihydroxy-benzoic acid showed th highest cytotoxic activity.

Conclusions : These results suggest that 3,4,5-trihydroxybenzoic acid may have a potential anticancer

· 접수 : 2009년 7월 22일 · 수정접수 : 2009년 8월 6일 · 채택 : 2009년 8월 10일

* 교신저자 : 백승화, 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과

Tel : 063-850-6225, Fax : 063-850-6225, E-mail : shbaek@wonkwang.ac.kr

activity

Key words : Cytotoxicity, 3,4,5-trihydroxybenzoic acid, cell viability, cell adhesion ability.

I. 서론

악성종양의 발생은 환경, 유전적 배경, 호르몬, 면역학적 인자들의 다양한 상호 연관 과정을 통한 다단계의 발생 과정, 즉 시작단계 (initiation), 발암촉진단계(promotion), 진전단계(progression)의 단계를 거치며, 지속적이고 조절되지 않는 성장 및 세포 분화 과정의 이상을 특징으로 한다.^{1,2)} 이러한 과정은 오랜 기간에 걸쳐 진행되며, 각 진행 단계는 여러 인자에 의해 조절되며, 그에 따른 세포학적, 유전자적 변화도 매우 다양하다.²⁾ 구강 및 인두 점막 상피에서 유래하는 편평세포암종은 전체 두경부 발생 암종의 90% 이상을 차지하며, 매우 공격적이며 빈번한 전이성으로 인해 많은 생명을 위협하고 있다.^{3,4)} 현재 두경부의 편평세포암종의 유병률은 매년 증가 추세이며 사망률도 증가하고 있다. 두경부의 암 발생과정은 대부분 구강점막에서 발생하며, 광범위하고 지속적인 화학적, 생물학적, 물리적 발암인자의 노출에 의한 다단계의 발암과정을 거치는 "Field Cancerization" 개념으로 설명하고 있다.^{1,5)} 특히 구강점막은 육안적으로 관찰이 가능하고 전암병소라 알려져 있는 광범위한 백반증(leukoplakia)형성이 나타나기 때문에 대표적인 다단계 발암 모델이지만,^{6,7)} 구강암 발생 기전과 정확한 생물학적 예후 인자를 찾아내지 못하고 있으며 그 결과 항암제의 개발도 이루어지지 못하고 있다.

Benzoic acid(BA)는 가장 간단한 페놀산으

로서 안식향산이라고도 하며,⁸⁾ 검 벤조인(gum benzoin)속에 유리상태로 존재하거나 페루발삼이나 트루발삼속에 변질 에스테르로 존재한다. 벤조산 나트륨염은 방부제, 검담제로 쓰이며, 해열제로서 급성관절 류마티즘, 방광염, 만성기관지염의 치료에도 쓰인다. 최근에는 각종 식물로부터 벤조산을 분리하였으며,⁹⁻¹³⁾ Abd-EL-Mawla와 Beerhues¹⁴⁾는 cinnamic acid로부터 벤조산을 생합성하였다. Wilhelm 등¹⁵⁾은 벤조산은 표피 삼투압의 장벽(epidermal permeability barrier)으로 작용할 수 있으며, Nunez Selles 등¹⁶⁾은 mango를 달인 즙에는 gallic acid, mangiferin, (+)-catechin, (-)-epicatechin 및 벤조산 등이 함유되어 있으며, 항산화작용이 있다고 보고하였다. Murakami 등¹⁷⁾은 벤조산 유도체인 TAC-101(4-[3,5-bis(trimethylsilyl) benzamido] BA는 JHH-7 인체 간세포상피 암종세포(JHH-7 human hepatocellular carcinoma cells)에 대하여 항암작용이 있다고 보고하였다. 또한 Sarma와 Antony⁸⁾는 버터에 함유되어 있는 무색지방인 tributyltin 성분을 구성하는 3종류의 벤조산염은 인체 백혈병세포주인 K562세포와 인체 유방암세포주인 MCF-7세포에 민감한 세포독성을 나타내는데, 이는 세포의 칼슘이온의 유입과 활성산소(ROS)의 생성에 의한 세포고사 기전에 벤조산염이 작용하는 결과라고 보고하였다. 벤조산 유도체는 방향족 고리구조에 카르복실기와 수산기의 위치에 따라, 각종세포에 나타나는 세포독성도 다르게 나타나는 데, De Graff¹⁸⁾는 3,4-dihydroxybenzoic acid(protocatechuic acid, DHB)를 chinese hamster V79 세포에 처리하

면 아드리아마이신(adriamycin, ADR)이 나타내는 세포독성을 감소시킬 수 있다고 보고하였다. Costa-Lotufe 등¹⁹⁾은 p-hydroxybenzoic acid를 암세포주에 처리하면 세포의 성장을 억제한다고 보고하였으며, Marom 등²⁰⁾은 2,6-dihydroxybenzoic acid(farnesylthio-salicylic acid, FTS)를 정상세포인 NIH3T3 섬유모세포와 암세포주인 chinese hamster ovary세포와 B16 흑색종세포에 처리하면, 세포의 성장을 선택적으로 억제한다고 보고하였다. 방향족 화합물은 항산화능 뿐만아니라 세포독성에 관련되어, 페놀 분자구조의 수산기나 카르복실기의 위치에 따라, 혹은 분자구조의 입체적인 성질에 따라 활성이 다르게 관찰된다고 보고하고 있다.²¹⁻²³⁾

식물성 성분중 페놀산은 방향족 고리구조에 결합된 수산기와 카르복실기의 수와 위치에 따라, 생리활성에 다양한 영향을 미치기 때문에 페놀산의 분자구조에 따른 항암활성을 연구할 필요가 사료된다.²²⁻²⁴⁾ 본 연구는 benzoic acid(BA), 3-hydroxybenzoic acid(3-HBA), 2,3-dihydroxybenzoic acid(2,3-DHBA), 2,6-dihydroxybenzoic acid(2,6-DHBA)와 3,4,5-trihydroxybenzoic acid(3,4,5-THBA, gallic acid)를 선정하여, 방향족 화합물의 수산기와 카르복실기의 위치와 수가 정상세포와 인체 구강유상피 암세포의 세포 생존율과 세포부착 저지능에 어떠한 영향을 미치는가를 보고하는 바이다.

II. 실험방법

1. 시약 및 기기

세포배양에 사용한 Minimum Essential Medium(MEM)과 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM) 및 RPMI 1640배지, fetal bovine serum, penicillin, streptomycin, fun-

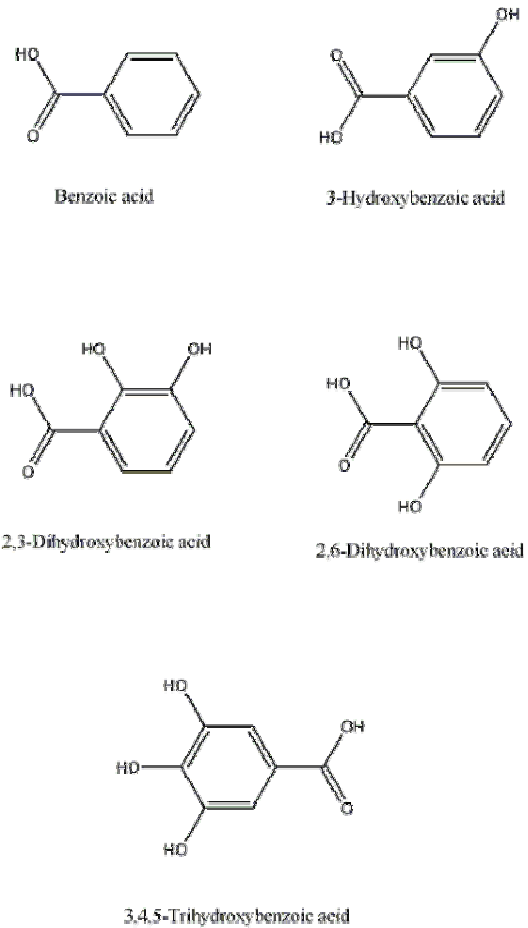


Fig. 1. Molecular structures of benzoic acid, 3-hydroxybenzoic acid, 2,3-dihydroxybenzoic acid, 2,6-dihydroxybenzoic acid and 3,4,5-trihydroxybenzoic acid.

gizone 시약은 Gibco/BRL(Grand Island, NY, USA)제 이었으며, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma Chemical Co.) 정량과 2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide(XTT, Sigma Chemical Co.) 정량에 사용한 시약과 benzoic acid(BA), 3-hydroxy benzoic acid(3-HBA), 2,3-dihydroxybenzoic acid(2,3-DHBA), 2,6-dihydroxybenzoic acid(2,6-DHBA)와 3,4,5-trihydro-

xybenzoic acid(3,4,5-THBA, gallic acid), (분자구조식 Fig. 1)는 Sigma Chemical Co.(ST. Louis, MO, USA)사에서 구입하였다.

2. 실험기기

세포의 배양은 CO₂ incubator(Shellab Co., Cornelius, U.S.A.)를 사용하였으며, 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기(Mariefeld Co., Mergentheim, Germany)를 이용하였다. MTT 정량, XTT 정량에는 ELISA reader(Spectra max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, U.S.A.)를 사용하였다.

3. 세포배양

BA, 3-HBA, 2,3-DHBA, 2,6-DHBA와 3,4,5-THBA의 세포독성과 암세포에 대한 세포독성을 측정하기 위하여, 원광대학교 의과대학 해부학교실에서 분양받은 NIH3T3 섬유모 세포(NIH3T3)는 MEM배지에, 서울대학교 암연구소에서 분양받은 인체 구강유상피 암세포(KB)는 RPMI 1640배지에 10% fetal bovine serum, penicillin(25 unit/mL) 및 fungizone을 첨가하여 사용하였다. 세포의 배양은 온도 37 °C, 습도 95%, 탄산가스 농도 5%의 배양기(CO₂ incubator, Shellab Co., Cornelius, U.S.A.)를 사용하였다. 실험을 위하여, 일차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin-EDTA로 처리하여 세포를 분리한 후, Turk형 혈구계산기를 이용하여 세포수가 5×10^4 cells/mL가 되도록 세포 부유액을 만들었다.

4. MTT 정량분석법

Mosmann의 방법²⁵⁾에 의하여, NIH3T3 섬유모 세포와 인체 구강유상피 암세포를 96-well plate에 well당 5×10^4 cells/mL 세포수를 넣

고 24시간 배양 후, BA, 3-HBA, 2,3-DHBA, 2,6-DHBA와 3,4,5-THBA 자체의 세포독성과 암종세포에 대한 세포독성을 측정하기 위하여, BA, 3-HBA, 2,3-DHBA, 2,6-DHBA와 3,4,5-THBA를 각각 농도별(1, 25, 50 및 100 μ M)로 첨가한 후 48시간 배양한 후 상층액을 버리고, 당일 조제한 500 μ g/mL MTT를 배양 용기당 1.0mL씩 넣어 은박지로 포장한 후 3시간 동안 배양하였다. 살아있는 세포는 MTT와 반응하여 보라색 불용성 formazan 침전물이 형성되며, 이것을 용해시키기 위하여 상층액을 버리고 10% dimethylsulfoxide를 200 μ L씩 넣고 15분간 실온 방치한 후, ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

5. XTT 정량분석법

Laminin-coated plate는 laminin 1mg을 PBS 2 mL에 용해하여 냉장고에 보관하면서, 필요시에 laminin의 농도(20 mg/mL)를 결정하여, 찬 PBS 용액으로 희석하였다. 이 용액을 24well plate의 각 well에 200 μ L씩 분주하여 하룻밤동안 건조시킨 뒤, PBS로 두 번 세척하여, 3% Bovine Serum Albumin(BSA)를 각 well에 200 μ L씩 첨가해 잘 흔들어 준 다음 제거하고, PBS로 두 번 정도 세척하였다. 배양된 NIH3T3 섬유모 세포와 인체 구강유상피 암세포 5×10^4 cells/mL 세포수를 laminin으로 coating한 배양용기에 넣고 24시간 배양한 후, MTT 정량 분석법과 같은 방법으로, BA, 3-HBA, 2,3-DHBA, 2,6-DHBA와 3,4,5-THBA를 넣고, 다시 48시간 배양한 후 배지는 조심스럽게 제거하고, PBS로 두 번 세척하였다. 여기에 XTT와 혼합하여, 각 well에 200 μ L씩 주입하고, 4~6시간동안 배양한 후, 450 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

6. IC₅₀ 결정

BA, 3-HBA, 2,3-DHBA, 2,6-DHBA와 3,4,5-THBA의 IC₅₀ 결정은 배양중인 NIH3T3 섬유모 세포와 인체 구강유상피 암세포를 각 배양 용기 당 5×10^4 cells/mL씩 넣고 24시간 배양 후, 1, 25, 50, 100 μ M의 BA, 3-HBA, 2,3-DHBA, 2,6-DHBA와 3,4,5-THBA를 첨가하여 48 시간 배양한 후, MTT 및 XTT 정량을 하여 이들 각각에 대한 50% 억제농도인 IC₅₀을 회귀 방정식²⁶⁾에 의해 구하였다.

7. 통계처리

실험결과와 통계처리는 Students' t-test에 준하였으며, p-value가 0.05 미만일 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

8. 세포의 광학 현미경적 관찰

세포의 광학 현미경적 관찰을 위하여, 인체 구강유상피 암세포는 각각 세포 분주 후, BA, 3-HBA, 2,3-DHBA, 2,6-DHBA와 3,4,5-THBA를 처리하여, MTT와 XTT를 처리하기 전에 독립위상차 현미경(Inverted Microscope, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

III. 결과 및 고찰

최근에는 페놀 화합물의 세포독성과 화학적 구조와의 관계에 관한 연구뿐만 아니라, 페놀성 성분의 고리구조에 결합된 수산기의 위치에 따른 선택적 세포독성에 관한 연구도 다양하게 이루어지고 있는 데, 3,4-dihydroxybenzoic acid의 암종세포주에 대한 성장억제 효과¹⁹⁾와 아드리아마이신에 의하여 유발되는 세포독성을 감소시킬 수 있다는 보고가 있다.¹⁸⁾ 2,3-dihydroxybenzoic acid에 결합된 수산기에 대

한 다양한 기능에 대하여도 보고되고 있으며,²⁷⁻²⁹⁾ 2,6-dihydroxybenzoic acid는 chinese hamster ovary세포, NIH3T3 섬유모세포, B16 피부흑색종 세포에서 GTP-결합단백질의 메틸화에 의하여 세포의 성장을 억제하는 것으로 보고하였다.²⁰⁾ 현재 많이 사용되고 있는 Tetrazolium-based colorimetric(MTT) 검색법은 96-well plate를 사용하고 검사결과를 ELISA reader (multiwell microplate reader)를 이용하여 많은 시료를 간단히 빠르고 객관성 높게 판독할 수 있어, 세포독성 및 세포증식 검색법으로서 sulforhodamine B(SRB) 검색법과 더불어 널리 사용되고 있다. MTT 검색법의 과정 중 생성된 formazan의 용해단계를 생략한 방법으로서 MTT의 변형 물질인 XTT, MTS ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) 등을 이용한 방법이 개발되어 사용되고 있으나, MTT 검색법에 비하여 background가 높고 값이 비싼 단점이 있다. MTT 검사법은 항암제의 감수성에 대한 1차 선별검사의 목적으로 많이 사용되지만, 성장인자에 대한 세포의 감수성 실험 등에도 대단히 유용하게 사용될 수 있다.²⁵⁾ 본 연구는 생물검정법으로 많이 이용되는 MTT와 XTT 분석방법으로, 정상세포에 대한 세포독성은 적으며, 인체 구강암세포에 대한 세포독성은 강한 생리활성물질 즉 선택적 세포독성을 나타내는 생리활성물질을 연구하기 위하여, 벤조산(BA) 유도체인, 3-HBA, 2,3-DHBA, 2,6-DHBA와 3,4,5-THBA를 선정하여, 정상세포인 NIH3T3 섬유모 세포와 암종 세포인 인체 구강유상피 암세포에 적용한 후, 세포 생존율, 세포부착 저지능, 및 광학 현미경적으로 관찰하였다.

1. NIH3T3 섬유모세포에 대한 세포독성

방향족 화합물의 벤젠고리 구조에 카르복실

기와 수산기의 위치와 수에 따라, 세포 생존율과 세포부착 저지능에 대한 활성을 검토하기 위하여, BA, 3-HBA, 2,3-DHBA, 2,6-DHBA와 3,4,5-THBA를 선정하여, 정상세포인 NIH3T3 섬유모 세포에 적용한 후, BA, 3-HBA, 2,3-DHBA, 2,6-DHBA와 3,4,5-THBA의 분자구조에 따른 세포 생존율과 세포부착 저지능의 활성 관계를 검토하였다. BA, 3-HBA, 2,3-DHBA, 2,6-DHBA와 3,4,5-THBA의 정상세포인 NIH3T3 섬유모 세포에 대한 MTT와 XTT 흡광도는 방향족 고리구조에 카르복실기와 수산기의 수와 위치에 활성에 큰 변화없이, 농도 의존적으로 감소하였으며, 벤조산 유도체에 대한 세포 생존율과 세포부착 저지능도 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다. BA, 3-HBA, 2,3-DHBA, 2,6-DHBA와 3,4,5-THBA의 IC₅₀의 측정값에서 얻은 연구결과에 의하면, 벤젠고리에 카르복실기가 있는 BA가 가장 높은 최소억제 농도(IC₅₀, 1,225.8µM)의 측정값이 관찰되었으며, 메타위치에 수산기가 있는 3-HBA(IC₅₀, 1,385.0 µM)보다 약 1.1배 정도로 높은 세포독성이 관찰되었으며, 벤조산의 2번과 3번위치에 수산기를 갖는 2,3-DHBA보다 약 2.5배 정도로 세포 생존율이 낮았으나, 1,2,3-DHBA와 구조 이성질체인 2,6-DHBA(IC₅₀, 4,972.5 µM)보다는 약 4.1배 정도로 높은 세포독성이 관찰되었다.³¹ 이러한 세포 생존율의 변화는 올소-메타위치에 수산기가 있는 2,3-DHBA의 세포 생존율이 올소-올소위치에 수산기가 있는 2,6-DHBA보다 세포 생존율이 낮은 결과는, 아마도 벤젠고리의 카르복실기와 올소-올소위치에 수산기와 수소결합으로 인한 카르복실기의 독성이 완화에 의한 것으로 사료되며, 이는 다른 방향족 화합물 중에, 가장 낮은 세포독성으로 거의 독성이 없는 것으로 판단된다.³¹ 벤조산에 수산기의 수가 가장 많은 3,4,5-THBA(IC₅₀, 2,552.4 µM)는 2,3-DHBA와 구조 이성질체인 2,6-DHBA보다 약 553-2420 µM 차이의

높은 세포독성이 관찰되어, 벤젠고리에 카르복실기가 3,4,5번위치에 수산기와 떨어져있어, 카르복실기와 수산기의 수소 결합력이 감소되어, 카르복실기의 올소위치에 나타낼수 있는 산성(H⁺)능력이 증가하여, 정상세포의 세포 생존율이 낮은 것으로 생각된다(Table I). BA, 3-HBA, 2,3-DHBA, 2,6-DHBA와 3,4,5-THBA의 XTT 흡광도에서 얻은 IC₅₀의 측정값에 의하면, 벤조산(IC₅₀, 1,292.1 µM)의 세포부착 저지능은 가장 높은 활성이 측정되었으며, 벤조산 메타위치에 수산기가 있는 3-HBA(IC₅₀, 1,414.9 µM)보다 약 1.1배 정도로 높은 세포부착 저지능이 관찰되었으며, 벤조산에 수산기의 수가 가장 많은 3,4,5-THBA(IC₅₀, 2,445.6 µM)는 세포부착 저지능이 2,3-DHBA과 2,6-DHBA보다 활성이 높게 측정되었다. 벤조산의 수산기가 올소-메타위치에 있는 2,3-DHBA는 벤조산보다는 약 2.8배 정도로 세포부착 저지능이 낮게 관찰되었으며, 2,3-DHBA의 구조 이성질체인 2,6-DHBA보다는 약 3배 정도로 세포부착 저지능이 낮게 관찰되었으며,³⁰ 벤조산의 올소-메타위치에 수산기가 있는 2,3-DHBA는 올소-올소위치에 수산기가 있는 2,6-DHBA보다 약 1.1배 정도로 높은 활성이 측정되었다. 이러한 벤조산의 수산기의 수와 위치는 세포부착 저지능과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있는데, 벤조산 유도체의 세포독성처럼 벤조산에 카르복실기와 수산기의 위치와 수는 수소결합력으로 인한 산성능력의 증감에 따라 활성에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 벤조산과 관련 화합물에 대한 XTT정량 분석법에 의한 IC₅₀측정값은 MTT 정량 분석법으로 측정된 것처럼, BA > 3-HBA > 3,4,5-THBA > 2,3-DHBA > 2,6-DHBA 순서로 활성이 감소되어 나타났다. 이와같은 연구결과에 의하면, 정상세포인 NIH3T3 섬유모 세포에 대한 XTT 흡광도는 MTT흡광도처럼, 벤조산 유도체의 분자구조와 수산기의 위치와 수에 따라, 유사

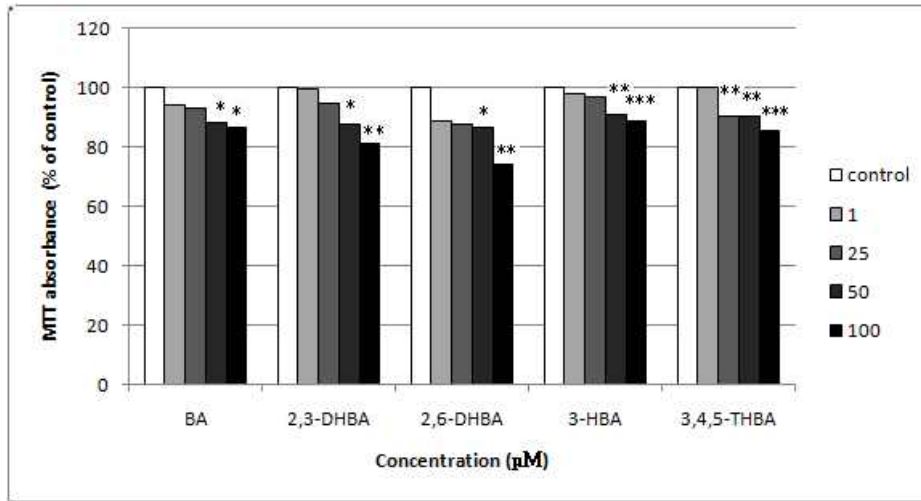


Fig. 2. The cytotoxic activity of BA, 3-HBA, 2,3-DHBA, 2,6-DHBA and 3,4,5-THBA on KB by the MTT method. The values represent the mean \pm standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 (Students' t -test).

한 활성을 관찰할 수가 있었다. 앞으로 벤조산 유도체와 페놀산 및 프라보노이드의 분자구조에 따른 세포독성에 따른 활성관계를 연구할 가치가 있다고 사료된다(Table I).

2. 인체 구강유상피 암종세포에 대한 세포독성.

BA, 3-HBA, 2,3-DHBA, 2,6-DHBA와 3,4,5-THBA의 인체 구강유상피 암종세포에 대한 세포 생존율과 세포부착 저지능은 농도 의존적으로 흡광도를 감소시켰으며, 벤조산은 50 μ M 농도와 100 μ M 농도에서 통계적으로 유의성이 관찰되었지만(p <0.05), 100 μ M 3-HBA에서 통계적으로 유의성이 관찰되었다(p <0.05). 2,3-DHBA, 2,6-DHBA와 3,4,5-THBA는 50 μ M 농도(p <0.05)와 100 μ M 농도(p <0.01)에서 통계적으로 유의성이 있었다. BA, 3-HBA, 2,3-DHBA, 2,6-DHBA와 3,4,5-THBA는 100 μ M 농도(p <0.01)에서 통계적으로 유의성이 측정되었으며, 벤조산 유도체의 세포독성은 수산

기의 증가에 따라, 최소억제 농도 (IC_{50})는 BA (419.9 μ M) > 3-HBA (323.1 μ M) > 2,3-DHBA (260.7 μ M) > 2,6-DHBA (222.4 μ M) > 3,4,5-THBA (168.4 μ M) 감소순서로 활성이 관찰되었다. 그렇지만 BA와 3-HBA의 최소억제 농도 (IC_{50})는 페닐기에 한개의 수산기에 의하여, 약 100 μ M농도의 활성이 증가하는 것으로 보아 세포독성에 많은 영향을 미치는 것으로 사료된다. 2,3-DHBA와 2,6-DHBA의 경우에 세포독성은 두 분자구조의 수산기에 대한 위치에 따라, 두 화합물의 구조 이성질체에 대한 세포독성은 2,3-DHBA > 2,6-DHBA와 같이 두 개의 수산기의 올소-올소위치가 올소-메타위치보다 더 활성이 증가하는 현상이 관찰되었으며, 3,4,5-THBA에서 가장 높은 세포독성이 관찰된 것은 다른 벤조산보다 수산기의 위치와 수에 따라 독성이 증가하는 것으로 사료된다 (Fig. 2, Table I).³⁰⁾

BA, 3-HBA와 2,3-DHBA의 세포부착 저지능은 세포 생존율과는 달리 보다 100 μ M 농도에서 세포부착 저지능에 대한 통계적으로

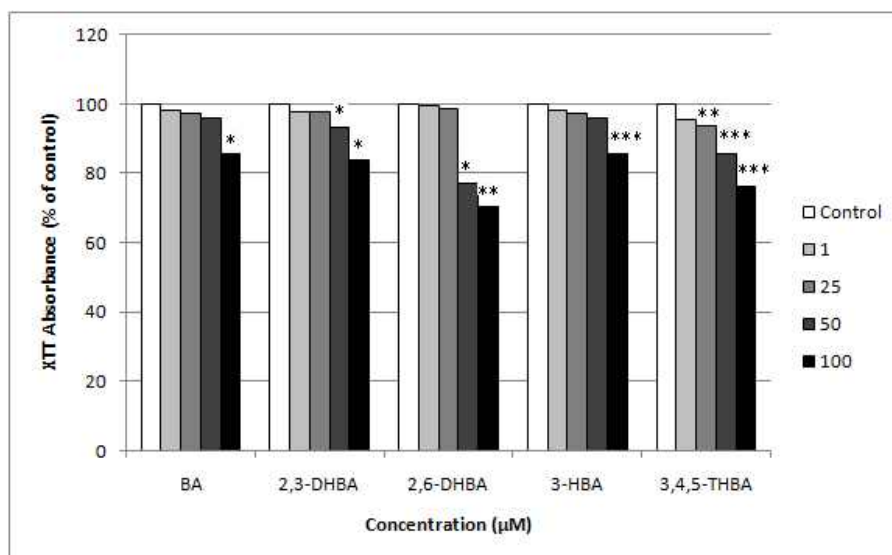


Fig. 3. Cell adhesion ability of BA, 3-HBA, 2,3-DHBA, 2,6-DHBA and 3,4,5-THBA on KB by the XTT method. The values represent the mean \pm standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Students' t-test).

Table I. The cytotoxic activity of BA, 3-HBA, 2,3-DHBA, 2,6-DHBA and 3,4,5-THBA on NIH3T3 fibroblast and KB cell lines by the colorimetric method^a

Compound	IC ₅₀ (μ M) ^b			
	MTT		XTT	
	NIH3T3	KB	NIH3T3	KB
BA	1,225.8	419.9	1,292.1	375.5
3-HBA	1385.0	323.1	1414.9	366.0
2,3-DHBA	3,105.8	260.7	3,552.9	299.5
2,6-DHBA	4,972.5	222.4	3,822.1	235.7
3,4,5-THBA	2,552.4	168.4	2,445.6	162.5

^aBA, 3-HBA, 2,3-DHBA, 2,6-DHBA and 3,4,5-THBA were examined in four concentrations in triplicate experiments. ^bIC₅₀ represents the concentration of BA, 3-HBA, 2,3-DHBA, 2,6-DHBA and 3,4,5-THBA required for 50% inhibition of cell growth. BA; Benzoic acid, 3-HBA; 3-hydroxybenzoic acid, 2,3-DHBA; 2,3-dihydroxybenzoic acid, 2,6-DHBA; 2,6-dihydroxybenzoic acid, and 3,4,5-THBA; 3,4,5-trihydroxybenzoic acid.

유의성이 관찰되었다($p < 0.05$). 그렇지만, 세포 부착 저지능에 대한 활성은 3,4,5-THBA의 경우, 50 μ M 농도($p < 0.05$)와 100 μ M 농도($p < 0.01$)에서 통계적으로 유의성이 관찰되었다. BA, 3-HBA, 2,3-DHBA, 2,6-DHBA와 3,4,5-

THBA의 세포부착 저지능의 활성은 세포 생존율의 활성처럼, 벤조산의 수산기의 위치와 수의 증가에 따라, 최소억제 농도(IC₅₀)는 BA(375.5 μ M) > 3-HBA(366.0 μ M) > 2,3-DHBA(299.5 μ M) > 2,6-DHBA(235.7 μ M) >

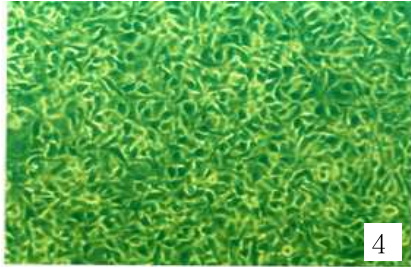


Fig. 4. Inverted photomicrograph of KB cells treated with MTT for an additional 3 hrs after incubation in unmodified medium(control) for 2 days x 100. Most cells had abundant cytoplasm and cytoplasmic process(4).

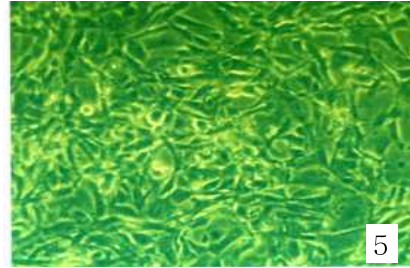


Fig. 5. Inverted photomicrograph of KB cells treated with MTT for an additional 3 hrs after incubation in 50µM 3,4,5-THBA containing medium for 2 days x 100. Most cells were formed cell cluster and number of cells were decreased(5).

3,4,5-THBA(162.5 µM) 순서로 활성이 증가하는 것으로 관찰되었다. BA와 3-HBA의 최소억제 농도(IC₅₀)는 페닐기에 한개의 수산기의 차이로 인해, 최소억제농도는 약간 활성이 증가하는 것으로 관찰되었으며, 2,3-DHBA와 2,6-DHBA의 경우에 세포부착 저지능은 두 분자구조의 수산기에 대한 위치에 따라, 두 화합물의 구조 이성질체에 대한 세포부착 저지능은 2,3-DHBA > 2,6-DHBA와 같이 두 개의 수산기의 올소-올소 위치가 결합된 2,6-DHBA의 최소억제농도가 올소-메타 위치가 결합된 2,3-DHBA보다 IC₅₀= 63.8 µM값의 최소억제 농도차이로 활성이 증가하는 현상이 관찰되었다. 벤조산에 3,4,5위치의 수산기를 갖는 3,4,5-THBA의 세포부착 저지능에 대한 최소억제농도 (162.5 µM)의 민감성은 가장 높은 활성이 관찰되었다. 이와 같은 방향족산의 세포 생존율과 세포부착 저지능은 카복실기와 수산기의 위치와 수의 증가에 따라, 활성에 영향을 미치는 것으로 생각된다(Fig. 3, Table I).³¹⁾

3. 세포의 형태학적 관찰

인체 구강상피 암종세포는 24 Well multidish 에 5 × 10⁴ 세포수를 넣고, 24시간 배양하면, 배

양용기 바닥에 뚜렷한 핵을 갖는 방추형세포가 단층을 이루며, 48 시간 배양하면, 여러 형태의 세포들이 층을 이룬다(Fig. 4). 인체 구강유상피 암종세포에 벤조산 유도체를 첨가하여 배양하면, 농도의 증가에 따라 세포의 퇴행성 변화와 세포수의 감소가 심하였으나, 3,4,5-THBA가 가장 세포의 퇴행성 변화와 세포수의 감소가 심하였다(Fig. 5). 세포의 퇴행성 변화와 세포수의 감소는 인체 구강유상피 암종세포 > NIH3T3 섬유모세포 순서로 관찰되었으며, 방향족산과 관련된 화합물에 대한 인체 구강유상피 암종세포에 세포의 퇴행성 변화와 세포수는 3,4,5-THBA > 2,6-DHBA > 2,3-DHBA > 3-HBA > BA > 순서로 활성이 증가되었다. BA, 3-HBA, 2,3-DHBA, 2,6-DHBA와 3,4,5-THBA는 정상세포보다 인체 구강유상피 암종세포에 대한 세포독성은 벤조산 유도체의 카복실기와 수산기의 수와 위치에 따라, 세포의 형태학적 변화가 다르게 관찰되었다.

IV. 결론

BA, 3-HBA, 2,3-DHBA, 2,6-DHBA와 3,4,5-THBA가 NIH3T3 섬유모 세포와 인체 구강유

상피 암종세포에 적용한 후, 세포 생존율, 세포 부착 저지능 및 세포의 형태학적 변화에 대한 광학현미경적 관찰을 실시한 결과, BA, 3-HBA, 2,3-DHBA, 2,6-DHBA와 3,4,5-THBA의 NIH3T3 섬유모세포에 대한 세포 생존율과 세포부착 저지능은 농도 의존적으로 감소시켰으며, 모든 농도에서 통계적으로 유의성이 관찰되지 않았다. 벤조산 유도체의 인체 구강유상피 암종세포에 대한 세포 생존율과 세포부착 저지능은 농도 의존적으로 흡광도를 감소시켰다. 정상세포인 NIH3T3 섬유모 세포에 대한 IC₅₀ 측정값은 BA < 3-HBA < 3,4,5-THBA < 2,3-DHBA < 2,6-DHBA 순서로 활성이 증가하였으나, 인체 구강유상피 암종세포에 대한 IC₅₀은 BA > 3-HBA > 2,3-DHBA > 2,6-DHBA > 3,4,5-THBA 순서로 세포독성이 증가하여 측정되었다. NIH3T3 섬유모세포에 벤조산 유도체를 농도별로 증가하면서 배양하면, 농도의 증가에 관계없이 세포의 형태와 수에 변화가 거의 없으나, 인체 구강유상피 암종세포는 벤조산 유도체의 농도의 증가에 따라 세포의 퇴행성 변화와 세포수의 감소가 심하였다. 세포의 퇴행성 변화와 세포수의 감소는 인체 구강유상피 암종세포 > NIH3T3 섬유모세포 순서로 관찰되었다. 벤조산 유도체의 분자구조에 따른 세포독성에 따른 활성관계를 연구할 가치가 있다고 사료된다.

참고문헌

1. Faber E: The multistep nature of cancer development. *Cancer Res.* 1984; 44: 4217-4223.
2. Weinstein IB: The origin of human cancer; molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment. *Cancer Res.* 1998; 48: 4135-4139.
3. Schlepfer JR: Prevention, detection and diagnosis of head and neck cancer. *Semin Oncol.* 1989; 5: 139-149.
4. Woods KV, Shillitoe EJ, Spitz MR, Shantz SP, Adler SK: Analysis of human papilloma virus DNA in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 1993; 2: 101-108.
5. Slaughter DL, Southwick HW, Smejkw W: Field cancerization in oral stratified squamous epithelium. clinical implication of muticentric origin. *Cancer* 1953; 6: 963-968.
6. Shin DM, Kim J, Ro JY, Hittelman J, Roth JA, Hong WK, Hittelman WN: Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res.* 1994; 54: 321-326.
7. Voravud N, Shin DM, Ro JY, Lee JS, Hong WK, Hittelman WN: Detection of chromosomes 7 and 17 aneuploidies during multistep carcinogenesis of head and neck cancer by in situ hybridization. *Cancer Res.* 1993; 53: 2874-2883.
8. Ray D, Sarma KD, Antony A: Differential effects of tri-n-butylstannyl benzoates on induction of apoptosis in K562 and MCF-7 cells. *IUBMB Life* 2000; 49: 519-525.
9. Lee HS: Tyrosinase inhibitors of *Pulsatilla cernua* root-derived materials. *J Agric Food Chem.* 2002; 50: 1400-1403.
10. Ishiwata H, Nishijima M, Fukasawa Y: Estimation of preservative concentrations in foods and their daily intake based on official inspection results in Japan in

- fiscal year 1998. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 2001; 42: 404-412.
11. Reichelt M, Brown PD, Schneider B, Oldham NJ, Stauber E, Tokuhisa J, Kliebenstein DJ, Mitchell-Olds T, Gershenzon J: Benzoic acid glucosinolate esters and other glucosinolates from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochem.* 2002; 59: 663-671.
 12. Wu TS, Chan YY, Leu YL: The constituents of the root and stem of *Aristolochia cucurbitifolia* Hayata and their biological activity. *Chem Pharm Bull(Tokyo)*. 2000; 48: 1006-1009.
 13. Kammerer D, Carle R, Schieber A: Characterization of phenolic acids in black carrots(*Daucus carota* ssp. sativus var. atrorubens Alef.) by high-performance liquid chromatography ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Spectrom.* 2004; 18: 1331-1340.
 14. Abd El-Mawla AA, Beerhues L: Benzoic acid biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum*. *Planta* 2002; 214: 727-733.
 15. Wilhelm KP, Bottjer B, Siegers CP: Quantitative assessment of primary skin irritants *in vitro* in a cytotoxicity model: comparison with *in vivo* human irritation tests. *Br J Dermatol.* 2001; 145: 709-715.
 16. Nunez Selles AJ, Velez Castro HT, Aguero-Aguero J, Gonzalez-Gonzalez J, Naddeo F, De Simone F, Rastrelli L: Isolation and quantitative analysis of phenolic antioxidants, free sugars, and polyols from mango(*Mangifera indica* L.) stem bark aqueous decoction used in Cuba as a nutritional supplement. *J Agric Food Chem.* 2002; 50: 762-766.
 17. Murakami K, Matsuura T, Sano M, Hashimoto A, Yonekura K, Sakukawa R, Yamada Y, Saiki I: 4-[3,5-Bis(trimethylsilyl)benzamido] benzoic acid(TAC-101) inhibits the intrahepatic spread of hepatocellular carcinoma and prolongs the life-span of tumor-bearing animals. *Clin Exp Metastasis* 1998; 16: 633-643.
 18. De Graff WG, I. Myers SJr, Mitchell JB, Hahn SM: Protection against adriamycin cytotoxicity and inhibition of DNA topoisomerase II activity by 3,4-dihydroxybenzoic acid. *Int J Oncol.* 2003; 23: 159-163.
 19. Costa-Lotufo LV, Jimenez PC, Wilke DV, Leal LK, Cunha GM, Silveira ER, Canuto KM, Viana GS, Moraes ME, de Moraes MO, Pessoa C: Anti-proliferative effects of several compound GS, solated from *Amburana cearensis* A. C. Smith. *Z Naturforsch [C]* 2003; 58: 675-680.
 20. Marom M, Haklai R, Ben-Baruch G, Marciano D, Egozi Y, Kloog Y: Selective inhibition of ras-dependent cell growth by farnesylthiosalicylic acid. *J Biol Chem.* 1995; 270: 22263-22270.
 21. Abu-Amsha R, Croft KD, Puddey IB, Proudfoot JM, Beilin LJ: Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of human serum and low-density lipoprotein oxidation *in vitro*: Identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine. *Clin Sci.(Colch.)* 1996; 91: 449-458.
 22. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free*

- Radic Biol Med. 1996; 20: 933-956.
23. Han DS, Kang JL, Baek SH: Cytoprotective effect of phenolic compounds against hexavalent chromium-induced cytotoxicity. Kor. J. Orient. Prev. Med. Soc. Accepted.
 24. Sauvant MP, Pepin D, Guillot J: Effects of humic substances and phenolic compounds on the in vitro toxicity of aluminium. Ecotoxicol Environ Saf. 1999; 44: 47-55.
 25. Mosmann T: Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65: 55-63.
 26. 채영암, 구자옥, 서학수, 이영만: 기초생물 통계학 제 9장 직선회귀. 서울: 학문사. 1991; pp.179-198.
 27. Valgimigli M, Merli Elgimlagutti P, Soukhomovskaia O, CicchitelliValgAntelliV A, Canistro D, FrancoliniValgimcriValg imstrorilli F, PaoliniVM, Gerrari R: HydroxcochidicaiVAeneration, levels of tumor necrosis factor-alpha, and progression to heart failure after acute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol. 2004; 43: 1000-1008.
 28. Kalenilova EI, Gorodetskaya EA, Murashev AN, Ruuge EK, Medvedev OS: Role of reactive oxygen species in the sensitivity of rat hypertrophied myocardium to ischemia. Biochem.(Mosc) 2004; 69: 311-316.
 29. Hashimoto T, Yonetani M, Nakamura H: Selective brain hypothermia protects against hypoxic-ischemic injury in newborn rats by reducing hydroxyl radical production. Kobe J Med Sci. 2003; 49: 83-91.
 30. Han DS, Park YK, Kang JI, Baek SH: The cytotoxic effect of benzoic acid and related compounds against oral cancer cell lines. J Pharm Soc Korea 2008; 52: 252-258.
 31. Borenfreund E, Babich H, Matin-Alcuacil N: Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays. The neutral red(NR) and tetrazolium MTT tests. Toxicol In Vitro 1988; 2: 1-8.