

고련피 추출물의 항암활성

김현우¹, 강세찬^{1,2*}

¹세명대학교 천연자원의약연구소, ²세명대학교 자연약재과학과

Anti-cancer Activities of Extract from the Bark of *Melia azedarach* L. var. *japonica* Makino

Hyun Woo Kim¹ and Se Chan Kang^{1,2*}

¹Research Institute for Natural Product and Medicines, Semyung University, Jecheon 390-711, Korea

²Department of Natural Medicine Resources, Semyung University, Jecheon 390-711, Korea

Abstract - In the present study, the anti-cancer activity of 80% ethanol extracts from 120 kinds of medicinal herbs and native plants were investigated. Among them, the barks of *Melia azedarach* L. var. *japonica* Makino showed the highest cytotoxicity in HCT-15 human colon cancer cell. With this result, we carried out hollow fiber (HF) assay and anti-metastasis study to confirm the anti-cancer effects of *M. azedarach* var. *japonica*. In MTT assay, *M. azedarach* var. *japonica* inhibited the proliferation of HCT-15 cells in dose-dependent manner. HF assay was carried out using A549 human adenocarcinoma cell, HCT-15 and SK-Hep1 human liver cancer cell via intraperitoneal (IP) and subcutaneous (SC) site. As a results, SK-Hep1 implanted in IP site showed the highest cytotoxicity. The result from metastatic model using B16/BL6 mouse corresponded to that of HF assay. These results suggest that the ethanol extract from *M. azedarach* var. *japonica* might have a potent anti-cancer activity and advanced study is needed for the development of novel natural anti-cancer drug.

Key words - Anti-cancer, human cancer cell, HF assay, metastasis, *Melia azedarach* L. var. *japonica* Makino

서 언

암을 포함한 각종 성인병은 식생활 습관의 변화와 평균 수명의 연장으로 증가 추세에 있으며, 이에 따른 치료제 개발 연구가 활발히 진행중이다(Boyd and Nash, 1989; Baguley *et al.*, 1981; Geran *et al.*, 1977; Thayer *et al.*, 1971). 이 중 암은 세계적으로 심장 질환 다음으로 높은 사망율을 가진 질병으로 최근 우리나라의 경우에도 사망률 순위를 구성비로 보면 암으로 인한 사망률이 매우 높다. 이러한 이유로 최근 식이와 관련된 암의 원인 물질을 검색하는 연구 뿐 아니라 식생활에서 섭취하는 식품 중 항암제로 이용하기 위한 물질 탐색 연구도 활발히 진행되고 있다(Miyazaki and Nishijima, 1981). 특히 우리나라의 경우, 200 여종의 한방 생약재가 암 환자에게 처방되고 있

음이 통계적으로 보고되었고(Hong, 1972; Cha, 1977), 여러 종의 한약재(Hwang *et al.*, 1982)와 마늘(Son and Hwang, 1990), 인삼(Hwang and Oh, 1984) 및 도라지(Lee *et al.*, 1998) 등에서 항암 작용이 있는 것으로 보고 되고 있다.

고련피는 멸구슬나무 (*Melia azedarach* L. var. *japonica* Makino)의 수피 또는 근피로서 한국, 중국 및 일본이 원산지로서 고련피로부터 분리된 beta-dihydroagarofuran 이 구충 및 살충작용을 나타냄이 보고된 바 있으며(Cespedes *et al.*, 2001), 고련피의 열수 및 에탄올 추출물에 대한 항말라리아작용(Ofulla *et al.*, 1995), SD계 자용 랫드에서 고련피 추출물의 피임작용(Keshri *et al.*, 2003), 항균작용(Khan *et al.*, 2001), 항암작용(Takeya *et al.*, 1996a; Takeya *et al.*, 1996b; Itokawa *et al.*, 1995)등이 보고된바 있다. 또한, 고련피의 에탄올 추출물이 iNOS를 억제하며, beta-carboline alkaloid류가

*교신저자(E-mail) : sckang@semyung.ac.kr

Raw264.7 세포주에서 iNOS를 억제하여 항염증작용(Lee *et al.*, 2000; Kwon *et al.*, 1999)이 있는 것으로 알려져 있으며 정장약, 조충구제약 및 말라리아열 치료에 이용되고 있다. 특히, 항암작용에 있어서 Takeya 등 (1996a; 1996b)은 고련피의 trichilin-type limonoid류 및 azadirachtin-type limonoid류가 HeLa 및 P388 세포주에 세포독성을 나타낸다고 보고한 바 있다.

본 연구에서는 120 종의 한약재 및 자생식물의 에탄올 추출물을 이용하여 세포 독성을 검색한 결과 가장 높은 활성을 가진 고련피 추출물에 대하여 대장암 세포주를 이용한 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay법, 폐암, 대장암 및 간암 세포주를 이용한 hollow fiber (HF) assay법 및 B16/BL6 mouse를 이용한 *in vivo* metastasis 모델에서 항암 효과를 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 에탄올 추출

본 연구에 사용된 시료는 (주)이수제약 (제천, 충북)의 GMP시설에서 가공된 고련피 표준한약재의 수피이며, 증류수로 2~3회 수세한 뒤 물기를 제거하여 음지에서 건조한 후 마쇄기로 분쇄하여 80% 에탄올 추출을 수행하여 시료(세명대학교 천연물라이브러리 SMT-12)로 사용하였다. 추출물은 rotary evaporator를 이용하여 40±1°C 범위 내에서 감압 농축하여 실험에 사용하였다. 배지는 RPMI 1640 및 DMEM 배지(PAA)에 10% fetal bovine serum과 penicillin-streptomycin 혼합용액을 첨가하여 사용하였으며, penicillin-streptomycin 혼합용액은 penicillin (10,000 units/ml)과 streptomycin(10 mg/ml)의 혼합액 (Gibco)을 배지에 100배 희석하여 사용하였다. MTT 염색 용액은 PBS(phosphate buffered saline)에 녹여 사용하였다. MTT, HF 및 metastasis 시험에 사용한 대장암 (HCT-15; CCL-225), 간암(SK-Hep1; HTB-52), 폐암 (A549; CCL-185) 및 흑색종(B16-F10; KCLBL80008) 세포주는 ATCC에서 분양받아 사용하였다. HF assay 및 생체내(*in vivo*) 시험에 사용한 동물은 중앙실험동물에서 구입한 B16-BL6와 누드 마우스이며, 시험개시전 최소 1주간 실험사육환경에 적응시킨 후 사용하였으며, 사육실 내의 온도는 22±3°C, 상대습도는 55±5%로 조절하고 조명은

12시간 명암 주기가 되도록 하였다.

MTT 분석

고련피 추출물에 의한 농도 의존적 세포생육의 저해효과는 MTT 방법(Denizot와 Rita, 1986)을 변형하여 분석하였다. 대장암 세포를 5 x 10⁴ cells/ml의 농도가 되도록 계수한 후 96 well microplate에 100 µl/well씩 분주하고 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 12시간 배양하여 세포를 부착시킨 다음 배지를 제거한 후 새로운 배지를 99 µl씩 첨가한 후 10, 5, 2.5 mg/ml 및 625 µg/ml 농도의 시료를 1 µl씩 첨가하였다. 이와 같이 시료가 첨가된 well plate를 24 시간 동안 배양시킨 후, MTT 용액을 각 well당 10 µl씩 넣고 세포 배양기에서 4시간 동안 반응시킨 후, MTT 용액을 제거하고 DMSO 100 µl를 첨가하여 세포를 용해시켜 microplate reader를 이용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

HF assay

고련피 추출물에 의한 마우스 체내에서의 암세포 생육 저해효과 시험은 HF assay 방법(Bridges *et al.*, 2006)을 변형하여 실시하였다. Yellow tip을 이용하여 간암, 대장암 및 폐암 세포주를 1 x 10⁵ cells/ml의 농도가 되도록 계수하여 implant membrane 내에 loading한 후 sealing하였다. 이식 전에 membrane을 6-well plate에 넣어 정상 조건하에서 12 시간 동안 *in vitro* 배양한 후 누드 마우스의 복강과 피하 조직에 각각 이식하였다. 이식 후 3일 이후부터 고련피 추출물을 100 mg/kg의 농도로 1주일간 경구 투여한 다음 마우스를 경추탈골하여 희생시킨 후 membrane을 마우스에서 제거하여 외부에 묻어 있는 조직을 씻어낸 후 membrane을 옮겨 37°C에서 30분간 안정화시킨 후 MTT 용액이 들어있는 배지 1 ml를 첨가하여 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 2.5% protamine sulfate가 들어있는 saline으로 membrane을 세척하고 4°C에서 O/N 반응시킨 다음 saline을 제거하고 다시 2.5% protamine sulfate/saline을 2ml 첨가한 뒤 4°C에서 4시간 동안 반응시켰다. Membrane을 24-well plate로 옮긴 후, membrane을 반으로 자른 후 O/N 건조시킨 다음 DMSO를 250 µl 넣은 후 실온에서 4시간 동안 흔들어진 후 microplate reader를 이용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

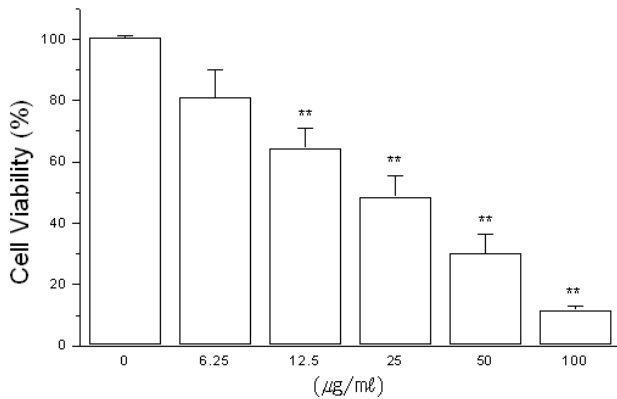


Fig. 1. Inhibitory effect on cell survival by ethanol extract from *M. azedarach* var. *japonica* in HCT-15 cells. Data represented Mean \pm SE, **; significantly different from vehicle control ($p < 0.01$).

In vivo 항암 효과

마우스 흑색종 세포주인 B16-F10은 2.5×10^6 cells/ml의 농도가 되도록 계수하여 B16/BL6 마우스에 200 μ l씩 정맥주사하여 전이암 모델을 제작하였다. 전이 유발 후 다음날부터 고련피 추출물을 100 mg/kg의 농도로 2주일간 경구투여한 다음 마우스를 경추탈골하여 희생시킨 후 폐를 적출하여 암세포 집락수를 측정하였다.

결과 및 고찰

암세포 성장 억제에 미치는 고련피 추출물의 영향

고련피 에탄올 추출물의 항암효과를 조사하기 위해 MTT assay 방법을 이용하여 추출물을 처리하지 않은 용매 대조구와 비교하여 암세포 성장 억제 효과를 확인하였다. 대장암 세포주에 고련피 추출물을 처리하였을 때 농도의존적으로 생존율이 감소하였으며 22.8 μ g/ml에서 50%의 생존율을 나타내었다(Fig. 1).

HF assay를 이용한 고련피 추출물의 암세포 증식 효과

HF assay는 암세포의 증식을 변화를 *in vivo* 상에서 단기간에 확인할 수 있는 방법으로 전이암 및 고형암 모델 실험을 수행하기 전 실시할 경우, MTT나 sulforhodamine B(SRB) assay와 같은 *in vitro* 연구 결과보다 높은 신뢰도를 가지는 시험 방법이다(Bridges *et al.*, 2006; Holbeck, 2004; Hollingshead *et al.*, 1995; Plowman *et al.*, 1999; Casciari *et al.*, 1994). 본 연구에서는 대장암, 간

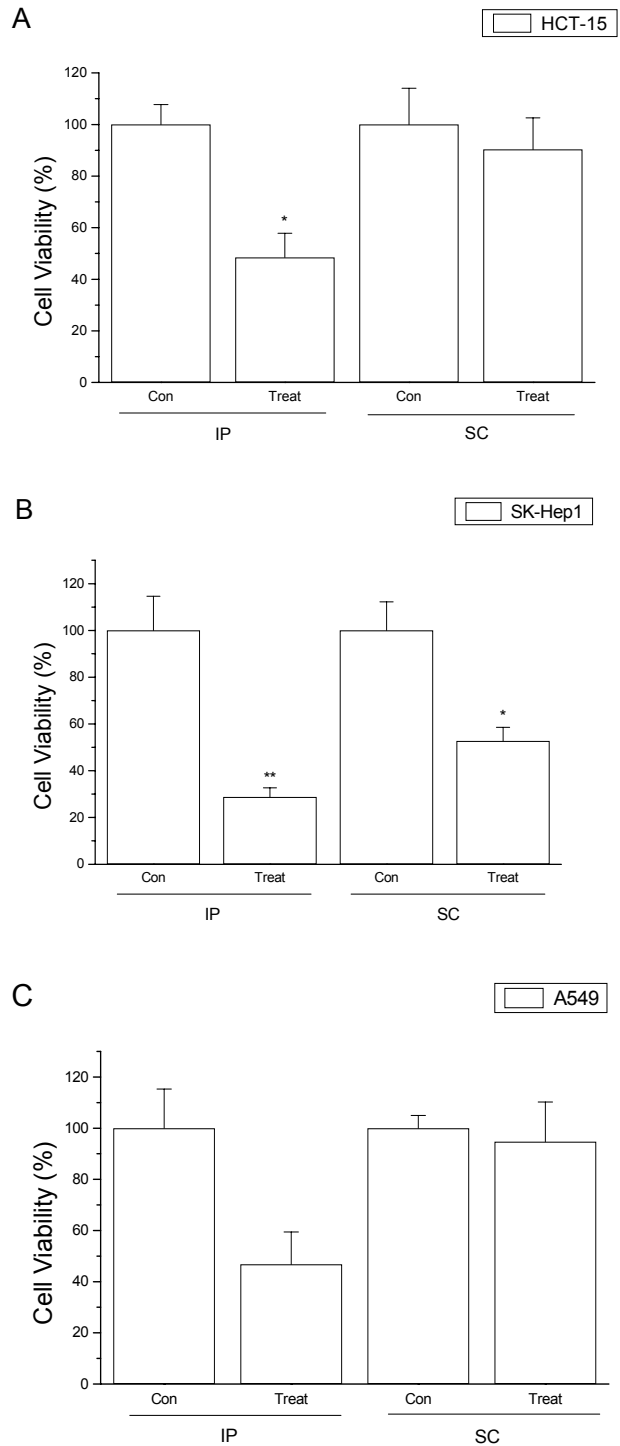


Fig. 2. Inhibitory effect on cell proliferation by ethanol extract from *M. azedarach* var. *japonica* in HCT-15 (A), SK-Hep1 (B) and A549 (C) using HF assay. IP; intraperitoneal site implantation, SC; subcutaneous implantation. Data represented Mean \pm SE, *; significantly different from vehicle control ($p < 0.05$), **; significantly different from vehicle control ($p < 0.01$).

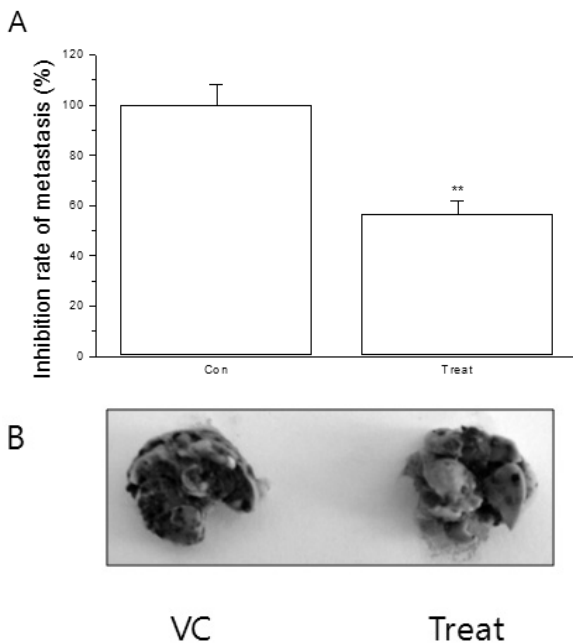


Fig. 3. Anti-metastatic effect of ethanol extract from *M. azedarach* var. *japonica* by PO for 2 weeks. VC; Vehicle control, Treat; 100 mg/kg

고련피 추출물의 *in vivo* 항암 효과

고련피 추출물의 *in vitro* 시험과 병행하여 *in vivo* 시험을 실시하였다. B16/BL6 마우스를 이용한 전이암 모델에 대한 고련피의 효과는 용매대조군에 비해 유의성 있는 수준으로 높은 전이 억제율을 보였으며, 이는 *in vitro* 시험의 결과와 일치하며 이후 고형암 모델을 이용한 시험 및 기존의 항암제와의 단독/병용 항암 효과 확인이 필요하다고 생각된다(Fig. 3). 현재까지 고련피로부터 beta-carboline alkaloid류 (Lee *et al.*, 2000)의 항염작용이 밝혀진 바 있으며, trichilin-type 및 azadirachtin-type limonoid류로부터 HeLa 및 P388 암세포주에 대한 세포독성 (Takeya *et al.*, 1996a; 1996b)이 보고된 바 있다. 따라서, 본 연구의 결과 기존의 암세포주 외에 타 고형암 세포주에 대한 항암효과가 나타나, 본 연구실에서는 고련피 추출물로부터 용매분획을 실시하고 이로부터 유효성분의 규명 및 작용기전을 밝힘으로써 자원식물로부터 새로운 항암제의 개발을 위한 노력을 경주하고 있다.

인용문헌

Baguley, B.C. and Nash, R. 1981. Antitumour activity of

substituted 9-anilinoacridines-comparison of *in vivo* and *in vitro* testing systems. *Eur. J. Cancer* 17:671-679.

Boyd, M.R. 1989. Status of the NCI preclinical antitumor drug discovery screen. *Principles and Practice of Oncology* 3:1-12.

Bridges, E.M., Bibby, M.C. and Burchill, S.A. 2006. The hollow fiber assay for drug responsiveness in the ewing's sarcoma family of tumors. *J. Pediatr.* 149:103-111.

Casciari, J.J., Hollingshead, M.G., Alley, M.C., Mayo, J.G. and Malspeis, L. 1994. Growth and chemotherapeutic response of cells in a hollow-fiber *in vitro* solid tumor model. *J. Natl. Cancer Inst.* 86:1846-1852.

Céspedes, C.L., Alarcón, J., Aranda, E., Becerra, J. and Silva, M. 2001. Insect growth regulator and insecticidal activity of beta-dihydroagarofurans from *Maytenus* spp. (Celastraceae). *Z. Naturforsch C.* 56:603-613.

Cha, S.M. 1977. Potential anticancer medicinal plants. A statistical evaluation of their frequencies of appearance in oriental medicine formularies. *Kor. J. Pharmacogn.* 8:1-15.

Denizot, F. and Lang, R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 89:271-277.

Geran, R.I., Greenberg, N.H., Macdonald, M.M. and Abbott, B.J. 1977. Modified protocol for the testing of new synthetics in the L1210 lymphoid leukemia murine model in the DR&D program, DCT, NCI. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 45:151-153.

Holbeck, S.L. 2004. Update on NCI *in vitro* drug screen utilities. *Eur. J. Cancer* 40:785-793.

Hollingshead, M.C., Alley, M.C., Camalier, R.F., Abbot, B.J. and Mayo, J.G. 1995. *In vivo* cultivation of tumor cells in hollow fibers. *Life Sci.* 57:131-141.

Hong, M.H. 1972. Statistical studies on the formularies of oriental medicine(1) prescription frequency and their origin distribution of herb drugs. *Kor. J. Pharmacogn.* 3:57-64.

Hwang, W.I., Lee, S.D. and Oh, S.K. 1982. A study on the pharmacological activities of Korean medicinal herbs mainly on the antitumor activities (in Korean). *Kor. Biochem. J.* 15:205-219.

Hwang, W.I. and Oh, S.K. 1984. Effects of petroleum ether extract of ginseng root on same enzyme activity in human colon cancer cells. *Kor. J. Ginseng Sci.* 8:153-166.

- Itokawa, H., Qiao, Z.S., Hirobe, C. and Takeya, K. 1995. Cytotoxic limonoids and tetranortriterpenoids from *Melia azedarach*. Chem. Pharm. Bull. 43:1171-1175.
- Keshri, G., Lakshmi, V. and Singh, M.M. 2003. Pregnancy interceptive activity of *Melia azedarach* Linn. in adult female Sprague-Dawley rats. Contraception 68:303-306.
- Khan, M.R., Kihara, M. and Omoloso, A.D. 2001. Antimicrobial activity of *Horsfieldia helwigii* and *Melia azedarach*. Fitoterapia 72:423-427.
- Kwon, H.C., Lee, B.G., Kim, S.H., Jung, C.M. and Hong, S.Y. 1999. Inducible nitric oxide synthase inhibitors from *Melia azedarach* var. *japonica*. Arch. Pharm. Res. 22:410-413.
- Lee, B.G., Kim, S.H., Zee, O.P., Lee, K.R. and Lee, H.Y. 2000. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264. 7 macrophages by two beta-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. Eur. J. Pharmacol. 406:301-309.
- Lee, J.Y., Hwang, W.I. and Lim, S.T. 1998. Effects of *Platycodon grandiflorum* DC. extract on the growth of cancer cell lines. Kor. J. Food Sci. Technol. 30:13-21.
- Miyazaki, T. and Nishijima, M. 1981. Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. Chem. Pharm. Bull. 29:3611-3616.
- Ofulla, A.V., Chege, G.M., Rukunga, G.M., Kiarie, F.K. and Githure, J.I. 1995. *In vitro* antimalarial activity of extracts of *Albizia gummifera*, *Aspilia mossambicensis*, *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against *Plasmodium falciparum*. Afr. J. Health Sci. 2:309-311.
- Plowman, J., Camalier, R., Alley, M., Sausville, E. and Schepartz, S. 1999. US NCI testing procedures. In: Fiebig H-H, Burger AM, editors. Contributions in oncology: relevance of tumour models for anticancer drug development. Basel: Karger pp. 121-135.
- Son, H.S. and Hwang, W.I. 1990. A study on the cytotoxic activity of garlic (*Allium sativum*) extract against cancer cells (in Korean). Kor. J. Nutrition 23:135-147.
- Takeya, K., Qiao, Z.S., Hirobe, C. and Itokawa, H. 1996a. Cytotoxic trichilin-type limonoids from *Melia azedarach*. Bioorg. Med. Chem. 4:1355-1359.
- Takeya, K., Qiao, Z.S., Hirobe, C. and Itokawa, H. 1996b. Cytotoxic azadirachtin-type limonoids from *Melia azedarach*. Phytochemistry 42:709-712.
- Thayer, P.S., Himmelfarb, P. and Watts, G.L. 1971. Cytotoxicity assays with L1210 cells *in vitro*: comparison with L1210 *in vivo* and KB cells *in vitro*. Cancer Chemother. Rep. 2:21-25.

(접수일 2009.6.15; 수락일 2009.7.20)