

몇 가지 식물추출물이 배양 NIH3T3 섬유모세포의 세포생존율과 세포부착률에 미치는 세포독성에 관한 연구

순천대학교 생물환경학과¹, 원광대학교 의과대학 병리학교실², 원광보건대학 임상병리과³

임요섭¹ · 송원섭¹ · 서영미² · 박승택² · 김신무³

A Study on the Cytotoxic Effects of Several Plant Extracts on the Cell viability and Cell Adhesion Activity in Cultured NIH3T3 Fibroblast

Yo-Sup Rim¹, Won-Seob Song¹, Young-Mi Seo², Seung-Taeck Park², and Shin-Moo Kim³

Department of Bioenviroment, Sunchon National University, Sunchun 540-742, Korea¹

Department of Anatomy, School of Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea²

Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University, Iksan 570-750, Korea³

This study was aimed to clarify the cytotoxicity of some plant extracts such as *Hosta longissima* HONDA (HL), *Hemerocallis fulva* var. Kwanso REGL (HFVK), *Hemerocallis fulva* L (HF), *Macrocapium officinale* NAKAI (MO) and *Mentha canadensis* var. *piperascens* HARA (MCVP), the cultured NIH3T3 fibroblasts were treated with 25, 50, 100, 150 and 200 µg/mL of five kinds of plant extracts for 48 hours, respectively. The cytotoxicity of plant extracts was measured by MTT and NR assays for the cell viability, and XTT assay for the cell adhesion activity. In this study, HL, MO and HFVK extracts showed the range of midtoxic-non toxic by the criteria of chemical cytotoxicity. While, the HF and MCVP extracts showed midtoxic. In the extract cytotoxicity, HL, MO and HFVK extracts showed non-toxic by the criteria of extract cytotoxicity. While, HF extract was determined as lower-toxic. In the responsive sensitivity of each plant extract on colorimetric assays, HF extract was sensitive to mitochondrial enzyme by MTT assay, lysosomal enzyme by NR assay and mitochondrial nucleus by XTT assay. While, MCVP extract was sensitive to mitochondrial enzyme by MTT assay and lysosomal enzyme by NR assay than other assays. While, HL, HFVK and MO extracts were most sensitive to NR assay. Cell culture is one of useful materials in the screening of cytotoxic and recovery effect on the putative chemical agents or plant extract. And also, colorimetric assay is regarded as very useful tools for quantitative measurement of cytotoxic effect on plant extracts in vitro.

Received 30, AUG 2010 / Returned for modification 28, NOV 2010 / Accepted 23, DEC 2010

Key Words : Cell viability, Cytotoxicity, Plant extract

I. 서 론

최근 식물이나 한약재의 추출물 중에 항암효과를 비롯한 항산화, 항염, 항균과 같은 여러 생리활성을 나타내는 성분들이 다량 함유되어 있다고 알려지면서 이를 이용한 치료적 약물개발은 물론 화장품제조나 의약품제조 및 건강식품 등의 제조에 많은 노력을 기울이고 있다(Kim 등, 2002; Wang 등, 2006; Gate 등, 2007). 지금까지 식물로부터 추출 정제된 추출물을 살펴보면 페놀화합물을 비롯한 터펜, 카로틴, 이소프란 유도체, 탄닌 및 스테로이드 등이 알려져 있다(Hirota 등, 2000; Krizkova 등, 2000). 이들은 과일을 비롯한 채소류, 견과류 등에 풍부하게 들어 있어 쉽게 섭취할 수 있다(Sun 등, 2002; Jung 등, 2003). 특히, 페놀화합물과 같은 성분들은 이의 분자구조에 수산기(OH)를 비롯하여 카르복실기(COOH)와 같은 사슬을 가지고 있는데 수산기는 다른 화합물과 친화력이 강하기 때문에 결합한 후 항염이나 항독소, 항산화 등과 같은 약리활성을 나타낸다고 보고된 바 있다(De Heredia 등, 2001; Han 등, 2006). 대체로 식물로부터 정제된 천연추출물은 기존의 화학제제에 비하여 독성이 미약하거나 또는 거의 없어 각종 식품첨가물이나 미용재료 등에 활용도가 높아지고 있다(Goldberg 등, 1999; Krizkova 등, 2000). 한편, 층층나무과를 비롯하여 광대나물과, 백합과, 물푸레과 등에 속하는 식물들도 페놀화합물과 같은 약리활성을 나타내는 성분들을 함유하고 있다고 제시된 바 있다(Yang 등, 1973; Seo 등, 1999).

이에 대한 몇 가지의 예를 들어보면 다음과 같다. 백합과에 속하는 옥잠화(*Hosta longissima* HONDA)는 7~8월에 개화하는 여러해살이풀로 맛은 담백하며 시원하다. 층층나무과에 속하는 산수유(*Macrocapium officinale* NAKAI)는 낙엽활엽수로 씨를 약으로 사용하며 맛은 시고 뽀으며 성질은 따뜻하고 독이 없다. 코르긴갈릭산을 비롯하여 타르타릭산, 말릭산, 비타민 A, 주석산 및 능금산 등 다양한 성분을 가지고 있다. 산수유는 오래 전부터 현기증을 비롯한 중이염, 강장, 수렴 등에 널리 사용되어 왔다(김과 소, 1995). 백합과에 속하는 원추리(*Hemerocallis fulva* L)는 여러해살이풀로서 뿌리를 약재로 사용한다. 맛은 달고 성질은 서늘하며 뿌리는 약간의 독이 있다. 뿌리에는 비타민 A, C를 비롯하여 아르기닌, 콜린, 아스파라긴 및 글

루코사이드 등 많은 성분들이 함유되어 있다. 오래 전부터 유선염을 비롯한 부종 및 수종 등에 사용되어 왔다(장, 2003). 백합과에 속하는 왕원추리(*Hemerocallis fulva* var. Kwanso REGL)는 여러해살이풀로 뿌리를 약재로 사용한다. 아데닌을 비롯한 콜린, 아르기닌 성분 등을 함유하고 있으며 원추리와 비슷하게 수종을 비롯한 월경과다, 황달, 유선염 등에 사용되어 왔다(장, 2003). 광대나물과에 속하는 박하(*Mentha canadensis* var. *piperascens* HARA)는 여러해살이풀로 잎과 줄기를 약재로 사용되어 왔다. 시원스럽고 향긋한 향을 풍기며 주성분은 멘톨을 비롯하여 캄펜, 리모넨 등을 함유하고 있다. 오래 전부터 두통을 비롯한 오심, 소화불량, 부스럼에 사용되어 왔으며 박하유는 동물실험에서 중추신경억제 및 심근마비를 일으킨다고 알려져 있다(김과 소, 1995).

그러나 몇몇 식물 추출물 중에는 간혹 독성을 나타내는 성분이 들어 있을 수가 있으며 다량 사용 시 각종 부작용을 유발할 수 있는 경우가 있다(Hirota 등, 2000; Leung 등, 2007). 따라서 실제로 이들 추출물의 적용 전에는 이에 대한 안전성에 대한 평가가 이루어져야 하기 때문에 세포독성에 대한 검색은 물론 임상적 실험에 대한 과정이 반드시 필수적 이다(Lavid 등, 2001; Li 등, 2007). 위에서 열거한 추출물은 물론이고 그 밖에도 다른 추출물에 대한 안전성 평가에 대한 기초자료가 매우 부족하기 때문에 이에 대한 연구가 시급한 실정에 있다(Kikuzaki와 Nakatami, 1993; 임과 한, 1997; Kim 등, 2003). 한편, 세포독성을 측정하는 시험관내 분석법(in vitro assay)으로 가장 널리 알려진 것으로는 비색분광법이 있는데 이는 초생체염색약을 사용하여 세포내 소기관의 효소활성을 측정하는 방법의 하나이다(Mosmann, 1983). MTT 분석법은 사립체의 막효소의 활성을 청색의 formazan MTT로 환원된 물질을 검색하는 방법이며, NR 분석법은 용해소체의 효소활성을, XTT 분석법은 사립체 핵에 대한 활성을 각각 정량하는 분석방법이다(Mosmann, 1983; Borenfreund와 Puerner, 1984; Goodwin 등, 1995). 본 연구에서는 옥잠화를 비롯한 왕원추리, 원추리, 산수유 및 박하추출물에 대한 세포독성을 조사하기 위하여 MTT 분석법과 NR 분석법에 의한 세포생존율(cell viability)과 XTT 분석법에 의한 세포부착률(cell adhesion activity)을 배양 NIH3T3 섬유모세포(mouse skin fibroblast)

를 재료로 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 배양세포

본 실험에 사용한 NIH3T3 섬유모세포는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 구입하여 사용하였다.

2) 시약

본 실험에 사용한 MTT, NR, XTT는 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입하였으며 Eagle's minimum essential medium(EMEM), fetal bovine serum(FBS), fungizone, penicillin G, streptomycin은 Gibco Chemical Co.(USA)에서 구입하였다. 그 밖에 시약은 특급시약을 구하여 실험에 사용하였다.

3) 실험기기

CO₂ incubator(Forma Scientific Co. USA), 위상차도립 현미경(Olympus, Japan), 무균대(SH-BCB1, SAM HEUNG, Korea), ELISA reader(THERMOmax, USA)를 각각 사용하였다.

2. 방법

1) 약재추출

본 실험에 사용한 약재인 옥잠화(*Hosta longissima* HONDA, HL), 왕원추리(*Hemerocallis fulva* var. Kwanso REGL, HFVK), 원추리(*Hemerocallis fulva* L, HF), 산수유(*Macrocapium officinale* NAKAI, MO) 및 박하(*Mentha canadensis* var. *piperascens* HARA, MCVP)는 2009년 순천시 구례군의 야산에서 채취하였다. 각 약재의 추출을 위하여 산수유 70 g, 박하 70 g은 1 L의 메탄올에, 왕원추리 600 g, 원추리 600 g 및 옥잠화 600 g은 6 L의 메탄올에 각각 넣어 일정 시간 정치한 다음 추출하였다. 메탄올 추출액은 농축시킨 후 여과과정을 거쳐 다시 농축시킨 후 본 실험에 사용하였다.

2) 세포배양

NIH3T3 섬유모세포의 배양은 배양용기(25 cm² flask, Nunc)에 넣어 계대배양하여 사용하였다. 세포배양을 위한 배양액은 EMEM에 10% FBS를 비롯하여 fungizone(25 µg/mL), penicillin G(25 U/mL), strepto-mycin(25 µg/mL)을 첨가하여 사용하였다. 세포배양은 위의 배양액에 세포를 넣어 37°C, 5% CO₂로 조절된 습기찬 정온기 내에서 배양하였으며, 배양된 세포는 0.25% trypsin(Gibco Chemical Co. USA)으로 처리하여 Turk 혈구계산기로 1x10⁵ cells/well이 되도록 산정하였다. 세포의 계대배양 시 3일 간격으로 배양액을 교환하여 주었다.

3) 세포독성 측정

세포독성을 측정하기 위하여 배양 중인 NIH3T3 섬유모세포에 25, 50, 100, 150, 200 µg/mL 농도의 각각의 시료를 48시간 동안 처리한 다음 MTT 분석법과 NR 분석법에 의한 세포생존율을, XTT 분석법에 의한 세포부착률을 각각 정량하였다. 세포독성은 Borenfreund와 Puermer(1984)의 독성판정기준에 따라 화학제의 세포독성[고독성, IC₅₀ < 100 µM(µg/mL); 중간독성, 100 µM(µg/mL) ≤ IC₅₀ < 1000 µM(µg/mL); 저독성, 1000 µM(µg/mL) ≤ IC₅₀ < 2000 µM(µg/mL); 무독성, 2000 µM(µg/mL) ≤ IC₅₀]과, 추출액의 세포독성[고독성, IC₅₀ < 10 µM(µg/mL); 중간독성, 10 µM(µg/mL) ≤ IC₅₀ < 100 µM(µg/mL); 저독성, 100 µM(µg/mL) ≤ IC₅₀ < 200 µM(µg/mL); 무독성, 200 µM(µg/mL) ≤ IC₅₀]을 적용하였다.

MTT(Tetrazolium MTT) 분석은 Mosmann(1983)의 분석방법에 의하였으며, 실험은 각 추출물의 시료를 농도별로 배양 NIH3T3 섬유모세포에 48시간 동안 처리하여 배양하였다. 배양이 완료된 후 실험전날 제조한 50 µg/mL의 MTT가 포함된 배양액을 well당 1 mL씩 넣어 3시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후 배양액을 버리고 PBS로 3회 세척한 다음 dimethylsulfoxide(DMSO, Sigma chemical Co, USA)를 well당 2 mL씩 넣어 실온에서 5분 동안 방치한 다음 용해된 formazan MTT를 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

NR(Neutral red)정량은 Borenfreund와 Puermer(1984)의 방법에 의하여 행하였으며, MTT 분석법과 동일하게 배

양 NIH3T3 섬유모세포에 시료를 48시간 동안 처리하였다. 처리 후 당일 제조한 50 µg/mL의 NR을 well당 1 mL씩 넣어 37°C로 조절된 항온기에서 3시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후 배양액을 버리고 PBS로 3회 세척하였다. 세척 후 1% formaldehyde-1% CaCl₂를 well당 0.5 mL씩 넣어 세포를 고정한 다음 1% glacial acetic acid-50% ethanol을 well당 2 mL씩 넣은 다음 실온에서 15분 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

XTT(Tetrazolium XTT) 정량은 1 mg laminin으로 처리된 배양용기에 NIH3T3 섬유모세포를 1x10⁵ cells/well로 넣은 후 각 추출물시료를 48시간 동안 처리하였다. 배양이 완료된 후 실험 전날 제조한 50 µg/mL의 XTT를 well당 200 µL씩 넣어 3시간 동안 배양하였다. 배양완료 후 배양액을 버리고 dimethylsulfoxide를 well당 2 mL씩 넣어 실온에서 10분간 처리한 다음 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

3. 통계처리

본 실험의 결과자료는 SPSS(version 12)에 의하여 행하였으며 mean±SD로 표시하였다. 자료에 대한 검정은 ANOVA의 변형인 일변량분산분석(ANCOVA)에 의하였으며 p-value가 0.05 미만인 경우를 유의한 것으로 하였다.

III. 결 과

1. 옥잠화(*Hosta lonissima* HONDA, HL) 추출물의 세포독성

옥잠화(HL) 추출물의 세포독성을 측정하기 위하여 MTT 분석법, NR 분석법에 의한 세포생존율 정량 및 XTT 분석법에 의한 세포부착률을 정량한 결과는 Table 1과 같다. Table 1에서와 같이 MTT분석법에서 25, 50, 100, 150, 200 µg/mL의 농도에서 세포생존율은 각각 대조군에 비하여 94.6%, 88.1%, 78.5, 70.4%(p<0.05), 64.7%(p<0.05)로 나타났다. 또한, NR분석법에 있어서는 25, 50, 100, 150, 200 µg/mL의 농도에서 세포생존율이 각각 99.8%, 84.2%, 79.9%, 66.2%, 53.1%(p<0.05)로 나타났다. XTT 분석법에 있어서는 세포부착률이 25, 50, 100, 150, 200 µg/mL의 농도에서 각각 88.7%(p<0.05), 77.3%(p<0.001), 69.9%(p<0.001), 68.8%(p<0.001), 67.8%(p<0.001)로 나타났다(Table 1). 위의 3종류의 분석법 결과에서 옥잠화 추출물은 200 µg/mL에서 IC₅₀ 농도 보다 높게 나타남으로서 Borenfreund와 Puerner(1984)의 독성 판정기준에 따라 화학제의 세포독성은 중간-무독성의 범위로 나타났으며, 추출액의 세포독성은 3종류 분석법 모두에서 200 µg/mL에서 IC₅₀이 나타나지 않았기 때문에 무독성인 것으로 나타났다.

2. 왕원추리(*Hemerocallis fulva*. L var. Kwanso REGL, HFVK) 추출물의 세포독성

배양 NIH3T3 섬유모세포에 왕원추리(HFVK) 추출물의 시료를 농도별로 처리한 결과 세포생존율과 세포부착

Table 1. Cytotoxicity of HL extract on cultured NIH3T3 fibroblast

Concentration of HL (µg/mL)	Cell viability* (%)		Cell adhesion activity* (%)
	MTT	NR	XTT
Control	251.44±67.9 (100)	204.57±83.2 (100)	117.57±15.6 (100)
25	237.78±64.4 (94.6)	204.14±106.5 (99.8)	104.29±19.1 (88.7) [†]
50	221.44±78.3 (88.1)	172.29±93.8 (84.2)	90.86±24.7 (77.3) [‡]
100	197.33±81.6 (78.5)	163.43±87.7 (79.9)	82.14±22.4 (69.9) [‡]
150	176.89±86.1 (70.4) [†]	135.43±65.4 (66.2)	80.86±26.3 (68.8) [‡]
200	162.78±72.6 (64.7) [†]	108.57±50.0 (53.1) [†]	79.71±18.4 (67.8) [‡]

*The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. [†] and [‡] are significantly different from the control at p<0.05 and p<0.001, respectively

Table 2. Cytotoxicity of HFVK extract on cultured NIH3T3 fibroblast

Concentration of HL ($\mu\text{g/mL}$)	Cell viability* (%)		Cell adhesion activity* (%)
	MTT	NR	XTT
Control	211.90 \pm 54.6 (100)	177.00 \pm 100.2 (100)	120.14 \pm 16.2 (100)
25	179.80 \pm 61.4 (84.9)	164.00 \pm 119.6 (92.7)	108.29 \pm 17.2 (90.1)
50	169.00 \pm 42.0 (79.8)	138.00 \pm 91.8 (78.0)	93.43 \pm 25.1 (77.8) [†]
100	153.90 \pm 37.6 (72.6) [‡]	118.29 \pm 72.8 (66.8)	82.00 \pm 21.0 (68.3) [§]
150	137.70 \pm 40.8 (65.0) [§]	96.29 \pm 61.6 (54.4)	80.00 \pm 16.5 (66.6) [§]
200	130.00 \pm 47.5 (61.3) [§]	91.29 \pm 61.8 (51.6)	78.43 \pm 16.7 (65.3) [§]

*The data indicate the mean \pm SD for triplicate experiments. [†], [‡] and [§] are significantly different from the control at $p<0.05$, $p<0.01$ and $p<0.001$, respectively.

들의 결과는 Table 2와 같다. Table 2에서와 같이 MTT 분석법에서 25, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 세포생존율은 각각 대조군에 비하여 84.9%, 79.8%, 72.6%($p<0.01$), 65.0%($p<0.001$), 61.3%($p<0.001$)로 나타났다. 또한, NR 분석법에 있어서는 25, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 각 농도에서 세포생존율이 각각 92.7%, 78.0%, 66.8%, 54.4%, 51.6%로 나타났다. XTT 분석법에서는 세포부착률이 25, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 90.1%($p<0.05$), 77.8%($p<0.05$), 68.3%($p<0.001$), 66.6%($p<0.001$), 65.3%($p<0.001$)로 나타났다(Table 2). 위의 실험결과로부터 왕원추리 추출물은 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 옥잠화 추출물에서처럼 IC_{50} 값보다 모두 높게 나타남으로서 화학제의 세포독성은 중간-무독성의 범위에 있는 것으로 나타났으며, 추출액의 세포독성은 옥잠화추출물에서 무독성인 것으로 나타났다.

3. 원추리(*Hemeracallis fulva*. L, HF) 추출물의 세포 독성

원추리(HF) 추출물의 세포독성을 조사하기 위하여 배양 중인 NIH3T3 섬유모세포에 원추리 추출물의 시료를 위의 추출물과 동일한 농도별로 처리한 결과는 Table 3과 같다. Table 3에서와 같이 MTT 분석법에서 25, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 세포생존율은 각각 대조군에 비하여 84.2%, 66.6%, 58.1%($p<0.01$), 54.7%($p<0.001$), 41.9%($p<0.001$)로 나타났다. 또한, NR 분석법에 있어서는 25, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도처리에서는 세포생존율이 각각 94.9%, 63.6%($p<0.01$), 61.7%($p<0.01$), 45.6%($p<0.001$), 38.4%($p<0.001$)로 나타났다. XTT 분석법에서는 세포부착률이 25, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 88.9%($p<0.01$), 73.0% ($p<0.001$), 66.6%($p<0.001$), 61.6%($p<0.001$), 59.3% ($p<0.001$)로 나타났다(Table 3). 위의 실험결과에서 보는 바와 같이 원추리 추출물은 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 XTT 분석법에서는 IC_{50} 값보다 모두 높게 나타났는데 비하여 MTT 분석법에서는 200

Table 3. Cytotoxicity of HF on cultured NIH3T3 fibroblast

Concentration of HL ($\mu\text{g/mL}$)	Cell viability* (%)		Cell adhesion activity* (%)
	MTT	NR	XTT
Control	200.46 \pm 60.1 (100)	160.78 \pm 62.2 (100)	113.63 \pm 6.2 (100)
25	168.85 \pm 61.5 (84.2)	152.56 \pm 62.7 (94.9)	101.00 \pm 9.4 (88.9) [‡]
50	133.46 \pm 56.4 (66.6)	102.33 \pm 41.0 (63.6) [†]	83.00 \pm 14.1 (73.0) [‡]
100	116.38 \pm 69.1 (58.1) [†]	99.22 \pm 35.9 (61.7) [†]	75.63 \pm 13.3 (66.6) [‡]
150	109.62 \pm 59.5 (54.7) [‡]	73.33 \pm 30.4 (45.6) [‡]	70.00 \pm 6.9 (61.6) [‡]
200	83.92 \pm 44.0 (41.9) [‡]	61.67 \pm 20.7 (38.4) [‡]	67.38 \pm 6.8 (59.3) [‡]

*The data indicate the mean \pm SD for triplicate experiments. [†] and [‡] are significantly different from the control at $p<0.01$ and $p<0.001$, respectively.

Table 4. Cytotoxicity of MO extract on cultured NIH3T3 fibroblast

Concentration of HL ($\mu\text{g/mL}$)	Cell viability* (%)		Cell adhesion activity* (%)
	MTT	NR	XTT
Control	284.20 \pm 99.6 (100)	158.22 \pm 70.4 (100)	126.29 \pm 42.6 (100)
25	274.00 \pm 119.8 (96.4)	146.11 \pm 89.1 (92.3)	119.86 \pm 44.0 (94.9)
50	270.60 \pm 100.0 (95.2)	127.67 \pm 75.0 (80.7)	114.86 \pm 44.1 (91.0)
100	241.40 \pm 101.7 (84.9)	124.22 \pm 70.8 (78.5)	108.29 \pm 42.2 (85.7)
150	201.80 \pm 70.8 (71.0)	98.33 \pm 61.1 (62.1)	107.14 \pm 50.6 (84.8)
200	185.20 \pm 108.7 (65.2)	90.00 \pm 55.9 (56.9)	98.00 \pm 48.6 (77.6)

*The data indicate the mean \pm SD for triplicate experiments.

$\mu\text{g/mL}$ 에서, NR 분석법에서는 150 $\mu\text{g/mL}$ 와 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 IC₅₀ 값이 나타났다. 따라서 화학제의 세포독성은 중간독성인 것으로 나타났으며, 또한 추출액의 세포독성은 저독성인 것으로 나타났다.

4. 산수유(*Macrocapium officinale* NAKAI, MO) 추출물의 세포독성

배양 중인 NIH3T3 섬유모세포에 산수유(MO) 추출물의 시료를 농도별로 48시간 동안 처리한 결과 세포생존율과 세포부착률에 대한 정량분석 결과는 Table 4와 같다. Table 4에서 보는 바와 같이 MTT분석법에 있어서 25, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 세포생존율은 각각 대조군에 비하여 96.4%, 95.2%, 84.9%, 71.0%, 65.2%로 각각 나타났다. 또한, NR분석법에 있어서는 25, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 각 농도에서 세포생존율이 각각 92.3%, 80.7%, 78.5%, 62.1%, 56.9%($p<0.05$)로 나타났다. XTT분석법에 의한 세포부착률은 25, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 94.9%, 91.0%, 85.7%, 84.8%, 77.6%로 나타났다(Table 4). 위의 3종류의 분석법

의 결과에서처럼 산수유 추출물은 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 위의 추출물에서와 같이 IC₅₀ 값보다 모두 높게 나타남으로서 화학제의 세포독성은 중간-무독성인 것으로 나타났으며, 추출액의 세포독성은 무독성인 것으로 나타났다.

5. 박하(*Mentha canadensis* var. *piperascens* HARA, MCVP) 추출물의 세포독성

박하(MCVP) 추출물의 세포독성을 MTT, NR 및 XTT 분석법에 의하여 조사한 결과는 Table 5와 같다. Table 5에서와 같이 MTT 분석법에 의한 세포생존율 정량에서 25, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 각 농도에서 세포생존율은 대조군에 비하여 97.6%, 84.1%, 69.5%($p<0.01$), 53.8%($p<0.001$), 45.4%($p<0.001$)로 각각 나타났다. 또한, NR 분석법에 의한 세포생존율에 있어서는 25, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도처리에서 각각 96.9%, 69.5%, 63.4%($p<0.05$), 52.3%($p<0.01$), 47.2%($p<0.01$)로 나타났다. XTT 분석법에 의한 세포부착률은 25, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 90.0%, 81.6%, 70.9%, 65.8%($p<0.05$), 59.9%($p<0.05$)로 나타났다(Table 5). 위의

Table 5. Cytotoxicity of MCVP extract on cultured NIH3T3 fibroblast

Concentration of HL ($\mu\text{g/mL}$)	Cell viability* (%)		Cell adhesion activity* (%)
	MTT	NR	XTT
Control	212.67 \pm 41.1 (100)	156.11 \pm 67.8 (100)	127.33 \pm 34.6 (100)
25	207.58 \pm 45.0 (97.6)	151.11 \pm 67.8 (100)	114.56 \pm 34.5 (90.0)
50	178.92 \pm 66.6 (84.1)	108.56 \pm 60.1 (69.5)	103.89 \pm 43.9 (81.6)
100	147.83 \pm 72.0 (69.5) [†]	99.00 \pm 58.6 (63.4) [†]	90.22 \pm 43.4 (70.9)
150	114.50 \pm 56.3 (53.8) [§]	81.56 \pm 40.5 (52.3) [†]	83.78 \pm 45.2 (65.8) [†]
200	96.50 \pm 55.6 (45.4) [§]	73.67 \pm 31.8 (47.2) [†]	76.33 \pm 44.6 (59.9) [†]

*The data indicate the mean \pm SD for triplicate experiments. [†], [‡] and [§] are significantly different from the control at $p<0.05$, $p<0.01$ and $p<0.001$, respectively.

실험결과에서처럼 박하 추출물은 원추리 추출물처럼 XTT 분석법에서는 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 IC_{50} 값보다 높게 나타나는데 비하여 MTT 분석법과 NR 분석법에서는 각각 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 IC_{50} 값이 나타났다. 따라서 Borenfreund와 Puerner(1984)에 의한 화학제의 세포독성은 중간독성인 것으로 나타났으며, 추출액의 세포독성은 무독성인 것으로 나타났다.

IV. 고 찰

본 연구는 옥잠화(*Hosta longissima* HONDA), 왕원추리(*Hemerocallis fulva* var. Kwanso REGL), 원추리(*Hemerocallis fulva* L), 산수유(*Macrocapium officinale* NAKAI) 및 박하(*Mentha canadensis* var. *piperascens* HARA)와 같은 몇 종류의 추출물에 대한 세포독성을 조사하기 위하여 비색분광법인 MTT 분석법을 비롯하여 NR 분석법 및 XTT 분석법을 적용하여 각각 세포생존율(cell viability)과 세포부착률(cell adhesion activity)을 조사하였다. 최근 식물추출물 중에는 중금속류에 대한 제독 효과(detoxic effect)를 비롯하여 자유라디칼에 대한 항산화효과(antioxidative effect) 및 피부염과 같은 염증에 대한 항염(anti-inflammatory effect) 등의 생리활성성분을 가지고 있다고 제시된 바 있다(박과 강, 1998; Lavid 등, 2001). 따라서 색소침착이나 미백을 위한 화장품의 원료나 자유라디칼에 의한 광노화와 같은 제품생산, 또는 병변의 치료제 개발 등, 이의 사용용도가 광범위하게 적용되고 있다(Krizkova 등, 2000; 박 등, 2002; 양, 2003). 그러나 무엇보다도 중요한 것은 이들 추출물의 사용에 있어서 안전성평가에 대한 문제 때문에 세포독성의 검증은 필수적이 아닐 수 없다(Peterson 등, 1981; 김 등, 1998). 최근 시험관내 분석(in vivo assay) 방법이 개발되면서 정확하면서도 간단한 분석법이 고안되고 있다(Michikawa 등, 1994; Kim 등, 2002; 변 등, 2005). 특히, MTT를 비롯한 NR, XTT, SRB, MTS, LDH 등은 세포내의 소기관의 효소 활성이나 세포막 독성을 측정하는데 있어 매우 유용한 분석도구의 하나이다(Mosmann, 1983; Goodwin 등, 1995). 따라서 본 연구에서는 이를 적용하여 위 추출물들에 대한 세포독성을 조사하였다. 본 실험에 있어서 각 추

출물들을 25-200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 3종류의 분석법으로 분석한 결과 옥잠화, 왕원추리, 산수유 추출물들은 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 IC_{50} 값이 나타나지 않아 Borenfreund와 Puerner(1984)의 화학제의 세포독성기준에 의하여 중간-무독성인 것으로 나타난 반면, 원추리와 박하는 중간독성인 것으로 나타났다.

Borenfreund와 Puerner(1984)는 화학제를 대상으로 이의 세포독성을 각각 100, 1000, 2000 $\mu\text{M}(\mu\text{g/mL})$ 를 한계 농도로 하여 IC_{50} 값이 나타나는 농도에 따라 독성정도를 정하였으며, 농축된 추출물의 세포독성농도는 화학제의 독성기준농도의 1/10과 독성이 같도록 정하였다. 따라서 본 실험에서 분석한 추출물중 옥잠화, 산수유, 왕원추리, 박하는 추출물의 세포독성기준에 따라 모두 무독성인 것으로 나타났다. 박하의 경우에는 저독성의 가능성도 배제할 수는 없다. 원추리 추출물에 있어서는 NR분석법에서 150 $\mu\text{g/mL}$ 와 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서, MTT 분석법에서는 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 IC_{50} 값이 나타남으로서 저독성인 것으로 나타났다. MTT 분석법은 사립체내막의 succinic dehydrogenase의 효소활성을 측정하는 것으로서(Mosmann, 1983), 본 실험의 MTT분석법에서 원추리와 박하추출물이 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 다른 추출물에 비하여 IC_{50} 값의 세포생존율이 나타남으로서 가장 민감하게 반응하였으며, 다음이 왕원추리, 옥잠화, 산수유 추출물 순으로 나타났다. 또한, NR 분석법은 용해소체의 효소활성을 측정하는 것으로서(Borenfreund와 Puerner, 1984), MTT 분석법에서 처럼 원추리와 박하 추출물이 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 IC_{50} 값이 나타나 NR 분석법에 민감하게 반응하였으며 왕원추리, 옥잠화, 산수유 추출물 순으로 나타났다. 한편, XTT 분석법은 사립체 핵의 활성을 측정하는 것으로서(Goodwin 등, 1995), 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 원추리 추출물이 XTT분석법에서 가장 민감하게 반응하였으며 그 다음으로 박하, 왕원추리, 옥잠화, 산수유 추출물 순으로 나타났다. 위와 같이 MTT 분석법처럼 각 분석법에 반응하는 정도에 차이가 있는 것은 아마도 각 추출물을 구성하고 있는 구성성분은 물론 성분간 양의 차이나 또는 이들이 세포에 작용하는 부위가 서로 각각 다르기 때문인 것으로 생각된다(Goodwin 등, 1995; 양, 2003).

본 실험에서 원추리 추출물은 사립체 효소(MTT 분석법)를 비롯한 용해소체(NR 분석법), 사립체핵(XTT 분석

법) 모두에 민감하게 작용한 반면, 박하 추출물은 사립체 효소(MTT 분석법)와 용해소체(NR 분석법)에, 옥잠화 추출물은 용해소체(NR 분석법)에, 산수유와 왕원추리 추출물은 용해소체(NR 분석법)에 가장 민감하게 반응하였다. 그러나 식물 추출물들에 대한 세포독성에 대한 기전을 더욱 자세히 밝히기 위해서는 독성에 관여하는 세포내 수용체를 비롯하여 신호전달체계 등의 측면에서 연구가 지속되어야 할 것으로 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 2009년 농림기술개발과제 연구지원의 일부로서 농림수산식품부와 구례군의 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J Tissue Cult Meth* 9:7-9, 1984.
- De Heredia JB, Torregrosa J, Dominguez JR, Peres JA. Kinetic model for phenolic compound oxidation by Fenton's reagent. *Chemosphere* 45(1):85-90, 2001.
- Gates MA, Tworoger SS, Hecht JL, De Vivo I, Rosner B, Hankinson SE. A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 121(10):2225-2232, 2007.
- Goldberg DM, Hoffman B, Yang J, Soleas GJ. Phenolic constituents, furans, and total antioxidant status of distilled spirits. *J Agric Food Chem* 47(10):3978-3985, 1999.
- Goodwin CJ, Holt SJ, Downes S, Marshall NJ. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts XTT and MTS. *J Immunol Methods* 179:95-103, 1995.
- Han DS, Jeon SW, Yang SJ, Choi BN, Suk SH, Hong GY, Song HJ. The Effect of Poncirin on Hexavalent Chromium in NIH3T3 Fibroblasts in Vitro. *Kor J Herbology* 21(1):101-107, 2006.
- Hirota A, Taki S, Kawaii S, Yano M, Abe N. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging compounds from soybean miso and antiproliferative activity of isoflavones from soybean miso toward the cancer cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem* 64(5):1038-1040, 2000.
- Jung HA, Jung MJ, Kim YJ, Chung HY, Choi JS. Inhibitory activity of flavonoids from *Prunus davidiana* and other flavonoids on total ROS and hydroxyl radical generation. *Arch Pharm Res* 26(10):809-815, 2003.
- Kikuzaki H, Nakatani N. Antioxidant effects of some ginger constituents. *J Food Sci* 58:1470-1410, 1993.
- Kim HS, Lee YS, Oh SK, Lee KC, Lee GM, Lee J, Lee SB, Kim JH, Yu JK, Kang YS, Kim SS, Song HJ, Park ST : Effect of *Ramulus et Uncus Uncariae* on Glucose Oxidase-Induced Toxicity in Cultured Cerebral Neurons. *Korean J Oriental Physiol & Pathol* 16(5):1016-1019, 2002.
- Kim SR, Kang SY, Lee KY, Kim SH, Markelonis GJ, Oh TH, Kim YC. Anti-amnestic activity of E-p-methoxycinnamic acid from *Scrophularia buergeriana*. *Brain Res Cogn Brain Res* 17(2):454-461, 2003.
- Krizkova L, Nagy M, Polonyi J, Dobias J, Belicova A, Grancai D, Krajcovic J. Phenolic acids inhibit chloroplast mutagenesis in *Euglena gracilis*. *Mutat Res* 469(1):107-114, 2000.
- Lavid N, Schwartz A, Yarden O, Tel-Or E. The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily(Nymphaeaceae). *Planta* 212:323-331, 2001.
- Leung HW, Lin CJ, Hour MJ, Yang WH, Wang MY, Lee HZ. Kaempferol induces apoptosis in human lung non-small carcinoma cells accompanied by an induction of antioxidant enzymes. *Food Chem Toxicol* 45(10):2005-2013, 2007.

15. Li YL, Gan GP, Zhang HZ, Wu HZ, Li CL, Hung YP, Liu TW, Liu JW. A flavonoid glycoside isolated from *Smilax china* L. rhizome in vitro anticancer effects on human cancer cell lines. *J Ethnopharmacol* 113(1):115-124, 2007.
16. Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG, Kim SU. Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res* 37:62-70, 1994.
17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immunol Methods* 65:55-63, 1983.
18. Peterson A, Lewne M, Walum E. Acute toxicity of organic solvents, heavy metals, and DDT tested in cultures of mouse neuroblastoma cells. *Toxicol Lett* 9:101-108, 1981.
19. Seo K, Lee SW, Yang KH. Antimicrobial and Antioxidative of *Corni fructus* extracts. *Kor J Postharvest Sci Technol.* 6(1):99-106, 1999.
20. Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of Common Fruits. *J Agric Food Chem* 50(25):7449-7454, 2002.
21. Wang L, Tu YC, Lian TW, Hung JT, Yen JH, Wu MJ. Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonoids. *J Agric Food Chem* 54(26): 9798-9804, 2006.
22. Yang TH, Liu SH, Sun MH. Constituents of the fruits of *Cornus officinalis*. *Taiwan Yao Hsueh Tsa Chih* 22:1-5, 1973.
23. 김일혁, 김정희, 김종원, 김창민, 유승도, 황완균. 신약품식물학. 학창사, 서울, 1998.
24. 김재배, 소배근. 동양전통약물 원색도감. p230, 영림사. 서울, 1995.
25. 박명오, 이명호, 이희재, 한두석. NIH3T3 섬유모세포에 대한 니켈의 세포독성과 ferulic acid의 독성경감효과. *대한구강해부학회지* 26(2):105-114, 2002.
26. 박용기, 강병수. 현삼의 항산화작용에 관한 연구. *대한본초학회지* 13(1):201-220, 1998.
27. 변성희, 양재하, 김상찬. 현삼메탄올 추출물이 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서의 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 nitric oxide 생성에 미치는 영향. *대한본초학회지* 20(2):7-16, 2005.
28. 양홍석. 시험관내에서 Ferulic Acid와 Vitamin E의 세포독성 평가. *대한구강해부학회지* 27(1):1-10, 2003.
29. 임요섭, 한성수. 살충제 Carbofuran이 쥐의 조직에 미치는 형태적 변화와 Phenobarbital Sodium 및 3-Methylcholanthrene에 의한 억제효과. *한국환경농학회지* 16(1):61-66, 1997.
30. 장준근. 산야초. p57-463, 넥서스BOOKS, 서울, 2003.