

소목(*Caesalpinia sappan* L.)에서 분리한 Brazilin의 항산화 활성과 구강상피암 KB 세포주의 증식억제효과

전미애 · 권현정 · 김용현 · 한국일 · 정하나 · 정성균¹ · 방인석² · 한만덕[†]
순천향대학교 생명과학과, ¹신흥대학 치위생과, ²호서대학교 생명과학과

Antioxidative Activities and Antiproliferation Effects on Oral Carcinoma KB Cell of the Brazilin from *Caesalpinia sappan* L.

Mi-Ae Jeon, Hyun-Jung Kwon, Yong-Hyun Kim, Kook-Il Han, Ha-Na Chung, Sung-Kyun Chung¹, In Seok Bang² and Man-Deuk Han[†]

Dept. of Biology, College of Natural Science, Soonchunhyang University, Chungnam 336-745, Korea

¹Dept. of Dental hygiene, Shinheung College, Uijeongbu, Gyeonggi, 480-701, Korea

²Dept. of Biological Science and the Research Institute for Basic Sciences, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

Abstract *Caesalpinia sappan* L. has long been commonly used in oriental folk medicines and as dyes materials. To investigate the antioxidative activities and antiproliferation effects of brazilin from *C. sappan* heart wood, the MeOH soluble extract was successively fractionated by using hexane, CHCl₃, EtOAc, BuOH, MeOH, and H₂O. In these fractions, we were purified brazilin from EtOAc fraction which partitioned to 3.94% of the highest yields. The effects of brazilin and the extracts on human oral carcinoma cells (KB) by MTT assay and their antioxidant activities by DPPH, TCA assay and Fenton reaction were tested. The results showed that the brazilin could inhibits the proliferation of KB cells and obviously decreased the production of nitric oxide of the cells. When the concentration of the brazilin reached to 100 µg/ml, the inhibition percentage of the cell growth was about 60%. In assay on antioxidant activities, The results showed that brazilin exhibit the highest capacity of DPPH free radical scavenging effects among tested extracts. When the concentration of brazilin reached to 1 mg/ml, the lipid peroxide inhibition and radical inhibition activities were determined to be 65.0% and 85.8%, respectively. These results are suggest that brazilin have stronger antiproliferation effect on KB cell and antioxidant properties.

Key words Antioxidative activities, Antiproliferation effect, *Caesalpinia sappan*, Oral carcinoma KB cell

서 론

백혈구는 병원체 방어를 위해 활성산소를 생성하나 비정상적으로 많이 발생하면 정상 세포를 공격하여 세포막 파괴 및 DNA 손상을 일으킨다. 활성산소는 크게 초과산화 이온, 수산화 이온, 과산화수소, 단일항산소 4가지로 분류하며, 과도하게 발생할 경우 심근경색, 위궤양, 뇌혈관질환, 심장 질환, 피부 질환, 암 등의 원인이 된다¹⁾. 따라서 활성산소를 제거하는 효소 superoxide dismutase (SOD)나 이를 소거시키는 물질에 대한 연구는 중앙 발생 억제와 예방을 위해 필요하다²⁾. 국가암정보센터 자료에 의하면 2007년, 한 해 동안 161,920건의 암이 발생하였고,

그 중 입술, 구강 및 인두 암은 2,312건으로 전체 암의 1.4%를 차지하며, 1999년에 비해 32%가 증가한 것으로 보고되고 있다. 구강암 환자의 90~95%는 구강 점막의 중층편평상피세포에서 발생하는 편평상피 암이고, 유전, 흡연, 알코올섭취, 영양결핍, 만성적 자극, 부적절한 구강 위생, 바이러스 감염 등에 의해 발생한다. 흔히 40대 이상의 남성에서 호발하며 외과수술과 함께 항암약물을 투여하는 방법으로 치료한다³⁻⁴⁾. 그러나 이러한 구강암을 치료하는 대부분의 항암제는 부작용이 있으므로 새로운 항암제의 개발이 요구된다.

본 연구에서 사용한 소목(*Caesalpinia sappan* L.)은 인도, 말레이시아, 중국 남부 등의 열대 아시아에 분포하는 낙엽 관목의 콩과(Liguminosae) 식물이며 홍색염료로 사용한다. 소방목, Sappan wood, Red wood라고도 하며 심재는 한방에서 항통증, 항염증 한약재로 사용된다⁵⁾. 소목에 관한 생리활성 연구로는 항산화 효과⁶⁻⁷⁾와 세포독성 효

[†]Corresponding author
Tel: 041-530-4702
Fax: 041-530-1256
E-mail: mdhan@sch.ac.kr

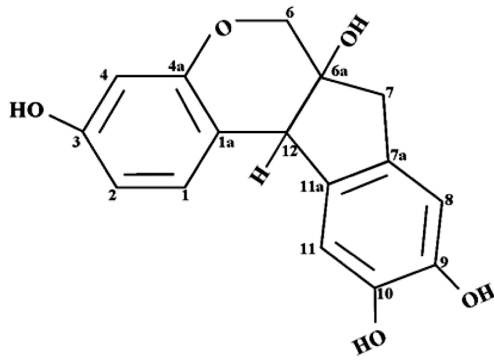


Fig. 1. The chemical structure of brazilin from *C. sappan* L.

과⁸⁾, 항염효과⁹⁾ 및 항균효과¹⁰⁾, 항알러지 효과¹¹⁾, 치아우식 증균에 대한 항균활성¹²⁾, 항 influenza virus¹³⁾, 항암효과¹⁴⁾ 등에 대해서 보고되었다. 특히 권 등¹⁵⁾은 이러한 활성을 나타내는 물질의 추출분리 및 구조에 관한 연구로서, 소목 추출물 중 항균활성이 가장 우수한 에틸아세테이트 분획을 silica gel adsorption column 및 HPLC로 정제하였으며, 300g의 소목으로부터 순도 98.48%의 1.67 mg의 순수 활성물질을 얻었으며, 이 성분은 엷은 황색 결정의 단일 화합물로 질량분석기로 분석한 결과 분자량 285 m/z 인 brazilin(Fig. 1)으로 보고한 바 있다. 지금까지 소목의 여러 추출물에 대한 항산화효과 및 항암효과 연구는 일부 있으나^{6-7,16-17)}, 분리정제된 brazilin에 대한 연구는 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 소목 유기용매 추출물 중 에틸아세테이트 추출물에 포함되어 있는 brazilin을 분리하여 항산화 활성을 조사하고, 구강암 세포주인 KB 세포에 대한 암세포 증식억제 효과를 알아보았다.

재료 및 방법

1. 소목에서 Brazilin 추출 및 정제

실험에 사용한 소목은 경동시장에서 구입하여 권 등의 추출방법¹⁵⁾에 따라 <Fig. 2>과 같이 각각의 추출물을 얻었다. 또한 여러 유기용매 추출물 가운데 생리활성이 우수한 에틸아세테이트 추출물로부터 brazilin을 분리정제하였다. 간략하면, 소목을 먼저 methanol(MeOH)로 추출하고 hexane, chloroform, ethyl acetate(EtOAc), *n*-butanol 및 H₂O 분획을 얻은 후, 분획 시료 중 EtOAc 분획을 silica gel adsorption column 및 HPLC로 정제하여 실험에 사용하였다. 모든 소목 추출물은 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 녹여 시험에 사용하였다.

2. DPPH assay에 의한 전자공여능 측정

전자공여능(Electron donating ability, EDA)은 Blois의 방법¹⁸⁾으로 측정하였다. DPPH(2,2-diphenyl-2-picrylhydrazylradical, Sigma, USA)를 methanol에 0.2 mM이 되게 녹이고, 소목 추출물은 methanol 70%에 농도별로

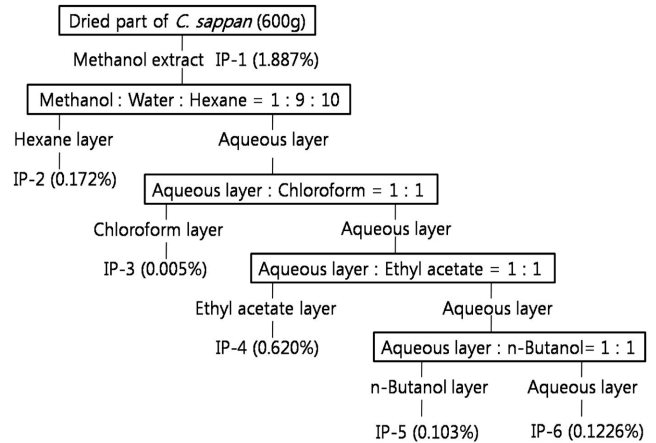


Fig. 2. Fractionation flow chart of *C. sappan* extracts.

조제한 후, 시료 100 μl와 900 μl의 DPPH를 분주하였다. 실온의 암소에서 20분간 반응시킨 후 microplate reader (Fluostar Optima, BMG, Germany)로 517 nm에서 흡광도 측정하여 아래와 같은 식으로 계산하였다. 대조군으로는 methanol 70%, BHA(Butylated hydroxyanisole, Sigma, USA)를 사용하였다.

$$\text{Radical scavenger ability(\%)} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

(A : 517 nm에서 실험구의 흡광도, B : 517 nm에서 대조구의 흡광도)

3. Ferric Thiocyanate(TCA)법에 의한 지질 과산화물 생성 억제율

지질 과산화물 생성 억제 능력은 Osawa와 Namiki방법¹⁹⁾을 응용하여 linoleic acid(Sigma, USA)를 자동산화방식으로 측정하였다. 시험액은 99.9% alcohol에 녹인 linoleic acid 2.5% 0.2 ml, 시료용액 0.2 ml, 0.2M 인산완충용액(pH 7.0) 0.4 ml를 혼합하여 40°C 암소에서 반응시켜 사용하였다. 96 well plate에 70% ethanol 200 μl, 혼합액 10 μl, ammonium thiocyanate 용액 10 μl, ferric chloride 10 μl씩을 분주하였고 3분 후 microplate reader로 498 nm에서 흡광도 측정하였다. 양성대조군으로 BHA를 사용하였고 7일차까지 측정된 후 상기 scavenger ability와 같은 식으로 계산하였다.

4. Hydroxyl radical 소거효과

Hydroxyl radical 소거효과를 측정하기 위해 Kang²⁰⁾의 방법으로 시행하였다. 1mM DCFDA(2',7'-Dichlorofluorescein diacetate, Sigma, USA)와 600 Unit/ml esterase (Sigma, USA)를 혼합한 뒤 실온에서 20분간 반응시켜 DCFH solution을 만들고, 20분이 지난 후에는 15°C에 보관하며 사용하였다. 96 well plate에 brazilin의 농도별로 20 μl씩 분주하고 10mM FeSO₄와 1.35 mM H₂O₂를 각각

분주했다. 100배 희석한 DCFH solution을 넣고 5분간 shaking 후 microplate reader로 485/520 nm에서 측정하였다. 대조군은 brazilin 무첨가군과 trolox(6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Sigma, USA)를 사용하여 비교하였다. Hydroxyl radical 소거효과는 상기 scavenger ability와 같은 식으로 계산하였다.

5. 세포배양

한국세포주 은행에서 분양받은 KB(human oral epidermoid carcinoma, KCLB 10017) 세포는 Yun의 방법²¹⁾에 따라 10% inactivated fetal bovine serum(FBS, Hyclone, Canada)과 1% penicillin/ streptomycin(Sigma, USA)을 첨가한 RPMI-1640 배지(Lonza, USA)를 성장배지로 사용하였고 37°C에서 5% CO₂, 95% O₂ 조건하에서 배양하였다. 모든 세포는 72시간 동안 배양하여 각 well 당 1×10⁴ cell/ml로 조정하여 실험에 사용하였다.

6. 구강암세포 특성

세포독성측정실험은 Yun의 방법²¹⁾에 따라 MTT 분석법을 이용하였다. KB cell을 96 well plate에 접종한 후 4시간 동안 배양하고 시료를 첨가하여 1시간, 24시간, 48시간 동안 배양하였다. MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma, USA)는 50 mM PB(pH 7.4)에 5 mg/ml로 녹여 사용하였다. 세포에 MTT 10 µl를 가하고 4시간 동안 37°C 암소에서 배양 후 각 well의 배양액을 제거하고 형성된 formazan salt를 DMSO 100 µl를 넣고 가볍게 진탕하여 완전히 용해시킨 후, microplate reader로 540 nm의 파장에서 흡광도 측정하였다. 실험 결과는 대조군에 대한 억제 비율(%)로 나타내었다.

7. 산화질소(Nitric oxide) 생성량의 측정

배양액 내의 NO농도는 Griess reaction²²⁾을 이용하여 측정하였다. 적정수의 세포를 96 well plate에 분주하고 4시간 배양 후 소목 추출물과 LPS(lipopolysaccharide, Sigma, USA) 1 µg/ml를 분주하고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포의 배양액을 새로운 plate로 옮겨 Griess reagent(5% phosphoric acid 용액에 녹인 2% sulfanilamide, 0.2% ethylene-diamide)와 동량 넣고 5분간 상온에서 반응시켰다. 이를 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도 측정하였고, 아질산염의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액 내의 NO 농도를 결정하였다.

8. LPS와 H₂O₂를 처리한 세포의 세포 증식 억제율

KB cell에 대한 LPS와 H₂O₂의 영향 및 brazilin의 효과를 알아보기 위해 세포증식을 MTT 측정법²¹⁾을 응용하여 확인하였다. 각 well 당 1×10⁴ cell/ml의 세포수로 조정된

KB cell을 96 well에 분주하여 24시간 배양한 후 LPS와 H₂O₂ 및 brazilin을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포에 MTT를 분주하고 37°C 암소에서 4시간 동안 배양한 후, 배양액을 제거하고, DMSO로 formazan salt를 용해하여 540 nm에서 흡광도 측정했다. 대조군으로 LPS와 H₂O₂만 처리한 군, LPS와 H₂O₂를 처리하지 않은 군, trolox를 사용하였다. 결과는 대조군에 대한 세포 증식억제율로 계산하였다.

결 과

1. 소목 유기용매 추출물의 수율

소목을 hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol의 유기용매로 분획 추출한 결과, 추출물의 수율은 Table 1과 같다. 추출물의 수율은 3회 추출하여 평균값으로 나타내었으며, 전체 추출물 수율은 2.5%이었다. 특히 MeOH 추출물은 1.7%이었고 ethyl acetate 추출물은 0.6%순으로 수율이 우수하였다.

2. 소목 첨가에 따른 전자공여능 측정

소목 유기용매 추출물의 전자공여능(% electron donating ability, EDA)을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 소목의 유기용매 추출물을 10 mg/ml 처리했을 때, 양성대조군인 BHA의 전자공여능(% EDA)은 89.2%로 음성 대조군에 보다 65%이상 효과를 나타내었다. 소목 추출물의 경우 IP-4 추출물이 83.9%로 가장 높았으며 IP-1과 IP-3 추출물도 80%이상을 나타내었다. 또한 Fig. 4에서와 같이 소목의 추출물을 농도 별(1 mg/ml-10 mg/ml)로 처리하였을 때에도 유사한 결과를 얻었다. 모든 시료는 5 mg/ml 이상의 농도에서 50%이상의 전자공여능을 나타내었으며, 특히 IP-4가 가장 우수한 항산화효과를 나타내었다.

Fig. 3과 Fig. 4에서 가장 우수한 항산화 효과를 나타낸 IP-4 분획물을 정제하여 얻은 brazilin의 항산화 효과를 측정한 결과, Fig. 5와 같다. Brazilin은 1 mg/ml의 농도에서 9.28%, 1.5 mg/ml에서 33.12%, 2 mg/ml에서 70.23%, 그리고 2.5 mg/ml에서 84.36%의 전자공여능을 보여 농도 의존적으로 나타내었다.

Table 1. Yields of *C. sappan* extracts

| Extraction no. | Solvent fraction | Dried extract (g)/600 g | Yield (mean ± SD, %) |
|----------------|-------------------|-------------------------|----------------------|
| IP-1 | MeOH | 9.9 | 1.7 ± 0.3 |
| IP-2 | Hexane | 0.6 | 0.1 ± 0.1 |
| IP-3 | Chloroform | 0.1 | 0.01 ± 0.01 |
| IP-4 | Ethyl acetate | 3.6 | 0.6 ± 0.03 |
| IP-5 | <i>n</i> -butanol | 0.7 | 0.1 ± 0.02 |
| IP-6 | Diluted water | 0.1 | 0.02 ± 0.004 |
| Sum | | 15 | 2.5 ± 0.5 |

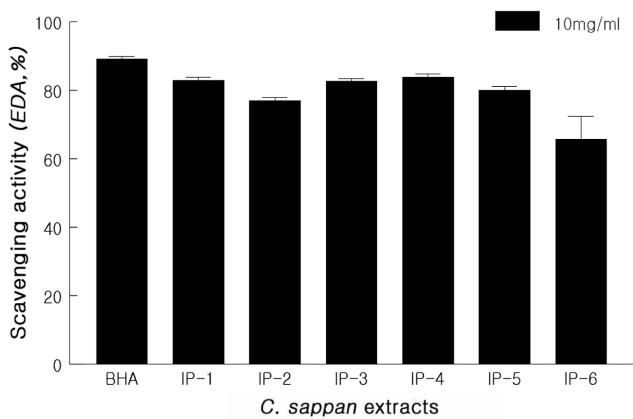


Fig. 3. The DPPH radical-scavenging activity(electron donating ability, % EDA) of *C. sappan* extracts. Results are expressed as percentage decrease in absorbance at a wave length of 517nm with respect to the control. BHA(200 µg/µl) is used as a standard. Each value represents mean±SD of three experiments, performed in duplicate. All samples were adjusted with 200 µg/µl of final concentration. BHA; butylated hydroxyanisole, IP-1; methanol extract, IP-2; hexane extract, IP-3; chloroform extract, IP-4(brazilin); ethyl acetate extract, IP-5; butanol extract and IP-6; water extract. $p < 0.01$ compared with control(Students' t-test).

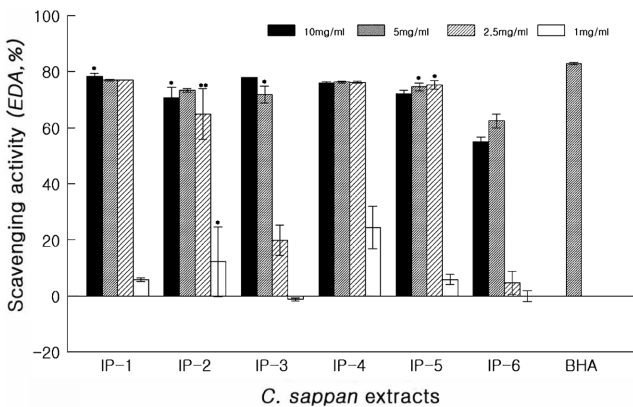


Fig. 4. The DPPH radical-scavenging activity(electron donating ability, % EDA) of *C. sappan* extracts concentrations. Results are expressed as percentage decrease in absorbance at a wave length of 517 nm with respect to the control. BHA(100 µg/µl) is used as a standard. Each value represents mean±SD of three experiments, performed in duplicate. Samples were adjusted with 200 µg/µl, 100 µg/µl, 50 µg/µl, 20 µg/µl of final concentration. BHA; butylated hydroxyanisole, IP-1; methanol extract, IP-2; hexane extract, IP-3; chloroform extract, IP-4(brazilin); ethyl acetate extract, IP-5; butanol extract and IP-6; water extract. $p < 0.001$, $*p < 0.01$, $**p < 0.05$ compared with control(Students' t-test).

3. 소목 첨가에 의한 리놀레산 자동 산화 방지 효과

소목의 brazilin에 의한 지질 과산화물 생성 억제 능력은 Fig. 6과 같다. 기존 항산화제인 BHA보다 지질 과산화물 생성 억제 능력이 약간 낮았으나, 음성 대조군보다 최소 26%에서 최대 66%의 억제 능력을 확인하였다. 1일째 56.5%, 4일째 66.4%, 7일째는 26.1%로 나타났으며 BHA는 4일째 83.73%, 7일째에 57.35%의 지질 과산화물

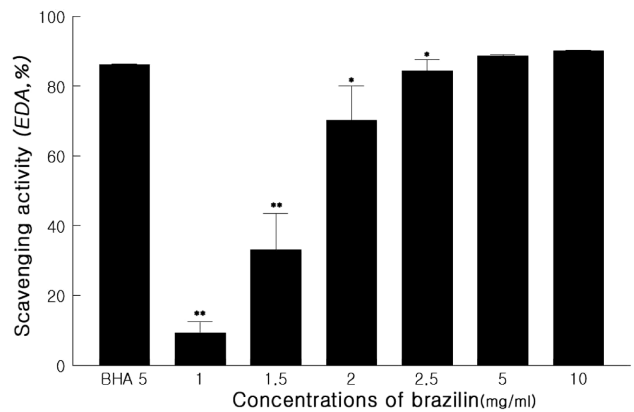


Fig. 5. The DPPH radical-scavenging activity(electron donating ability, % EDA) of brazilin from *C. sappan* extracts. Electron donating ability(EDA) was determined by DPPH assay. Results are expressed as percentage decrease in absorbance at a wave length of 517 nm with respect to the control. BHA (100 µg/µl) is used as a standard. Samples were adjusted with 20 µg/µl, 30 µg/µl, 40 µg/µl, 50 µg/µl, and 100 µg/µl of final concentration. $p < 0.001$, $*p < 0.01$, $**p < 0.05$ compared with control(Students' t-test).

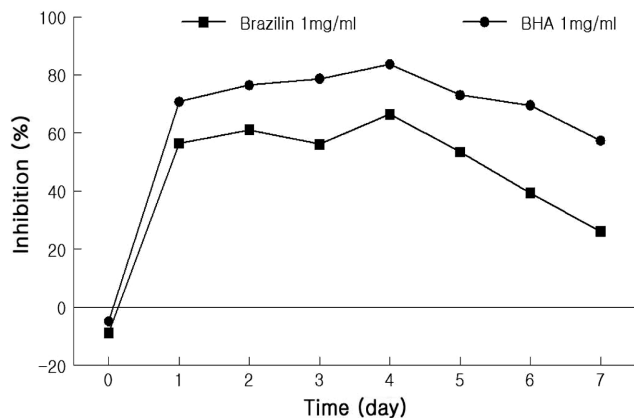


Fig. 6. Linoleic acid oxygenation inhibition effect of brazilin. Scavenging activity was measured using the Ferric Thiocyanate(TCA) assay. Results are expressed as percentage decrease in absorbance at a wave length of 498 nm with respect to the control. BHA (1 mg/ml, ●) was used as a standard. Brazilin(■) sample was adjusted with 1 mg/ml of concentration.

생성을 억제하였다.

4. Hydroxyl radical 소거효과 측정

소목의 brazilin에 의한 hydroxyl radical(OH·)은 최저 농도(0.001 mg/ml)에서 4.99%, 0.01 mg/ml에서 17.18%, 0.5 mg/ml 이상의 농도에서 80% 이상의 소거 능력을 나타냈고, 양성대조군인 trolox는 1 mg/ml에서 91.02%, 0.01 mg/ml에서 63.54%의 hydroxyl radical 소거 능력을 나타냈다 (Fig. 7).

5. 구강암세포 증식 억제율

Brazilin을 구강암세포 KB cell에 처리하고 시간에 따라 MTT 측정 한 결과 Fig. 8과 같다. 시료 2.5 mg/ml농도를

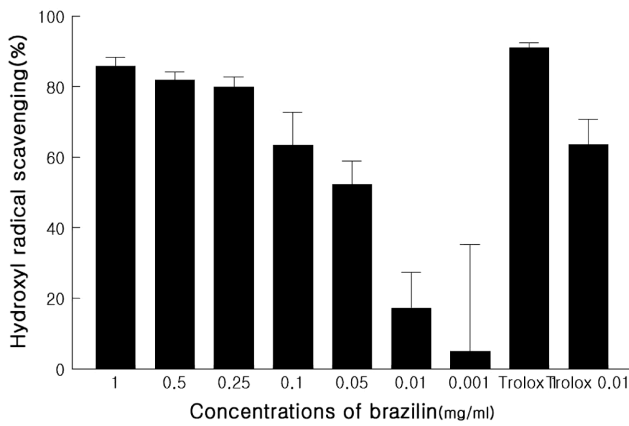


Fig. 7. Hydroxyl radical scavenging activities of brazilin by Fenton reaction. Results are expressed as percentage decrease in fluorescence with respect to the control. The fluorescence of DCF was measured at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm. Bars represent mean±SD of three experiments, performed in duplicate. $p < 0.05$ compared with control (Students' t-test).

투여한 후 1시간이 지난 경우(Fig. 8.A), 양성대조군인 MeOH과 시험군인 Brazilin의 세포 증식 억제율은 10% 이내로 차이는 없었다. 시료 투여 후 24 시간이 지나 최대 농도인 10 mg/ml에서 brazilin은 63.9%, MeOH는 64.8%까지 세포 증식을 억제하였다(Fig. 8B). KB cell에 시료를 48시간동안 처리하였을 때(Fig. 8C), 1 mg/ml의 brazilin 투여농도에서는 2.39%의 증식 억제율을 나타내어 구강암세포의 증식에는 영향을 미치지 않은 반면, 10 mg/ml의 농도에서는 78.56%의 증식 억제율을 나타냈다. MeOH 역시 최대농도(10 mg/ml)에서 74.63%의 세포 독성을 나타내었다.

6. 유도성 산화질소(Inducible nitric oxide)

구강암세포에 LPS 1 µg/µl을 처리한 후 배양하였을 때 250 µM의 nitric oxide(NO)가 생성되었으며, LPS를 처리하지 않은 대조군은 NO가 생성되지 않았다(Fig. 9). LPS와 1 mg/ml의 brazilin을 투여한 경우, NO는 272.67 µM로 증가되었으나, brazilin의 농도가 증가됨에 따라, KB cell의 NO 생성량은 감소되었다. Brazilin의 농도 2.5 mg/µl 이상 투여한 경우, 최저 73%에서 최대 98%까지 NO 생성을 억제하였다.

7. LPS 처리 및 과산화수소 처리에 따른 소목 brazilin의 농도별 변화

KB cell에 LPS와 H₂O₂를 처리한 후 brazilin을 투여한 결과 Fig. 10 및 Fig. 11과 같다. 먼저 KB cell에 LPS를 처리한 경우, LPS는 대조군에 비하여 KB 세포증식을 촉진하였으나, LPS와 brazilin을 처리한 군에서는 KB세포를 1 mg/ml에서 11.76%, 10 mg/ml에서 77.79%의 억제하였다. KB cell에 과산화수소와 brazilin을 처리하였을 때

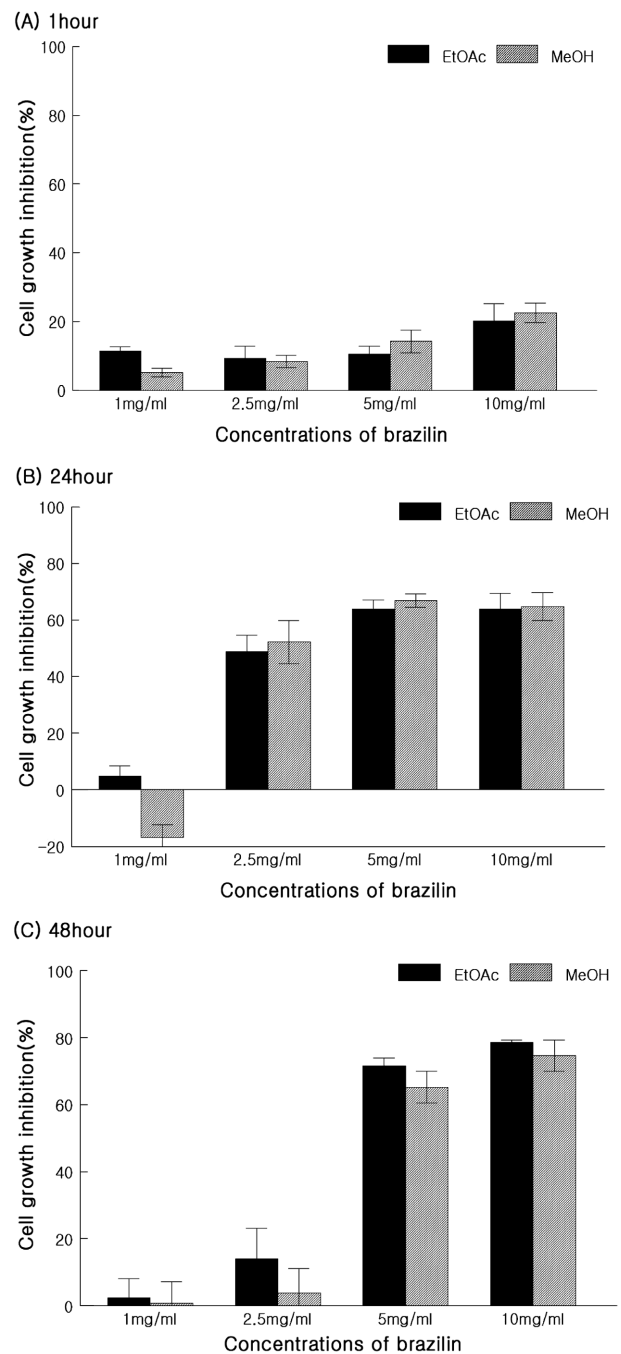


Fig. 8. Growth inhibition of methanol extract(MeOH) and brazilin on the oral carcinoma cell(KB cell). KB cells were incubated in the presence for 1 hr(A) or 24 hr(B) or 48 hr(C). Cell growth inhibition was measured using the MTT assay described in Methods. Cell growth inhibition is expressed as % of control. Error bars are standard error of the mean±SD of three experiments, performed in duplicate. $p < 0.05$ compared with control (Students' t-test).

H₂O₂를 처리하지 않은 군에 비해 67%의 감소율을 보였으며, brazilin을 처리한 군은 71.65%(1 mg/ml), 58.41%(10 mg/ml)의 세포증식을 억제했다. 양성대조군으로 사용한 trolox (1 mg/ml)의 경우 LPS 처리 후 52.91%, H₂O₂ 처리 후 64.61%를 억제하였다.

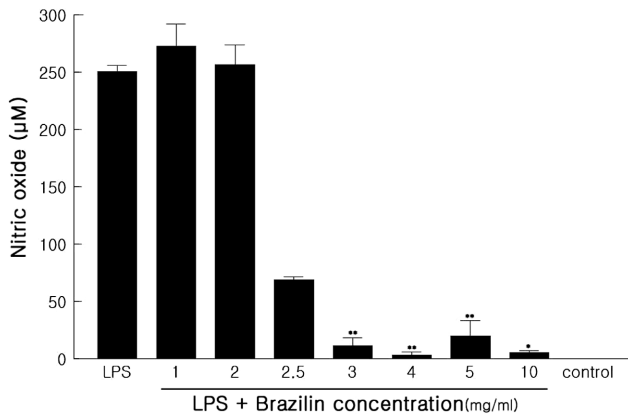


Fig. 9. Production of nitric oxide after treatment with difference concentrations of the brazilin in LPS induced KB cell. LPS was adjusted with 1 µg/ml of final concentration. Production of nitric oxide was measured using the Griess reaction described in methods. Each value represents the mean±SD of three duplicated experiments. $p < 0.01$, $*p < 0.05$, $**p < 0.1$ compared with control(Students' t-test).

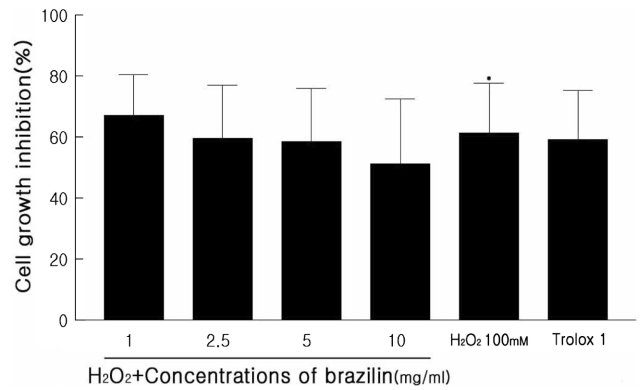


Fig. 11. Effect of brazilin on the cell growth inhibition of KB cell in response to H₂O₂. KB cell was incubated in the absence or presence of 100 mM H₂O₂ and brazilin for 24 h. Cell growth inhibition is measured using the MTT assay. Cell growth inhibition is expressed as % of control. Error bars are standard error of the mean±SD of three duplicated experiments. $p < 0.01$, $*p < 0.05$ compared with control(Students' t-test).

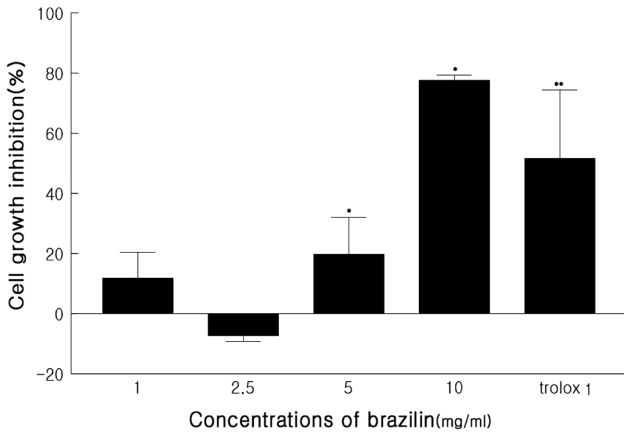


Fig. 10. Effect of brazilin on the cell growth inhibition of KB cell in response to lipopolysaccharide(LPS). KB cell were incubated in the presence of LPS(1 µg/ml) and brazilin for 24 h. Cell growth inhibition was measured using the MTT assay. Cell growth inhibition is expressed as % of control. Error bars are standard error of the mean±SD of three duplicated experiments. $p < 0.01$, $*p < 0.05$, $**p < 0.1$ compared with control(Students' t-test).

고찰

합성 의약품은 효능이 우수하나 부작용이 많기 때문에 천연물에서 새로운 의약품 개발을 위한 노력이 증가하고 있다. 새로운 항산화제나 항암제 역시 한약재와 같은 천연물을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다²³⁻²⁷. 특히 구강암은 전체 중앙 중 약 3-5%를 차지하는 암으로, 발병 연령도 7세에서 88세까지 광범위하고, 5년 생존율은 57.7%로 예후가 아주 나쁜 암이다²⁷. 또한 흡연 및 음주의 증가로 인해 최근 젊은 층의 환자가 증가하는 암이기도 하다²⁸. 본 연구에서는 구강암을 억제하는 유효한 물질 탐색하고자, 소목을 methanol, hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, water 층으로 분획하고, 항산화 및 암세포 사멸

효과를 알아보았다. 특히 본 연구에서는 앞서 권 등¹⁵이 구조 분석하여 보고한 소목의 brazilin을 이용하여 실험하였다. Badami S. 등은 소목의 분획물에 대한 항산화연구에서 chloroform 추출물은 효과가 없고, methanol, H₂O, ethyl acetate 추출물의 항산화효과가 적은 것으로 보고한 바 있다²⁹. 그러나 본 연구에서는 소목 유기용매 추출물에 대한 전자공여능을 확인한 결과 methanol(IP-1), hexane(IP-2), ethyl acetate(IP-4), butanol(IP-5) 분획의 항산화 효과를 확인하였다. 특히 brazilin이 포함되어 있는 ethyl acetate 추출물(IP-4, brazilin)은 다른 추출물에 비해 항산화 효과가 우수하였으며 농도 의존적으로 전자공여능 효과가 높게 나타내었다. 이 같은 결과의 차이는 추출 시료를 만드는 방법의 차이 때문인 것으로 사료된다. 지질의 산화에 의해 생성된 hydroperoxide는 강한 촉매능력 때문에 단백질과 DNA의 손상을 일으킨다. 본 연구에서는 소목에 의한 지질과산화물의 소거효과를 알아보기 위해 linoleic acid를 사용하여 *in vitro*에서 7일 동안 측정된 결과, brazilin은 대조군보다 최소 26%, 최대 66%의 억제효과를 나타내었다. 이 같은 결과는 임 등이 소목 에틸아세테이트 추출물이 지방성 유지인 팜유와 돈지에 대한 항산화효과가 높다고 보고⁷한 결과와 일치하였다. 또한 항산화 시험법에서 Hydroxyl radical(OH·)은 활성산소 중에 가장 반응성이 큰 물질로서 Fenton reaction³⁰을 이용하여 측정한다. 이 방법을 이용하여 측정된 결과, 우수한 항산화제인 trolox보다 효과는 적었으나 농도 의존적으로 H₂O₂ 소거 활성을 보였다. 즉 1 mg/ml의 투여농도에서 85.81%, 최저농도인 0.001 mg/ml에서 4.99%의 항산화 활성을 나타냈다.

이 같은 항산화 효과가 있는 brazilin을 구강암세포(KB cell)에 대한 세포증식억제(세포독성)를 확인한 결과, methanol 추출물과 brazilin을 처리하여 세포독성을 확인

하였다. 모든 시료는 농도 의존적으로 세포 증식률이 억제되었으며, 시료처리 1시간 후의 암세포의 증식률은 brazilin과 methanol 추출물이 유사하였으나, 48시간 후에는 brazilin이 methanol 추출물보다 우수한 세포 증식 억제를 나타냈다. 이 같은 결과는 Lee 등¹⁰⁾이 소목 추출물을 이용한 암세포 억제 연구결과와 동일하였다. Nitric oxide(NO)는 혈압조절, 신경전달, 혈소판 응집억제, 면역기능, 항균작용 등의 역할을 하는 물질이지만³⁰⁾, inducible NOS(iNOS)에 의해 생성된 다량의 NO는 면역반응을 야기한다³¹⁾. 본 연구에서 brazilin이 KB세포에 항암 및 염증 매개 물질인 NO 생성에 어떤 영향을 주는지 확인하였다. KB세포에 LPS를 단독 처리한 경우 NO는 250 μ M이 생성되었으며, brazilin과 병용 투여 시 NO의 양이 현저히 줄어들었다. 이는 LPS가 구강암세포를 자극하여 NO의 양을 증가시키고 분열을 유도하지만 brazilin이 세포와 NO를 동시에 억제하거나, 세포사멸에 의한 발생량 감소에 의한 것으로 사료된다. 또한 구강암세포 KB cell에 LPS와 H₂O₂ 처리하고 세포 증식 변화를 확인한 결과, LPS를 처리한 군은 세포가 증가하였으나, H₂O₂를 처리한 군은 처리하지 않은 세포보다 66.55% 세포증식이 감소하였다. LPS를 처리한 후 brazilin을 처리한 군에서는 2.5 mg/ml를 제외한 농도에서 증식률이 감소하였고, 10 mg/ml에서는 78%의 감소율을 보였다. H₂O₂를 처리한 후 brazilin을 처리한 군에서는 H₂O₂ 소거작용에 의하여 보상이 작용하였으며 억제율이 낮았다. 양성대조군으로 사용한 trolox 역시 소목처리한 군과 같이 억제율이 감소하였다. 지금까지 소목을 이용한 항암연구로는 암 억제 유전자 p53과 p21^{WAF1/CIP1}을 증가시키고¹⁷⁾, telomerase, topoisomerase I의 활성을 저해한다는 연구 보고는 있었으나^{14,16)}, 이는 정제되지 않은 추출물을 사용한 연구 결과들이다. 본 연구결과 소목에서 분리된 brazilin은 우수한 항산화 효과와 구강암세포에 대한 항암 효과가 있는 물질일 것으로 사료된다. 따라서 향후 brazilin의 항암 억제기전에 대한 분자생물학적 연구가 필요하다.

요 약

본 연구는 brazilin의 항산화 효과 및 구강암세포에 대한 암세포 증식억제 효과를 확인하고자 활성산소 소거능력을 측정하고, KB cell에 brazilin을 처리하여 세포 성장 억제 등을 측정하였다. 시행된 실험결과를 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Brazilin은 소목의 다른 유기용매 추출물에 비하여 최저 농도에서도 9%의 전자공여능 소거효과를 보이고 최고농도에서 90%의 소거효과를 나타내었다. 또한 리놀레산 자동 산화 방지 효과를 측정한 결과 26%에서 66%까지 억제하였다. Hydroxyl radical 소거효과 측정 결과 1 mg/ml에서 86%의 소거효과를

나타내었고, 0.001 mg/ml에서도 5%의 소거효과를 나타내었다.

2. Brazilin은 KB cell의 성장을 1시간 처리했을 경우 최저 5%에서 최대 23%까지 억제하였으며, 24시간 처리했을 경우 5%에서 최대 64%까지 억제하였고, 48시간 처리 후에는 최소 3%, 최대 79%까지 억제하였다.
3. KB cell에 LPS 처리 시 NO를 250 μ M 이상 생성시켰으며, 세포증식률을 231% 증가시켰고, LPS를 처리한 KB cell에 brazilin을 처리한 결과 세포의 증식률을 -7%에서 78%까지 감소시켰다. 또한 KB cell에 H₂O₂를 처리한 결과 세포증식률이 감소되었으며, brazilin을 첨가하였을 때 H₂O₂에 대한 소거작용으로 인해 생존 억제율이 72%에서 58%로 감소하였다.

참고문헌

1. Acharya K et al.: Antioxidant and nitric oxide synthase activation properties of *Ganoderma applanatum*. Indian J Exp Biol 43(10): 926-929, 2005.
2. Okada F et al.: Prevention of inflammation mediated acquisition of metastatic properties of benign mouse fibrosarcoma cells by administration of an orally available superoxide dismutase. Br J of Cancer 94: 854-862, 2006.
3. Khalili J: Oral cancer: risk factors, prevention and diagnostic. Exp Oncol 30(4): 259-264, 2008.
4. Funk GF et al.: Presentation, treatment, and outcome of oral cavity cancer: a national cancer data base report. Head Neck 24(2): 165-80, 2002.
5. Nagai M et al.: Protosappanin A, a novel biphenyl compound from *Sappan lignum*. Chem Pharm Bull 34: 1-6, 1986.
6. Safutri R et al.: Antioxidant activity in vitro of two aromatic compounds from *Caesalpinia sappan* L. BioFactors 19: 71-77, 2003.
7. Lim DK, Choi U, Shin DH: Antioxidative activity of some solvent extract from *Caesalpinia sappan* L. Kor J food Sci Technol 28: 77-82, 1996.
8. Chun HJ et al.: Inhibitory effects of butyl alcohol extract from *Caesalpinia sappan* L. on melanogenesis in melan-a cells. Kor J Phamacogn 33(2): 130-136, 2002.
9. Hong CH et al.: Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in cultured mouse macrophage cells. J Ethnopharmacol 83: 153-159, 2002.
10. Xu HX and Lee SF: The antibacterial principle of *Caesalpinia sappan*. Phytother Res 18: 647-651, 2004.
11. Yodsauoe O et al.: Anti-allergic activity of principles from the roots and heartwood of *Caesalpinia sappan* on antigen-induced β -hexosaminidase release. Phytother Res 23: 1028-1031, 2009.
12. You YO et al.: Effects of *Caesalpinia sappan* extracts on the growth, acid production, adhesion, and insoluble glucan synthesis of *Streptococcus mutans*. J Kor Acad Dent Health 27: 277-288, 2003.
13. Liu AL et al.: In vitro anti-influenza viral activities of constituents from *Caesalpinia sappan*. Planta Med 75: e137-e143, 2007.

14. Jeon WK et al.: In vitro studies on the anticancer effect and topoisomerase I inhibition activity of *Caesalpinia sappan* L. extract, Kor J Pharmacogn 30(1): 1-6, 1999.
15. Kwon HJ et al.: Antibacterial activities of *Caesalpinia sappan* L. Extract and structural analysis of related brazilin. Kor J Microbiol Biotechnol 38: 105-111, 2010.
16. Lee JS, Kim JH and Kim YG: Anticancer effects of *Caesalpinia sappan* extracts on oral carcinoma and osteosarcoma cells. J Kor Oral Maxillofac Surg 33: 583-590, 2007.
17. Kim EC et al.: *Caesalpinia sappan* induces cell death by increasing the expression of p53 and p21^{WAF1/CIP1} in head and neck cancer cells. Am J Chin Med 33(3): 405-414, 2005.
18. Blois MS: Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 181: 1199-1200, 1968.
19. Osawa T, Namiki M: A novel type of antioxidant Isolated from leaf wax of eucalyptus leaves. Agric Biol Chem 45: 735-739, 1980.
20. Kang HS et al.: Scavenging effect of Korean medicinal plants on the peroxynitrite and total ROS. Nat Prod Sci 9(2): 73-79, 2003.
21. Yun PY et al.: Anticancer effect of CKD-602(Belotecan, Camtobell) on the oral cancer cell lines. J Kor Oral Maxillofac Surg 31: 7-12, 2005.
22. Matsuda H et al.: Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. Bioorg Med Chem 11(9):1995-2000, 2003.
23. Ozsoy N, Candoken E, Akev N: Implications for degenerative disorders: antioxidative activity, total phenols, flavonoids, ascorbic acid, beta-carotene and beta-tocopherol in *Aloe vera*. Oxid Med Cell Longev 2(2): 99-106, 2009.
24. Baardseth P et al.: Vitamin C, total phenolics and antioxidative activity in tip-cut green beans (*Phaseolus vulgaris*) and swede rods (*Brassica napus* var. napobrassica) processed by methods used in catering. J Sci Food Agric 90(7):1245-1255, 2010.
25. Song JW, Min KJ, Cha CG: Antioxidative and antitumor activity of extracts from *Saussurea lappa*. J Env Hlth Sci 34(1): 55-61, 2008.
26. Lee YH, Kim YG, Kim JH: Studies on anti-oral activities of medicinal plant extracts. J Kor Oral Maxillofac Surg 26(1): 53-58, 2000.
27. Lee JY, Han YS: Clinical analysis of intra oral carcinomas. J Kosin Med col 4(1): 101-110, 1988.
28. Kim MY et al.: A clinicostatistical analysis of oral cancer patients for recent 8 years. J Kor Oral Maxillofac Surg 33: 660-668, 2007.
29. Badami S et al.: Antioxidant activity of *Caesalpinia sappan* heartwood. Biol Pharm Bull 26(11): 1534-1537, 2003.
30. Hur JW et al.: A study on remediation of explosives-contaminated soil/ground water using modified fenton reaction and fenton-like reaction. Kor Chem Eng Res 43(1): 153-160, 2005.
31. Kuo ML et al.: Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase block nitric oxide-induced apoptosis but not differentiation in human leukemia HL-60 cells. Biochem Biophys Res Commun 219(2): 502-508, 1996.

(Received September 10, 2010; Revised October 14, 2010; Accepted October 18, 2010)

