

감초 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)로부터 분리된 flavonoid의 인체 암세포에 대한 세포독성

박지해¹ · 우치엔¹ · 유기현² · 용혜임³ · 조승목³ · 정인식² · 백남인^{1*}

¹경희대학교 생명공학원 및 식물대사연구센터, ²경희대학교 유전공학과, ³한국식품연구원 산업진흥연구본부

Cytotoxic Effect of Flavonoids from the Roots of *Glycyrrhiza uralensis* on Human Cancer Cell Lines

Ji-Hae Park¹, Qian Wu¹, Ki-Hyun Yoo², Hye-Im Yong³, Sueng-Mock Cho³, In-Sik Chung², and Nam-In Baek^{1*}

¹The Graduate School of Biotechnology & Plant Metabolism Research Center, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Republic of Korea

²Department of Genetic Engineering, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Republic of Korea

³Research Division of Food Industry Promotion, Korea Food Research Institute, Seongnam 608-737, Republic of Korea

Received November 25, 2011; Accepted March 3, 2011

The roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. were extracted with 30% aqueous ethanol (EtOH), and the concentrated extract was partitioned with *n*-hexane, chloroform (CHCl₃), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH), and H₂O, successively. From the CHCl₃ fraction, four flavonoids were isolated through the repeated silica gel (SiO₂), octadecyl silica gel (ODS), and Sephadex LH-20 column chromatographies (c.c.). According to the results of spectroscopic data including nuclear magnetic resonance spectrometry (NMR), electron ionization mass spectrometry (EI/MS), and infrared spectroscopy (IR), the chemical structures of the compounds were determined as glabrol (1), abyssinone II (2), glabridin (3), and isoliquiritigenin (4). The flavonoids were evaluated for cytotoxic effect against human cancer cell lines, HCT-116, HepG2, HeLa, SK-OV-3, SK-BR-3, MCF-7, and SK-MEL-5. Especially, glabrol (1) and glabridin (2) showed IC₅₀ values of lower than 25 μM.

Key words: abyssinone II, cytotoxicity, glabridin, glabrol, *Glycyrrhiza uralensis*, isoliquiritigenin

감초는 콩과에 속하는 다년생 초본으로, 한국, 중국과 일본 등지에서 한약의 재료로 널리 이용하고 있는 약용식물이다. 감초의 가장 주요한 활성성분은 triterpenoid계 saponin인 glycyrrhizin으로 감초 뿌리에 3-5% 정도 함유되어 있고, 항알레르기성, 항산화성, 항궤양성, 항바이러스성 및 항암성과 같은 생리활성을 가지고 있다. 뿐만 아니라, 감미가 높고 기포력, 유효력과 풍미를 개선하는 능력을 가지고 있어서 식품, 의약품 및 화장품 공업에서 널리 사용하고 있다[Fenwick 등, 1990]. 또한, 감초는 flavonoid 화합물을 다량 함유하고 있는데, 그 함량은 약 5.5%이다[Kim 등, 2004]. Flavonoid는 식물의 꽃, 잎, 줄기 또는 과일 등 식물의 여러 부위에 함유되어 있는 천연의 항균 물질이

다. Flavonoid는 식물을 외부 자극에서 보호하고 색소의 형성, 항균물질 등의 기능을 할 뿐만 아니라 사람에게 있어 항균작용, 항바이러스작용, 항산화작용, 항암작용, 항방사작용과 같은 많은 생리적인 활성을 가지고 있다[Havsteen 등, 2002]. 따라서, 천연식물인 감초로부터 flavonoid 화합물을 분리, 동정하고 이에 대해 암세포에 대한 세포독성을 밝히고자 하였다. 암은 우리나라에서 사망률 1위인 심각한 질병이다. 국내에서도 식생활 및 생활양식의 서구화 등으로 각종 암의 발생빈도가 급격히 증가하고 있다. 따라서, 감초로부터 flavonoid 화합물을 분리, 정제하고 구조동정 하였으며 분리한 flavonoid 화합물을 다양한 인체 암세포: 대장암세포(HCT-116, human colon carcinoma), 간암세포(HepG2, human hepatoma), 자궁암세포(HeLa, human cervical adenocarcinoma), 난소암세포(SK-OV-3, human ovarian adenocarcinoma), 유방암세포(SK-BR-3; MCF-7, human breast adenocarcinoma), 피부암세포(SK-MEL-5, human melanoma)에 처리하여 세포독성을 측정하였다.

*Corresponding author
Phone: +82-31-201-2661; Fax: +82-31-204-8116
E-mail: nibaek@khu.ac.kr

본 실험에서 사용한 시료는 대한약전에서 제시하는 규격에 맞는 감초를 2010년 2월 일신상회(경기도, 국내산)에서 공급하는 시료를 제공받아 사용하였다. 감초의 주근과 잔뿌리를 사용하였으며 표본시료는 한국식품연구원에 보관되어 있다. 감초 뿌리 30 kg을 30% EtOH 수용액 30 L로 40°C에서 12시간 동안 추출 하였다. 얻어진 추출물을 여과하고 감압 농축하여 ethanol (EtOH) 추출물을 얻었다. 얻어진 EtOH 추출물을 *n*-hexane (3 L ×3)과 H₂O (3 L)로 분배 추출하였고, 다시 H₂O 층을 CHCl₃ (3 L×3)으로 분배 추출하였다. H₂O 층을 다시 ethyl acetate (EtOAc) (3 L×3) 및 butanol (*n*-BuOH, 2.7 L×3)을 이용하여 분배 추출하였다. 각 층을 감압 농축하여 *n*-hexane 분획(GUH, 218 mg), CHCl₃ 분획(GUC, 62.8 g), EtOAc 분획(GUE, 63.8 g), *n*-BuOH 분획(GUB, 38.1 g) 및 H₂O 분획(GUW, 54.38 g)을 얻었다.

CHCl₃ 분획(62.8 g)으로부터 SiO₂ column chromatography (c.c.) (φ 8×20 cm, *n*-hexane-EtOAc)를 실시하여 23개의 분획물 (GUC-1~GUC-23)을 얻었다. 그 중 GUC-18 분획(1.47 g)에 대하여 octadecyl silica gel (ODS) c.c. (φ 5×13 cm, MeOH-H₂O =2:1)를 실시하여 19개의 분획(GUC-18-1~GUC-18-19)으로 나누었고, 화합물 1 [GUC-18-11, 20 mg, TLC (ODS F_{254s}) R_f 0.60, MeOH-H₂O=5:1]을 분리하였다. GUC-18-4 분획(40 mg)에 대하여 Sephadex LH-20 c.c. (φ 2×50 cm, 70% MeOH)를 실시하여 15개의 분획(GUC-18-4-1~GUC-18-4-15)으로 나누었고, 화합물 2 [GUC-18-4-7, 3.5 mg, TLC (ODS F_{254s}) R_f 0.41, MeOH-H₂O=3:1]와 화합물 3 [GUC-18-4-11, 6 mg, TLC(ODS F_{254s}) R_f 0.22, MeOH-H₂O=3:1]을 분리하였다. GUC-22 분획(748 mg)에 대하여 ODS c.c. (φ 4×5 cm, MeOH-H₂O=1:1→3:1)를 진행하여 15개의 분획(GUC-22-1~GUC-22-15)으로 나누었으며, 다시 GUC-22-5 분획에 대하여 Sephadex LH-20 c.c. (φ 2×50 cm, 70% MeOH)를 실시하여 2개의 분획으로 나누었고, 화합물 4 [GUC-22-5-1, 3.5 mg, TLC (SiO₂ F₂₅₄) R_f 0.60, CHCl₃-MeOH=10:1]를 분리하였다.

화합물 1 (glabrol): yellow powder (CHCl₃); melting point 106-107°C; $[\alpha]_D^{20} = -34.5^\circ$ (*c*=0.20, CHCl₃); EI/MS *m/z* 392 [M]⁺; IR (KBr, ν) 3390, 1602 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ_H) 7.78 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H-5), 7.25 (1H, br s, H-2'), 7.26 (1H, br d, *J*=8.8 Hz, H-6'), 6.88 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H-5'), 6.58 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H-6), 5.40 (1H, dd, *J*=13.2, 2.8 Hz, H-2), 5.29 (2H, m, H-2'', 2'''), 3.43 (4H, *J*=7.6 Hz, H-1'', 1'''), 3.03 (1H, dd, *J*=16.8, 13.2 Hz, H-3_{ax}), 2.83 (1H, dd, *J*=16.8, 2.8 Hz, H-3_{eq}), 1.83 (6H, s, H-4'', 5''), 1.79 (6H, s, H-4''', 5'''); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ_C) 191.95 (C-4), 161.42 (C-7), 161.20 (C-9), 154.45 (C-4'), 135.02 (C-3''), 134.84 (C-3'''), 130.99 (C-1'), 127.85 (C-6'), 127.10 (C-3'), 126.40 (C-5), 125.29 (C-2'), 121.26 (C-2''), 121.00 (C-2'''), 115.70 (C-5'), 114.72 (C-8), 114.57 (C-10), 110.46 (C-6), 79.43 (C-2), 44.02 (C-3), 29.77 (C-1'''), 25.89 (C-4''), 25.83 (C-4'''), 22.31 (C-1''), 17.98 (C-5''), 17.92 (C-5''').

화합물 2 (abyssinone II): white powder (CHCl₃); melting point 76-78°C; $[\alpha]_D^{20} = -32^\circ$ (*c*=0.10, MeOH); EI/MS *m/z*

322 [M]⁺; IR (KBr, ν) 3301, 1599, 1504 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ_H) 7.82 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H-5), 7.19 (1H, br d, *J*=8.0 Hz, H-2'), 7.17 (1H, br s, H-6'), 6.82 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-3'), 6.50 (1H, dd, *J*=8.8, 2.0 Hz, H-6), 6.42 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 5.36 (1H, dd, *J*=13.6, 2.8 Hz, H-2), 5.31 (1H, t, *J*=6.4 Hz, H-2''), 3.36 (2H, d, *J*=6.4 Hz, H-1''), 3.07 (1H, dd, *J*=16.8, 13.2 Hz, H-3_{ax}), 2.77 (1H, dd, *J*=16.8, 2.8 Hz, H-3_{eq}), 1.76 (6H, s, H-4'', 5''); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ_C) 192.67 (C-4), 164.42 (C-7), 164.10 (C-9), 155.27 (C-4'), 135.61 (C-3''), 130.99 (C-1'), 129.87 (C-5), 128.69 (C-6'), 127.85 (C-2'), 126.14 (C-5'), 121.72 (C-2''), 116.39 (C-3'), 115.03 (C-10), 112.27 (C-6), 103.89 (C-8), 80.19 (C-2), 44.36 (C-3), 30.14 (C-1''), 26.22 (C-4''), 18.33 (C-5'').

화합물 3 [(+)-glabridin]: white powder (CH₃OH); melting point 233-235°C; $[\alpha]_D^{20} = -15^\circ$ (*c*=0.10, MeOH); EI/MS *m/z* 324 [M]⁺; IR (KBr, ν) 3380, 1606 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ_H) 6.88 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-2'), 6.78 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5), 6.61 (1H, d, *J*=10.0 Hz, H-1''), 6.31 (1H, d, *J*=1.2 Hz, H-5'), 6.26 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-6), 6.25 (1H, br d, *J*=8.4 Hz, H-3'), 5.57 (1H, d, *J*=10.0 Hz, H-2''), 4.31 (1H, dd, *J*=10.4, 5.2 Hz, H-2_{eq}), 4.01 (1H, dd, *J*=10.4, 10.4 Hz, H-2_{ax}), 3.97 (1H, t-like, *J*=10.4, 10.4 Hz, H-3_{ax}), 3.41 (1H, m, H-3_{eq}), 2.96 (1H, dd, *J*=15.6, 11.2 Hz, H-4_{ax}), 2.77 (1H, dd, *J*=15.6, 4.8 Hz, H-4_{eq}), 1.37 (6H, s, H-4'', 5''); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ_C) 157.86 (C-4'), 157.12 (C-6'), 152.85 (C-7), 150.89 (C-9), 130.17 (C-5), 129.58 (C-2''), 128.63 (C-2'), 119.80 (C-1'), 118.03 (C-1''), 116.03 (C-10), 110.88 (C-8), 109.39 (C-6), 107.52 (C-3'), 103.451 (C-5'), 76.43 (C-3''), 71.38 (C-2), 33.02 (C-3), 31.68 (C-4), 27.97 (C-4''), 27.84 (C-5'').

화합물 4 (isoliquiritigenin): yellow powder (CH₃OH); melting point 209-210°C; EI/MS *m/z* 256 [M]⁺; IR (KBr, ν) 3343, 1629, 1598, 1451, 1367, 1235, 1120 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ_H) 7.98 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H-6'), 7.76 (1H, d, *J*=15.2 Hz, H-α), 7.63 (1H, d, *J*=15.2 Hz, H-β), 7.61 (2H, d, *J*=8.8 Hz, H-2, 6), 6.83 (2H, d, *J*=8.8 Hz, H-3, 5), 6.42 (1H, dd, *J*=8.8, 2.4 Hz, H-5'), 6.27 (1H, d, *J*=2.4 Hz, H-3'); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ_C) 193.26 (C=O), 167.36 (C-4'), 166.34 (C-2'), 161.42 (C-4), 145.48 (C-β), 133.24 (C-6'), 131.71 (C-2, 6), 127.71 (C-1), 118.22 (C-α), 116.81 (C-3, 5), 114.55 (C-1'), 109.09 (C-5'), 103.72 (C-3').

암세포주는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)으로부터 구입하였다. 간암세포 및 자궁암세포는 10% phosphate buffered saline (PBS)와 10% penicillin-streptomycin이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지를 이용하였고, 나머지 세포는 10% PBS와 10% penicillin-streptomycin이 포함된 RPMI-1640 배지를 이용하여 5% CO₂ 농도가 유지되는 37°C 배양기에서 배양하였다. 세포를 배양 후 회수하기 위해 약 2분 정도 0.25% trypsin을 처리하였다. 회수된 세포를 분주하고 24

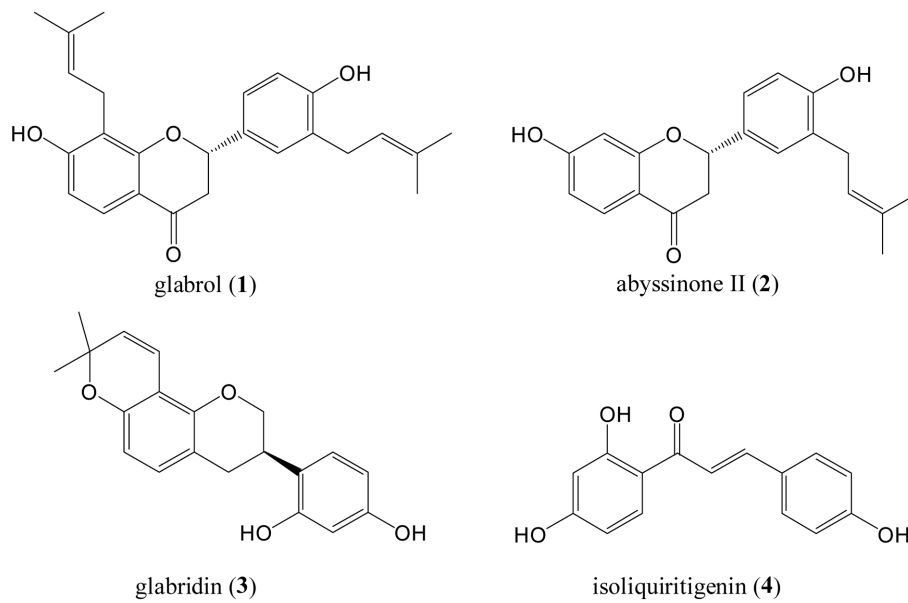


Fig. 1. Chemical structures of flavonoids isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.

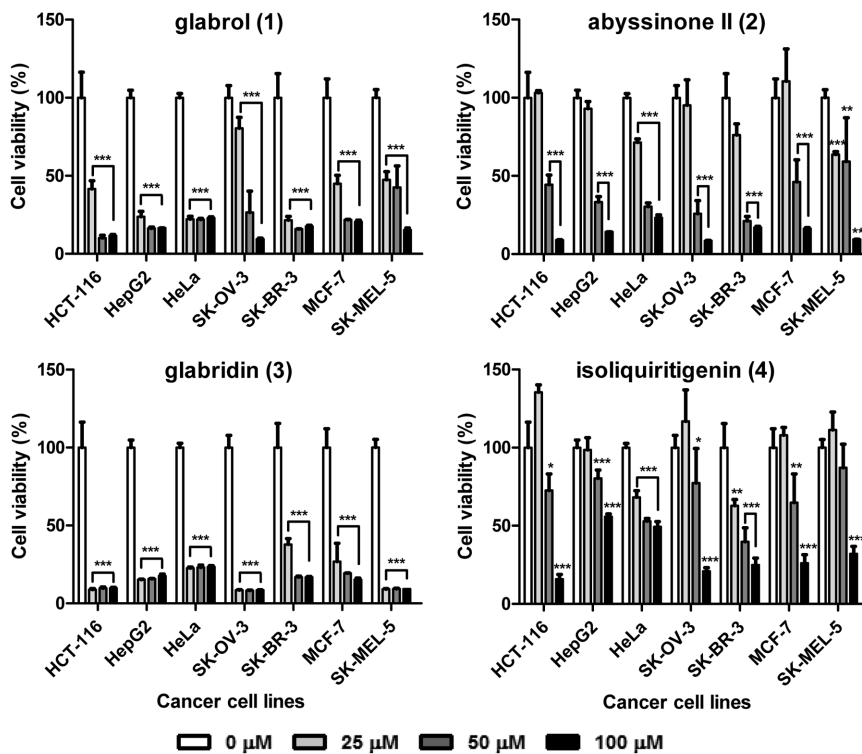


Fig. 2. Effects of flavonoids on the viability of cancer cells. The flavonoids of *G. uralensis* Fisch. dose-dependently decreased the viability of human cancer cell lines. Cells were treated with different concentrations (0, 25, 50, 100 μM) of flavonoids. After 24 h incubation, the viabilities were assessed by MTT assay. All data were represented as mean±SD of triplicates. Statistically significant differences compared with the control cells were determined by Student's *t* test (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001).

시간 동안 배양한 후에 실험에 사용하였다. 감초로부터 분리된 4종의 flavonoid 화합물에 대한 세포독성은 model transformation tools (MTT) colorimetric assay를 이용해 측정하였으며, 화합물은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹였다. 각 암세포는 well 당 배지 100 μL 안에 1×10⁴ cell의 초기세포 농도로 96-well microplate에 분주하였다. 37°C에서 24시간 배양시킨 후에 혈청

이 없는 배지에 각각의 단일화합물을 다양한 농도(25, 50, 100 μM)로 처리하였다. 24시간 배양한 후 각각의 well에 MTT solution (5 mg/mL in PBS)을 50 μL씩 첨가하였다. 그리고 37°C에서 약 2 시간 배양한 후에, 배지를 제거하고 약 5분간 DMSO 100 μL를 처리해 주었다. Optical density (OD)는 550 nm 파장에서 microplate reader (BIO-TEK Inc., Winooski,

VT)를 사용하여 측정하였다. 세포의 생존율은 다음의 식에 따라서 화합물을 처리한 그룹과 대조군 그룹 내에 있는 생존세포의 비율로써 측정하였다. 세포 생존률 (%)=[OD (Compound)-OD (Blank)/OD (Control)-OD (Blank)] ×100. 각 실험은 3반복으로 실험하였다. 자료의 통계적 유의성 검사는 student's *t* test를 이용하였다. P value가 0.05 이하일 때 통계적 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

감초를 EtOH 수용액으로 추출하고, 얻어진 추출물을 용매 계통분획 하였다. 이 중 CHCl₃ 분획으로부터 silica gel, ODS 그리고 Sephadex LH-20 c.c.를 반복 수행하여 4종의 flavonoid 화합물을 분리, 정제하였다. 각 화합물의 화학구조는 nuclear magnetic resonance spectrometry (NMR), electron ionization mass spectrometry (EI/MS) 및 infrared spectroscopy (IR) 등의 spectrum data를 해석하여 결정하였다. 화합물 1과 2는 flavanone 골격에 isoprenyl기가 결합된 glabrol (1)과 abyssinone II (2)로 구조동정 하였고, 화합물 3은 isoflavane 골격에 isoprenyl기가 결합된 glabrol (3)로 구조동정 하였으며, 화합물 4는 chalcone 골격의 flavonoid인 isoliquiritigenin (4)으로 구조동정 하였다. 각 화합물의 구조는 문헌[Asada 등, 2000; Fukai 등, 2002; Kim 등, 2008; Choi 등, 2010]과 비교하여 확인하였다.

감초에서 분리한 4종 flavonoid 화합물의 7종 인체암 세포에 대한 세포독성을 측정하였다. 각 화합물을 24시간 동안 암세포주에 처리하여 MTT assay로 확인한 결과 약 25 µM 농도에서 glabridin은 7종의 암세포주에서, glabrol은 난소암세포주(SK-OV-3)를 제외한 6종의 암세포주에서 세포 생존율이 50% 이하로 감소하였다. Abyssinone II는 약 50 µM 농도에서 피부암세포주(SK-MEL-5)를 제외한 6종의 암세포주에서 세포 생존율이 50% 이하로 감소하였다. 또한, isoliquiritigenin은 간암세포주(HepG2)를 제외한 6종의 암세포주에서 50 µM 농도 이상에서 세포 생존율이 50% 이하로 감소하였다(Fig. 2). Miranda 등 [1999]에 따르면 flavanone, chalcone 혹은 isoprenyl기가 결합된 골격의 flavonoid인 경우 다양한 인체 암 세포주에서 세포독성 효과를 나타내는데 IC₅₀ 값이 약 15 µM으로 높은 암세포 성장 억제율을 나타내는 것으로 보고되어있다. 이번에 분리한 4종의 flavonoid도 다양한 인체암 세포주의 성장을 억제한다는 연구결과가 보고되어 있으나, glabrol (1)이 HCT-116, SK-BR-3 및 SK-MEL-5에 세포독성이 있다는 연구결과는 이번에 처음 확인되었다. 화합물 1의 경우는 HCT-116, SK-BR-3 및 SK-MEL-5에 대해 농도의존적으로 암세포 성장을 억제하는 것으로 나타났으며, IC₅₀ 값은 25 µM보다도 다소 낮았으며, SK-BR-3의 경우에는 IC₅₀ 값이 20 µM보다도 낮게 나타났다.

Glabrol (1)과 abyssinone II (2)는 동일한 isoflavone 계열의 화합물이고 결합한 수산기의 개수와 결합위치도 같지만, glabrol (1)은 isoprenyl기의 결합위치가 C-3과 C-8인 반면 abyssinone II (2)는 C-3에만 결합하고 있는 점이 다르다. Glabridin (3) 역시 C-8 위치에 isoprenyl기가 결합하고 있는데 세포독성 효과가 높게 나타나는 것으로 보아 flavonoid 골격에서 C-8에 결합하는 isoprenyl기가 세포독성의 발현에 중요한 영향을 미치는 것으로 추정되었다.

감사의 글

이 연구는 한국식품연구원의 수면증진 추출물의 분리정제 및 기능성분 규명(과제번호 20100797U0054101S000100)에서 지원한 연구비로 수행하였음.

참고문헌

- Asada Y, Li W, and Yoshikawa T (2000) Biosynthesis of the dimethylallyl moiety of glabrol in *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures via a non-mevalonate pathway. *Phytochemistry* **55**, 323-326.
- Choi JH, Choi JN, Lee SY, Lee SJ, Kim K, and Kim YK (2010) Inhibitory activity of diacylglycerol acyltransferase by glabrol isolated from the roots of licorice. *Arch Pharm Res* **33**, 237-242.
- Fenwick GR, Lutomski J, and Nieman C (1990) Licorice, *glycyrrhiza glabra* L. composition uses and analysis. *Food Chem* **38**, 119-143.
- Fukai T, Marumo A, Kaitou K, Kanda T, Terada S, and Nomura T (2002) Anti-Helicobacter pylori flavonoids from licorice extract. *Life Sci* **71**, 1449-1463.
- Havsteen BH (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Parmacol Ther* **96**, 67-202.
- Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, and Rhyu MR (2004) Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Sci. Technol* **36**, 333-338.
- Kim JY, Park SJ, Yun KJ, Cho YW, Park HJ, and Lee KT (2008) Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-Induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF-κB in Raw 264.7 macrophages. *Eur J Med Chem* **53**, 175-184.
- Miranda CL, Stevens JF, Helmrich A, Henderson MC, Rodriguez RJ, Yang YH, Deinzer ML, Barnes DW, and Buhler DR (1999) Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food Chem Toxicol* **37**, 271-285.