

Hollow Fiber Assay을 이용한 고량강 추출물의 항종양 효과

이 경 호 · *이 기 형*

코오롱생명과학연구소, *공주대학교 산업과학대학

Anti-tumor Activity of the Extract of *Alpinia officinarum* using Hollow Fiber Assay

Keyong Ho Lee and *Ki-Hyeong Rhee*

Kolon Life Science Inc., Seoul 153-786 Korea

*College of Industrial Sciences, Kongju National University, Yesan 340-702, Korea

Abstract

The purpose of this investigation was to evaluate anti-tumor activity and detect what compounds affect its activity form *Alpinia officinarum* Hance. Two fractions, methanol and ethylacetate, were isolated by Amberlite XAD-2 resin column chromatography from methanol extract of the rhizomes of *Alpinia officinarum*. In hollow fiber assay, the methanol extract and methanol fraction were found to inhibit the tumor growth against colon tumor cell lines such as Colo-320, HCT116 and WiDr. Three diarylheptanoids [5-hydroxy-1,7-diphenyl-3-heptanone, 5-hydroxy-7-(4"-hydroxy-3"-methoxyphenyl)-1-phenyl-3-heptanone and 3,5-dihydroxy-1,7-diphenylheptane] and two flavonoids [galangin and kaempferide] were isolated and identified from the methanol fraction, which is higher activity than ethylacetate fraction. Among these diarylheptanoids and flavonoids, 3,5-dihydroxy-1,7-diphenylheptane, galangin and kaempferide as active components on anti-tumor activity were mainly posited in methanol fraction.

Key words: *Alpinia officinarum* Hance, hollow fiber, anti-tumor

서 론

고량강(*Alpinia officinarum* Hance)은 생강과(Zingiberaceae)에 속하는 다년생 초본의 뿌리줄기로 주로 중국의 남부지방에서 재배되어 왔으며, 약 46종에 이른다고 알려져 있다. 고량강의 생리활성으로는 항염증, 항산화, 항암 및 구토 억제 효과가 알려져 왔다(Claeson 등 1996; Yang 등 2002; Yokosuka 등 2002). 현재까지 보고된 대표적 성분으로는 벌집성분인 프로폴리에도 함유된 flavonoid류인 galangin이 알려져 있으며(Chung & Baek 2002; Park 등 2008), 이 성분으로 주요 생리활성으로는 항암, 항궤양, 항생 및 항진균 효과가 있는 것으로 보고되었다(Itokawa 등 1985; Matsuda 등 2006; Newman 등 2003). 고량강의 항암활성성분으로 diarylheptanoids류와 flavonoids

류가 주요 활성물질로 알려져 있으나(Houghton 등 2007; Lee & Houghton 2005; Lu 등 2007; Tabata 등 2009; Yasukawa 등 2008), 전부가 *in vitro*에 측정된 결과로 *in vivo*에서 본격적으로 평가된 결과는 전무한 상태이다.

본 연구는 고량강의 메탄올 추출물로부터 흡착 크로마토그래피에 의하여 분리한 분획에 대하여 광범위한 종양세포에 대하여 항암 효과 검색을 실시하였다. 항암 효과는 *in vivo*의 생체내 약리조건에 충족시킬 수 있는 hollow fiber assay를 이용하여, 20종의 종양세포에 대한 검색을 실시하였다. 일반적으로 초기 물질탐색과정부터 동물을 이용한 기존의 물질검색은 많은 시간 및 비용이 소모되는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 Hollingshead 등(1995)은 실험동물을 이용하면서 기존의 동물모델보다 경제적인 검색법인 hollow fiber

* Corresponding author: Ki-Hyeong Rhee, College of Industrial Sciences, Kongju National University, Yesan 340-702, Korea. Tel: + 82-41-330-1626, Fax: + 82-41-330-1629, E-mail: howard@kongju.ac.kr

assay을 개발하였다. 배양세포를 polyvinylidene fluoride(PVDF) 막으로 만들어진 hollow fiber에 주입하여 실험동물의 복강이나 피부에 이식하여 마치 기존 동물모델에서 복강이나 피부에 종양을 이식한 것과 유사한 모델을 재현한 것으로 미국의 국립암연구소에서 항암제 검색에 사용되어 왔다(Casciari 등 1994).

본 연구에서는 고량강 추출물의 흡착 크로마토그래피 분획물로부터 항암 효과를 hollow fiber assay를 이용하여 검색하였고, 각 분획물에 대하여 항암효과에 영향을 미치는 성분에 대한 함량을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

고량강은 청주에 위치한 한의원으로부터 공급받아 실험에 사용하였으며, voucher specimen은 국립공주대학교에 보관되어 있다. Polyvinylidene fluoride(PVDF) hollow fibers(500,000 Da molecular weight cut-off and 1.0 mm ID)는 Spectrum Laboratories(USA)로부터 구입하였다. Balb/c 마우스(수컷, 5 주령)는 일본의 SLC Inc.(Shizuoka, Japan)사의 동물을 중앙실험동물로부터 구입하여 사용하였다. 동물의 온도는 22±3°C, 습도는 55±5%, 명암주기는 12시간으로 조절하였다.

2. 시료

건조된 고량강(1 kg)을 메탄올(MeOH)에 3시간 동안 환류 냉각장치로 추출 및 감압 농축하여 메탄올 추출물(MeOH ext.) 50 g을 얻었다. 이를 증류수에 현탁시킨 후, Amberlite XAD-2 resin column(20×6.0 cm)을 이용하여 MeOH 3 l와 에틸아세테이트(ethylacetate, EtOAc) 3 l로 순차적으로 용출하여 각각의 건조 분획을 얻었으며, 항암 효과 측정 시는 DMSO에 녹여 투여를 하였다.

3. HPLC 분석

각 분획에 대한 분석을 위하여 HPLC(YMC-Pack ODS-A, 250×20 mm, 이동상 MeOH-H₂O gradient(MeOH 10~40%), Agilent 1100 series)로 분석하였고, 동정은 LC/MS로 확인하였다.

4. 종양세포주

20개의 종양세포주로는 melanoma인 SK-MEL-2, cervix adenocarcinoma인 HeLa와 SiHa, breast adenocarcinoma인 MCF-7와 MDAMB-231, ovary adenocarcinoma인 SK-OV-3, pancreas adenocarcinoma인 Capan-1와 Capan-2, colon adenocarcinoma인 Colo-320, WiDr 및 HCT116, lung carcinoma인 A549와 H209, larynx

carcinoma인 A431, stomach carcinoma인 MKN-28와 MKN-45, prostate carcinoma인 PC-3, cervical carcinoma인 KB, pharynx carcinoma인 FaDu와 liver hepatoblastoma인 Hep-G2를 사용하였다. 모든 세포주는 표준배양배지에 10% fetal bovine serum (FBS, JRH Bioscience)를 사용하였다. HeLa, MCF-7, Hep-G2, KB, Colo-320, WiDr, HCT116와 SK-MEL-2는 minimum essential medium (MEM)를, SK-OV-3는 McCoy's 5a medium을 이용하였다. 나머지 세포주들은 RPMI1640을 표준배지로 이용하였다.

5. Hollow Fiber Assay

항암활성의 측정은 Hollingshead 등(1995)의 방법을 이용하였다. 즉, 세포를 1×10⁶ cells/ml로 하여 미리 한쪽 끝이 봉인된 멸균 hollow fiber에 5 cc 주사기를 이용하여 세포현탁액을 주입한 후, 세포현탁액이 세어 나오지 못하도록 열을 가하여 hollow fiber의 나머지 한쪽을 봉인하였고, 세포가 충전된 fiber를 2 cm 간격으로 가열 봉인하여 macrocapsule를 만들었다. 이 캡슐을 24시간 동안 37°C CO₂배양기에서 예비 배양한 후, 마우스의 좌우 옆구리 피하에 이식하였다. 평가는 시료 투여일로부터 8일 후에 마우스로부터 hollow fiber 캡슐을 적출하여 캡슐 내에 있는 세포농도를 MTT시약(1 mg/kg)으로 염색한 후, 형성된 formazan를 DMSO로 녹여 흡광도(540 nm, Biorad ELISA microreader model 680, USA)를 측정하여 저해율로 측정하였다. 활성을 측정하고자 하는 시료는 매일 1회씩 5일간 복강 투여하였으며, 양성대조물질로는 5-fluorouracil (25 mg/kg, LD₅₀의 1/10값)을 동일하게 투여하였다. 각 시험물질의 투여농도는 MeOH 추출물은 2,000 mg/kg, MeOH 분획 및 ethylacetate 분획은 100 mg/kg으로 하였다. 대조군은 5% DMSO를 투여하였다.

결과 및 고찰

1. 고량강 분획의 성분

고량강 MeOH 추출물(50 g)으로부터 Amberlite XAD-2 resin column(20×6.0 cm)을 이용하여 MeOH 3 l와 EtOAc 3 l로 순차적으로 용출하여 각각의 건조 분획 26 g과 13 g을 얻었다. HPLC의 면적비(%) 산출로MeOH 분획으로부터의 성분의 비는 Table 1과 같았다. 즉, 3종류의 diarylheptanoids 성분으로 5-hydroxy-1,7-diphenyl-3-heptanone(1)는 1.2%, 5-hydroxy-7-(4"-hydroxy-3"-methoxyphenyl)-1-phenyl-3-heptanone(2)는 0.4%, 3,5-dihydroxy-1,7-diphenylheptane(3)는 3.8%이 검출되었고, 2종류의 flavonoids로는 galangin(4) 5.8%와 kaempferide(5) 3.0%가 검출이 되었다. 반면, EtOAc 분획에서는 4종류의 diarylheptanoids과 1종류의 flavonoid가 각각 다음과 같이 검출되었다;

5-hydroxy-1,7-diphenyl-3-heptanone(1) 0.06%, 5-hydroxy-7-(4"-hydroxy-3"-methoxyphenyl)-1-phenyl-3-heptanone(2) 0.01%, 3,5-dihydroxy-1,7-diphenylheptane(3) 0.002%, 5-methoxy-7-(4"-hydroxy-3"-methoxyphenyl)-1-phenyl-3-heptanone(6) 0.05% 및 kaempferide (5) 0.01%(Table 1). MeOH 분획에서는 diarylheptanoids 및 flavonoids의 함량이 EtOAc 분획 대비 전반적으로 높게 검출이 되었고, 특징적으로는 galangin과 kaempferide의 함량이 EtOAc 분획보다 높게 나타났다.

2. 각 분획물의 항암활성

Amberlite XAD 컬럼을 이용하여 분리된 각 분획물 및 MeOH 추출물을 20종의 종양세포에 대하여 hollow fiber assay로 종양세포증식억제효과를 검색하여 본 결과, 전체적으로 고량강 추출물 유래의 물질은 Colo-320, HCT116 및 WiDr과 같은 주로 대장암 유래의 종양세포에 대하여 특이적으로 저해 효과를 나타내었다. 투여 농도의 결정에서 있어서 MeOH 추출물에서 경우는 2,000 mg/kg(MeOH 추출물에서 독성을 나타내지 않는 최대농도)로 하였고, Amberlite XAD 컬럼 분획물의 경우는 급성독성(정맥투여)을 나타내는 농도의 1/20이하(100 mg/kg)로 하였다(data not shown). MeOH 추출물에 대한 20종의 종양세포 중 Colo-320과 HCT116에서 각각 52%와 54%의 저해율을 나타내었고, 나머지 종양세포주에서는 50% 이하의 다양한 저해율을 나타내어, 본 연구자가 사용한 hollow fiber 시스템에서는 Colo-320과 HCT116의 두 종류의 세포에서만 특이적으로 실험농도에서 감수성이 있는 것으로 나타났다. 또한 Amberlite XAD 컬럼으로부터의 MeOH 및 EtOAc 분획물의 경우, 동일 농도에서 비교 평가한 결과 MeOH 분획물에서 Colo-320, HCT116 및 WiDr에서 각각 68%, 60% 및 57%의 저해율을 나타내어 컬럼 분획 전 단계인 MeOH 추출물에서와 유사한 활성 스펙트럼을 나타내었다. 반면에 EtOAc 분획물 처리에서는 Colo-320, HCT116 및 WiDr을 포함한 나머지 모든 종양세포주에서 MeOH 분획물 처리시 보다 낮은 저해율을 나타내어 전반적으로 Amberlite XAD 컬럼 분획 시에 MeOH 용출에 활성성분이 많이 용출되는 것으로 판단되었다.

Table 1에서 보는 바와 같이, MeOH과 EtOAc 분획시 용출되는 화합물의 성분 및 함량은 서로 상이하게 나타났다. MeOH 분획물에서 함량이 높은 순서로는 galangin(4), 3,5-dihydroxy-1,7-diphenylheptane(3) 및 kaempferide(5)으로 나타났으며, EtOAc 분획물에서는 5-hydroxy-1,7-diphenyl-3-heptanone(1)과 5-methoxy-7-(4"-hydroxy-3"-methoxyphenyl)-1-phenyl-3-heptanone(6)이 주요한 성분으로 나타났으나, MeOH 분획에서 가장 높게 검출된 galangin의 경우는 검출되지 않았다. 따라서, 본 물질들이 항종양 활성에 가장 영향력을 나타내는 성분으로는 MeOH 분획물에서 높은 함량을 나타낸 galangin(4), 3,5-dihydroxy-

Table 1. The contents of components in the same concentration of methanol fraction and ethylacetate fraction by HPLC analysis

Components	Methanol fraction	Ethylacetate fraction
	(%)	(%)
1	1.2	0.06
2	0.4	0.01
3	3.8	0.002
4	5.8	ND
5	3.0	0.01
6	ND	0.05

ND; not detected.

1,7-diphenylheptane(3) 및 kaempferide(5)의 성분들로 사료된다. 또한 Table 2의 hollow fiber assay의 결과에서 보는 바와 같이 주요 활성 성분으로 예측되는 3가지 성분이 많이 함유된 MeOH 분획물에서 나타났다. 따라서, 본 연구결과에서는 고량강의 항종양 활성은 MeOH 분획물에서 나타났으며, 이러한 분획 중의 주요 활성성분으로는 galangin(4), 3,5-dihydroxy-1,7-diphenylheptane(3) 및 kaempferide(5)으로 추정되었다. 본 연구의 이러한 결과는, 비록 *in vitro* 검색 결과이기는 하지만, 이 등(2008)의 결과와 유사하게 대장암 세포주(HCT-15)에 활성을 나타내었고, 검출된 활성성분으로는 galangin과 kaempferide으로 본 연구결과와도 일치하였다. 이와 함께 Tabata 등(2009)의 연구결과에 의하면, 항암기전으로 apoptosis을 유도하는 성분으로 7-(4"-hydroxy-3"-methoxyphenyl)-1-phenyl-4E-hepten-3-one와 (5R)-5-methoxy-7-(4"-hydroxy-3"-methoxyphenyl)-1-phenyl-3-heptanone와 같은 diarylheptanoids이 주요 활성이었으며, 본 연구결과에서도 활성이 높은 MeOH 분획물에서도 3,5-dihydroxy-1,7-diphenylheptane와 같은 diarylheptanoids가 검출이 되었다. 여러 연구자들의 연구결과, 고량강의 항암 활성 성분으로는 diarylheptanoids류와 galangin과 같은 flavonoids류가 주요 약리활성을 나타내는 것으로 알려져 있으며 (Houghton 등 2007; Lee & Houghton 2005; Lu 등 2007; Yasukawa 등 2008), 본 연구결과에서 구체적 성분에는 약간의 차이가 있었으나, 3,5-dihydroxy-1,7-diphenylheptane와 같은 diarylheptanoids와 galangin 및 kaempferide와 같은 flavonoids류가 주요 활성 성분으로 사료되었다. 본 연구결과 의의는 이전의 연구자들은 주로 *in vitro* 연구결과이었으나, 본 연구자는 이러한 *in vitro* 결과를 마우스를 이용한 *in vivo* 결과에서 입증한 것에 의의가 있다고 할 수 있으며, 이러한 결과는 향후, xenograft 동물모델을 이용하여 입증과 나아가서는 대장암에 대하여 구체적으로 효능을 접근할 수 있는 주요한 자료 사료가 된다.

Table 2. Anti-tumor effect of methanol extracts and its fractions from rhizomes of *A. officinarum* on various human tumor cell lines cultivated in hollow fibers in mice

Cell lines	Inhibition rate by the treatment of			
	5-Fluorouracil	Methanol extract	Methanol fraction	Ethylacetate fraction
A 549	12 ± 2	13 ± 4	14 ± 4	4 ± 1
A 431	9 ± 3	5 ± 2	6 ± 1	7 ± 1
Capan-1	15 ± 2	23 ± 1	14 ± 3	6 ± 2
Capan-2	4 ± 1	12 ± 1	10 ± 3	21 ± 4
Colo-320	25 ± 4	52 ± 4*	68 ± 3*	25 ± 4
FaDu	22 ± 5	14 ± 2	13 ± 5	14 ± 1
HCT116	70 ± 2*	54 ± 1*	60 ± 3*	12 ± 5
HeLa	43 ± 4	32 ± 4	12 ± 3	21 ± 2
Hep-G2	21 ± 5	10 ± 3	5 ± 2	0 ± 0
KB	78 ± 2*	5 ± 2	8 ± 3	0 ± 0
MCF-7	90 ± 3*	35 ± 4	11 ± 4	14 ± 1
MKN-28	75 ± 2*	8 ± 1	4 ± 1	5 ± 2
MKN-45	89 ± 3*	37 ± 4	27 ± 2	3 ± 1
MDA-MB-231	60 ± 2*	29 ± 2	36 ± 1	0 ± 0
NCI-H-209	75 ± 1*	30 ± 1	40 ± 5	2 ± 1
PC-3	7 ± 2	37 ± 6	41 ± 3	12 ± 2
SK-OV-3	29 ± 4	20 ± 2	32 ± 6	13 ± 1
SK-MEL-2	80 ± 4*	30 ± 1	29 ± 4	6 ± 2
SiHa	37 ± 3	10 ± 2	23 ± 1	0 ± 0
WiDr	77 ± 3*	43 ± 1	57 ± 2*	11 ± 2

Methanol extract was administered by 2,000 mg/kg; Methanol and Ethylacetate fraction did 100 mg/kg. With the *t*-test, the results was significant ($p < 0.05$), *Sensitive, i.e., % inhibition ≥ 50 .

요약 및 결론

고량강에 대한 항종양 효과로는 주로 *in vitro*에서 효과가 입증되었으며, 구체적으로 여러 종류의 종양세포주에 대하여 광범위한 검색과 *in vivo*에서는 평가되어 있지 않았다. 본 연구에서는 고량강의 MeOH 추출물을 Amberlite XAD 컬럼을 이용한 흡착 크로마토그래피 분획물로부터 항종양 효과를 hollow fiber assay를 이용하여 검색하였고, 각 분획물에 대하여 항종양 효과에 영향을 미치는 성분에 대한 함량을 조사하였다. 그 결과, 고량강의 항종양 활성은 MeOH 분획물에서 나타났으며, 특히 Colo-320, HCT116 및 WiDr와 같은 대장암 세포주에 활성을 나타내었다. 활성이 나타난 MeOH 분획물의 주요 성분으로는 함량이 높은 순서로 galangin, 3,5-dihydroxy-1,7-diphenylheptane 및 kaempferide으로 flavonoids와 diarylheptanoids이 검출되었고, EtOAc 분획물에서는 5-hydroxy-1,7-diphenyl-3-heptanone과 5-methoxy-7-(4"-hydroxy-3"-methoxyphenyl)-1-phenyl-3-heptanone와 같은 diarylheptanoids만이 소량으로 검

출되었다. 이러한 결과로 볼 때 두 분획물의 항종양 활성의 차이는 각 분획물의 성분의 함량차이로 사료가 된다. 따라서, 본 연구결과에서 구체적 성분에는 약간의 차이가 있었으나 3,5-dihydroxy-1,7-diphenylheptane와 같은 diarylheptanoids와 galangin 및 kaempferide와 같은 flavonoids류가 주요 활성 성분으로 사료되었다. 또한 본 연구결과는 이전의 연구자들은 주로 *in vitro* 연구결과이었으나, 마우스를 이용한 *in vivo* 결과에서 입증한 것에 의의가 있다고 할 수 있으며, 이러한 결과는 향후 대장암 치료에 있어서 diarylheptanoids와 flavonoids류를 이용한 치료에 적용할 수 있는 기초적인 자료라 판단된다.

참고문헌

- Casciari JJ, Hollingshead MG, Alley MC, Mayo JG, Malspeis L, Miyauchi S, Grever MR, Weinstein JN. 1994. Growth and chemotherapeutic response of cells in a hollow-fiber *in*

- vitro* solid tumor model. *J Natl Cancer Inst* 86:1846-1852
- Chung DH, Baek SH. 2002. Antibacterial activities of honeys on the *Staphylococcus aureus*. *Korean J Food and Nutr* 15: 58-164
- Claeson P, Pongprayoon U, Sematong T, Tuchinda P, Reutrakul V. 1996. Non-phenolic linear diarylheptanoids from *Curcuma xanthorrhiza*. A novel type of topical anti-inflammatory agents. Structure-activity relationship. *Planta Med* 62:236-40
- Hall LA, Krauthauser CM, Wexler RS, Hollingshead MG, Slee AM, Kerr JS. 2000. The hollow fiber assay: Continued characterization with novel approaches. *Anticancer Res* 20: 03-911
- Hollingshead MG, Alley MC, Camalier RF, Abott BJ, Mayo JG, Malspeis L, Grever MR. 1995. *In vivo* cultivation of tumor cells in hollow fibers. *Life Sci* 57:131-141
- Houghton P, Fang R, Techatanawat I, Steventon G, Hylands PJ, Lee CC. 2007. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods* 42:377-387.
- Lee CC, Houghton P. 2005. Cytotoxicity of plants from Malaysia and Thailand used traditionally to treat cancer. *J Ethnopharmacol* 100:237-243
- Lee HS, Cha MR, Choi CW, Choi SU, Kim YS, Kim YK, Kim YH, Yon GH, Ryu SY. 2008. Anti-proliferative effect of the rhizome extract of *Alpinia officinarum* on cultured human tumor cell lines. *Kor J Pharmacogn* 39:347-351
- Lu YH, Lin-Tao, Wang ZT, Wei DZ, Xiang HB. 2007. Mechanism and inhibitory effect of galangin and its flavonoid mixture from *Alpinia officinarum* on mushroom tyrosinase and B16 murine melanoma cells. *J Enzyme Inhib Med Chem* 22:433-438
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period. *Nat Prod* 66:1022-037
- Park HK, Kim SB, Shim CH. 2008. Antimicrobial activity of water soluble propolis. *Korean J Food and Nutr* 21:15-21
- Tabata K, Yamazaki Y, Okada M, Fukumura K, Shimada A, Sun Y, Yasukawa K, Suzuki T. 2009. Diarylheptanoids derived from *Alpinia officinarum* induce apoptosis, S-phase arrest and differentiation in human neuroblastoma cells. *Anticancer Res* 29:4981-4988
- Yang Y, Kinoshita K, Koyama K, Takahashi T, Kondo S, Watanabe K. 2002. Structure-antiemetic-activity of some diarylheptanoids and their analogues. *Phytomedicine* 9:146-152
- Yasukawa K, Sun Y, Kitanaka S, Tomizawa N, Miura M, Motohashi S. 2008. Inhibitory effect of the rhizomes of *Alpinia officinarum* on TPA-induced inflammation and tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *J Nat Med* 62:374-37
- Yokosuka A, Mimaki Y, Sakagami H, Sashida Y. 2000. New diarylheptanoids and diarylheptanoid glucosides from the rhizomes of *Tacca chantrieri* and their cytotoxic activity. *J Nat Prod* 65:283-289

접 수 : 2011년 8월 15일
 최종수정 : 2011년 9월 20일
 채 택 : 2011년 10월 3일