

당귀 추출성분의 세포독성 효과와 Quinone Reductase 유도활성 효과

한은주 · 노승배* · 배송자†

신라대학교 식품영양학과
*양산대학 식품가공과

Effects of Quinone Reductase Induction and Cytotoxicity of the *Angelica radix* Extracts

Eun-Joo Han, Sung-Bae Roh* and Song-Ja Bae†

Dept. of Food and Nutrition, Silla University, Pusan 617-736, Korea

*Dept. of Food Science and Technology, Yangsan College, Yangsan 626-800, Korea

Abstract

Various lines of evidence suggest that dietary components protect the initiation of carcinogenesis. In this study, the ethanol extracts (AGE) and the methanol and hexane partition layers (AGEM, AGEH) of the *Angelica radix* were screened for their cytotoxic effects using the MTT assay on HepG2, HeLa, MCF7 and SW626 cells and for their ability to induce quinone reductase (QR) in HepG2 cells. AGEM and AGEH of the *Angelica radix* showed the strongest cytotoxic effects on HepG2 and HeLa cells. Cell growth was inhibited by 99.8% and 99.8% on HepG2 cells and 99.3% and 99.4% on HeLa cells, at dose of 100 µg/mL of AGEM and AGEH extracts respectively. AGE and AGEH significantly induced QR activities in the HepG2 cells. The QR activities of HepG2 cells grown in the presence of AGE, AGEH, and AGEM at the concentration of 50 µg/mL were 313.5, 273.3 and 133.3 nmol/min/mg protein, respectively. Therefore, based on these studies, *Angelica radix* may be developed into a potentially useful cancer chemopreventive agent.

Key words: *Angelica radix*, cytotoxicity, quinone reductase activity

서 론

세계적으로 암은 심장질환 다음으로 최근 우리나라의 경우 사망자의 사인 순위도 그 구성비로 보면 암으로 인한 사망률이 매우 높다. 1995년의 통계에 의하면 암 사망률은 인구 10만명 당 1,145명으로 초진 연령은 55~59세가 가장 많았음이 밝혀졌다(1). 특히 암의 장기별 발생빈도를 보면 위암, 폐암, 간암, 자궁경부암, 대장암, 유방암의 순이었고 위암이 전체암의 21.6%를 차지하였다. 성별로는 남성의 경우 위암이 첫 번째로 26.1%였으며, 여성은 자궁경부암으로서 전체 암의 16.15%에 해당하였다(2). 암의 발병은 많은 시간이 흘렀음에도 불구하고 아직까지 현대 의학의 가장 큰 당면과제로 대두되어 있으며 그 주요 인자로서 대두되고 있는, 환경성 요인으로 인한 발생율은 거의 85%에 달하고 있으며, 환경성 발암인자의 대부분을 식품이 차지하고 있는 것으로 알려져 있다(3). 이와 관련하여 최근 식이와 관련된 암의 원인 물질을 검색하는 연구가 활발히 진행되고 있을 뿐 아니라 일상 식생활에서 섭취하는 식품 중 항암제로 이용하기 위한 물질이 계속

탐색되고 있다(4). 특히, 우리 나라에서는 200여종의 한방 생약재가 암 환자에게 처방되고 있음이 통계적으로 밝혀졌고(5,6) 또 수종의 한약재(7)와 마늘(8), 인삼(9), 도라지(10)등에서 항암 작용이 보고된 바 있다. Hyun 등(11)은 일부 약용 식물 및 식용 식물추출물의 항암 효과에 관한 연구를 보고한 바 있으며 중국이나 일본에서도 식용식물의 항암성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 실험에 사용한 당귀는 미나리과에 속하는 다년생 초본으로 우리나라 전북, 경남북, 강원 및 경기 지방 등에 분포하고 있으며(12) 옛부터 심한 기침, 불임증, 약창, 부스럼, 비증 및 냉병 등을 낮게 하는데 사용되어 왔으며 속을 덥게 하고 아픔을 멈추게 하며 오장과 피를 보호하여 새살을 잘 돋아나오게 하는 작용을 한다고 알려져 약용으로 널리 사용되어 왔다(13). 당귀는 oligosaccharide, coumarin 및 정유성분을 주성분으로 함유하고 있으며(14) 면역능에 관한 연구(15), 항산화능(16), 항돌연변이성(17) 및 당귀 추출물의 liposome의 안정성 및 유동성에 미치는 영향(18)과 식품에 착색료로서도 이용되는 당귀의 연구(19-22) 등이 국내외에서 이루어져 왔으나 본 연구에서는 한

† To whom all correspondence should be addressed

방에서 간장 해독을 위한 한약의 재료로 사용되고 있는 미나리과에 속하는 당귀(*Angelica Radix*, AG)가 우리나라 남성암의 주된 원인인 간암과 여성암의 주된 원인인 자궁경부암, 유방암 및 난소암에 대한 세포독성(cytotoxicity)효과와 암예방 효소제인 quinone reductase의 유도 활성효과를 비교 측정하였으므로 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시료의 추출 및 분획

시료로 사용한 당귀(*Angelica radix*, AG)는 부산시 남포동 소재 한약방에서 구입하여 흐르는 물에서 깨끗이 씻고, 그늘에서 건조시킨 후 분쇄하여 -30°C 의 냉동고에 보관하였다. 건조된 시료에 에탄올을 넣고 3회 추출하여 회전식 진공 농축기로 농축한 후 동결 건조 후 에탄올 추출물(ethanol extracts, E)로 사용하였고, 이 추출물을 다시 메탄올 분배층(methanol partition layer, EM)과 헥산 분배층(hexane partition layer, EH)으로 분리하여 각각 시료로 사용하였으며 추출과정은 Fig. 1과 같다.

암세포주 및 배양

실험에 사용한 암세포주는 인체 간암세포주인 HepG2와 자궁경부암 세포인 HeLa, 유방암 세포주인 MCF7 및 난소암 세포주인 SW626로서 한국과학 기술원 생명공학 연구소로부터 분양받아 배양하면서 실험에 사용하였다. HepG2세포주는 minimum essential medium(MEM배지), HeLa세포주는 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM 배지), MCF7과 SW626은 RPMI medium 1640에서 10% fetal bovine serum (FBS)와 100 units/mL의 penicillin streptomycin이 함유된 것을 사용하여 37°C , 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 배양된 각각의 암세포는 일주일에 2~3

회 refeeding 하고 6~7일만에 phosphate buffered saline (PBS, pH7.0)으로 세척한 후, 0.05% trypsin-0.002% EDTA를 사용하여 부착된 세포를 분리하여 원심 분리한 후 집적된 암세포에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 cell culture flask (75 cm^2 , Nalge Nunc International Co.)에 10 mL씩 일정량 분할 주입하고 6~7일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

세포독성 측정

본 연구에서는 간암세포주인 HepG2를 10% FBS를 함유하는 MEM배지, 자궁경부암 세포인 HeLa세포주를 DMEM배지를 사용하였고, 유방암 세포주인 MCF7과 난소암 세포주인 SW626를 RPMI 1640배지를 사용하여 각각의 24-well plate에 1×10^5 cells/well을 첨가하여 24시간 동안 배양(37°C , 5% CO_2)한 후 추출물들을 각각 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 12.5, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g}/\text{well}$ 의 농도로 첨가하여 48시간 동안 다시 배양하였다. 무처리군인 대조 세포군(control)이 confluency에 도달했을 때 배양시킨 각 well에 MTT용액(3 mg/mL in PBS)을 100 μL 씩 첨가하여 4시간 동안 다시 배양시킨 후, well 바닥에 형성된 formazan이 흡이지 않게 조심스럽게 다루어 aspirator로 상등액을 제거하였다. 형성된 formazan에 DMSO와 ethanol을 1:1로 혼합한 용액 1 mL를 첨가하여 충분히 녹인 후 UV-visible spectrophotometer (Pharmacia Biotech 80-2105-20)를 이용하여 570 nm에서 흡광도값을 측정하여 대조 세포군과 비교하여 시료의 세포 성장 억제율(%)를 계산하였다.

Quinone reductase (QR) 유도활성 측정

QR활성은 Prochaska와 Santamaria(23,24)의 microtiter method를 일부 변형하여 측정하였다. 우선 24-well plate의 각 well에 1×10^4 cells/well으로 HepG2세포주를 분주하고, 24시간 배양 후, 추출물들을 각각 DMSO에 녹여 6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{well}$ 의 농도로 첨가하고 다시 24시간 배양한 다음 배지를 제거하였다.

Control군이 confluency에 도달했을 때 배양시킨 각 well에 250 μL 의 lysis buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 140 mM NaCl, 15 mM MgCl_2 , 0.5% NP-40)을 첨가한 후, 25°C 의 온도 하에서 10분간 서서히 흔들어주면서 cells를 lysis하였다 여기에 반응액의 최종농도가 10 mM Tris-Cl(pH 7.4), 0.5 mg/mL BSA, 0.008% Tween-20, 40 μM FAD, 0.8 mM glucose 6-phosphate, 2 U/mL glucose 6-phosphate dehydrogenase, 25 μM NADP, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MTT 및 1 mM menadione이 되도록 1 mL의 효소 용액을 첨가하여, 5분간 반응시킨 후, 250 μL 의 반응 정지용액 10.3 mM dicoumarol, 0.5% pyridine, 5 mM potassium phosphate (pH 7.4)으로 효소반응을 정지시킨 다음, UV-

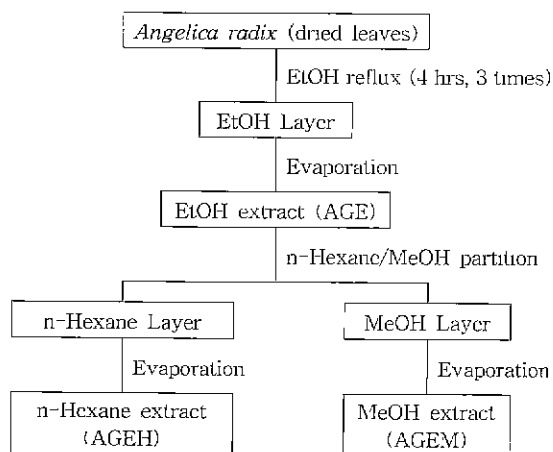


Fig. 1. Fractionation procedure of *Angelica radix*.

visible spectrophotometer (Pharmacia Biotech 80-2105-20)를 이용하여 610 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질량은 동일한 sct의 well plate에 대한 crystal violet염색 방법으로 정량하였다.

암세포 형태의 관찰

HepG2, HeLa, MCF7 및 SW626의 4종류의 암세포에 각각의 시료를 100 µg/mL씩 첨가하고 72시간 배양하면서 실험군과 대조군의 세포모양의 변화를 24시간마다 현미경으로 관찰하여 세포증식 억제 현상을 비교하였다(25).

결과 및 고찰

암세포에 대한 세포독성 효과

간암 세포 HepG2, 자궁 경부암세포 HeLa, 유방암 세포인 MCF7 및 난소암 세포인 SW626에 대한 당귀 추출물의 세포독성 효과를 조사하였다. 당귀 추출물은 다시 에탄올층, 메탄올 분배층 및 헥산 분배층으로 구분 추출하였으며 그 세포독성 실험결과는 Fig. 2, 3, 4 및 5에 나타내었다.

이 결과에서 보면, HepG2에 각 추출물시료를 100 µg/mL씩 첨가했을 때 메탄올 분배층과 헥산 분배층의 경우 각각 99.8%의 높은 세포 성장 억제 효과를 나타내었고, 이

탄올 추출물의 경우 72.1%의 억제 효과를 나타내었다. 이 실험결과에서 볼 수 있듯이 암세포 성장 억제 효과는 세포 종류의 추출물 첨가 농도가 증가할수록 증가됨을 알 수

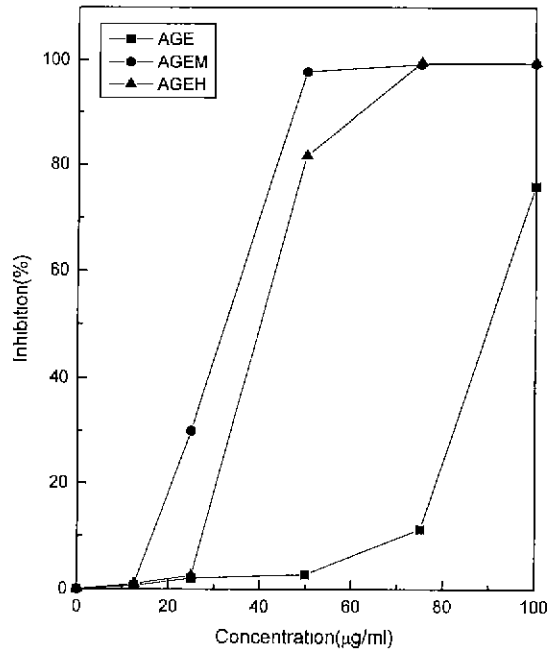


Fig. 3. Inhibitory effects of extracts and partition layers of *Angelica radix* on HeLa cells. Refer to the legend in Fig. 2

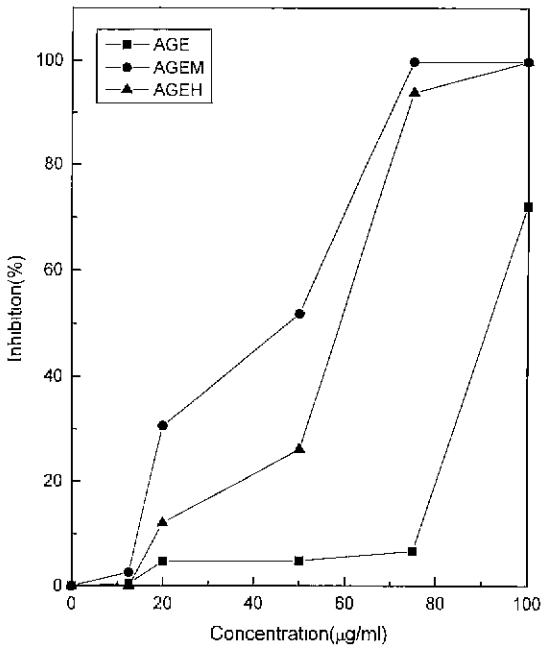


Fig. 2. Inhibitory effects of extracts and partition layers of *Angelica radix* on HepG2 cells.
AGE: Ethanol extract
AGEM: Methanol partition layer
AGEH: n-Hexane partition layer

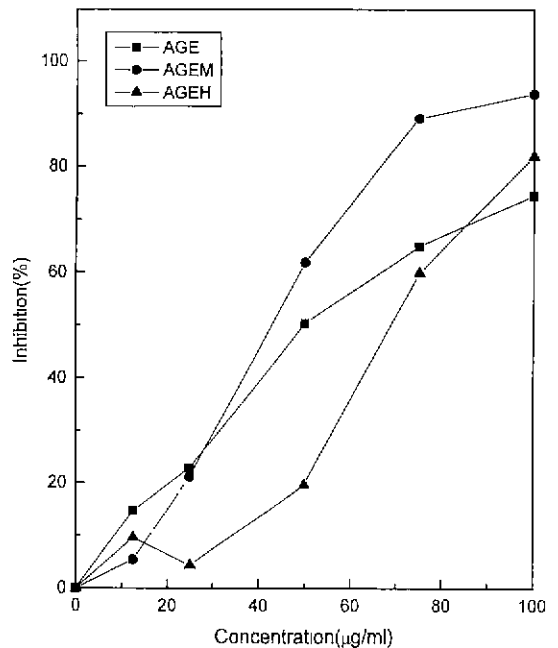


Fig. 4. Inhibitory effects of extracts and partition layers of *Angelica radix* on MCF7 cells. Refer to the legend in Fig. 2

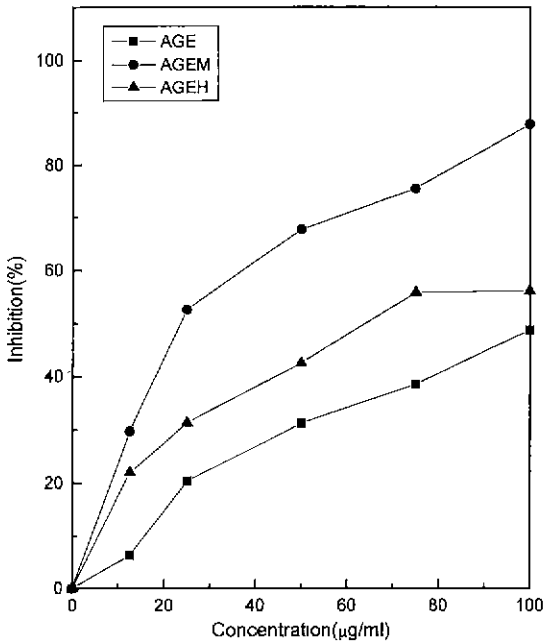


Fig. 5. Inhibitory effects of extracts and partition layers of *Angelica radix* on SW626 cells. Refer to the legend in Fig. 2

있었다.

한편 자궁경부암 세포주인 HeLa에 대한 세포독성 실험 결과는 각 시료 100 µg/mL을 HeLa세포주에 첨가시 핵산 분배층의 경우 99.4%, 메탄올 분배층의 경우 99.3%의 매우 높은 세포 성장 억제 효과를 나타내었고, 에탄올 추출물의 경우 핵산 분배층과 메탄올 분배층에 비해서는 그 효과가 낮았으나 75.9%의 비교적 높은 세포 사멸효과를 나타내었다. 유방암 세포인 MCF7에 대한 세포독성 결과는 메탄올 분배층이 93.7%의 암세포 성장 억제 효과를 나타내었고 핵산 분배층의 경우도 81.9%, 에탄올 추출물은 74.6%의 비교적 높은 사멸 효과를 나타내었다. 난소암 세포인 SW626에 대한 각 당귀 추출물의 세포독성 효과는 자궁암과 유방암에 비해서는 그 효과가 좀 떨어졌으나 메탄올 분배층의 경우 87.8%로 제일 높았고 핵산 분배층 및 에탄올 추출물의 경우 각 56.1% 및 48.6%의 세포 성장 억제 효과를 나타내었다. 이 결과에서 간암세포 HepG2와 3종류의 여성암세포주인 HeLa, MCF7 및 SW626세포주에 대한 각 당귀 추출물의 암세포 성장 억제 즉, 항암 효과는 메탄올 분배층에서 가장 높은 효과를 보여 주었고 SW626을 제외하고는 핵산 분배층에서도 메탄올 분배층에서와 비슷한 강력한 세포독성 효과를 나타내었다.

이 결과를 분석하여 보면 용매별 당귀 추출물들의 인체 각종 암세포에 대한 세포독성효과는 암 세포간의 차이는 다소 있었으나 메탄올 분배층의 경우 평균 95.15%의 높은 세포독성효과를 나타내었고 핵산 분배층에서 이와 유사한 강한 세포독성효과를 나타내었다.

Quinone reductase 유도활성

Quinone reductase는 phase II 해독 효소 중의 하나로 특징으로는 첫째, NAD(P)H를 전자공여체로 이용하고 둘째, 2개의 전자를 이동시켜 semiquinone을 형성하지 않으며 셋째, dicoumarol과 같은 항혈액응고제에 의해 강한 저해를 받으며 넷째, 많은 세포와 조직에서 여러 가지 외부 물질들에 의해 유도된다. 특히 phase II 해독 효소 중 암 예방 물질 탐색의 지표가 되는 대표적인 효소로 선정된 이유는 quinone류 자체에 대한 보호효과가 있고 다른 암 예방 효소계와 공통적으로 유도되며 항암 작용이 있는 많은 화합물에 의해 유도되어지기 때문이다.

세포독성효과에 사용한 4종의 인체암 세포주 중 유일하게 quinone reductase를 가지고 있는 간암 세포주 HepG2를 사용하여 당귀의 에탄올 추출물, 메탄올 및 핵산 분배층들의 quinone reductase유도 활성효과를 측정하였으며 그 결과는 Fig 6에 나타내었다.

즉 HepG2세포주에 각각의 추출물 시료를 50 µg/mL씩 첨가시 당귀의 에탄올 추출물과 핵산 분배층이 유의적으로 QR효소 활성을 증가시키는 것으로 나타났으며, 메탄올 추출물은 큰 영향을 미치지 않았다

각 에탄올 추출물을 DMSO용액에 녹여 농도별로 증가시켜 6.25, 12.5, 25 및 50 µg/mL씩 HepG2세포주에 첨가했을 때 용매 대조군을 1로 하여 비교해 본 결과 각각 1.49, 1.85, 1.99 및 2.09배의 QR유도효과를 나타내었으며 핵산

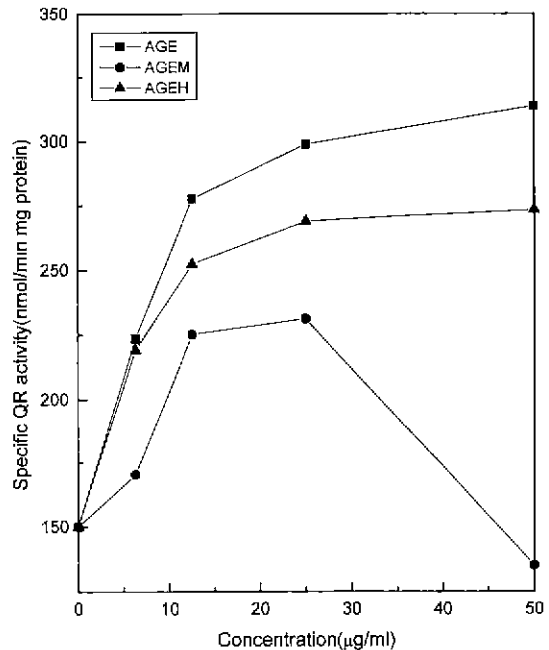


Fig. 6. Effects of solvent partition layers from methanol extract of *Angelica radix* on the induction of quinone reductase in HepG2 cells. Refer to the legend in Fig. 2

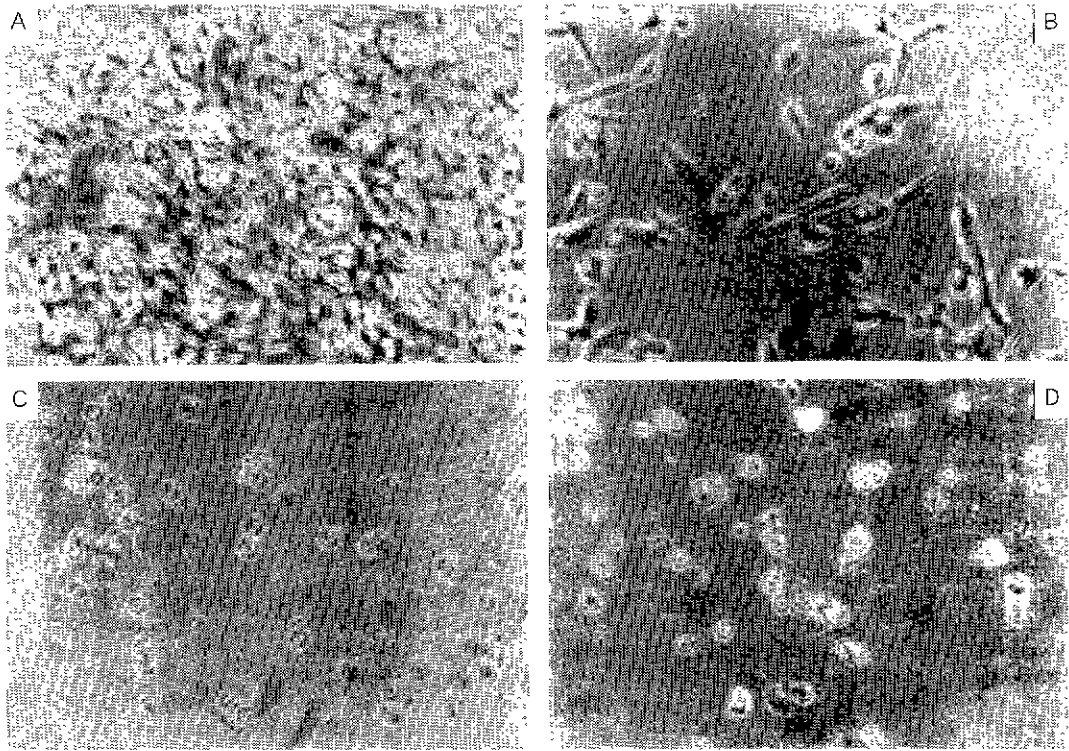


Fig. 7. Photomicrographs ($\times 200$) of HepG2 cells on various layers of *Angelica radix*. A: HepG2 cells (control), B: Ethanol extracts of AG (AGE), C: Methanol partition layer of AG (AGEM), D: n-Hexane partition layer of AG (AGEH)

분배층에서 에탄올 분배층에서와 유사하게 각각 1.45, 1.67, 1.78 및 1.81배의 QR유도활성효과를 나타내었다. 또한 Fig 7에서 보는 바와 같이 HepG2는 배양이 지속되면서 군집을 형성하며 자랐고 그 성장 속도가 다른 세포주에 비해 매우 느렸다. 시료 처리 후에는 세포의 밀도가 매우 낮아지며 세포 손실이 많았음을 확인할 수 있었다.

요 약

예로부터 여러 가지 질병 치료를 위하여 민간 의약용으로 많이 쓰이고, 또한 식품보존제로도 사용되어 온 우리 나라 전역에서 생산되는 약초류의 하나인 당귀를, 인체 간암 세포주 HepG2, 자궁경부암 세포주 HeLa, 유방암 세포주 MCF7 및 난소암 세포주 SW626에 대한 당귀의 에탄올 추출물과 메탄올 및 헥산 분배층에 대한 세포독성 실험을 한 결과 HepG2의 경우 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도를 첨가하였을 때 메탄올 및 헥산 분배층은 각각 99.8%, 에탄올 추출물은 72.1%의 암세포 성장 억제 효과를 나타내었다. 또한 자궁경부암 세포주인 HeLa에서는 각 추출물을 각 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가시 헥산 분배층에서 99.4%, 메탄올 분배층에서 99.3%, 에탄올 추출물의 경우 75.9%의 암세포 성장 억제 효과를 나타내었고, 유방암 세포인 MCF7에 대해서는 메탄올 분배층이 93.7%, 헥산 분배층이 81.9% 및 에

탄올 추출물이 74.6%의 암세포 성장 억제 효과를 나타내었다. 난소암 세포인 SW626에 대해서는 메탄올 분배층이 87.8%의 세포독성효과를 나타내었고 헥산 분배층이 56.1% 및 에탄올 추출물의 경우 48.6%의 저해효과를 나타내어 상대적으로 세포독성효과가 미약하였다. 4종류의 인체 암세포주에 대한 당귀의 세포독성효과 즉 항암효과는 실험에 사용한 4종의 암세포 모두 메탄올 분배층에서 아주 강한 세포독성효과를 보여주었으며 HepG2와 HeLa 세포주에서는 헥산 분배층에서도 메탄올 분배층에서와 같이 강한 항암효과를 나타내었다. 한편 quinone reductase 효소활성을 탐색하기 위해서 HepG2 세포주를 이용하여 quinone reductase활성 유도 여부를 측정한 결과 각 추출물 시료를 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가시 당귀의 에탄올 추출물과 헥산 분배층이 QR효소활성을 유의적으로 증가시키는 것으로 나타났으며, 메탄올 추출물은 에탄올 및 헥산 분배층에 비해 비교적 그 효과가 미흡하였다.

본 실험연구결과에서 옛부터 약재, 식품 보존제로 이용되어온 당귀는 메탄올 및 헥산 분배층에서 인체암세포 4종에 대해 항암효과가 뚜렷하였고 HepG2 세포주에서는 에탄올과 헥산 분배층에서 암예방효과의 지표로 사용되는 quinone reductase 효소활성 유도효과가 아주 좋았으므로 보다 단계적인 물질의 분리 동정이 이루어져 향후 당귀를 이용한 기능성 식품 소재로서뿐 아니라 암예방 차

원의 건강 천연물로서의 개발 및 응용성이 높을 것으로 기대된다

문헌

- 통계청. 사망원인 통계연보 (1995)
- Youm, P.Y. and Kim, S.H. A case-control study on dietary and other factors related to stomach cancer incidence. *Korean J. Nutr.*, **31**, 62-71 (1998)
- Wynder, E.L. and Gori, G.B. Contribution of environment to cancer medicine. *J. Natl. Cancer Inst.*, **58**, 826-832 (1977)
- Miyazaki, T. and Nishijima, M. Structural examination of a water soluble antitumor polysaccharide of *Ganodermaucidum*. *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 3611-3616 (1981)
- Hong, M.H. Statistical studies on the formularies of oriental medicine(I) prescription frequency and their origin distribution of herb drugs. *Kor. J. Pharmacogn.*, **3**, 57-64 (1972)
- Cha, S.M. Potential anticancer medicinal plants. A statistical evaluation of their frequencies of appearance in oriental medicine formularies. *Kor. J. Pharmacogn.*, **8**, 1-15(1977)
- Hwang, W.I., Lee, S.D. and Oh, S.K. A study on the pharmacological activities of Korean medicinal herbs. Mainly on the antitumor activities (in Korean). *Korean Biochem. J.*, **15**, 205-219 (1982)
- Son, H.S. and Hwang, W.I. A study on the cytotoxic activity of galic (*Allium sativum*) extract against cancer cells (in Korean). *Korean J. Nutrition*, **23**, 135-147 (1990)
- Hwang, W.I. and Oh, S.K. Effects of petroleum ether extract of *ginseng* root on same enzyme activity in human colon cancer cells. *Korean J. Ginseng Sci.*, **8**, 153-166 (1984)
- Lee, J.Y., Hwang, W.I. and Lim, S.T. Effects of *Platycodon grandiflorum* D.C. extract on the growth of cancer cell lines. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **30**, 13-21 (1998)
- Hyun, J.W., Lim, K.H., Shin, J.E., Sung, M.S., Won, Y.J. and Paik, W.H. Antineoplastic effect of extracts from traditional medical plants and various plants. *Kor. J. Pharmacogn.*, **25**, 171-177 (1994)
- 나승옥: 본초학. 영림사, 서울, p 578-579 (1988)
- 신민교: 흰색임상 본초학. 남산당, 서울, p.221-223 (1986)
- 윤서석. 한국의 음식-약. 국민영양, **198**, 26-32 (1998)
- Han, S.B., Kim, Y.H., Lee, C.W., Park, S.M., Lee, H.Y., Ahn, K.S., Kim, I.H. and Kim, H.M. Characteristic immunostimulation by angelan isolated from *Angelica gigas* Nakai. *Immunopharmacol.*, **40**, 39-48 (1998)
- Wn, H., Kong, L., Wu, M. and Xi, P. Effects of different processed products of radix *Angelica sinensis* on clearing out oxygen free radicals and anti-lipid peroxidation. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chin*, **21**, 599-601 (1996)
- Salikhova, R.A. and Poroshenko, G.G. Antimutagenic properties of *Angelica archangelica* L. *Vestn Ross Akad Med. Nauk*, **1**, 58-61 (1995)
- 배송자, 김경숙, 노승배: 당귀추출물이 liposome의 안정성 및 유동성에 미치는 영향. 신라대학교 자연과학논문집 (1997)
- Wakan-Yaku. 原色和漢藥圖鑑(上) 保育社, p 60-62 (1980)
- Srivastava, R. and Kulshreshtha, K.K. Bioactive polysaccharides from plants. *Phytochemistry*, **28**, 2877-2882 (1989)
- Yamaoka, Y., Kawakita, T., Kaneko, M. and Nomoto, K. A polysaccharide fraction of *Zizyphi fructus* in augmenting natural killer activity by oral administration. *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 936-946 (1996)
- Medina, F.S., Gamez, M.J., Jimenez, J., Osuna, J.I. and Zarzuelo, A. Hypoglycemic activity of Juniper Berries. *Planta Medica*, **60**, 197-201 (1994)
- Prochaska, H.J. and Santamaria, A.B. Direct measurement of NAD(P)H Quinone reductase from cells cultured in microtiter wells. A screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal Biochem*, **169**, 328-336 (1988)
- Park, H.J. Induction of quinone reductase and its regulatory mechanism at the transcriptional level by *Scutellaria baicalensis*. Ph.D. Dissertation, Yonsei University (1998)
- Cleck, G. *Staining Procedures* 4th ed., Williams and Wilkins, p 46 (198)

(1999년 11월 10일 접수)