

## 대황 모상근 추출물의 세포독성

황성진, 표병식, 나명석\*, 박돈희\*\*, 황 백\*\*\*

동신대학교 생물산업학부, \*광주여자대학교 생명과학부, \*\*전남대학교 생물화학공학과,

\*\*\*전남대학교 생물학과

전화: 061-330-3225/3228 E.mail/ jinsci@lycos.co.kr

The purpose of this research was to investigate the effects of extracts from cultured hairy roots of *R. undulatum* on human kidney epithelial cells. Hairy roots were induced by a co-culture with *A. rhizogenes* ATCC15834 and cultured in WPM medium. The cytotoxicity was measured by colorimetric assay using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), neutral red (NR) and sulforhodamine protein B (SRB) with human kidney epithelial cell lines A498. MTT, NR and SRB quantities decreased proportionally in cultured A498 cells treated with the water or chloroform extracts of cultured hairy roots at increasing concentrations. These results suggest that extracts of cultured hairy roots are cytotoxic on human epithelial cells. The cytotoxicity of chloroform fraction was stronger than that of water fraction. The values of  $MTT_{50}$ ,  $NR_{50}$ ,  $SRB_{50}$  of the extracts of chloroform fraction and those of water fraction were measured to be 289.3 $\mu$ g/ml, 302.7 $\mu$ g/ml, 433.8 $\mu$ g/ml and 475.8 $\mu$ g/ml, 428.3 $\mu$ g/ml, 549.5 $\mu$ g/ml in A498 cell line.

### 서론

대황(*Rheum undulatum* L.)은 18세기 이후 유럽 및 아시아지역에서 민간요법에 의한 치료제로 널리 사용하여 왔으며, 한방에서는 변비, 만성설사, 장염, 황달, 복막염, 담석증의 치료 등에 이용되고 있고 진정, 지혈, 구충, 항균, 항종양, 혈압강하 등의 효과가 알려져 있다. 대황은 실제로 신장 질환등에 처방 약재로 사용되고 있으나, 그 자체의 독성과 부작용을 최소화 하기 위해서는 적정 처리 농도가 설정 되어야 할 필요가 있다. 한편, 대황으로부터 약리 물질을 생산하기 위해서는 다양한 환경요인들에 의해 영향을 받는 노지재배 보다는 탈분화된 배양세포를 이용하는 방법이 바람직 할 수 있다. 그러나 이와같은 탈분화된 세포는 배양 과정에서 특정 물질의 생합성능이 불안정하거나 전혀 이루어지지 않은 경우가 많다. 따라서, 본 연구에서는 *Agrobacterium rhizogenes*에 의해 대황의 형질전환을 유도하여 빠른 성장과 화학적 전형성능을 나타내는 모상근을 유용 2차대사물질의 생산에 활용하고자 하였다.

### 재료 및 방법

**모상근의 유도 및 배양** : 대황(*Rheum undulatum* L.)의 모상근은 *A. rhizogenes* 15834와 공조배양을 통하여 유도 하였으며, 생체 시료 약 0.05 g을 50 ml WPM 액체배지에 접종하여 12주 동안 100 rpm으로 진탕배양(25 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C, in the dark) 하였다.

**표준엑스의 제조** : 배양된 대황 모상근은 36시간 냉동 건조하여 건조시료 분말 5 g을 80% 메탄올에서 3회 환류 추출하였다. 추출물은 여과 후 감압 농축하고 증류수를 가하여 현탁시킨 후 분액여두에 넣고 동량의 클로로포름을 가하여 분획시켰다. 클로로포름층은 회수하고 수층에 다시 동량의 클로로포름을 가하여 분획하는 방법으로 2회 반복하여 시행하였다. 클로로포름층은 50 $^{\circ}$ C에서 농축 건조시켰으며 수층은 감압 농축한 후 동결 건조하여 수층분획으로 하였다.

세포주 : 세포주는 human kidney epithelial cell A498로 한국세포은행으로부터 분양받아 사용하였다.

MTT assay : Mosmann (1983)의 방법에 따라 신장세포에 대황 모상근의 분획별 추출물을 농도별로 처리하고 24시간 배양한 다음 MTT 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가하여 3시간 후 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

NR assay : Borenfreund 와 Purener (1984)의 방법에 따라 신장세포에 분획별 대황 모상근 추출물을 농도별로 첨가하고 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 neutral red을 처리하여 3시간 후 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

SRB assay : Skehan 등(1990)의 방법에 따라 신장세포에 분획별 대황 모상근 추출물을 농도별로 첨가하고 0.4% SRB용액을 넣어 20~30분 동안 반응시킨 후 ELISA reader로 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 결과 및 고찰

대황의 모상근으로부터 표준엑스를 추출하여 사람의 신장 상피세포에 대한 세포독성을 조사하였다. Table 1 과 2는 MTT방법에 의한 세포독성조사 결과로 수층분획은 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도까지는 대조군에 비교할 때 99.1%로 세포에 미치는 영향이 거의 없었으나, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도에서 대조군의 96.5%로 세포에 영향을 나타내었다. 수층분획을 처리하지 않은 대조구와 비교할 때 50%에 영향을 주는  $\text{MTT}_{50}$ 농도는 475.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. 클로로포름층의 분획물은 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 대조군의 93.9%이었고, 첨가한 추출물의 농도 증가에 따라 세포에 미치는 독성효과가 크게 나타났다. 클로로포름층의  $\text{MTT}_{50}$  농도는 289.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 수층분획에 비해 낮게 나타났다.

Table 1. Cytotoxicity and activity of the water fraction of hairy roots by MTT assay on A498 cell line

Concentration( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	MTT quantity	
	Mean $\pm$ S.D. <sup>a</sup>	% of control
Control	0.344 $\pm$ 0.05**	100.0
1	0.345 $\pm$ 0.03	100.3
10	0.341 $\pm$ 0.02**	99.1
50	0.332 $\pm$ 0.05*	96.5
100	0.298 $\pm$ 0.03*	86.6
$\text{MTT}_{50}$		475.8

<sup>a</sup>The values represent the mean $\pm$ standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control group, \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs control.

Table 2. Cytotoxicity and activity of the chloroform fraction of hairy root cultures by MTT assay on A498 cell line

Concentration( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	MTT quantity	
	Mean $\pm$ S.D. <sup>a</sup>	% of control
Control	0.344 $\pm$ 0.05**	100.0
1	0.323 $\pm$ 0.06*	93.9
10	0.305 $\pm$ 0.02**	88.7
50	0.294 $\pm$ 0.03*	85.5
100	0.275 $\pm$ 0.01*	79.9
$\text{MTT}_{50}$		289.3

NR방법에 의한 세포독성 결과를 보면 수층분획의 경우 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도까지는 세포에 거의 영향을 미치지 못하였으나, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 대조군의 95.5%로 세포에 독성을 나타내었다 (Table 3). NR<sub>50</sub>의 농도는 428.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다. 한편, 클로로포름층으로부터 얻은 대황 추출물에서는 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 대조군의 96.9%로 세포에 영향이 나타나기 시작하였으며, 100

$\mu\text{g/ml}$ 에서 대조군의 87.8%를 나타내었다.  $\text{NR}_{50}$ 의 농도는  $307.7 \mu\text{g/ml}$ 로 나타났다(Table 4).

Table 3. Cytotoxicity and activity of the water fraction of hairy root cultures by NR assay on A498 cell line

Concentration( $\mu\text{g/ml}$ )	NR quantity	
	Mean $\pm$ S.D. <sup>a</sup>	% of control
Control	0.286 $\pm$ 0.04 <sup>*</sup>	100.0
1	0.285 $\pm$ 0.03 <sup>*</sup>	99.7
10	0.280 $\pm$ 0.02 <sup>**</sup>	97.9
50	0.273 $\pm$ 0.04 <sup>*</sup>	95.5
100	0.268 $\pm$ 0.03 <sup>**</sup>	93.7
$\text{NR}_{50}$		428.3

Table 4. Cytotoxicity and activity of the chloroform fraction of hairy root cultures by NR assay on A498 cell line

Concentration( $\mu\text{g/ml}$ )	NR quantity	
	Mean $\pm$ S.D.	% of control
Control	0.286 $\pm$ 0.04 <sup>*</sup>	100.0
1	0.281 $\pm$ 0.02	98.3
10	0.277 $\pm$ 0.02 <sup>**</sup>	96.9
50	0.264 $\pm$ 0.01 <sup>*</sup>	92.3
100	0.251 $\pm$ 0.05 <sup>*</sup>	87.8
$\text{NR}_{50}$		302.7

SRB방법을 이용한 세포독성조사 결과 수층으로부터 얻은 대왕추출물의 경우  $50 \mu\text{g/ml}$  농도에서 대조군의 97.8%가 영향을 받았으며  $100 \mu\text{g/ml}$  농도에서 대조군의 92.9%로 비교적 세포에 미치는 영향이 적었다.  $\text{SRB}_{50}$ 의 농도는  $549.5 \mu\text{g/ml}$ 로 나타났다 (Table 5). 클로로포름층으로부터 얻은 대왕 추출물에서는  $10 \mu\text{g/ml}$ 에서는 대조군의 96.8%,  $50 \mu\text{g/ml}$ 에서는 94.6%을 나타내었고  $100 \mu\text{g/ml}$ 에서는 87.9%을 나타내었으며  $\text{SRB}_{50}$ 의 농도는  $433.8 \mu\text{g/ml}$ 로 나타났다(Table 6).

Table 5. Cytotoxicity and activity of the water fraction of hairy root cultures by SRB assay on A498 cell line

Concentration( $\mu\text{g/ml}$ )	SRB quantity	
	Mean $\pm$ S.D. <sup>a</sup>	% of control
Control	0.313 $\pm$ 0.04 <sup>**</sup>	100.0
1	0.316 $\pm$ 0.07 <sup>*</sup>	100.9
10	0.311 $\pm$ 0.03 <sup>*</sup>	99.4
50	0.306 $\pm$ 0.02 <sup>*</sup>	97.8
100	0.288 $\pm$ 0.04 <sup>**</sup>	92.0
$\text{SRB}_{50}$		549.5

Table 6. Cytotoxicity and activity of the chloroform fraction of hairy root cultures by SRB assay on A498 cell line

Concentration( $\mu\text{g/ml}$ )	SRB quantity	
	Mean $\pm$ S.D. <sup>a</sup>	% of control
Control	0.313 $\pm$ 0.04 <sup>**</sup>	100.0
1	0.312 $\pm$ 0.01	99.7
10	0.303 $\pm$ 0.05 <sup>*</sup>	96.8
50	0.296 $\pm$ 0.02 <sup>*</sup>	94.6
100	0.275 $\pm$ 0.02 <sup>**</sup>	87.9
$\text{SRB}_{50}$		433.8

수층과 클로로포름층으로부터 얻은 대왕 모상근의 추출물을 사람의 신장세포인 A498세포주에 처리하고 MTT, NR, 그리고 SRB정량법에 의해 세포독성을 측정된 결과 분획별 추출물

의 처리농도의 증가에 따라 세포에 미치는 독성은 증가하였다. 특히, 클로로포름층으로부터 얻은 추출물이 세포에 미치는 영향은 수층으로부터 얻은 추출물 보다 세포에 미치는 영향이 크게 나타났다. 50%의 세포독성을 나타내는 MTT<sub>50</sub>, NR<sub>50</sub>, 그리고 SRB<sub>50</sub>에서도 서로 차이를 나타내었다. 이러한 결과는 Lee 등(1997)이 인체 피부암세포에 적용하여 세포수 생존율, MTT정량 및 SRB정량을 실시한 결과와 비교할 때 메탄올, 에탄올, 클로로포름층으로부터 얻은 추출액이 세포에 미치는 영향과 항암작용에 있어 서로 차이를 보인다는 결과와 유사하였다. 따라서 추출시 사용하는 용매에 따라 세포에 미치는 영향이 다름을 확인 할 수 있었다. 조사방법에 따른 차이는 수층으로 얻은 대황 추출물의 경우 NR방법에서 클로로포름층으로부터 얻은 대황 추출물의 경우 MTT정량방법에서 다른 방법보다 동일 농도에서 민감하게 나타났는데 이러한 결과는 실험에 사용하는 물질에 따라 조사 방법의 차이를 갖는 기 보고된 결과들과 일치하였다(Han 등, 1998). 또한, Han 등(1998)은 클로로포름층의 분획별 처리구에서 항암활성의 차이를 보았다. 본 실험에서 두가지 종류의 분획층에 따른 세포독성의 차이는 각 층에 포함된 약리물질의 생리 생화학적인 작용 특성에 따른 차이가 있을 것으로 추정되므로 각 분획층의 성분 분석에 관한 연구를 계속 실시할 필요가 있을 것으로 사료되었다.

#### 요 약

배양된 대황의 모상근으로부터 추출한 물질에 대한 분획별 신장상피세포에 있어서의 세포 독성을 조사하였다.

1. 수층과 클로로포름 층으로부터 얻은 대황 모상근 추출물 모두 농도의 증가에 따라 세포에 미치는 독성이 증가하였다.
2. 클로로포름층으로부터 얻은 대황 모상근 추출물이 수층으로부터 얻은 대황 추출물보다 세포에 미치는 독성이 크게 나타났다. 클로로포름층 분획의 MTT<sub>50</sub>, NR<sub>50</sub>, SRB<sub>50</sub>은 각각 289.3  $\mu\text{g/ml}$ , 302.7  $\mu\text{g/ml}$ , 433.8  $\mu\text{g/ml}$ 이었고, 수층 분획물의 MTT<sub>50</sub>, NR<sub>50</sub>, SRB<sub>50</sub>은 각각 475.8  $\mu\text{g/ml}$ , 428.3  $\mu\text{g/ml}$ , 549.5  $\mu\text{g/ml}$  이었다.
3. 세포독성 측정방법에 따라 차이를 보였으며 수층 분획의 경우 NR정량법에서 클로로포름 층 분획의 경우 MTT정량법에서 독성 정도가 더 높게 나타났다.

#### 인용문헌

1. Babich H, IIL Zuckerbraun, LB Barber, SB Babich, E Borenfreund (1996) *Pharmacol. and Toxicol.* 78:397-403.
2. Borehfreund E, H Babich (1987) *Cell. Biol. Toxic.* 3:63-79.
3. Buitelaar RM, J Tramoer (1992) *J. Biotechnology* 23:111-141
4. Carmichael J, WG Degraff, AFGazdar, JD Minna, JB Michell (1987) *Cancer Reserch* 47:936-942.
5. Han DS, YI Kim, KE Choi, JS Kwag, SH Baek (1998) *Environmental Mutagens & Carcinogens.* 18:37-42.
6. Hwang SJ, MS Na, BS Pyo, JB Lee, B Hwang (2000) *Korea J. Medicinal Crop Sci.* 8:250-258.
7. Lee KN, HH Shin, DS Han, YO Kim, KE Choi, JS Kwag, SH Beak (1997) *Kor. J. Pharmacogn.* 28:264-270.
8. Lloyd G, B McCown (1981) *Proc. Int. Plant Proc. Soc.* 30:412-427
9. Mosmann T (1983) *J. Immunol. Methods* 65:55-63.
10. Skehan P, R Storeng, DA Scudiero, A Monks, J McMahon, DT Vistica, J Warren, H Bokesch, S Kenney, MR Boyd (1990) *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1107-1112.