

枇杷의 항암효과에 대한 암세포특이성 검정

黃台益 · 林賢玉 · 李載窪

Anticancer Effect of *Eriobotrya japonica* Lindl by Specificity Test with Several Cancer Cell Lines

Whang Tay-Eak*, Lim Hyun-Ock* and Lee Jae-Wa*

ABSTRACT : Antitumouric effect of loquat was investigated treating the extract from leaves, stems, fruits or seeds to normal and cancer cell lines to check by MTT method wheather the cancer cells are specifically attacked. The results are summarized as follows.

Water of MeOH extract from each organ were applied to human normal and caner cell lines, SNU-1 and SNU-C4. The water extract from fruit flesh gave no dffect to normal cell lines by killed all the cancer cell lines.

The water extract from fruit flesh was purified by Sephadex LH-20 and separated into 9 fractions which were than applied to 8 cancer cell lines. The eighth fraction out of the 9 fractions gave no effect to normal cells but exerted specific cytotoxicity to breast cancer, stomach and liver cancer cells.

The eighth fraction was orally administered and injected to 10 mice each suffering from the abdominal cancer induced by myeloma cells, SP2/0-Ag14. In the groups received the treatment , only one mouse each died in 2 months but the rest survived until the end of the experimental period, which those in the control plot died in 10 to 13 days.

The present results confirmed that loquat contained some substance that had specific cytotoxicity to human cancer cells.

緒 論

비파는 항암효과가 있는것으로 알려져있다. 비파는 항암제로서 민간약으로 오래전부터 사용되어 오고 있으며^{*)} 이에 대한 연구들이 일부수행되고 있다. 특히 비파의 잎에 함유된 Ursolic acid는 항암

효과가 있는것으로 잘알려져있다^{*)}. 또한 비파는 약리효과이외에도 특수과실로도 사용되고 있다.

식물로 부터 유래한 대표적인 항암물질은 Taxol, binblastin등이 유명하다^{*)}. 이러한 식물로 부터 획득된 항암제가 각광을 받는것은 합성항암제 보다 치료에 유리하기 때문이다. 지금까지 개발되어 임상에 이용되는 암 화학요법제로는 alkyl화제 항

* 全南大學校 農科大學 (Coll. of Agri. Univ. of Chonnam, Kwangju 500 - 070, Korea)

생물질 또는 최근에는 백금착체, 동위원소화합물 등 새로운방법도 개발되고 있다^{4,5}. 그러나 이러한 합성 화학제품들의 임상에서 사용은 부작용이 심하여 암세포에 작용보다 오히려 정상세포나 조직에 더 크게 작용하여 골수세포, 임파세포 파괴에 의한 저항력약화등의 2차감염을 유발시킨다. 따라서 결국 최선의 항암제는 암세포를 얼마나 잘공격하느냐에 있는것이 아니고 얼마나 정상세포에 부작용을 야기시키지 않느냐에 관심이 모아질수 밖에 없다. 본연구팀의 조사에 의하면 여러가지 식물로부터 암세포를 고사시킬수 있는 물질은 무수하게 많이 분리하였다. 그러한 정상세포에는 영향을 미치지 않고 암세포만 선택적으로 죽일수있는 물질은 좀처럼 얻기가 어려웠다.

본 연구에서는 비파를 여러 추출분획으로 분리한다음 이 분획들을 정상세포와 암세포주에처리하여 그 결과를 조사하고 동물실험을 이용하여 항암효과를 조사하였던바 선택적 항암물질의 존재 가능성을 확인하였기에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 재 료

비파는 완도지역에 분포된 야생으로 부터 과실의 수확시기에 채취하여 사용하였으며정상세포주는 사람 상피세포와 피부조직을 얻어서 작성하였으며 암세포주는 서울대 암연구센터와 본 연구진에 의해서 선발 한것을 사용하였고 mouse는 6-8주된 Balb/c 를 사용하였다. 세포배양용 배지와 serum은 Gibco사, 용기는 Nunclon제품을 사용하였으며 추출에 사용한 시약은 Sigma화학사 Sephadex LH-20은 Pharmacia 에서 구입하였으며 기타 연구에 사용한 시약들도 시약특급으로 사용하였다.

2. 方 法

1) 추 출

비파는 MeOH와 물로 추출하였다. 실온에서 각각 24시간씩 3회 추출하고 이를 합하여 감압농축하였다. 또한 필요한 분획은 Sephadex LH-20 컬럼크로마토그래피하였다. 컬럼은 시료의 용매로 평형

시킨다음 물은 100% MeOH로 그리고 MeOH 시료는 100% H₂O로 각각 농도구배 크로마토그래피를 수행하였다. 컬럼은 30mm×450mm를 사용하여 용출속도는 2ml/min 으로 하였다.

2) 세포배양

정상세포는 구강점막세포 와 피부상피세포 그리고 혈액으로부터 얻은 것으로 형태적으로 fibroblast 세포와 같은것이였다. 암세포는 한국 세포주은행 또는 본연구진에 의해서 암환자로 부터 적출한 장기로 부터 작성한 세포주들을 사용하였다. 세포배양을 위한 배지는 DMEM또는 RPMI-1640을 사용하였으며 2mM L-glutamine, sodium pyruvate, MEM-비필수 아미노산을 첨가하여 사용 하였다. 항생제는 gentamycin 만을 처리하였고 5% CO₂, 37℃ 로 조절된 incubator를 사용하여 배양하였다. 세포는 각 세포주 의 성장 특성에 따라서 대수기 말기 이전에 계대배양하였다. 부착세포는 trypsin처리에 의해서 그리고 부유세포는 원심세척후 계수한다음 10% Fetal bovine serum 을 가한 배지에 적정농도로 희석하여 96 well plate에 치상하여 배양하였다.

3) 추출물의 처리

상기와 같이 배양중인 세포들에 적정농도를 계산하여 0.45um membrane filter 를 통과시킨것을 well에 가하였다. 대조구는 동일 량의 배지로 대신 하였다. 실험동물에 투여는 구강에 강제 투여하거나 복강에 주사하였다.

4) MTT assay

96 well plate의 세포에 시료를 처리하여 그 효과를 측정하고자 하는 시간에 100ul 배지당 10ul MTT용액 (0.5mg/ml)을 가하여 4 시간동안 incubator (37℃, 5% CO₂) 에 방치후 plate를 2000rpm에서 20분간 원심침전 시켜 형성된 formazan을 남기고 상층액을 제거하였다. 여기에 fomazan 용해시키기 위해서 100ul DMSO를 가한 후ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다^{1,5,7}. 시료 처리는 3반복이상으로 하였으며 세포수와 성장곡선을 작성하여 암세포 고사능은 무처리와 처리간의 흡광도비율을 계산하여 세포의 생존율을 계산하였다. 즉 세포생존율(100%)=시료처리흡광도/무처리×100으로 하여 계산하였다.

結果 및 考察

1. 비파 추출물의 항암성 검정

암세포종에서 SNU-1(위암세포주)과 SNU-C4(대장암세포주)는 항암효과를 검색에 있어서 반응이 예민한 세포주에 속한다. 따라서 1차 추출물에 대한 선택적 항암효과를 조사하기 위하여 정상세포와 비교하여 조사를 하였던바 표 1에 표시한바와 같다. 추출물을 각각 0~1mg/ml까지 첨가하여 처리 하였던바 세포독성의 정도는 비파의 잎과 줄기에서 강하게 나타나고 있다. 그러나 과실, 즉 과육 중에서도 물로 추출한 분획에서는 정상세포에는 영향없이 암세포를 고사시켰다. 이 결과는 비파의 과육가운데는 암세포에만 세포독성을 나타내고 정상세포는 다치지 않는 선택성을 가진 항암성물질 존재를 강하게 시사하고 있다고 볼수있다. 일반적

으로 다른연구자들은 정상세포와 비교하지 않기 때문에 다만 세포독성에 대한 조사를 하기 때문에 앞에서 더 강한 항암효과가 있다고 주장하고 있다. 이 세포독성은 암세포에만 작용하는 것이 아니고 정상세포에 까지 강한 세포 독성을 나타낸 결과라는 것을 표1에서 제시하고 있다. 상대적으로 과육의 물 추출분획은 세포독성이 낮게 나타나지만 선택성이 대단히 높다는 것을 알 수가 있다.

이상의 결과에 따라서 이하의 실험에서는 과육의 물 분획을 더 정제하여 여러 암세포와 비교 관찰 하였다.

2. 비파과육의 정제와 함암효과

비파의 과육 물 추출분획을 Sephadex LH-20 컬럼크로마토 그래피를 수행하여 그림1과 같이 분리 하였다. 그 결과 9개의 높은 피크를 얻어서 이 분획을 농축하여 세포에 처리하고 그 항암효과의 선택

Table 1. Cytotoxicity of extracts of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl) on cell lines.

Cell lines	Dose	Percent survival (%)								
		Con.	Leaf		Furit		Seed		Stem	
			MeOH Ext.	H ₂ O Ext.	MeOH Ext.	H ₂ O Ext.	MeOH Ext.	H ₂ O Ext.	MeOH Ext.	H ₂ O Ext.
Nomal	0 μ g/ml	100								
	10 μ g/ml		78.1	67.6	81	100	63.2	71.5	65	68.1
	50 μ g/ml		42.3	45.5	79.1	100	38.5	42.7	41.3	51.5
	100 μ g/ml		8.1	11.2	80.2	100	4.3	7.2	6.8	7.3
	1mg/ml		0	0	63.1	93.2	0	0	0	1.1
SNU-1	0 μ g/ml	100								
	10 μ g/ml		68.1	63.2	71.8	72.2	69.7	71.4	73.2	79.3
	50 μ g/ml		38.5	42.7	46.3	47.7	39.8	41.3	36.7	43.7
	100 μ g/ml		12.6	10.7	23.3	18.6	20.2	16.7	21.0	12.7
	1mg/ml		0	0	2.7	1.8	0	0	0	0
SNU-C4	0 μ g/ml	100								
	10 μ g/ml		61.7	67.8	62.5	63.2	59.7	68.1	58.1	62.7
	50 μ g/ml		31.2	28.7	25.4	27.6	31.4	24.2	25.6	22.9
	100 μ g/ml		11.9	8.9	10.7	7.8	8.8	12.1	9.7	8.5
	1mg/ml		0	0	0	0	0	0	0	0

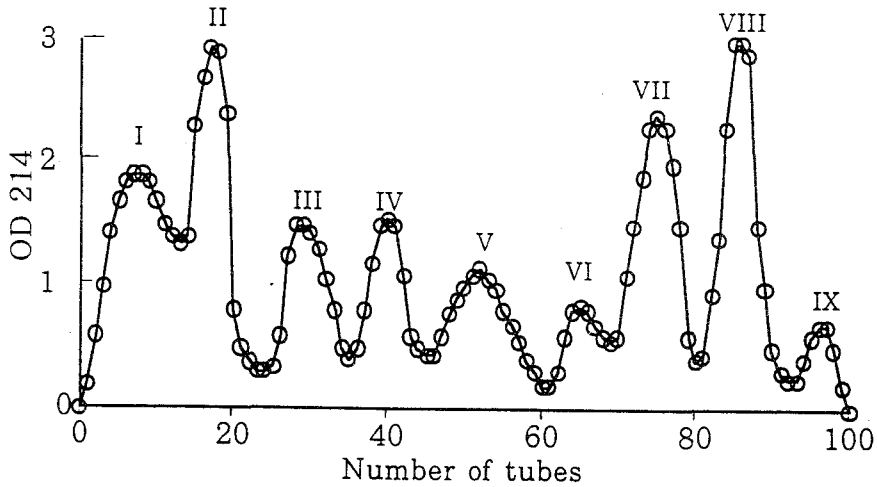


Fig. 1. Elution profile of anticancer substance from Sephadex LH-20 column chromatography. This column was developed by gradient of MeOH

성을 검색하였다.

Sephadex LH-20 컬럼크로마토 그래피로 부터 1에서 9번까지의 분획을 얻어서 이하의 실험을 수행하였다.

3. 정제된 비파과육의 항암선택성

표 2에 나타난바와 같이 8가지로 분리정제된 비파과육의 분획을 정상세포와 여러 장기로부터 얻

Table 2. Cytotoxicity of each fractions from Sephadex LH-20 column chromatography on cell lines of normal and cancer. Dose of Treatment was $10\mu\text{g/ml}$. MTT assay was tested at 72 hours after treatment of the fractions.

Cell lines	percent survival (%)								
	Number of fraction								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normal	98.7	95.3	97.9	97.3	93.2	91.4	98.5	99.5	95.1
H7822	91.3	85.2	82.6	88.7	95.4	93.7	83.4	3.5	8.9
NCI-H69	84.7	86.1	78.9	85.7	79.6	85.7	91.8	72.3	80.5
HL-60	78.4	82.4	68.5	76.9	80.2	87.5	87.1	88.1	85.9
HepG2	84.5	87.7	78.5	91.2	87.4	85.7	73.7	0.4	21.3
Hela	81.2	87.1	88.4	89.7	81.3	84.2	79.5	86.8	81.2
KATO-III	76.9	82.3	87.4	85.8	87.8	88.9	86.4	45.7	91.3
Hep2	96.4	389.8	83.6	85.7	88.3	91.3	88.5	92.5	47.3

H78222 : 유방암, NCI-H69 : 폐암, HL-60 : 골수암, Hep2 : 후두암, Hela : 자궁암, KATO-III : 위암, HepG2 : 간암

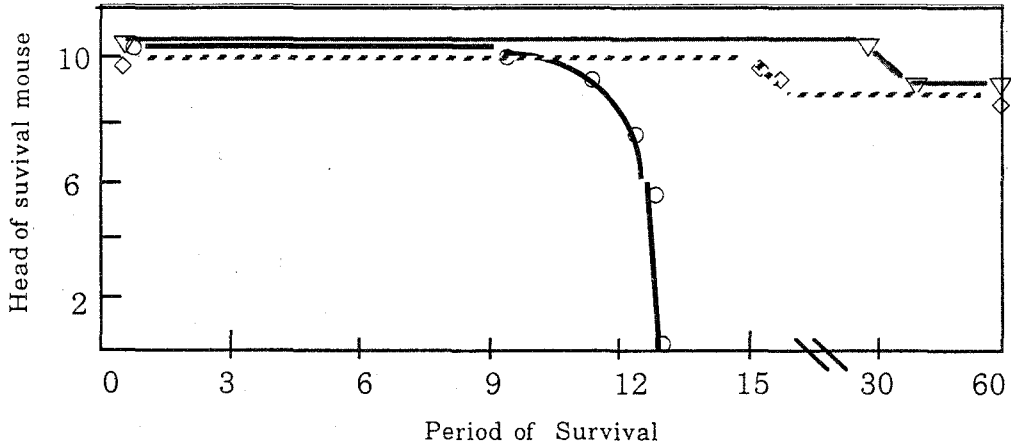


Fig. 2. Effect of 8th fraction on mouse with abdominal cancer. The 8th fraction was orally administered (◇) and injected (▽). Only one mouse each died in 2 months but control plot (○) died 10 to 13 days.

은 암세포에 처리하였다. 그결과 항암반응은 암세포 가운데 유방암세포주 (H7822)와 간암세포주 (HepG 2) 그리고 위암세포주 (KATO-III)에 특이적으로 강하게 세포독성을 나타내고 있다. 이제 8분획은 정상세포에는 별다른 피해를 주지않고 있다. 표1에서 과육 물분획은 정상세포에 독성을 보이지 않았는데 이를 더 분리하였을때는 세포독성을 나타내는 분획이 나타났다. 이는 항암기능을 가진 물질과 그밖에 물질이 혼재되었을때 협력효과로 인정되며 단일물질에 가깝게 정제가 되어 갈수록 화합물의 성질이 나타나고 있음을 알수 있는것이다. 이 결과는 제 8분획의 분리정제에 의해서 선택적 항암성을 가진 물질의 분리가 가능함을 강력하게 시사하고 있다고 보겠다.

4. in vivo 검사

세포상태에서 항암효과가 실제로 이용되는 생체에서도 반드시 똑같은 결과를 가져오지 않는 경우가 많기 때문에 생쥐에 암을유발시켜 효과를 조사하였다. 동물에 암의 유발은 생후 6주된 mouse의 복강에 mouse 골수암 세포 (myeloma cell, SP2/0-Ag14)를 1마리당 1×10^7 씩 접종하여 복수암을 유발시켰다. 암세포 접종 5일째, 형태적으로 복부 비대등 발암을 확인한후 제 8분획을 1일 $100\mu\text{g}$ 씩 구강투여하거나 복부에 주사하였다. 실험에 사용되

는 mouse는 대조군과 구강투여군 및 복부주사군으로 하여 각각 10마리씩으로 하였다. 제 8분획의 주사는 처음 5일간은 12시간마다 그리고 그이후 5일동안은 1일 1회 투여 하거나 접종했으며 그 이

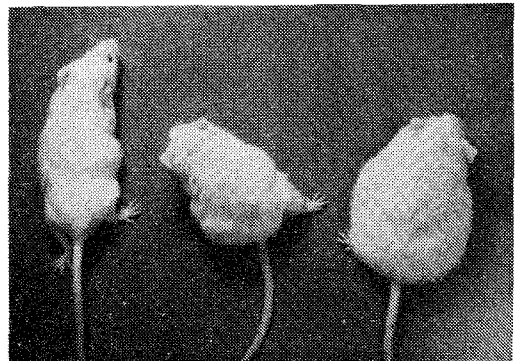


Fig. 3. Effect of the water extract from loquat fruit flesh on the mice suffering from abdominal cancer induced by myeloma cells, SP2/0-Ag14.

Left : the mouse received the extract and completely recovered. Middle : the mouse received the xtract and cancer recovering. Right : the mouse of control plot swollen due to tumorousis and on the edge of death.

후는 2-3일에 1회접종을 10일간 계속하였다.

그림 2에 도식한 바와 같이 암이 유발된 대조군의 mouse는 접종후 13일 까지 모두 죽었다. 그러나 제 8분획을 구강 또는 복강에 주입투여한 처리군은 각각 10마리씩인데 구강투여군에서 1마리가 죽었고 복강에 주사접종한 군에서는 45일째에 1마리가 죽었을 뿐이다. 따라서 제 8분획은 암세포에 대한 세포독성은 생체중에서 항암효과 있음이 증명되었다. 그림 3의 mouse는 치유된 mouse(사진 왼쪽)과 거의치유되고 있는것(가운데)대조군의 복강이 비대하고 거동이 불편한 죽기직전의 모습을 볼수있다. 그림4는 유방암과 간암 배양세포에 비파에서 분리된 제 8분획을 처리했을때 거의 고사

된 세포(하단)와 정상적으로 생육중인 세포(상단)를 보여주고 있다.

이상의 결과에서 와같이 비파의 과실에 암세포에 선택적으로 세포독성을 나타내는 것은 항암성분의 존재 확인과 함께 작물 재배학적인 측면에서 중요한 의의를 가질수 있다고 판단된다.

摘 要

비파의 항암효과에 대하여 조사하였다. 비파를 잎 줄기 과실 종자로 나누어 정상세포와 여러가지 암세포주를 비교하여 특이적으로 암세포를 공격하는지 여부를 MTT 방법에 의해서 조사한 결과는 다

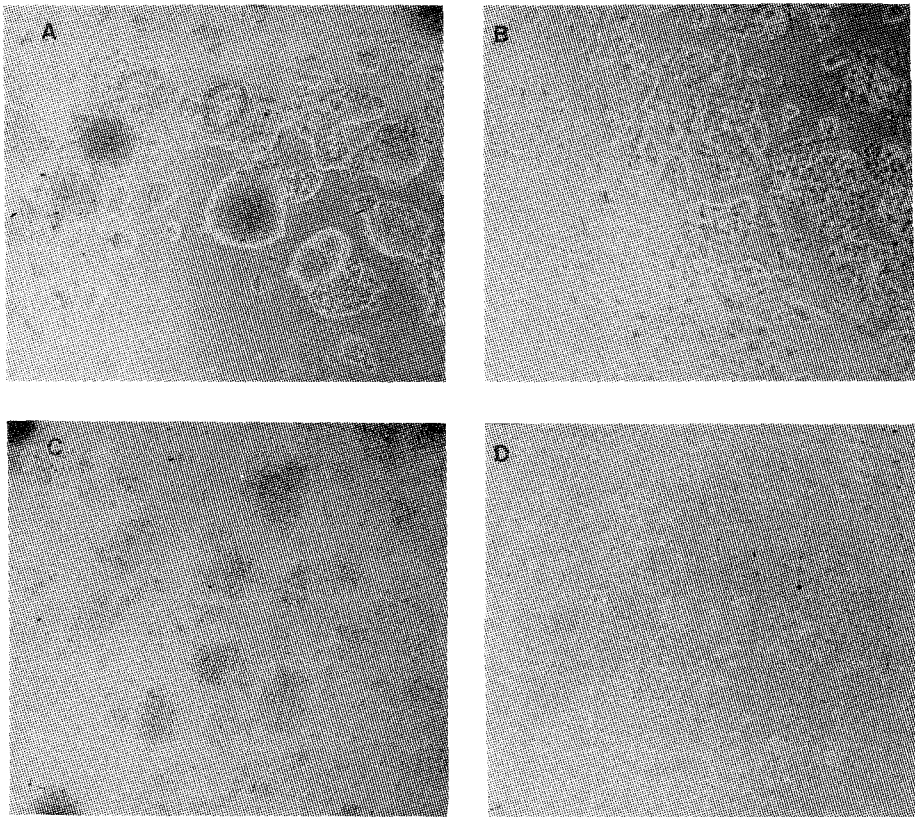


Fig. 4. Effect of water extract from fruit flesh of *Eriobotrya japonica* Lindl on the liver(A and C) and breast(B and D) cancer cells cultured in vitro. A and B are liver and breast cancer cells vigorously growing in RPMI-1640 medium while C and D are those almost killed in the same medium containing the eight fraction of the water extract at $10\mu\text{g/ml}$

음과 같다.

1. 비파의 4가지 부위를 MeOH 와 물로 추출하여 정상세포와 암세포 (SNU-1, SNU-C4)에 처리하였다. 이 가운데서 과육의 물추출 분획이 정상세포는 영향이 없이 암세포를 고사시켰다.

2. 과육의 물추출 분획을 Sephadex LH-20으로 분리정제하여 9개의 분획으로 나누어 이분획들을 사람 정상세포와 7가지 암세포에 처리하였다. 이 9개의 분획중 8번째 분획이 정상세포에 영향을 미치지 않고 유방암, 간암, 위암에 특이적으로 세포독성을 나타냈다.

3. 제 8분획의 생체에서 암치유 효과를 알아보기 위해서 mouse에 복수암을 유발시켜 (10마리) 구강투여하거나 복강에 주사하였다. 암이 유발된 대조구는 10일 부터 13일 사이에 모두 죽었다. 그러나 투여군은 2개월사이에 1마리씩 죽었고 나머지는 모두 생존하였다.

상기는 결과는 비파과육에는 암세포에 특이적으로 작용하여 세포독성을 나타내는 물질을 가지고 있다는 것을 확인해주었다.

參考文獻

1. Alley, M. C., Dominic, A., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott, B. J., May, J. G., Shoemaker, R. H. and Boyd, M. R.. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48 : 589-601
2. Carmichael, J., Degraff, W. G., Gazdar A. F., Minn, J. D. and Mitchell J. B.. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay, assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47 : 936-942.
3. Choi, Y. A., Rhew, T. H., Park, K. Y., Chung, H. Y. and H, J. C.. 1992. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 21 (3) : 314-318.
4. Gilman A. G., Goodman L. S., Gilman, A. . 1975. *The pharmacological basis of therapeutics*, 6th ed., Macmillan Co. Inc. NewYork.
5. Rosenberg, B., Van Camp, L., Trosko J. F.. 1969. Platinum conound ; a new class of potent antitumour agents. *Nature* 223, 385.
6. Shen, D. W., Dardarelli, C., Hwang, J., Cornwell, M., Richert, N., Ishii, S., Pastan, I. and Gottesman, M. M.. 1986. Multiple drug resistant human KB carcinoma cells independently selected for high level resistance to colchicine, adriamycin or vinblastine show changes in expression of specific protein. *J. Bio. Chem.* 261 : 7762-7770.
7. Vistica, D. T., Skehan, P., Scudiero, D. A., Monks, A., Pittman, A. and Boyd, M. R.. 1991. Tetrazolium based assays for cellular viability. A critical examination of selected parameters affecting formazan production . *Cancer Res.* 51. 2515-2520
8. 李尙仁, 安德均. 1988. 漢方家庭療法大全 1040-1044.