

## L1210 및 P388D<sub>1</sub>에 대한 고삼 추출물의 세포독성에 관한 연구(II)

조훈, 양은영, 김종수,<sup>1</sup> 유일수,<sup>1</sup> 류도곤,<sup>2</sup> 강길웅,<sup>3</sup> 이정호,<sup>3</sup> 백승화<sup>3,\*</sup>

건일제약(주), <sup>1</sup>익산대학 화학공업과, <sup>2</sup>원광대학교 한의과대학 생리학교실,

<sup>3</sup>한의학전문대학원 천연물학교실

## Studies on the Cytotoxicity of *Sophora flavescens* Ait. Extract Against L1210 and P388D<sub>1</sub> Cells (II)

Hoon Cho, Eun Yang Yeong, Jong Soo Kim,<sup>1</sup> Il Soo Yoo,<sup>1</sup> Do Gon Ryu,<sup>2</sup>  
Jeong Ho Lee,<sup>3</sup> Kil Ung Kang<sup>3</sup> and Seung Hwa Baek<sup>3,\*</sup>

*Kuhnil Pharmaceutical Co., LTD., Chunan Chungnam 330-810, Korea,*

<sup>1</sup>*Department of Chemical Engineering, Iksan National College, Iksan 570-752, Korea,*

<sup>2</sup>*Department of Physiology, School of Oriental Medicine and* <sup>3</sup>*Department of Natural Products,  
Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea.*

**Abstract** – This study was carried out to evaluate cytotoxicity of the extracts from *Sophora flavescens* Ait. against L1210 (lymphocytic leukemia) and P388D<sub>1</sub> (lymphoid neoplasma) cells *in vitro*. We have determined cytotoxicity by MTT {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide} assay. The order of cytotoxicity of *Sophora flavescens* Ait. extracts against L1210 and P388D<sub>1</sub> cells *in vitro* is as follows: AM > EASF > CFSF > MTSF > WSF > HXSf and AM > EASF > CFSF > MTSF > HXSf > WSF. These results suggest that the ethyl acetate soluble extract of *Sophora flavescens* Ait may be a valuable choice for the development of antitumor agents.

**Key words** – *Sophora flavescens* Ait; MTT assay; P388D<sub>1</sub> cells; L1210 cells.

콩과 Leguminosae에 속하는 다년생 초본인 苦蔘 *Sophora flavescens* Ait., *S. angustifolia* S. et Z.의 뿌리를 건조한 것으로, 한방에서는 이노, 해열, 항균, 항trichomonas 작용에 사용되어 왔으며, 임상적으로 습진, 피부화농증, 여성의 음부소양 등의 피부병에 대하여 외용하며, 또한 세균성이질, 장염에는 고삼, 감초, 목향을 물에 달여서 복용하면 효과가 있다고 하였다. 주요 성분으로는 alkaloid 1~2% 와 flavonoid 약 0.5% 등이 함유되었다고 보고하였다.<sup>1,3)</sup> 이에 본 연구는 고삼에서 항암활성이 있는 물질을 찾아내기 위하여 물과 몇가지 유기용매를 사용하여, 고삼으로부터 조제한 추출물을 재현성이 높고 자동화가 가능하며 대량검색이 용이한 MTT 정량분석법을 이용하여 항암활성을 측정하여, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

\*교신저자 : Fax-0653-841-4893

## 재료 및 방법

**실험재료** – 본 실험에서 사용한 고삼은 원광대학교 한의과대학 한방병원에서 구입하여 외부형태를 비교 조사하여 확인 후 사용하였다. 실험에 사용된 식물체는 한의학전문대학원 천연물학교실에 보관되어 있다.

**실험기기** – CO<sub>2</sub> incubator (NUAIRE), Deep freezer (Ishin), Nitrogen freezer (MVE, XC34/14), Elisa reader (Molecular devices, spectra MAX 340), Microscope (Olimpus, CK2), Micropipette (Gilson), 96 well (Falcon), Conical tube (Falcon).

**시약** – FBS (Fetal bovin serum), RPMI medium 1640, antibiotic-antimyzolic, hepes, L-glutamine, D-PBS (Dulgecos phosphate buffer solution), HBSS

(Hanks' balanced salt solution) 등은 Gibco 제품을 사용하였으며, DMSO, 0.4% Trypan blue solution, SDS (sodium dodecyl sulfate) 등은 Sigma 제품을 사용하였고, 추출용매는 시약급을 재증류하여 사용하였다.

**검액재료** - 본 연구에 사용한 고삼은 원광대학교 한의과대학 한방병원에서 구입한 것을 검정받아 고삼 20 g을 500 ml 등근 플라스크에 1차 증류수 100 ml 넣고, 100°C에서 3시간 동안 물 증탕하여 환류추출하였다. 이와같이 세번 반복 추출하여 얻은 추출물을 0.4 µm 필터로 여과한 후, 여과액을 증류기로 35°C에 감압농축시킨 후 냉동건조하였다. 건조된 양은 물 추출물 2,386 mg을 얻었다. 헥산, 에틸 아세테이트, 클로로포름은 상온에서 위의 방법에 따라, 용매를 감압농축하여 헥산 추출물 310 mg, 에틸 아세테이트 795 mg, 클로로포름 612 mg, 메탄올 추출물 2,641 mg을 얻었다.

**시료의 처리** - 조제한 시료는 즉시 4°C 냉장고에 저장하였다가 사용직전에 배지로 희석하여  $10^{-2} \sim 10^{-6}$  mg/ml 농도를 실험에 사용하였다.

**세포독성능 측정을 위한 세포주** - 암세포 성장억제능 측정을 위해 사용한 L1210과 P388D<sub>1</sub>은 mouse 유래 암세포주로서 L1210은 lymphocytic leukemia이며 P388D<sub>1</sub>은 lymphoid neoplasma이다. 세포독성능 측정을 위한 세포주는 서울대학 세포주은행에서 분양 받아 실험실에서 계대배양하면서 실험하였다.

**세포배양배지** - 세포배양에 사용된 배지는 L-glutamic acid 포함된 RPMI-1640에 NaHCO<sub>3</sub> (2 g, 23.81 mmol)을 혼합한 후, 3차 증류수에 녹인 다음 membrane filter (0.2 µm)로 여과한 후, 여액에 56°C에서 30분간 inactivation 시킨 우태아 혈청 FBS를 전체 양의 1%가 되도록 혼합한 다음, 1N NaOH와 1N HCl을 사용하여 pH 7.2가 되도록 하였다.

**세포배양** - 세포독성능 측정에 사용된 부유세포 (suspension cell)인 L1210, P388D<sub>1</sub>은 위에서 제조한 세포배양배지를 사용하여, 세포의 지수적 성장 (exponential growth)을 유지하도록 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 2~3일간 배양한 후, conical tube (falcon)에 옮겨 1500 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포침전물을 분리하였다. 분리된 세포침전물을 다시 D-PBS에 부유시켜 원심분리한 다음, 상등액을 제거하여 세포만을 취하였다. 동일한 방법으로 반복 세척한 후, 일부를 취하여 0.4% trypan blue을 가하여 염색되지 않은 살아있는 세포를 haemocytometer로 세어  $5 \times 10^5$  cells/ml의 농도가 되도록 새로운 배지에

부유시켜 배양하여 실험에 들어갔다.

**MTT assay** - 암세포에 대한 세포독성능 측정은 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] colorimetric 검정법으로 실험하였다.<sup>4,6)</sup> 암세포에 대한 세포독성능을 측정하기 위해, 96 well flat bottom microtiter의 각 well에 logarithmic phase에 도달한 암세포 L1210, P388D<sub>1</sub>을  $2 \times 10^5$  cells/ml 농도로 100 µl/well씩 접종하고, 각각의 검체를 단계 희석하여 10 µl/well 각 well에 첨가하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator 조건하에서 4시간 동안 배양한 후, 형성된 불용성 formazan crystal products를 용해시키기 위하여, 10% SDS를 함유한 0.01N HCl 용액을 각 well당 150 µl씩 가해 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator 조건하에서 1일간 배양하여, Elisa reader (Molecular Devices spectra MAX 340)로 흡광도 (540 nm)를 측정하여 IC<sub>50</sub>값을 구하였다. 비교약물로는 adriamycin (일동제약)을 사용하였고, 약물 없이 동일한 조건하에서 배양된 세포를 control로 하였다. IC<sub>50</sub>값은 대조군의 50% 수준으로 암세포의 성장을 억제하는 약물의 농도 (µg/ml)로 주어지며, 미국암연구소 (NCI; National Cancer Institute, USA)의 manual 방법에 의해 결정하였다.<sup>7)</sup>

**세포의 광학현미경적 관찰** - 광학현미경으로 세포를 관찰하기 위하여, P388D<sub>1</sub>세포는 MTT정량을 하기전에 도립현미경으로 관찰하였다.

**통계처리** - 실험결과의 통계처리는 Student's t-test에 준하였고, P-value가 0.05이하일 경우 유의한 것으로 판명하였다.

## 결과 및 고찰

고삼 (*Sophora flavescens* Ait, *S. angustifolia* S. et Z)의 뿌리로부터 물과 몇가지 유기용매를 사용하여 추출된 추출물에 대한 세포독성의 결과 (Table I)에 의하면, 마우스의 백혈병 세포인 L1210 세포에 대하여, 고삼의 뿌리 추출물은 현재 임상에 널리 사용되고 있는 비교약물인 adriamycin 보다는 전반적으로 약한 세포독성을 보였으나, 이들 추출물 중 에틸 아세테이트 추출물의 경우에는 다른 추출물에 비하여 현저하게 강한 세포독성을 보였다. 즉 Table I에 나타난 바와 같이 MTT 정량분석법에 의하면, 메탄올 추출물의 경우 L1210에 대한 IC<sub>50</sub>값은 36.92 µg/ml인 반면 에틸 아세테이트 추출물의 경우에는 8.25 µg/ml로 가장 강한 세포독성을 보여주고 있다. 이들

**Table I.** Cytotoxicity of the *Sophora flavescens* Ait. against L1210 and P388D<sub>1</sub> cells

| Sample <sup>a</sup> | IC <sub>50</sub> (mg/ml) <sup>b</sup>    |   |
|---------------------|--|---|
|                     | Mouse lymphocytic leukemia cells (L1210) | Murine leukemia tumor cells (P388D <sub>1</sub> ) |
| WSF                 | 28.62                                    | 150.00  |
| MTSF                | 36.92                                    | 11.91   |
| CFSF                | 13.38                                    | 7.78  |
| EASF                | 8.25                                     | 4.13  |
| HXSF                | 56.33                                    | 23.44   |
| AM                  | 0.02                                     | 0.03  |

Plants extracts; WSF; water extract of *Sophora flavescens* Ait.; MTSF; methanol of *Sophora flavescens* Ait.; CFSF; chloroform extract of *Sophora flavescens* Ait.; EASF; ethyl acetate extract of *Sophora flavescens* Ait.; HXSF; hexane extract of *Sophora flavescens* Ait.

Adriamycin; AM

<sup>a</sup>Each extract was examined in triplicate experiments.

<sup>b</sup>IC<sub>50</sub> represents the concentration of an extract required for 50% inhibition of cell growth.

추출물은 마이크로그램농도의 범위에서 투여량에 따라 세포독성을 보였다. L1210세포에 대한 고삼 추출물의 세포독성에 대한 비교는 다음과 같은 순서로 세포독성이 감소하였다. MTT 정량분석법에 의하면, 아드리아마이신 > 에틸 아세테이트 추출물 > 클로로포름 추출물 > 물 추출물 > 메탄올 추출물 > 헥산 추출물 순으로 정량분석값을 얻을 수 있었다. 고삼 추출액을 MTT 정량분석법으로, P388D<sub>1</sub> (murine leukemia tumor cells) 세포에 대해서도 성장억제효과를 평가하였다. 본 실험에서도 L1210에 대한 세포독성실험에서와 마찬가지로, 모든 추출물이 비교약물인 adriamycin (IC<sub>50</sub> 0.03 µg/ml)보다 낮은 세포독성을 보였으며, 추출물 중 에틸 아세테이트 추출물이 가장 강한 세포독성 IC<sub>50</sub> 4.13 µg/ml 보였다. 이러한 결과로 보아 에틸 아세테이트 추출물에 항암활성이 높은 화합물이 함유되어 있으리라 생각한다. P388D<sub>1</sub> 세포에 대한 고삼 추출물의 세포독성 비교에서는 다음과 같은 순서로 감소하였다. MTT정량 분석에 의하면, 아드리아마이신 > 에틸 아세테이트 추출물 > 클로로포름 추출물 > 메탄올 추출물 > 헥산 추출물 순으로 정량분석값을 얻을 수 있었다.

마우스 암세포인 L1210 및 P388D<sub>1</sub>에 대한 지금까지의 실험결과에서 에틸 아세테이트 추출물이 가장 강한 세포독성을 보임에 따라, 고삼 에틸 아세테이트 추출물에 항암활성이 높은 화합물이 함유되어 있을

것으로 판단되어, 이 추출물에 대한 최적분리조건을 확립하여 순수한 화합물을 분리한 다음, 구조확인 및 보다 다양한 암세포종에 대하여 각 성분의 항암활성을 측정해야 할 것으로 판단된다. 더 나아가 화합물의 구조와 항암활성간의 상관관계를 규명함으로써, 이들 화합물질을 출발물질로 하여 보다 항암활성이 높은 유도체의 개발도 가능할 것으로 본다.

## 결 론

고삼 (*Sophora flavescens* Ait. *S. angustifolia* S. et Z) 추출물을 MTT정량분석법으로, 마우스의 백혈병 세포인 L1210 및 P388D<sub>1</sub> 세포에 대하여 세포독성효과를 평가하였다. 이들 추출물은 마이크로 그램 농도의 범위에 대하여 세포독성을 나타내었으며, 이들 추출물에 대한 세포독성은 Table I에 나타난 바와 같이 에틸 아세테이트 추출물이 가장 강한 세포독성을 보였다. 즉 L1210 암세포에 대하여 메탄올 추출물의 경우 IC<sub>50</sub>값은 36.92 µg/ml인 반면 에틸 아세테이트 추출물의 경우에는 IC<sub>50</sub> 8.25 µg/ml로 4배 이상 강한 세포독성을 보였다. P388D<sub>1</sub> 암세포에 대한 세포독성 실험결과에서도 에틸 아세테이트 추출물이 가장 강한 세포독성을 보였으며, 다음과 같은 순서로 세포독성이 감소하였다. MTT정량분석법에 의하면, 아드리아마이신 > 에틸 아세테이트 추출물 > 클로로포름 추출물 > 메탄올 추출물 > 헥산 추출물 > 물 추출물 순으로 정량분석값을 얻을 수 있었다. 결론적으로 고삼으로부터 여러종의 용매를 이용한 추출물 중에서, 에틸 아세테이트 추출물이 마우스의 백혈병 세포인 L1210 및 P388D<sub>1</sub> 암세포에 대한 가장 강한 항암활성을 나타내었다. 따라서 에틸 아세테이트 추출물에 보다 항암활성이 높은 화합물이 함유되어 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 전라북도청 후원, 의약사원연구센터의 연구지원 (98-16-01-04-A-3)에 의해 이루어 졌으며, 이에 감사한다.

## 인용문헌

1. 육장수, 김성만, 정진모, 정명숙, 김정화, 김승배 (1995) 한약의 약리성분, 임상응용, 414-416. 계측

- 문화사, 서울.
2. 신민교 (1986) 임상본초학, 314-315. 남산당, 서울.
  3. Bensky, D., Gamble, A. and Bensky, L. L. (1986) Chinese herbal medicine *Materia Medica*. 117-118. Eastland Press.
  4. Mosmann, T. J. (1983) Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival; application of proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63.
  5. Keepers, Y. P., Pozao, P. E., Peters, G. T., Otte, J. A., Winograd, B. and Pinedo, H. M. (1991) Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing *Eur. J. Cancer* 27: 897-900.
  6. Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdr, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research* 47: 936-942.
  7. a) Goldin, A., Venditti, J. M., Macdonald, J. S., Muggia, F. M., Henney, J. E. and Devita, V. T. (1981) Current results of the screening program at the cancer treatment, National Cancer Institute. *Europ. J. Cancer*. 17: 129-142.  
 b) Kallmann, R. F. (1985) The use of rodent tumors in experimental cancer therapy. *Cancer Res.* 45: 6541-6545

(1999년 2월 27일 접수)