

팔손이 용매별 추출물의 항암 및 면역 활성 탐색

김대호* · 김정화* · 유진현* · 김철희* · 권민철* · 이학주** · 황 백*** · 이현용*†

*강원대학교 바이오산업공학부, **국립산림과학원, ***전남대학교 생물학과

Screening of Anticancer and Immune Activities by the Extracts of *Fatsia japonica* Decne. et Planch.

Dae Ho Kim*, Jung Hwa Kim*, Cheol Hee Kim*, Jin Hyun You*, Min Chul Kwon*, Hak Ju Lee**, Baik Hwang***, and Hyeon Yong Lee*†

*School of Biotechnology & Bioengineering, Kangwon Natl. Univ., Chunchon 200-701, Korea.

**Korea Forest Reserch Institute, Seoul 130-712, Korea.

***Dept. of Biology Chonnam Natl. Univ., Kwangju 520-830, Korea.

ABSTRACT : The study was performed using of ethanol and water extracts of *Fatsia japonica* Decne. et Planch. in anticancer and immune activities. All extracts of 1.0 g/l concentration were increased in over 60% of the anticancer activities in A549 and MCF7 cells. Root barks inhibited 55%, 74% in A549 and MCF7 cell by adding ethanol extracts of 1.0 g/l concentration. The cytotoxicity of human lung normal cell (HEL299) counted up to about 22% for ethanol extracts of root barks in 1 g/l concentration. The activity of human immune T and B cells were increased up to 140~170% by adding ethanol extract of the root barks. Increasing trend of secretion of cytokine (IL-6, TNF- α) from human B and T cell for 5 days cultivation has been observed. From the results, the anticancer and immune-stimulatory activities of the roots extract were higher than the extracts of other parts.

Key words : anticancer activities, immune activities, *Fatsia japonica*, IL-6, TNF- α

서 언

팔손이속 (*Fatsia* spp.)은 두릅나무과 (Araliaceae)에 속하는 목본식물로 3종 (*F. oligocarpella* Koidz., *F. japonica* (Thunb.) Decne. et Planch., *F. polycarpa* Hayata)으로 구성되어 있고, 상록 관목으로서 거제도과 남해도를 중심으로 통영시 비진도와 내도 등지의 해변 산골짜기에 자생군락지를 형성하고 있다 (Hoo *et al.*, 1978; Lee, 1991). 또한 희귀종으로서 학술연구를 위한 가치가 인정되어 이의 자생지는 천연기념물 제63호로 지정·보호되고 있다 (Cultural Properties Administration, 2003).

팔손이는 타 수종의 인삼, 오갈피, 음나무등의 식물들은 예전부터 비교적 채취가 어렵지 않고 독성이 적어 많이 알려져 왔다. 또한, 대표적으로 인삼과 오가피나무의 유용성에 이목이 집중되어 지속적인 연구와 함께 그 추출물의 효능과 이용방법에 대해 많이 알려지고 있다 (Kim, 2002). 그러나 이와 달리 팔손이나마는 단지 관상용과 관절계 질환에 대한 민간약재로 알려져 있으며, 용혈성과 독성 성분을 포함하고 있으며 각 부

위별 성분분석 연구와 생리활성 연구는 미비한 상태에 있는 것으로 보고 되었다 (Tadash *et al.*, 1976).

약리 및 기능성 연구가 타 수종에 집중에 되어 있고 이를 이용한 기능성 식품과 약재로서의 과도한 채집으로 인하여 국내 자생 수종이 멸종하는 위기를 초래할 수 있으리라 사료된다. 이의 대안으로 팔손이나마와 같은 유사품종에 대한 지속적인 연구 활동을 통하여 새로운 임산 자원을 육성함으로써 이미 알려진 식물자원에 대한 보호가 가능할 것으로 보여진다. 이로서 새로운 수종인 팔손이 나무의 유용 생리활성 탐색을 위하여 국내에 자생하고 있는 *Fatsia japonica*의 근피와 수피를 비롯한 목부, 잎의 각 부위별로 식용이 가능한 용매들을 이용하여 추출 용매에 따른 추출성분들의 생리활성을 탐색함으로써 효과가 우수한 부위와 추출 용매를 선발하고자 한다. 이를 위해 본 논문은 물과 에탄올 추출물을 이용하여 인간 암세포의 항암활성 실험과 인간 폐 정상 세포를 이용한 세포 독성실험을 통하여 추출물들에 의한 세포 선택성 능력을 확인하고자 하였다. 또한 항암활성 실험에서 확인되어진 활성이 높은 추

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6455 (E-mail) hyeonl@kangwon.ac.kr

Received January 24, 2005 / Accepted March 31, 2005

출물에 대한 확인을 위해 인간의 면역 세포를 이용하여 생육 활성을 측정하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험 재료 및 추출방법

본 실험에 사용한 팔손이나무 (*Fatsia japonica* Decne. et Planch.)는 2003년 7월에 경남 통영시 농업관린센터의 도움을 받아 비진도의 자생지에서 채취하였으며, 근피와 수피, 목부, 잎 부위를 각각 수세하여 표면의 잔여 수분이 제거될 정도로 상온에서 음건하였다. 추출 수율의 향상을 위하여 잘게 분쇄한 후 수직 환류 냉각기가 부착된 추출 flask에 시료 중량 100 g에 대하여 각 10배의 ethanol과 물의 추출용매를 사용하여 65°C, 95°C로 12시간 동안 2회 반복 추출하였다. 추출물들은 감압여과장치로 여과하여 농축 후 동결건조를 통해 분말을 얻었으며, 각각의 수율을 계산하였다.

2. 항암 활성 탐색

실험에 이용된 암세포로는 인간 위암세포인 A549 (Lung carcinoma, Human)와 인간 유방암세포인 MCF7 (breast adenocarcinoma, pleural effusion, Human)를 사용하였고, 시료 자체의 세포 독성을 알아보기 위한 정상 세포로는 인간 폐 세포인 HEL299 (Lung normal, Human)를 사용하였다. 세포배양에 사용된 기본 배지 A549와 HEL299는 RPMI 1640 (GIBCO, USA), MCF7는 DMEM (GIBCO, USA)를 사용하였고 10% heat-inactivated fetal bovine serum을 첨가하여 배양을 하였다. SRB (sulforhodamine B) assay는 세포 단백질을 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 실험 대상 세포인 MCF7 (10% FBS, DMEM media)과 A549 (10% FBS, RPMI 1640 media)의 농도를 4.0~5.0×10⁴ cells/ml로 96 well plate의 각 well에 100 µl씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C, 5% CO₂)한 후, 각각의 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g/l로 100 µl씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상등액을 제거하고 차가운 10% (w/v) TCA (Trichloroacetic acid) 100 µl를 가하여 4°C에서 1시간동안 방치한 후 증류수로 4-5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온에서 plate를 건조하였다. 그 후 각 well에 1%(v/v) acetic acid에 녹인 0.4% (w/v) SRB용액을 100 µl씩 첨가하고 상온에서 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% acetic acid로 45회 정도 세척, 건조시킨 후에 10 mM Tris buffer 100 µl를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm에서 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다 (Rubinstein *et al.*, 1990). 그리고, 세포독성 효과는 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetra zoilum bromide) assay를 사용하였으며 실험 대상 세포의 농도를 4.0~5.0×10⁴ cells/ml의 농도로 조절된 후

24 well plate에 900 µl씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C, 5% CO₂)시킨 후 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g/l로 100 µl씩 첨가하여 48시간 동안 다시 배양하였다. 배양한 후, 100 µl의 MTT (50 mg/ml) 용액을 첨가하여 4시간 동안 배양하여 formazan을 형성시킨 후, DMSO 900 µl를 첨가하여 formazan을 녹인 후, 각 well에서 100 µl씩 취하여 96 well plate에 옮긴 다음 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다 (Philip *et al.*, 1990). 정상 세포 (HEL299)의 세포독성과 각 암세포주의 암세포 생육 억제 활성을 측정한 후 각 농도에서의 세포 독성에 대한 암세포 생육 억제 활성의 비로 selectivity를 계산한다.

$$\text{Selectivity} = \frac{\text{암세포생육억제활성}}{\text{정상세포의세포독성}}$$

3. 면역 증진 탐색

가. 면역세포 생육활성 실험

면역 기능 증강 효과는 인간 면역 세포인 T cell (Jurkat)과 B cell (Raji)을 이용하여 검증하였으며, 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다. 면역 기능 증강 효과는 MTT assay를 이용하였으며 생육 증진 효과 실험은 24 well plate에 세포를 2.0×10⁴ cells/ml의 농도로 조절한 후 시료를 투여하여 8일 동안 배양시켰고, 매일 각 well의 cell을 cell counter (CHEMOMETEC : GERMAN)를 사용하여 세포 수를 측정하였다 (Lee *et al.*, 2002).

나. Cytokine 분비량 측정

Cytokine은 Chemicon (USA)사의 IL-6와 TNF-α 정량 kit를 사용하여 측정하였다. 세포의 농도를 4.0~5.0×10⁴ cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 900 µl씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C, 5% CO₂)시킨 후, 시료의 최종농도를 1.0 g/l로 100 µl씩 첨가하여 다시 배양 (37°C, 5% CO₂)하였다. 배양배지를 원심분리기를 이용하여 상층액을 취한 다음 450 nm에서 흡광도를 측정하여 얻어진 O.D값을 표준물질을 이용해 작성한 표준곡선과 비교하여 cytokine의 양을 측정하였다 (Oh, 1991).

Table 1. Extraction yields of various plant tissue *F. japonica* Decne. et Planch by ethanol and water solutions.

Sample	Solvent	Yield (%)
Root barks	ethanol	4.62
	water	12.68
Barks	ethanol	3.43
	water	5.77
Leaves	ethanol	8.43
	water	12.88
Woods	ethanol	5.76
	water	13.86

결과 및 고찰

1. 팔손이의 부위별 추출 수율

Table 1은 팔손이의 에탄올과 물을 이용한 각 부위별 추출 수율을 나타낸 것이다. 모든 부위에서 물 추출물이 에탄올 추출물에 비해 최고 3배 이상 추출수율이 높게 나타났다. 특히적으로 두릅나무과 식물들의 대표적인 생리활성 특징이 나타나는 근피와 수피는 상대적으로 다른 부위보다 추출 수율이 에탄올 추출물은 4.62%와 3.43%로 나타났고 물 추출물은 12.68%와 5.77%로 나타났지만 다른 부위에 비해 최고 4%이상 낮게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

2. 항암 활성 탐색

본 항암효과 실험에서는 사람의 암세포주를 이용하여 MTT assay 및 SRB assay로 활성을 측정하였고, 사용된 sample의 농도는 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g/l로 조절하여 실험하였으며, 각각의 실험결과는 다음과 같다.

Fig. 1은 인간 정상 폐 세포인 HEL 299에 대한 팔손이 나

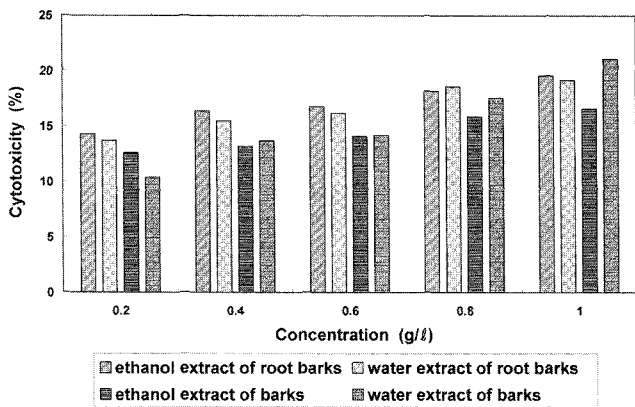


Fig. 1. Cytotoxicity of the extracts from *Fatsia japonica* against the human normal cell, HEL299.

무 추출물의 세포독성효과를 나타낸 것이다. 모든 시료에서 농도의 증가에 따라 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 부위별 각 추출물들의 세포 독성의 변화에서 살펴보면 근피의 추출물들이 다른 용매보다 대체적으로 세포독성이 높게 나타났으며, 농도에 따른 세포 독성의 변화량은 모든 부위가 완만한 곡선을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 2는 위암세포인 A549를 이용하여 팔손이의 성분 시료 자체의 암세포 생육 억제 활성을 나타낸 것이다. 그 결과 근피의 추출물이 1.0 g/l의 농도에서 다른 추출물과 비교하여 가장 높은 약 55% 정도의 활성도를 보이고 있으며, 세포 선택성 또한 다른 추출물과는 달리 2.0 이상을 나타내고 있다. 또한 수피는 근피보다 각각 10% 정도 낮은 활성을 나타내고, 세포 선택성에 있어서는 수피 추출물이 3.0으로 농도에 따라 유의적인 변화가 나타났다.

Fig. 3은 인간 유방암 세포인 MCF7에 대한 추출물의 생육 억제 활성을 나타낸 것으로 근피의 추출물이 1 g/l의 농도에서 73.9%의 억제 활성을 나타내고 있고, 세포 선택성 또한 3.5으로 나타났다. 이는 두릅나무과에 포함되어 있는 타 수종의 항암활성과 비슷한 양상을 보이는데 인삼의 지용성 분획은 인체장암세포에 대하여 최고 90%의 억제효과를 보였으며 육종암세포를 접종시킨 swiss mice의 암세포가 90%까지 정상화되는 연구결과 (Hwang *et al.*, 1984, 1992)를 나타내었다. Kim 등 (2002)은 으나무 내피의 메탄올 추출물에 의한 암세포주의 억제활성에서 MCF7는 57% 정도의 암세포 생육 억제 활성을 나타내었다. 또한 Kim 등 (2000)은 오갈피속 근피의 50% 에탄올 추출물에서 최고 90%의 암세포 생육 억제 활성을 나타내었다고 보고하였다. 이에 따라 타 수종의 생리 활성 연구는 수피와 근피에 집중되어 있었고 팔손이 나무의 경우에도 근피 추출물의 활성이 다른 부위보다 높게 나타났다. 이는 팔손이 나무 근피는 사포닌 성분이 다른 부위에 비해 많이 함유하고 있는데서 기인하는 것으로 생각되어지며, 추후 단일성분 분리 등의 연구가 수행되어야 할 것이다.

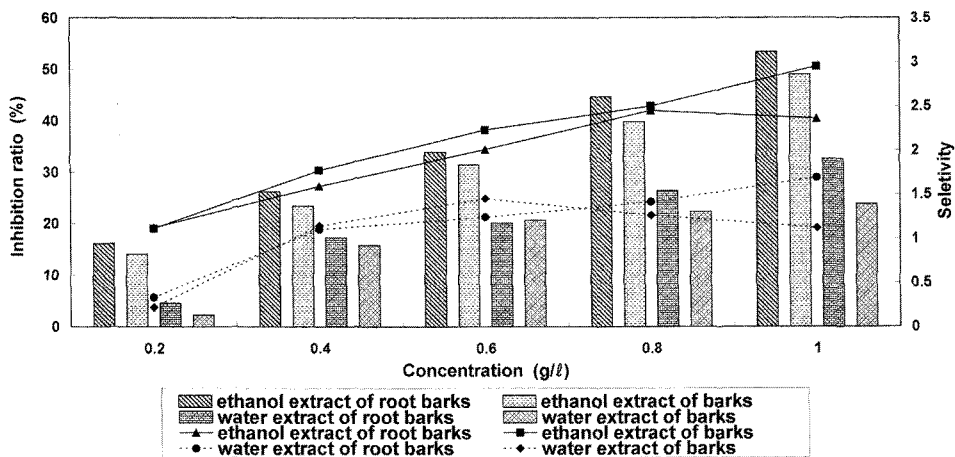


Fig. 2. Inhibition ratio of growth of A549 (bar chart) and selectivity (scatter line) in adding the extracts from *Fatsia japonica*.

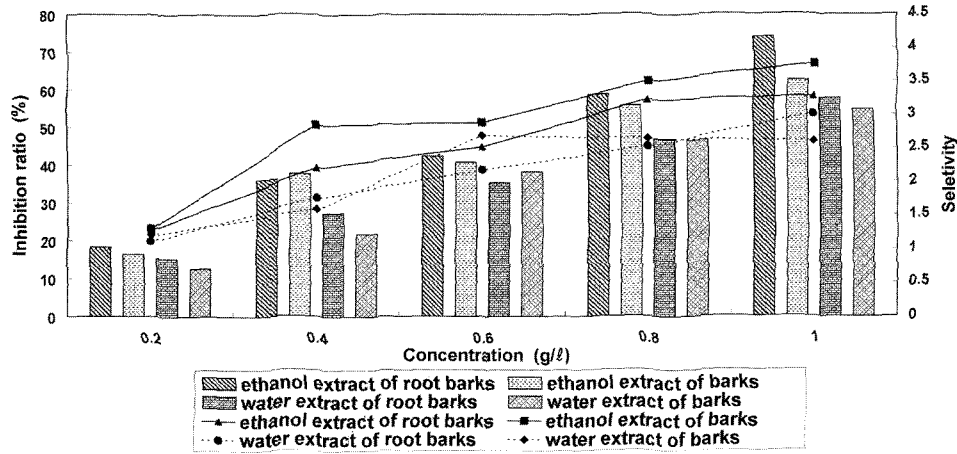


Fig. 3. Inhibition ratio of growth of MCF7 (bar chart) and selectivity (scatter line) in adding the extracts from *Fatsia japonica*.

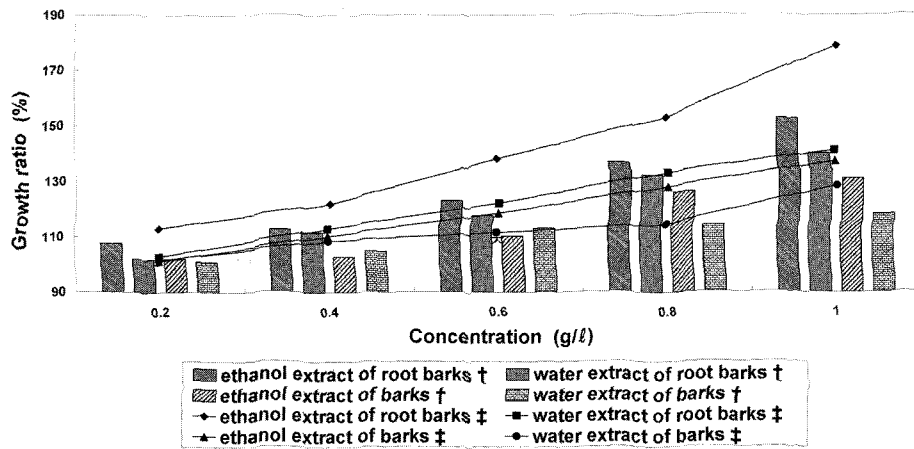


Fig. 4. The growth of human immune cells based on adding of the extracts of *Fatsia japonica* [†: human B cell (Raji), ‡: human T cell (Jurkat)].

3. 면역 증진 탐색

가. 면역세포 생육활성 실험

본 면역 세포의 생육 활성도 실험에서는 면역체계에 중요한 역할을 하는 면역세포인 B세포와 T세포를 이용하였고, 생육 증진 효과를 측정하기 위하여 MTT assay를 이용하였다. 사용된 sample의 농도는 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g/l로 조절하여 실험하였으며 각각의 실험결과는 다음과 같다.

Fig. 4는 각각 B 세포와 T 세포의 생육 증진 효과를 MTT assay를 통하여 나타낸 것이다. 근피와 수피의 추출물이 가장 높은 생육 증진 효과를 보여주고 있다. 각각 B 세포와 T 세포 모두 근피 추출물의 1.0 g/l 농도에서 각각 약 170%와 140%의 생육 증진을 보였다.

Fig. 5는 B 세포와 T 세포의 배양 시간별로 생육 활성 증진 효과를 살펴본 것이다. 각 추출물에 대해 6일째까지 유의적으로 증가하는 것을 확인 할 수 있었으며, 그 이후에는 급격히 감소하는 것을 확인하였다. 또한 근피 추출물에 의해서는 B 세포와 T 세포가 각각 최고 11.0×10^4 cells/ml와 12.0×10^4 cells/ml의 농도까지 증가하는 것을 확인 할 수 있었

으나 이에 비해 수피의 물 추출물은 완만한 곡선을 나타내어 에탄올 추출물보다는 생육 활성이 낮게 나타났다. 이에 따라 두릅나무과 식물들의 특성과 비교하여 볼 때 팔손이 나무는 면역 증진과 관련하여 근피의 활용 가능성이 잘 나타나고 있음을 보여주고 있다 (Kim et al., 2000).

나. Cytokine 분비량 측정

Table 2는 B 세포와 T 세포의 시료 첨가에 따른 cytokine 분비량을 나타낸 것이다. 각각의 세포는 IL-6와 TNF- α 를 cytokine kit를 이용하여 측정하였다. 앞선 면역활성 실험에서와 같이 cytokine 양의 변화는 근피의 에탄올 추출물이 가장 높게 나타났으며, 수피의 에탄올 추출물, 근피의 물 추출물, 수피의 물 추출물 순으로 나타났다. 각각의 추출물의 cytokine의 분비량을 비교해보면 5일째에 B 세포의 근피 추출물이 IL-6는 95 pg/ml가 TNF- α 는 105 pg/ml로 가장 높게 나타났으며 수피는 89 pg/ml와 91 pg/ml이 각각 나타났다. 또한 T 세포의 cytokine 분비량은 근피의 에탄올 추출물이 TNF- α 가 125 pg/ml이며, 물 추출물은 84 pg/ml 순으로 나타났다. 이는 앞선

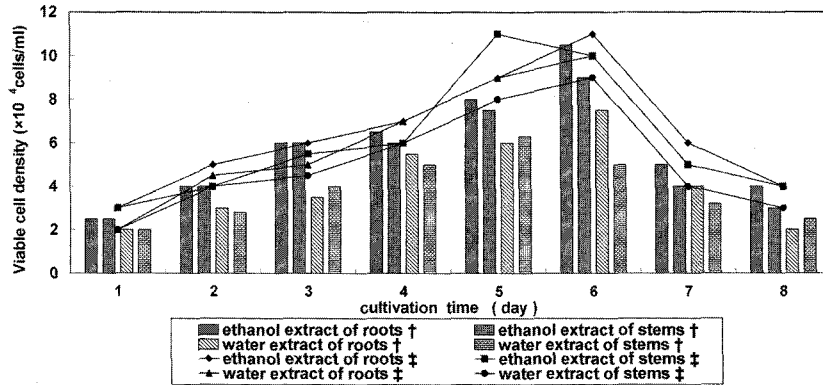


Fig. 5. The growth of viable cell density of immune cells in adding the extracts of *Fatsia japonica* [[†]: human B cell (Raji), [‡]: human T cell (Jurkat)].

Table 2. The kinetics of secretion of IL-6 and TNF- α from B cell (Raji) and T cell (Jurkat) cultured in the extracts of *Fatsia japonica*.

Sample	Time (day)	Cell line			
		B cell (pg/ml)		T cell (pg/ml)	
		IL-6	TNF- α	IL-6	TNF- α
Ethanol of root barks	1	19	22	28	31
	2	33	41	48	53
	3	57	67	65	67
	4	69	79	83	85
	5	95	105	110	125
Ethanol of barks	1	17	19	24	27
	2	30	37	39	46
	3	51	59	56	62
	4	59	64	74	78
	5	89	91	98	105
Water of root barks	1	13	15	15	17
	2	23	26	25	26
	3	30	36	39	41
	4	54	62	61	64
	5	62	69	82	84
Water of barks	1	13	15	15	16
	2	22	23	24	29
	3	28	34	37	38
	4	51	59	54	59
	5	58	62	71	73
Control (no addition)		13	14	13	16

면역 활성 실험에서와 같이 에탄올 추출물이 면역 활성에 있어 물 추출물보다 높은 활성을 띄는 것을 확인 할 수 있었으며, 또한 배양일에 따른 세포의 농도 변화에 따라 cytokine의 분비량의 변화는 모든 용매의 추출물에서 유사한 변화를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 앞서 살펴본 cytokine의 분비량과 관련하여 팔손이 나무의 근피 부위가 면역 활성과 관련하여 활용도가 높음을 확인 할 수 있었다.

적 요

국내에서 자생하는 팔손이 나무의 각 부위를 이용하여 에탄올과 물 용매를 이용하여 각각 65°C와 95°C로 12시간 동안 2회 반복 추출하였으며 부위에 따른 항암 및 면역 활성의 변화를 측정하는 실험을 하였다. 실험결과 부위에 따른 항암 활성 증진 효과 실험 중 근피와 에탄올 용매 추출물이 가장 높게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. 면역세포의 생육활성 측정결과에서는 근피 부위가 높은 활성도를 나타내어 다른 부위에 비해 40~60% 정도의 높은 활성을 나타내었다. 이는 두릅나무과 수종들의 특징인 근피의 특이 활성을 나타내는 예인데 이에 반해 목부의 활성을 살펴보면 농도의 증가에 따라 활성도가 증가하기는 하지만 저 농도의 시료에서는 100% 미만의 활성도를 나타냄으로서 면역 세포에 독성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 면역세포의 활성과 관련하여 Cytokine의 분비량과의 상관관계를 확인 할 수 있었는데 면역세포의 생육활성이 가장 높은 때에 IL-6와 TNF- α 의 Cytokine의 분비량이 최대치인 110~120 pg/ml 를 나타내었다.

이로서 앞선 결과들에 따라 팔손이 나무의 부위별 항암 및 면역 활성 실험에서 다른 두릅나무들과 수종들과 같이 근피의 높은 활성도를 확인할 수 있었으며 특히 가장 활성이 좋은 근피는 가장 낮은 활성을 나타내는 목부의 추출물과 비교하여 최대 40% 이상의 높은 활성도를 관찰할 수 있었다. 이로서 근피의 추출물이 다른 부위와 비교하여 높은 활성을 나타내는 것은 두릅나무과 수종들의 대표적인 특징 성분인 사포닌이 다른 부위에 비해 많이 함유되어 있는 것으로 사료되어지며 이는 후에 분획 및 물질 분석 실험을 통하여 확인되어야 할 사항으로 사료되어진다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업 (0903003-1-1(2003343))의 지원으로 수행된 것으로 이에 심심한 사의를 표합니다.

LITERATURE CITED

- Hoo G, Tseng CJ** (1978) *Flora reipublicae popularis sinicae*. Tomus 54. Angiospermae dicotyledonae Araliaceae. *Facultas Biologiae Universitatis Amoensis*. p. 210.
- Hwang WI, Oh SK** (1984) A study on the anticancer activities of lipid soluble ginseng saponin derivatives against some cancer cells. *Korean J. Ginseng Sci.* 8:153-166.
- Kim MJ, Kim JS, Kang WH, Yeon KD** (2002) Antimutagenic and cytotoxic effects of extracts of *Kalopanax pictus* NAKAI endoermis. *Kor. J. Medicinal Crop. Sci.* 10:132-138.
- Kim SK, Kim YG, Lee MK, Han JS, Lee JH, Lee HY** (2000) Comparison of biological activity according to extracting solvents of four *Acanthopanax* root bark. *Korean J. Medicinal Crop. Sci.* 8:21-28.
- Lee CH, Lee ST** (1991) A palynotaxonomic study of the genus *Fatsia* Decne. & Planch. and its relatives (Araliaceae). 21:9-25.
- Lee SH, Lee HS, Park YS, Hwang B, Kim JH, Lee HY** (2002) Screening of immune activation activities in the leaves of *Dendropanax morbifera* Lev. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 10:109-115.
- Philip S, Ritsa S** (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1107-1112.
- Rubinstein LV, Shoemaker RH** (1990) Comparison of in vitro anticancer drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1113-1118.
- Tadash A, Yumiko T, Takayuki S** (1976) Triterpenoid saponins from *Fatsia japonica*. *Phytochemistry.* 13:1623-1624.
- 김태정** (2002) 한국의 자원식물. 서울대학교 출판부 p. 156-177.
- 오오진** (1991) 쇠비름이 세포성 및 체액성 면역반응계에 끼치는 영향. 숙명여자대학교 대학원 석사학위논문.
- 한국문화재청** (2003) 천연기념물 백서. 문화재청 p. 331.
- 황우익** (1992) 인삼의 항암작용. 고려임삼학회지 16:170-171.