

만병초 잎 추출물의 유전 독성과 사람의 암세포주 등에 대한 세포독성

변경섭* · 이영우* · 진효주* · 이미경* · 이현용* · 이근재*¹⁾ · 허문영** · 유창연*** · 이진하*[†]

*강원대학교 바이오산업공학부, **강원대학교 약학대학, ***강원대학교 농업생명과학대학 식물자원공학부

Genotoxicity and Cytotoxicity in Human Cancer and Normal Cell Lines of the Extracts of *Rhododendron brachycarpum* D. Don leaves

Kyoung Sup Byun*, Young Woo Lee*, Hyou Ju Jin*, Mi Kyoung Lee*, Hyeon Yong Lee*, Kun Jae Lee*, Moon Young Heo**, Chang Yeon Yu***, and Jin Ha Lee*[†]

*School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701.

**College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200-701.

***College of Agriculture and Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701.

Abstract : This study was carried out to investigate the effect of 70% ethanol extract and each fraction from *Rhododendron brachycarpum* D. Don leaves on cytotoxicity, anticancer, genotoxicity and immunological activity *in vitro* bioassay. Cytotoxicity for human normal cells (HEL299 and Chang) of the samples was shown below 35% in 0.5 mg/ml concentration of samples except aqueous fraction by SRB assay. DNA damage on the Chang cell of the samples alone in comet assay was observed very weak damage activity even in high concentration (1 mg/ml) of the samples. The anticancer effect of the samples on human cancer cell lines (A549, AGS, Hep3B, MCF7) was indicated that the cancer cells were inhibited gradually in proportion to the increase of the concentration of the samples by MTT assay. The growth of the Raji and Jurkat cells were hastened by adding butanol fraction among the samples. In the genotoxicity on H₂O₂-induced DNA damage in Chang cells using alkaline comet assay, most of samples were shown a strong protective activity from DNA OTM values.

Key word : *Rhododendron brachycarpum* D. Don, genotoxicity, cytotoxicity, anticancer, DNA, Comet, MTT, SRB

서 언

만병초 (*Rhododendron brachycarpum* D. Don)는 진달래과 식물로 별칭으로는 천상초(天上草), 뚝갈나무, 풍엽, 석암엽 등 여러 이름으로 불리고 있다. 중국에서는 칠리향(七里香) 또는 향수(香樹)라는 이름으로 불리며, 우리나라에는 태백산, 울릉도, 한라산, 지리산, 오대산, 소백산, 설악산 등 해발 700 m 가 넘는 곳에서 자란다. 백두산에 노랑색 꽃이 피는 노란 만병초의 군락이 있고, 울릉도에는 붉은 꽃이 피는 홍만병초가 알려져 있다. 이 만병초는 민간에서는 위, 장의 민무늬근 경련에 의해 생기는 요배산통(腰背痠痛), 동통, 관절통, 신장의 기능이 약해져 생기는 신허요통(腎虛腰痛), 음위, 월경불순, 불임증 등의 치료, 신경통, 고혈압, 강장제, 이노제로 효과가 있다(Kim, 1996; So, 1994; Ahan, 2000). 현재까지 만병초는 희귀 수종이기 때문에 재배 육종 및 수종의 생육 환경에 대한 연구(Park et al., 1983; Park et al., 1995)와 flavonoid의 분

리연구(Choi et al., 1986)가 있으며 만병초의 생약학적 기능이나 생리 활성 등에 대한 연구는 거의 전무한 실정이므로, 본 연구에서는 만병초 잎의 추출물의 *in vitro*에서 정상 세포에 대한 독성과 및 항암 활성 등의 생리 활성을 탐색하였다.

본 연구에서는 만병초 잎의 70% ethanol 추출물과 분획 과정을 통한 3가지 분획물(ethyl acetate fr., butanol fr., aqueous fr.)에 대해 *in vitro*에서 정상세포에 대한 세포 독성, single cell gel electrophoresis(SCGE, comet assay)를 이용한 유전 독성, 사람 암세포주 등에 대한 *in vitro* 항암활성, 사람의 면역 세포주에 대한 생육 활성으로 면역 기능에 대한 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용한 만병초는 강원도 백두대간의 고산지역에

[†]Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6454 (E-mail) jinhalee@kangwon.ac.kr

Received July 16, 2005 / Accepted July 31, 2005

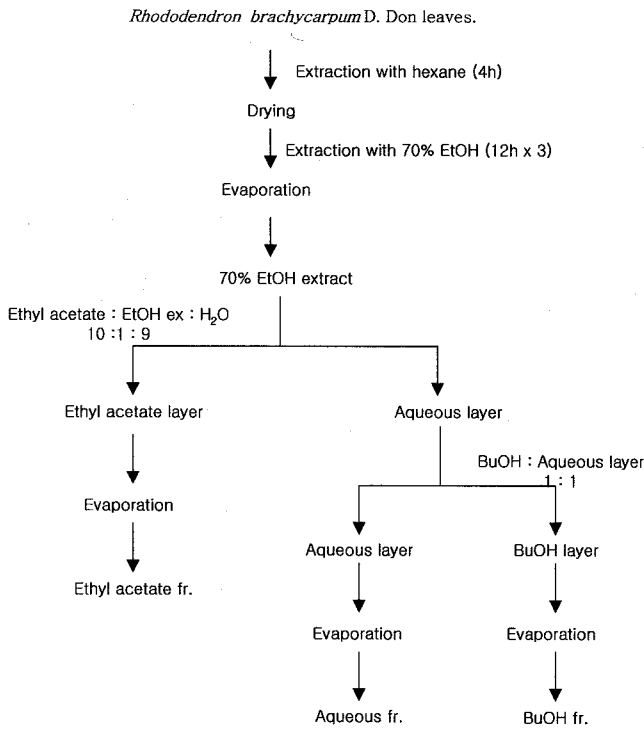


Fig. 1. Process of extraction and fraction of *Rhododendron brachycarpum* D. Don leaves.

서 직접 채집하여 실험에 사용하였고, 세포배양 배지인 RPMI 1640과 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), Minimum essential medium (MEM), fetal bovine serum (FBS)은 Hyclone사로부터 구입하였고, hepes buffer, Trypsin-EDTA는 Gibco사에서, 1,1-diphenyl 1-2-picryl-hydrazyl (DPPH), sulforhodamine B (SRB), 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), normal melting agarose, low melting agarose, ethidium bromide, tris (base), L-ascorbic acid, Ferrous sulfate (FeSO_4), ethylenediamine tetra-acetic acid 는 Sigma 사에서, 그 외 추출 용매인 ethanol (EtOH), hexane, ethyl acetate (EtOAc), butanol (BuOH) 등의 유기용매는 시판 특급시약을 사용하였다.

2. 시료조제

만병초 잎을 물로 깨끗이 세척하여 음건 한 후 hexane을 이용하여 잎의 wax층을 제거하고 파쇄하여 수직의 환류 냉각기가 부착된 추출 flask에 시료 중량 150g에 대하여 10배의 70% EtOH을 사용하여 12시간동안 3회 반복 추출 하였다. 얻어진 추출물은 감압 여과 장치에서 EtOH을 제거하여 농축하고 동결 건조 한 후 각각의 실험에 사용하였다. 다음 단계의 유기용매에서 분획을 얻기 위하여 Fig. 1에 표시한 바와 같이 70% EtOH로 추출하여 얻은 농축물을 EtOAc, BuOH 및 증류수 층으로 분별 분획을 행하고, 각각의 용액을 감압 농축시켜 용매를 제거한 분획물 (fr.)을 얻었다.

3. 세포독성측정

가. 세포주 및 세포 생육 배지

정상 세포에 대한 독성을 알아보기 위해 인간 폐 세포인 HEL 299 (embryo lung cell, human, CCL-247, ATCC)와 간장 세포인 Chang cell (liver cell, human, CCL-13, ATCC)을 사용하였다. HEL 299는 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지에서, Chang cell은 10% FBS가 포함된 DMEM배지로 37, 5% CO_2 의 배양기 에서 배양하였다.

나. SRB assay (Yu *et al.*, 2003)

핑크색의 aminoxanthene dye인 sulforhodamine B (SRB)를 이용하는 이 assay는 세포 단백질을 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 실험 대상 세포인 HEL 299와 Chang cell을 5×10^4 cell/ml의 농도로 96 well plate의 각 well에 각 $100 \mu\text{l}$ 씩 가하여 24시간 동안 배양 (37°C , 5% CO_2)한 후, 각각의 시료를 최종농도 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/ml로 $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 다음 상등액을 제거하고 냉각시켜둔 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) $100 \mu\text{l}$ 를 가하여 4°C 에서 1시간동안 방치한 후 증류수로 TCA를 제거하기 위하여 4~5회 세척하고 실온에서 plate를 건조한다. 각 well에 1% (v/v) acetic acid에 녹인 0.4% (w/v) SRB용액을 $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하고 상온에서 30분 동안 염색시켰다. 세포에 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% acetic acid로 4~5회 정도 세척, 건조 시킨후에 10 mM Tris buffer $100 \mu\text{l}$ 를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 microplate reader (UVT 05997, Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 관찰하였다.

다. MTT assay (Yamauchi *et al.*, 2003)

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay는 생세포내 미토콘드리아의 dehydrogenase에 의해 생성되는 파란색 formazan 측정으로 세포의 증식이나 독성을 조사하는 방법이다. 세포를 배양한 후 HEL 299와 Chang cell을 4×10^4 cell/ml의 농도가 되도록 24 well plate의 각 well에 각 1.8 ml 씩 가하여 24시간 동안 배양 한 후 각각의 시료를 최종농도 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/ml로 $200 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양한 후 MTT (50 mg/ml) 용액 $200 \mu\text{l}$ 를 첨가하고 4시간 동안 배양하여 formazan을 형성시킨 후 suction을 실시하였다. 그후 DMSO 1 ml 를 취하여 각 well에 넣고 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. SCGE 를 이용한 DNA damage

각 시료들의 유전독성을 조사하기 위하여 사람의 간 정상 세포인 Chang cell을 배양하여 SCGE를 실시하였다. 이 세포주는 DMEM media에 적응시켜 10% FBS, 37°C , 5% CO_2

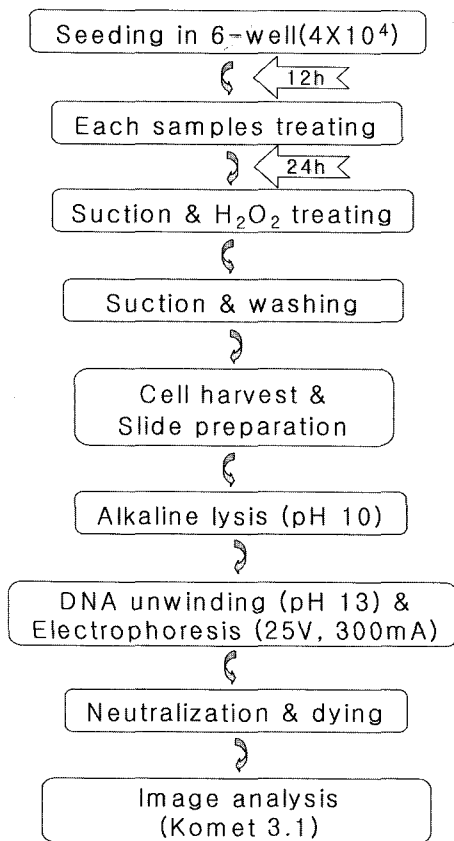


Fig. 2. Process of the single cell gel electrophoresis (SCGE).

incubator에서 배양하였고 positive control로 H₂O₂를 사용하였다. Chang cell 5×10⁴ 개를 6-well에 넣고, 24시간 동안 배양한 후 각각의 시료를 최종농도 0.25, 0.5, 1, 2 mg/ml로 200 μl씩 첨가하여 12시간 배양하였다. 그 후에 각 well의 배지를 제거하고 새로운 배지를 1 ml씩 넣어 CO₂ incubator에서 1시간 보관한 후 trypsin-EDTA를 1 ml를 가하여 cell을 모았다. 여기에 PBS (without Cl⁻, Mg²⁺)를 동량 가한 후, 1000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다 상층액을 버리고 각각에 0.5% low melting point agarose를 200 μl 가하고 적절히 vortex상에서 혼합 하였다. 이 액 100 μl를 0.65% normal melting point agarose 100 μl로 미리 입힌 slide에 도포하고, cover slide를 덮어 상온에서 20분간 굳힌 뒤, cover slide를 제거하고 0.5% low melting point agarose 100 μl로 다시 도포하고 다시 cover slide를 덮고 상온에서 30분정도 굳혔다. Cover slide를 제거한 후, lysis buffer (2.5M NaCl, 100 mM EDTA-Na₂, 10 mM Tris (pH 10), 10% dimethylsulfoxide (DMSO), 1% Triton X-100) 혼합 용액에 담근 후에 차광한 채로 1시간 동안 lysis시켰다. 그 후 electrophoresis buffer (300mM NaOH, 1mM EDTA Na₂, pH 13)에 담근 후에 역시 aluminum foil로 빛을 차단한 채로 30분간 정치시켰다. 다음에 electrophoresis apparatus (Bio-Rad, USA)에 slide를 양

극쪽으로 배열한 뒤 25 V, 300 mA에서 15분간 electrophoresis 하였다. Slide를 꺼내어 10분간씩 3회 0.4M Tris (pH 7.5)로 중화시켰다. 충분히 건조시킨 후 ethidium bromide (2 μg/ml)를 30 μl씩 각각에 가하여 염색하고 515~560 nm의 excitation filter와 590 nm의 barrier filter를 이용하여 형광현미경 (Microscope and UV burner (Olympus, Japan)로 관찰하였다. 이 관찰 결과는 image analyzer 인 KOMET 3.1 (Kinetic Imaging, England)을 사용하여 분석하였다 (Heo, 1998; Lee et al., 2003).

5. 암세포의 생육 억제 활성 측정

가. 세포주 및 세포 생육 배지

실험에 이용된 세포주는 암세포로 사람 간암세포인 Hep3B (hepatocellular carcinoma, human, HB-8064, ATCC), 인간 폐암 세포인 A549 (Lung carcinoma, human, CCL-185, ATCC), 인간 위암세포인 AGS (stomach adenocarcinoma, human, CRL-1739, ATCC), 인간 유방암 세포인 MCF7 (breast adenocarcinoma, pleural, effusion, human, HTB-22, ATCC)을 사용하였다. Hep3B, MCF7은 10% FBS가 포함된 DMEM 배지를 A549, AGS는 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다.

나. SRB assay

SRB assay는 앞의 정상세포 실험에서와 같은 방법으로 Hep3B, MCF7, A549, AGS 에 대하여 측정하였다.

다. MTT assay

Hep3B, MCF7, A549, AGS에 대한 MTT assay 역시 정상 세포 실험에서와 같은 방법과 조건으로 실험을 진행하였다.

6. 면역 세포의 생육 활성 측정 (Lee et al, 2003)

면역 기능 증강 효과는 인간 면역 세포주인 T cell (Jurkat) 과 B cell (Raji)을 이용하여 면역 세포 생육 증진 효과를 검증하였다. 세포는 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 24 well plate에 세포를 4.3×10⁴ cell/ml의 농도로 조절한 후 0.25 μm의 filter상에서 여과한 시료들을 T cell 과 B cell 에 각각 0.25 mg/ml와 0.5 mg/ml의 농도로 첨가한 후 24시간 마다 세포의 수를 8일 동안 nucleo counter (Chemometec, Denmark)를 이용해 세포수를 측정하였다. 그리고 이것을 아무것도 처리하지 않은 대조군과 비교하여 세포의 생육과 세포수에 따라 면역 활성을 측정하였다.

7. 통계처리

모든 실험과정은 3번 반복하여 수행하고 유의성 검정을 하기 위하여 Microsoft사의 Exel Program 을 이용하여 t-test를 행하였다.

Table 1. Inhibition rate on the human cancer cell lines and cytotoxicity of human normal cell lines of the extracts from *Rhododendron brachycarpum* D. Don leaves by using SRB assay

Sample	Concentration (mg/ml)	Inhibition ratio (%)				Cytotoxicity (%)	
		A549	AGS	Hep3B	MCF7	HEL299	Chang
70% EtOH Ex.	0.125	19.24	38.69	21.38	41.73	12.58	14.66
	0.25	64.04	49.41	27.58	64.06	19.96	23.45
	0.5	68.52	75.9	42.34	67.71	25.31	39.6
	1	73.98	79.97	65.78	73.06	39.45	55.95
EtOAc fr.	0.125	24.04	48.64	19.08	65.44	26.46	45.8
	0.25	73.4	69.99	51.3	80.78	34.15	52.52
	0.5	77.65	86.86	58.18	89.48	39.48	54.86
	1	79.41	87.53	70.27	91.69	45.35	60.07
BuOH fr.	0.125	13.81	54.53	13.54	13.58	17.35	24.4
	0.25	54.88	67.95	39.55	66.95	21.38	40.59
	0.5	69.75	73.96	41.27	70.27	30.12	43.88
	1	73.42	80.41	59.56	80.78	37.26	50.74
Aqueous fr.	0.125	2.43	23.27	7.53	5.5	1.23	1.42
	0.25	6.31	48.0	13.92	18.41	13.45	46.08
	0.5	45.89	74.51	22.91	71.75	18.57	50.74
	1	74.48	74.44	44.91	75.2	22.74	53.07

결과 및 고찰

1. 정상세포에 대한 세포 독성 측정

만병초에 대한 정상 세포에 대한 독성에 대한 실험은 국내 외로 연구가 많이 부족한 실정이다. 그리하여 만병초 잎의 70% EtOH 추출물과 fraction들을 이용해 정상세포인 HEL 299와 Chang cell에 대한 세포 독성을 SRB assay로 조사하였고, 측정된 결과는 Table 1에 나타내었다. 만병초 잎의 각 시료는 Chang cell과 HEL299 대하여 대부분 시료의 농도 의존적으로 독성이 증가하였으나, HEL299 세포에 대하여 EtOAc fr.을 제외한 나머지 샘플에서는 0.5 mg/ml 농도에서 35%이하의 낮은 독성을 나타냈으나 Chang cell에 대하여는 다소 강한 세포독성을 보였다. 특히 Chang cell에 대하여 수용성 분획물은 다소 강한 세포독성을 보였고, EtOAc fr.의 경우는 HEL299 cell에 대한 것 보다 더욱 강한 독성을 보였다.

2. SCGE를 이용한 시료들만의 DNA damage

사람의 정상 세포를 이용한 만병초의 잎의 추출물 및 분획물 자체로만 처리하였을 경우의 유전독성에 미치는 영향을 측정하기 위하여 SCGE를 실시하였다. Positive control은 세포에 산화적 손상을 주는 H₂O₂ (10⁻²M)를 이용하였고, negative control은 DMSO (0.5 mg/ml)를 사용하여 비교하였다.

Fig. 3은 Chang cell에 대한 각 시료들만의 DNA 손상 정도를 image analyzer인 KOMET 3.1을 사용해 DNA 손상 정도를 Olive Tail Moment (OTM) 값으로 나타내었다. 모든

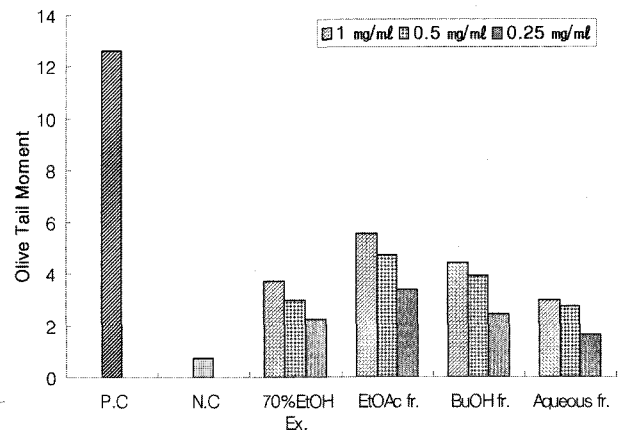


Fig. 3. Genotoxicity of the 70 % EtOH Ex. and fractions from *Rhododendron brachycarpum* on normal cell line, Chang (human liver cell) by comet assay P.C : Postive control, N.C : Negative control.

시료들에서 농도 의존적으로 OTM값이 증가한 것을 보였으나, positive control과 비교시 EtOAc fr.에서는 약 45%정도, BuOH fr.에서는 40%, 그리고 70% EtOH Ex.에서는 30%정도로 낮은 수준의 세포 DNA damage를 주는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과로부터 단순 시료만의 처리는 사람의 정상세포에 대한 유전독성은 극히 미미한 것으로 사료된다.

3. 사람의 암세포 주에 대한 생육 억제 활성 측정

만병초 잎의 각 추출물 및 분획물들이 사람의 유방암 세포 (MCF7), 간암세포 (Hep3B), 폐암 세포 (A549), 위암세포 (AGS)에 대한 항암성 작용을 조사하기 위하여 SRB assay와

MTT assay를 이용하여 생육억제활성을 수행한 결과를 각각 Table 1과 2에 나타내었다. Table 1 에는 동일한 방법으로 사람의 정상 세포인 Chang 및 HEL299 cell 에 대한 세포독성을 조사한 결과와 사람의 암세포에 대한 항암 기능에 대하여 상호 비교하였다.

Table 1의 SRB assay의 결과에서 폐암세포인 A549에 대하여 각 추출물의 1 mg/ml 농도에서 70%가 넘는 억제 활성을 보였고 각 시료간의 큰 차이는 보이지 않았다. 위암세포인 AGS에 대하여 특히 EtOAc fr.과 BuOH fr. 에서는 낮은 농도인 0.25 mg/ml 농도에서도 60% 이상의 높은 억제 활성을 보였고 다른 분획물에서도 약하지만 생육 억제활성을 보였다. 간암 세포인 Hep3B에 대하여 1 mg/ml 농도에서 EtOAc fr. 에서만 70% 정도의 생육 억제 효과를 나타내었고, 다른 암세포와 비교했을 때 낮은 생육 억제 활성을 보였다. 유방암 세포인 MCF7에 대한 생육 억제 활성은 1 mg/ml 농도의 EtOAc fr.의 경우는 다른 암세포들과 비교시 91%로 가장 높은 항암 효과를 나타냈다. SRB assay의 결과에서 간암 세포인 Hep3B의 약 66% 억제 기능을 제외하고 70% EtOH 의 추출물은 70% 이상의 억제 기능을 보여 EtOH 추출물 중에 많은 사람의 암세포에 대하여 유효한 성분이 많이 포함된 것을 알 수 있었고 EtOAc fr.은 1 mg/ml 농도에서 암세포에 대하여 70% 이상의 항암억제 기능을 보인 결과로부터 EtOAc fr. 에 더욱 유효한 성분이 함유 되어 있음을 암시하였다. 만병초 잎의 대부분의 추출물 및 분획물들의 거의 모든 농도에서 정상 세포에 대해서는 50% 이하의 독성을 보였다.

Table 2는 MTT assay를 이용한 사람의 암세포인 A549,

Table 2. Inhibition rate on the human cancer cell lines of the extracts from *Rhododendron brachycarpum* D. Don leaves by using MTT assay

Sample	Concentration (mg/ml)	Inhibition ratio (%)			
		A549	AGS	Hep3B	MCF7
70% EtOH Ex.	0.125	6.18	8.13	33.22	11.12
	0.25	21.01	39.42	51.43	56.37
	0.5	59.38	55.28	59.26	67.54
	1	81.93	84.08	83.38	84.22
EtOAc fr.	0.125	50.45	19.59	16.08	13.98
	0.25	60.64	41.38	29.49	24.98
	0.5	60.99	59.61	68.84	58.82
	1	78.07	77	84.82	71.87
BuOH fr.	0.125	27.05	29.03	11.87	7.99
	0.25	38.86	45.66	43.66	57.39
	0.5	51.86	52.49	52.6	58.01
	1	72.8	59.91	64.05	64.94
Aqueous fr.	0.125	17.77	11.38	6.81	2.6
	0.25	22.69	21.37	27.74	18.99
	0.5	30.42	28.89	38.55	36.85
	1	68.37	56.35	61.92	55.6

AGS, Hep3B, MCF7에 대한 생육 억제 활성을 % 값으로 나타낸 것이다. 만병초 잎의 추출물 및 분획물들의 암세포에 대한 생육 저해율은 폐암 세포인 A549에 대한 암세포 억제 활성은 1 mg/ml 농도의 70% EtOH Ex.에서 82%로 가장 높은 생육 억제 활성을 나타내었고, 위암세포인 AGS에 대하여 BuOH fr.과 aqueous fr.을 제외한 70% EtOH Ex.와 EtOAc fr.에서 84%와 77%의 높은 생육 억제 활성을 나타냈다. 간암 세포 Hep3B에 대하여 EtOH Ex.와 EtOAc fr.에서 84%의 높은 생육 억제 활성을 보였다. 유방암 세포인 MCF7에 대하여 70% EtOH Ex.에서 84%로 가장 높은 생육 억제 활성을 나타낸 것을 확인할 수 있었다. 이 결과에서 알 수 있듯이 정상 세포에 대해 모든 시료에 대하여 농도가 증가하면서 독성이 높아지는 농도 의존적인 경향을 나타내는 것을 볼 수 있었고, 암세포에 대해서도 역시 농도 의존적으로 생육 억제 활성이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 모든 시료의 1 mg/ml 의 농도의 70% EtOH 의 추출물은 실험대상인 모든 사람의 암세포에 대하여 80% 이상의 항암 기능을, EtOAc fr. 는 모든 암세포에 대하여 가장 높은 농도인 1 mg/ml에서 70% 이상의 높은 억제 활성이 보인 결과로부터 SRB assay에서 얻은 결과와 일치하며 유효한 성분이 역시 EtOAc fr.에 함유 되어 있을 것을 시사하였다.

4. 면역활성 기능

일반적인 면역 기능 측정법으로는 B-cell과 T-cell의 lymphokine 분비 능력을 측정하거나 Natural Killer cell과 대식세포 등의 생육 능력을 측정하는데 이 연구에서는 시료를 첨가하여 후자를 행하여 면역 기능을 탐색하였다. 만병초 잎 추출물과 그 분획물 들을 인간 면역 체계에서 항체 분비 기능을 가진 사람의 B-cell인 Raji cell과 T-cell인 jurkat cell의 생육에 대한 영향을 조사한 결과를 Table 3에 나타내었다. Human B-cell과 T-cell에 대하여 앞의 결과에서 정상세포에 대한 독성이 비교적 낮은 값을 나타낸 0.5 mg/ml 의 농도와 0.25 mg/ml 의 농도에서 실험을 수행하였다. T-cell의 경우 0.25 mg/ml의 농도에서 배양 3일 째에 control과 비교 시에 다

Table 3. The cell growth of human T (jurkat) cells of the 70% EtOH Ex. and each fraction from *Rhododendron brachycarpum* D. Don leaves using nucleo counter

Cell concn*	Number of T cells (X 104)		Number of B cells (X 104)	
	0.25 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.5 mg/ml
Control	8	8	7.6	7.6
70% EtOH Ex.	7	5.5	8	5.9
Ethylacetate Fr.	11	6.8	6	6
BuOH Fr.	13.5	8	12.5	9
Aqueous Fr.	9.1	4.2	8	7

* concentration of samples added in each cell plate

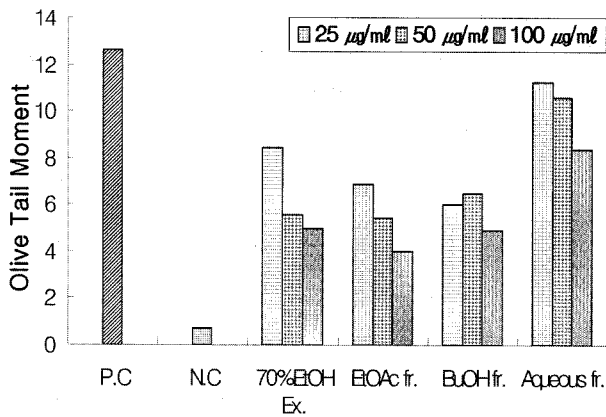


Fig. 4. Protective effect of Extract and fractions from *Rhododendron brachycarpum* D. Don leaves on H₂O₂-induced DNA damage in Chang cell P.C : Postive control, N.C : Negative control.

른 시료보다 BuOH fr.이 1.6배의 세포생육 촉진 활성을 보였으며, 0.5 mg/ml의 농도에서 control과 유사한 세포 증식 속도를 보여서 낮은 농도의 BuOH fr.이 면역기능이 강한 것으로 사료된다. B-cell의 세포 증식 속도에 대한 결과에서도 0.25 mg/ml를 첨가한 군에서 다른 시료에 비하여 BuOH fr.의 경우가 1.6 배의 세포생육 촉진 활성을 나타냈다. 이러한 결과로부터 면역세포에 대한 기능은 낮은 농도의 BuOH fr.에서도 가능하고, 이 분획물은 암세포에 대한 독성을 보인 다른 분획물 과 서로 다른 기능을 가진 성분이 함유되어 있음을 시사하였다.

5. SCGE를 이용한 각 시료들의 Genotoxicity 억제작용

유전독성에 대한 연구는 comet assay를 이용하여 Chang cell의 DNA damage 정도를 측정하는 방법으로 수행하였다.

Table 4. Inhibition ratio (OTM Value) of 70% EtOH Ex. and each fraction from *Rhododendron brachycarpum* D. Don leaves on H₂O₂-induced DNA damage in Chang cells

Concentration (µg/ml)	70% EtOH Ex.	EtOAc fr.	BuOH fr.	Aqueous fr.
25	33.01	45.32	52.37	10.78
50	56.07	56.97	48.82	16.09
100	60.82	68.53	61.28	33.83

Fig. 4와 Table 4와 5에서는 SCGE를 이용하여 만병초 잎과 그 분획물들의 Chang cell의 산화적 DNA 손상에 대한 효과를 나타내었다. Fig. 4는 양성 대조구인 H₂O₂를 먼저 처리하고 각 시료가 positive control의 유전독성에 대한 억제효과를 보인 것이다. OTM 값을 나타낸 것으로서 OTM 값은 tail extent moment와 tail length, 그리고 tail DNA% 등의 image analyzer maker가 제공하는 parameter들의 계산식에 의하여 구한 값으로 보통 DNA damage에 대한 값으로 나타낸다. 산화적 손상을 유도하기 위하여 H₂O₂를 처리한 양성대조군은 12.6으로 높은 OTM 값을 나타냈으나 만병초 잎 추출물과 그 분획물 들을 같이 처리 했을 때 aqueous fr.을 제외한 모든 시료에서 농도 의존적으로 DNA tail이 감소하는 유전독성 억제 활성을 나타내었다. 이 결과에서 EtOAc fr.이 100 µg/ml 농도에서 control 대비 저해율 68.5%로 가장 높은 산화 손상 억제율을 보였으며 BuOH fr.에서도 강한 유전독성 억제 기능이 있음이 확인되었다. 그러나 수용액 분획은 매우 약한 유전독성 억제 활성을 보여 각 분획의 특성이 다양함을 알 수 있었다.

Table 4와 5에서도 tail length와 tail extent moment를 살펴보면 농도 의존적으로 모든 샘플에서 값이 감소하는 것으로

Table 5. Comet image analysis data of 70% EtOH Ex. and each fraction from *Rhododendron brachycarpum* D. Don leaves on Chang cell by using KOMET 3.1 system

		Cell Area	Head DNA	Tail DNA	Tail Length	*Tail Extent Moment
	Positive control(H ₂ O ₂)	21849.7	57.6741	42.3259	50.16	22.36
	Negative control	21921.8	94.9109	5.08914	4.1	0.63
70% EtOH Ex.	25 µg/ml	21833.5	74.26	25.74	47.4	15.55
	50 µg/ml	21915.9	78.73	21.27	31.36	9.69
	100 µg/ml	21910.2	74.8	25.2	30.94	8.79
Ethylacetate fr.	25 µg/ml	21896.8	69.39	30.61	34.88	14.55
	50 µg/ml	21909.2	74.76	25.24	33.18	9.09
	100 µg/ml	21952.9	79.02	20.98	27.42	6.48
BuOH fr.	25 µg/ml	21930.7	73.53	26.47	40.86	11.95
	50 µg/ml	21879.4	70.1	29.9	37.32	11.92
	100 µg/ml	21966.7	73.75	26.25	26.14	7.42
Aqueous fr.	25 µg/ml	21887.5	59.62	40.38	47.45	19.16
	50 µg/ml	21935.1	63.45	36.55	45.33	16.57
	100 µg/ml	21911.1	65.06	34.94	41.58	14.53

* Tail Extent Moment = (%DNA in Tail×Tail length)/100

보아 각 시료들이 DNA의 산화적 손상에 의한 유전독성에 대한 보호 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다.

유전독성 억제 활성을 보여 각 분획의 특성이 다양함을 알 수 있었다.

적 요

강원도 산지에서 채취한 만병초 잎의 70% ethanol 추출물과 다른 유기용매 분획 과정을 통한 3가지의 분획물에 대한 *in vitro*에서의 정상세포에 대한 세포독성과 유전독성, 여러 암세포에 대한 항암 기능, 면역세포에 대한 면역기능 등을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 만병초 잎의 EtOH 추출물과 각 용매 분획물 들의 사람의 정상 세포인 HEL 299와 Chang에 대한 세포 독성을 SRB assay로 측정한 결과, 대부분의 시료 0.5 mg/ml 이하의 농도에서 35% 이하의 세포 독성이 나타났다.

2. 만병초 잎의 70% EtOH 추출물 및 각 다른 용매 분획물 만 처리한 정상 세포에 대한 유전독성을 comet assay에서 측정한 결과, 양성 대조구 ($10^{-2}M$, H_2O_2)과 비교시, 가장 높은 농도인 1 mg/ml의 농도에서 1/3 이하의 낮은 DNA damage가 관찰되었다. 이것은 세포독성과 관련하여 대부분의 각 시료가 세포 DNA에 대하여 매우 약한 손상만 일으키는 것이 확인되었다.

3. 사람의 암세포에 대한 SRB 및 MTT assay를 이용한 만병초의 잎의 모든 시료의 1 mg/ml의 농도의 70% EtOH의 추출물은 실험대상인 모든 사람의 암세포에 대하여 80% 이상의 항암 기능을, EtOAc fr.는 모든 암세포에 대하여 가장 높은 농도인 1 mg/ml에서 70% 이상의 높은 억제 활성이 보인 결과로 부터 유효한 성분이 역시 EtOAc fr.에 함유되어 있을 것을 시사하였다.

4. 만병초 잎 추출물의 면역세포 생육에 대한 조사에서 사람의 B-cell과 T-cell에 대하여 0.5 mg/ml의 농도에서 배양 3일째에 BuOH fr.에서 대조구와 비교시 1.6배 정도의 생육 촉진 활성을 보였다.

5. SCGE를 통해 H_2O_2 로 유도된 산화적 손상에 대한 만병초 잎 추출물과 분획물들의 유전독성 억제 기능은 EtOAc fr.이 100 $\mu g/ml$ 농도에서 대조구 대비 68.5%의 가장 높은 산화손상 억제율을 보였으며 BuOH fr.에서도 강한 유전독성 억제 기능이 있음이 확인되었다. 그러나 수용액 분획은 매우 약한

사 사

이 논문은 2004년도 산업기술자원부의 지역협력사업 (한림대 실버생물산업기술연구센터)의 연구비와 2003년도 강원대학교 학술연구조성비 (해외파견)의 지원에 의하여 얻은 결과이므로 이에 감사를 드린다. 이 연구의 일부는 강원대학교 공동실습관의 기자재를 활용하여 이에 사의를 표함한다. 또한 본 연구의 재료를 채취하는데 도움을 주신 이효운, 권영순씨에게 깊은 감사드립니다.

LITERATUR CITED

- Choi JS, Han SY, Park JC, Choi JH, Woo WS** (1986) Flavonoids from the leaves of *Rhododendron brachycarpum*. Arch Pharm Res. 9(4):233-236.
- Heo MY** (1998) Antigenotoxicity of Ginseng Petroleum Ether Extract and its Action Mechanism. J. Fd. Hyg. Safety 13(3): 243-251.
- Hong HO, Lee GE, Yoo KC, Han KH** (1983) Studies on the wild *Rhododendron brachycarpum* in Korea.. J. Kor. Soc. Hort. Sci 21(1):57-61.
- Lee SJ, Lee MK, Choi GP, Kim NY, Roh SK, Heo MY, Kim JD, Lee HY, Lee JH** (2003) Inhibitory Effect of Korean Mistletoes on the Oxidative DNA Damage. Korean J. Medicinal Crop Sci.: 11(2):89-96.
- Lee SJ, Lee MK, Choi GP, Yu CY, Roh SK, Kim JD, Lee HY, Lee JH** (2003) Growth Enhancement and Cytotoxicity of Korean Mistletoe fractions on Human Cell Lines. Korean J. Medicinal Crop Sci.: 11(1):62-70.
- Park JH, Kim JS, Jeong AY, Namba T** (1995) A Pharmacognostical Study on the 'Man Byung Cho' Kor. J. pharmacogn 26(2), 168-174(1995).
- Yu CY, Kim SH, Lim JD, Kim MJ, Chung IM** (2003) Intraspecific relationship analysis by DNA markers and in vitro cytotoxic and antioxidant activity in *Eleutherococcus senticosus*. Toxicology in vitro 17:229-236.
- 김태정** (1996) 한국의 자원식물 III, p. 219, 서울대학교출판부, 서울.
- 蕭培根** (1994), 중국본초도감 (강병수, 이유미 공역), II, p. 31 여강출판사, 서울.
- 안덕균** (2000) 원색한국본초도감, p. 751, 교학사, 서울.