

세신 비극성 분획의 항암 활성 및 성분 분석

조승식^{1#} · 강복윤^{2#} · 배민석³ · 심정현¹ · 김현정¹ · 윤 구^{1*}

¹목포대학교 약학대학, ²전남대학교 약학대학, ³목포대학교 공과대학

Anticancer Activity and Chemical Composition of a Non-Polar Fraction from *Asiasari Radix et Rhizoma*

Seung-Sik Cho^{1#}, Bok Yun Kang^{2#}, Min-Suk Bae³, Jung-Hyun Shim¹, Hyun Jung Kim¹, and Goo Yoon^{1*}

¹College of Pharmacy, Mokpo National University, Jeonnam 534-729, Korea

²College of Pharmacy and Research Institute of Drug Development, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

³Department of Environmental Engineering, College of Engineering, Mokpo National University, Mu-an, Jeollanam-do 58554, Korea

Abstracts – The study aimed to characterize chemical composition and anticancer property of the *n*-hexane fraction derived from *Asiasari Radix et Rhizoma*. The anticancer activity was evaluated on a panel of cancer cell lines including HN22, HSC2, HSC3, and HSC4 cells (human oral cancer), HCC827 and HCC827GR cells (human lung cancer), and KYSE30 and KYSE450 (human esophageal cancer) by MTS assay. As a result, The least polar subfraction from *n*-hexane-soluble layer displayed notable cytotoxicity on the tumor cell lines with IC₅₀ ranging from 1.20 to 17.0 µg/ml. The chemical composition of constituents in the active subfraction was determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The essential oils comprised of sesquiterpenes including β-gurjunene (7.45%), γ-amorphene (6.61%), guaia-6,9-diene (6.40%), δ-guaiene (5.21%) and a phenylpropanoid, safrole (0.49%) were mainly identified in addition to long-chain hydrocarbons including *n*-heptadecane (24.60%), 7-hexadecene (4.44%) and a diterpenoid, *ent*-kaur-16-ene (6.57%).

Keywords – *Asiasari Radix et Rhizoma*, Anticancer activity, Essential oil

세신(細辛, *Asiasari Radix et Rhizoma*)은 쥐방울덩굴과(Aristolochiaceae)에 속하는 죽도리풀 *Asarum sieboldii* Miq. [*Asiasarum sieboldii* (Miq.) F.Maek.], 만주죽도리풀 *Asarum heterotropoides* F.Schmidt f. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag. [*Asiasarum heterotropoides* (F.Schmidt) F.Maek var. *mandshuricum* (Maxim.) F.Maek]의 뿌리 및 뿌리줄기를 이르고 있으며, 주로 신온해표약(辛溫解表藥)으로 한국, 중국, 일본에서 사용되어 왔다. 전통의학에서는 세신을 해열, 진경, 진통 효능으로 상기(上氣), 두통(頭痛), 뇌동(腦動), 풍습(風濕), 비통(痺痛), 사기(死肌) 등의 증상에 적용하였으며, 주로 해열, 진해, 진통, 거담, 이뇨약으로 풍한감모(風寒感冒), 두통(頭痛), 이통(耳痛), 비색비연(鼻塞鼻淵), 풍습비통(風濕痺痛), 담음천해(痰飲喘咳) 등의 감기나 축농증에 이용

하고 있다.^{1,2)} 지금까지 보고된 세신의 주요작용으로는 해열, 진정, 진통, 항염증, 면역 억제, 항알러지 작용 등 다양한 생리활성이 보고되고 있으며, 주요 함유 성분으로는 saftrole 및 asarinol 등의 다양한 식물정유 성분, pellitorin 등 alkylamide계 성분, sesamin, asarinin 등의 lignan 화합물, aristolactam III 등의 alkaloid와 여러 phenol성 화합물 및 배당체들이 보고되었다.^{2,3)}

이전 연구에서 세신의 EtOH 추출물은 당뇨병, 비만 및 암과 같은 만성 질환과 관련이 있는 것으로 알려진 protein tyrosine phosphatase 1B(PTP1B) 억제 효과를 나타냈다.⁴⁾ 세신 EtOH 추출물의 암세포 독성을 검색한 결과 항암 효과가 확인되었으며 이를 바탕으로 (-)-asarinin, xanthoxylol 등 일부 lignan 화합물이 항암 활성 성분으로 분리되어 규명된 바 있다.^{5,6)} 그러나 세신 유래의 비극성 *n*-hexane층에 대한 항암 활성과 화학적 조성을 연구한 논문은 거의 없다는 것이 주목되었다. 이에 본 연구에서는 세신에서 얻은 *n*-hexane 층 비극성 분획의 성분 분석과 암세포 독성 효과를 보고한다.

#These authors contributed equally to this work

*교신저자(E-mail): gyoon@mokpo.ac.kr

(Tel): +82-61) 450-2682

재료 및 방법

실험재료 - 세신은 전남생약조합(Chonnam Herb Association, 전남 화순)에서 구입한 후 목포대학교 약학과 윤구 교수가 검증하여 실험에 사용하였으며 표본(MNUYG-10)은 목포대학교 약학대학에 보관 중이다.

추출 및 분획 - 건조된 세신(1.2 kg)을 초음파로 3시간 동안 EtOH을 이용하여 2회 추출하였다. 세신 추출액을 감압 하에서 증발시켜 EtOH 추출물(91 g)을 수득하고, 이를 증류수에 현탁시킨 후, *n*-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc를 차례로 가하여 극성에 따른 용매 분획을 시행하여 총 4개의 분획물을 얻었다. 얻어진 *n*-hexane 분획(5 g)을 silica gel column chromatography를 이용하여 *n*-hexane:EtOAc로 구성된 기율기 용리 조건(1:0→0:1)으로 용출시켜 7개의 소분획물(H1-H7)로 나누었다. 이 중 암세포 독성 결과를 토대로 가장 비극성인 H1 소분획물의 성분 분석을 시행하였다.

Gas Chromatography-Mass Spectrometry 분석 - 세신 유래의 비극성 분획물 H1의 성분 분석은 이전 보고된 gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS) 분석 방법을 토대로 적용하였다(Table I).^{7,8)} Agilent 5975C mass selective detector(MSD)(EI, 70 eV)에 연결된 Agilent 7890 gas chromatography system을 사용하여 유기화합물 분석을 수행하였다(Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA). 이때 칼럼은 Agilent HP-5MS 용융 실리카 모세관 컬럼(30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm 필름 두께)을 사용하였다. GC-MS는 전자 이온화(EI) 조건하에서 *m/z* 69.0, 219.0, 502.0의 mass fragment에 의해 perfluorotributylamine(PFTBA)을 사용하여 조정되었다. GC 오븐은 carrier gas로서 He를 사용하

였고 65°C에서 10분 동안 등온조건에서 가열한 후 분당 10°C씩 300°C까지 가온하였으며, 전송 라인을 300°C에서 가열한 다음 질량 분석기를 scan 모드(50-550 amu)에서 작동시켰다. 결과로 얻어진 모든 질량 스펙트럼은 데이터 시스템 라이브러리(NIST 2008)와 비교되었다.

Cytotoxicity Test - 구강편평상피암 세포 중 HN22 세포주는 단국대학교(천안, 대한민국)에서, HSC2, HSC3, HSC4는 Hokkaido University(Hokkaido, Japan)에서 제공받았다. 사람 비소세포폐암 세포주 HCC827은 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구매하였고, gefitinib 저항성을 가진 HCC827(HCC827GR) 세포는 Pasi A. Jänne(Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA) 교수에게 제공받았다. 사람 식도편평세포암 세포주(KYSE30, KYSE450)는 Chinese Academy of Sciences(Shanghai, China)에서 구입하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), RPMI-1640, fetal bovine serum(FBS), penicillin and streptomycin, trypsin, phosphate buffered saline(PBS)은 Thermo Scientific(Logan, UT, USA)에서 구입하였다. 각 암세포의 성장 억제 효과를 관찰하기 위하여, CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega, Madison, WI, USA)가 사용되었으며 제조사의 매뉴얼에 따라 측정되었다. 8종의 암세포 HN22(2 × 10³ cells/well), HSC2(3 × 10³ cells/well), HSC3(3 × 10³ cells/well), HSC4(2.5 × 10³ cells/well), HCC827(6 × 10³ cells/well), HCC827GR(5.5 × 10³ cells/well), KYSE30(2.75 × 10³ cells/well) 및 KYSE450(3.5 × 10³ cells/well)를 96-well plate에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 세신 소분획물 시료를 농도별로 처리하

Table I. Operation parameters for GC/MS analysis

Parameter	Condition		
Column	Agilent J&W HP-5MS Capillary GC column		
Carrier gas	Helium		
Split/Splitless	Split 10:1		
Injection Volume	1 μl		
MS Source	230 °C		
MS Quad	150 °C		
Analytical Temperature	Rate(°C/min)	Value(°C)	Hold(min)
	Initial	-	65
	Step 1	-	65
	Step 2	10	300
	Time	55.5 min	
Electron Ionization	70 eV		
Mass Range	50 - 550 amu		
Scan Method	Full Scan		

여 24시간 및 48시간 동안 반응시켰다. MTS[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] 용액을 각 well 당 30 μ l씩 넣고 37°C에서 2시간 동안 반응하였다. 흡광도(optical density, O.D.)는 spectrophotometer(Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland)를 이용하여 490 nm에서 측정하였다. 세포 생존율은 다음과 같이 측정하였다[(약물처리군의 흡광도/약물처리하지 않은군의 흡광도) \times 100(%)].

통계처리 - 실험의 측정 결과는 mean \pm SD로 나타내었으며, SigmaPlot(Systat Software Inc., San Jose, CA, USA)을 통해 Student *t*-test를 실시하여 각 실험군 사이의 통계학적 유의성을 결정하였다. $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 평가하였다.

결과 및 고찰

생약 및 천연물 유래의 항암성분을 탐색하고 있는 중, 세신 추출물의 *n*-hexane 분획물이 비교적 우수한 암세포 독성을 나타냄을 확인하고, *n*-hexane 분획물을 flash column chromatography에 적용하여 총 7개의 소분획물(H1-H7)을 얻었다. H1-H7 소분획물 중 가장 비극성이자 오일상을 띠

는 H1 소분획물이 강한 암세포 독성을 나타내었으며(Table III 및 Fig. 2), 이에 주요 화합물 구성을 알아내고자 GC-MS를 통한 성분 분석을 수행하여 주로 식물정유로 이루어져 있음을 확인하였다(Table II 및 Fig. 1). 일반적으로 정유는 식물 보호에 핵심적인 역할을 하는 2차 대사산물로 주로 휘발성의 monoterpene 또는 sesquiterpene의 저분자 비극성 terpenoid 및 phenylpropanoid로 구성되어 있다. 식물정유는 광범위한 생물 활성, 특히 항균 활성을 나타내 오랫동안 다양한 인간 질병 및 질병 치료에 활용되어 왔다.^{9,10)} 또한 정유는 암세포 표적 활성을 보유하고, paclitaxel과 docetaxel 등 일반적으로 사용되는 화학요법 약물의 효능을 증가시킬 수 있으며, 암 환자에게 투여될 때 면역증진 기능을 하고 있음이 밝혀지고 있다.¹¹⁾ 세신 유래의 식물정유 성분은 항알리지,¹²⁾ 콜레스테롤 저하 작용¹³⁾이 보고되었으나 항암 활성에 대해 보고된 바가 없어 화학적 조성 및 항암 활성 연구를 진행하게 되었다. 정유 성분은 GC-MS를 사용하여 분석하였으며, HN22, HSC2, HSC3 및 HSC4 세포(사람 구강편평 세포암), HCC827 및 HCC827GR 세포(사람 폐암), 및 KYSE30 및 KYSE450(사람 식도암)에 대한 MTS로 항암 활성을 측정하였다. 주로 식물정유 성분으로 이루어진 H1의 화학적 조성 및 해당 구조를 Table II 및 Fig. 1에 나타내

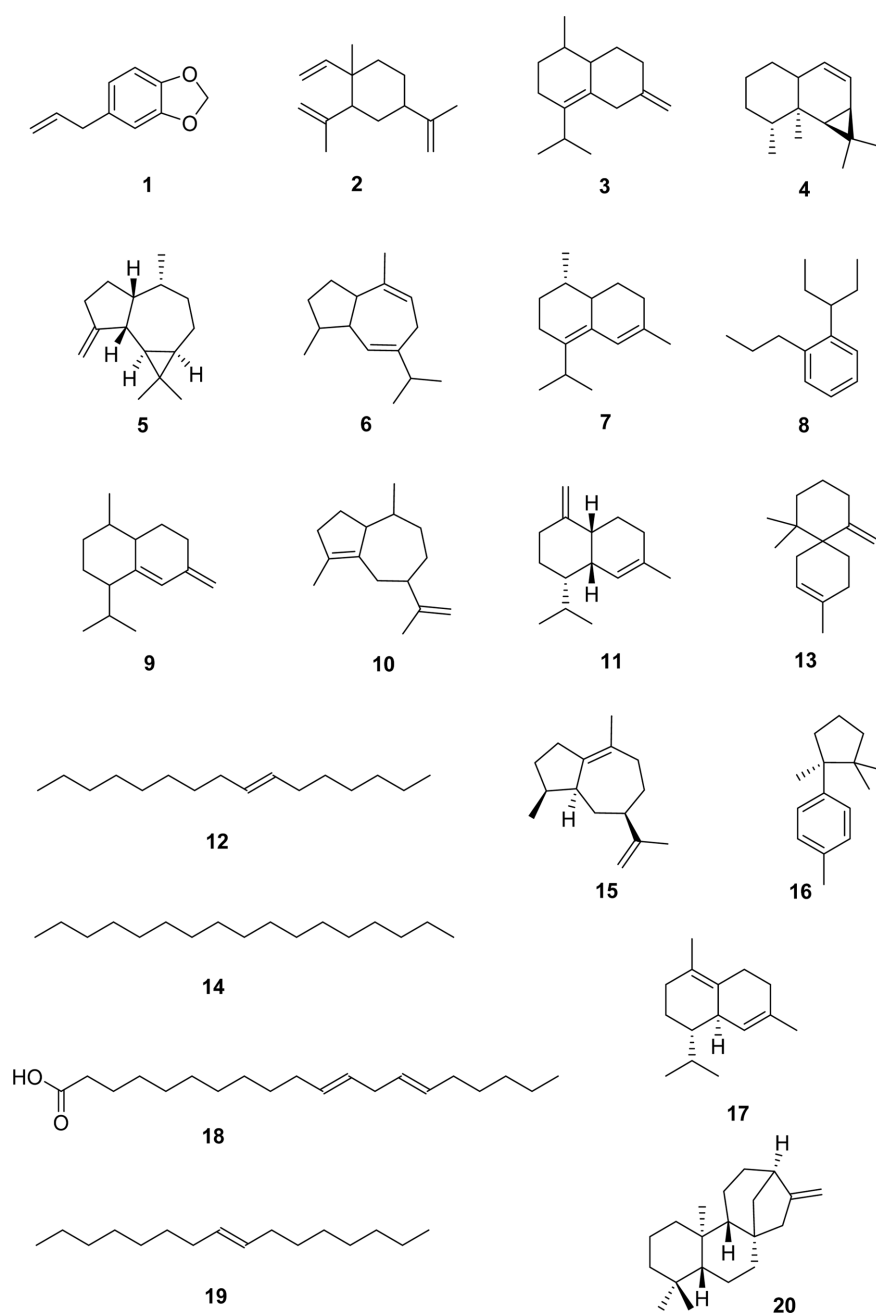
Table II. Chemical composition of a non-polar subfraction H1 from *Asiasari Radix et Rhizoma* by GC-MS

No	Constituents	Retention Time (min)	Area (%)
1	Safrole	18.016	0.49
2	β -Elemene	19.601	0.77
3	2-Isopropyl-5-methyl-9-methylene bicyclo[4.4.0]dec-1-ene	20.024	3.11
4	(-)-Aristolene	20.070	2.52
5	β -Gurjunene	20.247	7.45
6	Guaia-6,9-diene	20.367	6.40
7	Zonarene	20.424	1.09
8	1-(1-Ethylpropyl)-2-propylbenzene	20.470	1.82
9	<i>epi</i> -Bicyclosesquiphellandrene	20.630	1.92
10	Aciphyllene	20.671	1.24
11	γ -Amorphene	20.814	6.61
12	7-Hexadecene	20.894	4.44
13	β -Chamigrene	21.025	1.52
14	<i>n</i> -Heptadecane	21.088	24.60
15	δ -Guaiene	21.180	5.21
16	(<i>R</i>)-Cuparene	21.294	1.48
17	δ -Cadinene	21.369	0.45
18	11,14-Eicosadienoic acid	23.131	0.71
19	8-Hexadecene	23.234	2.72
20	<i>ent</i> -Kaur-16-ene	27.331	6.57

Table III. The IC_{50} values of H1 on cell viability in cancer cells

Cancer cells	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Cancer cells	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
HN22	9.0	HCC827	5.8
HSC2	11.9	HCC827GR	7.8
HSC3	7.4	KYSE30	1.2
HSC4	13.6	KYSE450	17.0

The values were measured using MTS assay kit. Data represent mean percentage levels \pm SD. 48 h treatment. Shown values represent the average of triplicate samples from independent experiments.

**Fig. 1.** Structures of compounds identified in the H1 subfraction.

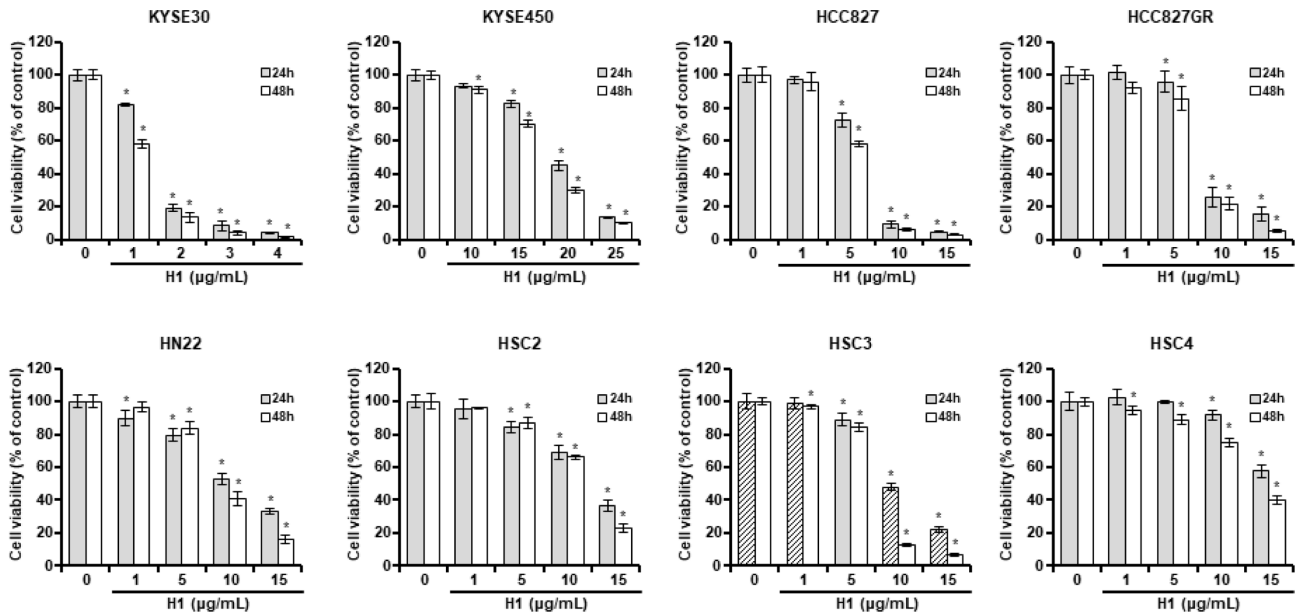


Fig. 2. The anti-proliferative effect of H1 in cancer cells. The viabilities of HN22, HSC2, HSC3, and HSC4 cells (human oral cancer), HCC827 and HCC827GR cells (human lung cancer), and KYSE30 and KYSE450 (human esophageal cancer) in H1 treatment for 24 h and 48 h. The values were measured using MTS assay kit. Data represent mean percentage levels \pm S.D. 48 h treatment. Shown values represent the averages of triplicate samples from independent experiments. The asterisk (*) indicates a significant difference ($p < 0.05$) between DMSO-treated and H1-treated cells.

었다. 전체 조성물의 81.12%에 해당하는 세신의 비극성 분획에서 총 20종의 성분이 확인되었다. GC-MS 분석 결과, H1은 주로 β -gurjunene(7.45%), γ -amorphene(6.61%), guaia-6,9-diene(6.40%) 및 δ -guaiene(5.21%) 등의 sesquiterpene 화합물과 *n*-heptadecane(24.60%)을 포함한 hydrocarbon 화합물, *ent*-kaur-16-ene(6.57%)의 diterpene 화합물 및 safrole(0.49%)의 phenylpropene 화합물로 이루어져 있음이 확인되었다. 그 중 safrole, β -elemene, *epi*-bicyclosquiphellandrene 및 δ -cadinene의 항암 효과와 기전이 기존에 보고되었다.¹⁴⁻¹⁷⁾ 암세포 생존력에 대한 H1의 억제 효과를 측정하기 위해, MTS 분석을 24 시간 및 48 시간 후에 수행하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이, H1은 모든 암세포의 생존을 감소시킴과 함께 시간 의존적으로 실현되었음을 보여 주었다. 특히 KYSE30 식도암 세포에서 IC_{50} 값이 1.2 μ g/ml로 가장 좋은 결과를 보였다. 구강편평상피암(HN22, HSC2, HSC3 및 HSC4)의 4가지 세포주 유형은 48시간 H1 소분획물 투여에 대해 7.4-13.6 μ g/ml 범위의 IC_{50} 값을 나타내었다. 인간 폐암의 경우 gefitinib 내성 HCC827(HCC827GR)과 모체인 HCC827 세포에 대하여 H1의 IC_{50} 값이 각각 7.8 및 5.8 μ g/ml이었다. 결론적으로 인간 유래 구강편평상피암, 폐암, gefitinib 내성 및 식도암에 대한 세신 비극성 소분획물 H1의 항암 활성 IC_{50} 값이 1.2-17.0 μ g/ml로 평가되었다. 식물 정유의 주요 구성성분인 monoterpene, sesquiterpene, 및

phenylpropane계 화합물이 항산화, 항돌연변이, 세포증식 억제, 면역기능 조절 등의 기전으로 나타내는 암 예방 및 항암 효과가 다양한 방향성 약물 및 식용식물에서 보고되고 있다.^{18,19)} 또한 oridonin 등 *ent*-kaur-16-ene 유도체는 여러 암세포에 대한 강력한 항암작용으로 널리 알려져 있다.^{20,21)} 이에 세신 비극성 소분획물 H1의 강력한 세포 독성 효과는 식물정유의 sesquiterpene, phenylpropanoid와 diterpene이 일부 관련이 있으리라 사료 되며, 이의 규명을 위해 인간 암세포에 대한 작용 기작과 생체 내 효능에 대한 추가 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

결론

생약 세신 추출물의 *n*-hexane 분획물 유래로 가장 비극성을 띠는 소분획물 H1이 인간 유래의 구강편평상피암, 폐암, 식도암 세포주에서 유의성 있는 항암 활성을 나타내었으며, 해당 소분획물은 sesquiterpene, hydrocarbon, phenylpropene 및 diterpene 화합물로 주로 구성되어 있음이 GC-MS 분석을 바탕으로 밝혀졌다.

인용문헌

1. 박종희(2002) 한약백과도감(상), 466-467. 도서출판 신일상

- 사, 서울.
2. 생약학교재편찬위원회(2006) 생약학, 158-160. 동명사, 서울.
 3. Ramalingam, M. and Kim, S. J. (2015) Phytochemical, toxicological and pharmacological studies of *Asiasari Radix et Rhizoma*: A review. *Trop. J. Pharm. Res.* **14**: 545-554.
 4. Lee, W., Kim, H. J., Moon, H. S., Kim, S. N. and Yoon, G. (2013) Screening of Korean traditional prescriptions with inhibitory activity against protein tyrosine phosphatase 1B and analysis of jakgamhwangsinsbu-tang prescription. *Kor. J. Pharmacogn.* **44**: 176-181.
 5. Jeong, M., Kim, H. M., Lee, J. S., Choi, J. H. and Jang, D. S. (2018) (-)-Asarinin from the roots of *Asarum sieboldii* induces apoptotic cell death via caspase activation in human ovarian cancer cells. *Molecules* **23**: E1849.
 6. Kim, E., Kim, H. J., Oh, H. N., Kwak, A. W., Kim, S. N., Kang, B. Y., Cho, S. S., Shim, J. H. and Yoon, G. (2019) Cytotoxic constituents from the roots of *Asarum sieboldii* in human breast cancer cells. *Nat. Prod. Sci.* **25**: 1-4.
 7. Bae, M. S., Shin, J. S., Lee, K. Y., Lee, K. H. and Kim, Y. J. (2014) Long-range transport of biomass burning emissions based on organic molecular markers and carbonaceous thermal distribution. *Sci. Total Environ.* **466-467**: 56-66.
 8. Nolte, C. G., Schauer, J. J., Cass, G. R. and Simoneit, B. R. (2002) Trimethylsilyl derivatives of organic compounds in source samples and in atmospheric fine particulate matter. *Environ. Sci. Technol.* **36**: 4273-4281.
 9. Edris, A. E. (2007) Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytother. Res.* **21**: 308-323.
 10. Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N. and Mnif, W. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *Medicines* **3**: 25.
 11. Blowman, K., Magalhães, M., Lemos, M. F. L., Cabral, C. and Pires, I. M. (2018) Anticancer properties of essential oils and other natural products. *Evid.-Based Complementary Altern. Med.* **2018**: 3149362.
 12. Hashimoto, K., Yanagisawa, T., Okui, Y., Ikeya, Y., Murano, M. and Fujita, T. (1994) Studies on anti-allergic components in the roots of *Asiasarum sieboldii*. *Planta Med.* **60**: 124-127.
 13. Rodríguez-Páez, L., Juárez-Sánchez, M., Antúnez-Solis, J., Baeza, I. and Wong, C. (2003) α -Asarone inhibits HMG-CoA reductase, lower serum LDL-cholesterol levels and reduces biliary CSI in hypercholesterolemic rats. *Phytomedicine* **10**: 397-404.
 14. Yu, C. S., Huang, A. C., Yang, J. S., Yu, C. C., Lin, C. C., Chung, H. K., Huang, Y. P., Chueh, F. S. and Chung, J. G. (2012) Safrole induces G0/G1 phase arrest via inhibition of cyclin E and provokes apoptosis through endoplasmic reticulum stress and mitochondrion-dependent pathways in human leukemia HL-60 cells. *Anticancer Res.* **32**: 1671-1679.
 15. Jiang, S., Ling, C., Li, W., Jiang, H., Zhi, Q. and Jiang, M. (2016) Molecular mechanisms of anti-cancer activities of β -elemene: Targeting hallmarks of cancer. *Anticancer Agents Med. Chem.* **16**: 1426-1434.
 16. Guesmi, F., Prasad, S., Tyagi, A. K. and Landoulsi, A. (2017) Antiinflammatory and anticancer effects of terpenes from oily fractions of *Teucrium alopecurus*, blocker of I κ B α kinase, through downregulation of NF- κ B activation, potentiation of apoptosis and suppression of NF- κ B-regulated gene expression. *Biomed. Pharmacother.* **95**: 1876-1885.
 17. Ferraz, R. P., Cardoso, G. M., da Silva, T. B., Fontes, J. E., Prata, A. P., Carvalho, A. A., Moraes, M. O., Pessoa, C., Costa, E. V. and Bezerra, D. P. (2013) Antitumor properties of the leaf essential oil of *Xylopiya frutescens* Aubl. (Annonaceae). *Food Chem.* **141**: 196-200.
 18. Bhalla, Y., Gupta, V. K. and Jaitak, V. (2013) Anticancer activity of essential oils: a review. *J. Sci. Food Agric.* **93**: 3643-3653.
 19. Malik, F. and Kumar, S. (2015) Sesquiterpenes from essential oils with promising antitumor properties. In de Sousa, D. P. (ed.), *Bioactive essential oils and cancer*, 201-230, Springer International Publishing AG Switzerland.
 20. Li, D., Han, T., Liao, J., Hu, X., Xu, S., Tian, K., Gu, X., Cheng, K., Li, Z., Hua, H. and Xu, J. (2016) Oridonin, a promising *ent*-kaurane diterpenoid lead compound. *Int. J. Mol. Sci.* **17**: 1395.
 21. Ding, C., Ding, Y., Chen, H. and Zhou, J. (2017) Chapter 5 - Chemistry and bioactivity of *ent*-kaurene diterpenoids. In Rahman, A. (ed.) *Studies in natural products chemistry*, 141-197, Elsevier, Amsterdam, Netherlands.

(2020. 9. 14 접수; 2020. 10. 22 심사;
2020. 11. 13 게재확정)