순비기 나무(*Vitex rotundifolia*) 추출 · 분획물 및 화합물의 인체 암세포 증식억제 효과

김유아¹ · 이정임¹ · 김해진¹ · 공창숙² · 남택정³ · 서영완^{1*}

¹한국해양대학교 해양환경 · 생명과학부, ²부경대학교 해양바이오프로세스연구단, ³부경대학교 식품생명공학부

Antiproliferative Effect of Extracts, Fractions and Compound from *Vitex rotundifolia* on Human Cancer Cells

You Ah Kim¹, Jung Im Lee¹, Haejin Kim¹, Chang-Suk Kong², Taek Jeong Nam³, and Youngwan Seo^{1*}

¹Division of Marine Environment & Bioscience, Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea

²Marine Bioprocess Research Center, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

³Faculty of Food Science & Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Received November 2, 2009; Accepted December 1, 2009

Whole plants of *Vitex rotundifolia* were extracted for 2 days with methylene chloride (CH₂Cl₂) followed by extraction of the residue for an additional 2 days. The same procedure was also applied using methanol (MeOH). The two crude extracts were combined and partitioned between CH₂Cl₂ and H₂O. The organic layer was further partitioned between *n*-hexane and 85% aq. MeOH, and the aqueous layer was also further fractionated with *n*-BuOH and H₂O, successively. From the 85% aq. MeOH fraction, one compound was isolated through the repeated HPLC. According to the results of physicochemical data including NMR and MS, the chemical structure of the compound was determined as artemetin (1). The antiproliferative effects of the crude extracts, fractions, and compound against HT1080, AGS, MCF-7 and HT-29 human cancer cells were compared with the control by using MTT assay. In the comparative analysis, the 85% aq. MeOH fraction exhibited the strongest antiproliferative effects on human cancer cell lines in a dose-dependent manner ($p < 0.05$). In addition, exposure of compound 1 isolated from 85% aq. MeOH fraction led to strong antiproliferative effect in HT1080 cancer cell lines. These results suggest that the extracts and compound isolated from *V. rotundifolia* may be used as potential chemopreventive and chemotherapeutic agents.

Key words: anticancer, artemetin, human cancer cells, *Vitex rotundifolia*

현대의학의 발전과 다양한 의약품의 개발에도 불구하고 인류에게 암은 여전히 해결되지 않는 위협 요소로 작용하고 있다. 특히, doxorubicin과 paclitaxel(taxol) 같은 항암제는 부작용이나 내성 등의 부정적인 면을 지니고 있어 이러한 면을 보완할 수 있는 의약품의 지속적인 개발이 요구된다. 최근에 들어서는 합성의약품을 주로 하는 서양의학에 반해 천연물의 약리효과를 근본으로 하는 동양의학에 관심이 높아지고 있다[Doll, 1992]. 하지만 동양의학의 효능을 입증할만한 생리학·천연물화학적 자료의 부족으로 인하여 과학적인 면에서 그 활용도가 부족한 실정이다. 이러한 이유에서 동양의 천연물질로부터 암이나 심

혈관계 질환을 치료하고 예방하려는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 여러 가지 부작용을 줄일 수 있는 천연물 유래의 신규 생리활성물질 개발에 대한 관심이 고조되고 있다[Park과 Pezzuto, 2002; Shur, 2004; Stan 등, 2008].

순비기나무(*Vitex rotundifolia*)는 한국, 일본 등의 곳곳에서 해안가를 따라 분포하는 사구성 열성식물의 일종으로, 이러한 식물은 해수와 민물이 섞이는 독특한 환경에 서식하며 이에 적합한 적응기작을 발전시킴으로써 새로운 신물질 자원으로서 주목받고 있다[Seo 등, 2004; Ng 등, 2004; Kong 등, 2008]. 순비기나무는 입술 모양의 자줏빛 꽃과 전체에 회색빛을 띤 흰색의 잔 털이 있는 것이 특징이며, 한방에서는 그 열매를 만형자(蔓荊子)라고 하여 두통, 안질, 궤병 등의 질병의 치료에 사용한다[Lee, 2002]. Jo 등의 연구[2007]에 따르면 순비기나무 추출물이 HT-29 인체 결장암세포에 대하여 항암 효과가 있는 것으로 확인되었다. 또한 다수의 연구에 의해 flavonoid류 및 terpenoid

*Corresponding author

Phone: +82-51-410-4328; Fax: +82-51-404-3538

E-mail: ywseo@hhu.ac.kr

Scheme 1. Procedure of extraction, fractions and isolation of the compound from *Vitex rotundifolia*.

류의 이차대사산물이 분리된 바 있으며, 이들의 생리활성효과 또한 보고되었다[You 등, 1998; Shin 등, 2000; Ko 등, 2000; Ono 등, 2002; Wang 등, 2005].

본 연구에서는 순비기나무를 이용하여 인체 암세포의 종류에 따른 생리활성효과의 특이성을 파악하고, 생리활성에 의한 발암물질의 생성방지 및 생체방어작용 그리고 더 나아가 항암 생리활성물질 탐색을 위한 기초 연구로서 활용하고자 하였다. 따라서 순비기나무의 추출물 및 용매 분획물을 제조하고 1종의 flavonoid 계열의 화합물을 분리하여 이들에 대한 섬유육종세포(HT1080), 위암세포(AGS), 유방암세포(MCF-7), 결장암세포(HT-29)에 대한 증식억제 효과를 검토하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

순비기나무의 추출·분획 및 분리. 본 연구에 사용한 순비기 나무(*Vitex rotundifolia*)는 2003년 7월 전라남도 무안군 현경면 해안가에서 채집하여 음건한 후 -25°C 에서 냉동 보관하였다. 냉동 보관된 시료(3 kg)는 추출 직전 분쇄한 후, methylene chloride 용매를 이용하여 24시간씩 2회 반복 추출하고, 남은 잔사에 다시 methanol 용매를 가하고 동일과정으로 2회 반복 추

출하여 각각의 용매에 대해서 43.3 g과 102.0 g(총 145.3 g)의 추출물을 얻었다. 두 종류의 용매 추출물을 합한 후에 용매의 극성에 따라 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H_2O 층으로 순차적으로 분획하여 40°C 수욕 상에서 rotary vacuum evaporator (EYELA, N-N series)로 농축하고 각각 33.6, 21.0, 39.0, 47.8 g 얻었다. 85% MeOH 분획물(21.0 g)은 역상크로마토그래피(C_{18} reversed-phase vacuum flash chromatography)를 이용하여 총 6개의 fraction을 얻었으며, 각각에 사용된 용매는 50, 60, 70, 80, 90% aq. MeOH, 및 100% MeOH 이다. Fraction 4는 78% aq. MeOH 및 50% aq. MeCN의 이동상으로 2회에 걸쳐 reversed-phase HPLC하여 화합물 1(25.0 mg)을 분리하였다(Scheme 1). 각각의 추출·분획물 및 화합물은 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 희석하여 일정 농도로 만들어 실험에 사용하였다.

화합물 1 (artemetin): a pale yellow solid; EIMS m/z 388 $[\text{M}]^+$; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 12.6 (1H, s, 5-OH), 7.70 (1H, dd, $J=8.6, 2.0$ Hz, H-6'), 7.65 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-5'), 6.97 (1H, d, $J=8.6$ Hz, H-2'), 6.49 (1H, s, H-8), 3.97 (3H, s, 7-OMe), 3.96 (3H, s, 4'-OMe), 3.95 (3H, s, 3'-OMe), 3.91 (3H, s, 6-OMe), 3.86 (3H, s, 3-OMe); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 178.7 (C, C-4), 158.6 (C, C-7),

Fig. 1. Inhibitory effects of crude extracts from *Vitex rotundifolia* on the growth of human cancer cell lines (A) HT1080, (B) AGS, (C) MCF-7, and (D) HT-29. ^{a-f}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

155.7 (C, C-2), 152.6 (C, C-9), 152.2 (C-5), 151.3 (C, C-4'), 148.7 (C, C-3'), 138.7 (C, C-3), 132.2 (C, C-6), 122.8 (C, C-1'), 122.1 (CH, C-6'), 111.2 (CH, C-5'), 110.8 (CH, C-2'), 106.5 (C, C-10), 90.3 (CH, C-8), 60.9 (CH₃, 6-OMe), 60.2 (CH₃, 3-OMe), 56.4 (CH₃, 7-OMe), 56.1 (CH₃, 4'-OMe), 56.0 (CH₃, 3'-OMe).

사용시약. 세포 배양에 필요한 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM)은 Hyclone사(Logan, UT)에서 구입하였으며, RPMI 1640 medium, fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin, phosphate buffered saline(PBS) 등은 GIBCO사(Grand Island, NY) 제품을 사용하였다. 암세포의 증식억제 효과를 실험하기 위한 시약으로 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]는 Sigma사(St. Louis, MO)로부터 구입하였으며, 그 외의 연구에 사용된 용매는 Junsei사(Tokyo, Japan)의 일급시약을 증류하여 사용하였다.

암세포배양. 본 연구에 사용한 암세포주인 섬유육종세포(HT1080), 위암세포(AGS), 유방암세포(MCF-7), 결장암세포(HT-29)는 한국 세포주 은행(서울의대, 서울, 대한민국)으로부터 분양 받아 배양하면서 실험에 사용하였다. HT1080과 MCF-7 세포는 100 units/mL의 penicillin-streptomycin과 10%의 FBS가 함유된 DMEM medium을 사용하였으며, AGS와 HT-29 세포의 경우, 100 units/mL의 penicillin-streptomycin과 10%의 FBS가 함유된 RPMI 1640 medium을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator(Sanyo, Osaka, Japan)에서 배양하였다. 배양된 각각의 암세포는 2-3일 간격으로 배지를 교환하고 6-7일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

암세포 증식억제 효과 분석. 순비기나무 추출·분획물 및 화합물의 암세포 증식억제 효과 분석은 MTT assay를 이용하여 확인하였다. 생존하는 암세포의 mitochondrial dehydrogenase의 효소작용에 의하여 황색의 수용성 물질인 MTT가 환원되어 보라색의 formazan crystal을 형성하고, formazan crystal의 형성

정도를 흡광도로 측정함으로써 암세포의 사멸 또는 증식억제 정도를 결정할 수 있다[Hansen 등, 1989]. 배양된 암세포는 well당 1×10^5 cells/mL가 되도록 96-well plate에 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후, DMSO에 녹인 각 용매별 추출·분획물 및 화합물을 농도별로 제조하여 암세포주에 처리하였다. 대조군에는 시료 대신 phosphate buffered saline(PBS)를 처리하였으며, 24시간 동안 배양한 후 100 µL의 MTT 용액(1 mg/mL)을 첨가하여 동일한 배양 조건에서 4시간 동안 더 배양하였다[Park 등, 1990]. 생성된 formazan crystal은 100 µL의 DMSO에 녹여서 ELISA reader(Bio-Tek instruments, Winooski, VT)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 암세포 증식억제율(%)을 구하였다.

$$\text{증식억제율(\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

통계처리. 각각의 암세포에 대한 순비기나무의 증식억제 효과 측정 결과는 SAS 9.1.3 통계프로그램(SAS Inc., Cary, NC)에서 ANOVA를 실시한 후, Duncan's multiple range test를 하여 $p < 0.05$ 수준에서 시료 평균간의 유의성을 검정하였다. 모든 실험결과는 3회 이상 실시하여 얻어진 평균(Mean)±표준편차(Standard deviation, SD)로 표시하였다.

결과 및 고찰

순비기나무(*V. rotundifolia*) 추출물의 인체 암세포 증식억제 효과. HT1080, AGS, MCF-7 및 HT-29 세포에 순비기나무의 용매추출물을 10, 50 및 100 µg/mL의 농도로 처리한 결과(Fig. 1), 시료 처리 농도의 증가에 따라 농도 의존적으로 암세포의 증식억제율이 증가하는 경향을 나타내었다. Methanol과 methylene chloride 추출물을 HT1080 세포에 10 µg/mL의 농도로 처리 했을 때에 각각 2.1%와 66.2%의 효과로 추출물의 극

성도에 따라 HT1080 세포의 증식억제율에 차이를 보였다. 동일 세포에 추출물의 농도를 50과 100 $\mu\text{g/mL}$ 으로 하여 처리하였을 경우, methanol 추출물에서 각각 12.1%와 63.8%로 급격히 암세포 증식억제 효과가 증가하는 것을 볼 수 있었다. 또한 methylene chloride 추출물은 동일한 농도 조건에서 각각 94.2%와 94.1%로 methanol 추출물보다 훨씬 뛰어난 억제 효과를 나타내어 추출 용매에 따른 생리활성물질이 추출되는 정도를 추측해 하였다. 이러한 용매에 따른 물질의 이동 성향은 Jo 등 [2007]의 연구에서 기록한 methanol, ethanol, 및 acetone 추출물의 암세포 증식억제 효과와 비교하여 유사하였다. 한편 본 연구에서 사용된 추출 용매가 이전의 연구에서 보다 뚜렷한 효과를 나타냄으로써 물질의 경향을 파악하기에 더 유용하리라 여겨진다.

HT1080 세포의 증식억제 효과를 관찰하였을 때와 같이 AGS 세포의 증식억제 실험에서도 유사한 경향을 확인할 수 있었다. 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 각각의 추출물을 AGS 세포에 처리한 결과, methanol 추출물에서는 각각 19.4, 32.7, 87.6%로 HT1080 세포에 대한 methanol 추출물의 증식억제 효과보다 뛰어났으며, methylene chloride 추출물은 각각 70.8, 90.5, 90.9%로 HT1080 세포의 결과에서와 동일하게 methanol 추출물보다 높은 암세포 증식억제 효과가 관찰되었다. 특히, HT1080과 AGS 세포에 methylene chloride 추출물을 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 낮은 농도로 처리하여도 암세포 증식을 60~70% 이상 억제 시키는 것으로 나타나 그 효과가 주목할 만 하였다.

동일 조건하에서 MCF-7과 HT-29 세포에 두 가지 추출물 시료를 처리한 결과, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 methanol 추출물 농도에서 대조군에 비해 각각 33.5, 36.9% 억제 활성을 나타냈으나, HT1080과 AGS 세포에 대한 결과에는 미치지 못하였다. MCF-7과 HT-29 세포에 methylene chloride 추출물을 동일 농도에서 처리한 경우에는 각각 84.0, 81.3%로 HT1080과 AGS 세포의 결과보다는 약하지만 추출 용매의 극성에 따른 효과는 뚜렷이 관찰되었다. 순비기나무 추출물의 HT-29 세포주에 대한 세포 생존율, 세포 독성 및 형태학적 특성은 Jo 등[2007]에 의하여 우수하게 검토되어 보고된 바 있으나, 본 연구를 통해 HT-29 세포에 추출물을 처리한 결과보다 더 선택성이 우수한 암세포주가 있음을 확인할 수 있었다.

전반적으로 순비기나무의 methanol과 methylene chloride 추출물을 4종의 암세포에 처리한 결과, 모든 세포에서 methylene chloride 용매 추출물이 높은 활성을 나타내었으며, Hernández 등[1999]의 각종 암세포에 대한 추출물의 연구 결과와도 유사하였다. 이는 각각의 용매 추출물 내에 존재하는 여러 생리활성 물질들 중에 비교적 극성이 덜한 성분들이 암세포의 증식억제에 영향을 미치는 것으로 예상되었다.

순비기나무(*V. rotundifolia*) 분획물의 인체 암세포 증식억제 효과. 순비기나무 추출물에서와 유사하게 분획물의 암세포 증식억제효과 또한 HT1080 세포와 AGS 세포에서 높게 나타났다. HT1080 세포에 순비기나무 용매 분획물을 농도별(10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하여 암세포 증식억제 정도를 확인한 결과 (Fig. 2), 85% aq. MeOH 층이 대조군에 비해 각각 74.0, 93.3, 93.8%의 강력한 암세포 증식억제 효과를 나타내었으며,

Fig. 2. Inhibitory effects of solvent fractions (A) H₂O (B) *n*-BuOH (C) 85% aq. MeOH and (D) *n*-hexane from *Vitex rotundifolia* on the growth of HT1080 human fibrosarcoma cells. ^{a-d}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

Fig. 3. Inhibitory effects of solvent fractions (A) H₂O (B) *n*-BuOH (C) 85% aq. MeOH and (D) *n*-hexane from *Vitex rotundifolia* on the growth of AGS human gastric cancer cells. ^{a-d}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

n-hexane 층은 각각 24.3, 38.4, 94.2%의 암세포 증식억제 효과를 나타내었다. 특히, 85% aq. MeOH 층은 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 저농도 시료 처리 결과가 약 74%의 억제 효과를 나타내는 특징을 보였다. H₂O 층과 *n*-BuOH 층의 경우, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 고농도에서 각각 42.1, 64.0%의 억제율을 보여 다른 분획물에 비해 암세포 증식억제에 약한 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 이는 Jo 등[2007]에서 가장 높은 효과를 보여주었던 *n*-hexane 층보다도 우수한 암세포 증식억제 효과로서 본 연구의 분획법이 순비기나무의 유용성분을 분리하기에 더 적절함을 의미한다.

분획물에 대한 AGS 세포의 암세포 증식억제 효과는 HT1080 세포의 처리 결과와 유사한 경향을 나타냈다(Fig. 3). 특히, 85% aq. MeOH 층은 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 시료 처리 농도에서 암세포 증식억제율이 각각 79.9, 90.8, 91.6%로 농도의존적으로 우수한 암세포 증식억제 효과를 보였다. 또한 동일 농도 하에서 *n*-hexane 층은 각각 26.8, 65.6, 90.9%의 효과를 보여

Fig. 4. Inhibitory effects of solvent fractions (A) H₂O (B) *n*-BuOH (C) 85% aq. MeOH and (D) *n*-hexane from *Vitex rotundifolia* on the growth of MCF-7 human breast cancer cells. ^{a-d}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

Fig. 5. Inhibitory effects of solvent fractions (A) H₂O (B) *n*-BuOH (C) 85% aq. MeOH and (D) *n*-hexane from *Vitex rotundifolia* on the growth of HT-29 human colon cancer cells. ^{a-d}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

HT1080 세포의 결과를 뒷받침하였다. 또 한 가지 주목할 사항은 AGS 세포에서는 100 µg/mL의 시료 처리 농도의 H₂O와 *n*-BuOH 층에서도 53.2, 84.2%의 높은 억제율을 보여 AGS 세포에 탁월한 효과를 보이는 생리활성 물질이 존재할 것으로 예상되었다.

동일 조건하에서 각각의 순비기나무 분획물을 10, 50 및 100 µg/mL의 농도로 MCF-7 세포에 처리하고 증식억제 효과를 확인한 결과(Fig. 4), 다른 인체 암세포와 같이 85% aq. MeOH 층에서 가장 높은 암세포 증식억제 효과를 가짐을 확인 할 수 있었으며, 억제율은 농도의존적으로 나타나 각각 45.0, 77.3, 90.9%였다. *n*-hexane 층에서는 100 µg/mL의 처리 농도에서 50% 이하의 효과를 보였으며, 그 외의 다른 층에서는 동일 농도에서 약 25%의 약한 억제 효과를 나타냈다.

순비기나무 용매 분획물의 인체 암세포에 대한 증식억제효과를 HT-29 세포에서 확인한 결과(Fig. 5), 85% aq. MeOH 층

Compound 1. (artemetin)

Fig. 6. Chemical Structure of compounds 1 isolated from *Vitex rotundifolia*.

과 *n*-hexane 층에서 가장 뛰어난 효과를 보이며, 100 µg/mL의 시료 처리 농도에서 각각 82.7%와 81.3%로 다른 세포에서와 유사한 경향이 나타났다. 뒤이어 *n*-BuOH과 H₂O 층이 동일 농도에서 각각 41.8%와 29.0%의 약한 활성을 보여 Jo 등[2007]의 결과와 유사하였다.

따라서 순비기나무 조추출물의 암세포 증식억제에 영향을 미치는 생리활성 물질들이 용매 분획에 의해 85% aq. MeOH 층으로 이동함을 확인 할 수 있었으며, 10 µg/mL의 낮은 농도에도 HT1080과 AGS 세포에서 각각 74.0%와 79.9%의 탁월한 증식억제효과를 보임을 관찰할 수 있었다. 이는 Kawaii 등 [1999]의 연구에서 보고된 각종 암세포에 대한 단일 물질의 효과와 상응하는 결과로 암세포 증식억제 효과가 가장 뛰어난 85% aq. MeOH 용매 분획물에서 활성성분의 분리 및 정제가 가능할 것으로 여겨졌다.

순비기나무(*V. rotundifolia*) 화합물의 인체 암세포 증식억제 효과. 분획물의 생리활성 결과를 바탕으로 순비기나무의 85% aq. MeOH 분획물에서 flavonoid 계열의 화합물 1종을 분리하였으며 분광학적 방법과 문헌 조사를 통하여 artemetin으로 알려진 화합물임을 확인할 수 있었다[Inuma 등, 1980; Rahman 등, 1988; Ahmad 등, 1995; Yoshioka 등, 2004](Fig. 6). 식물 성장인자로 알려진[Yoshioka 등, 2004] artemetin은 polymethoxy-flavonoid류의 화합물로 myeloid leukemia 세포주에 대한 증식억제 효과가 보고된 바 있다[Ko 등, 2000]. 또한 유사한 flavonoid 계열의 화합물에서 다양한 세포주에 대한 세포독성, 암세포 증식억제 효과, 및 항산화 효과가 검토된 바 있기에[Hirobe 등, 1997; Kawaii 등, 1999; Sadhu 등, 2006] 본 연구에서는 화합물 1을 이용한 다양한 인체 암세포 증식억제 효과를 검토하고자 하였다.

HT1080, AGS, MCF-7, HT-29 세포에 화합물을 1, 5, 10, 25, 50 µM의 농도로 처리한 결과(Fig. 7), 농도의존적으로 암세포 증식억제 효과를 보여주었으며, 특히 HT1080 세포에서 그 경향이 뚜렷하게 나타났다. 그 효과는 농도별로 27.2, 27.6, 44.3, 47.7, 51.5%로 확인되었으며 50 µM의 시료 처리 농도에서 50% 이상의 강한 암세포 증식억제 효과를 보여 항암제인 doxorubicin(IC₅₀=33.2±3.5)에 상응하는 결과를 보여주었다. 50

Fig. 7. Inhibitory effects of compounds 1 from *Vitex rotundifolia* on the growth of human cancer cell lines (A) HT1080, (B) AGS, (C) MCF-7, and (D) HT-29. ^{a-d}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

µM의 농도로 AGS, MCF-7, HT-29 세포에 화합물을 처리한 결과는 각각 28.2, 26.0, 10.2%의 효과를 보였으나 HT1080의 효과에는 미치지 못하였다.

Kawaii 등[1999]에 의하면 다수의 methoxyl기를 가지는 flavonoid가 다양한 인체 암세포에 대하여 증식억제 효과와 세포사멸 효과가 있으며, 이러한 효과는 flavonoid의 B 고리의 ortho-catechol 부분, C2-C3의 이중결합, 그리고 A 고리의 3-hydroxyl과 8-methoxyl기가 중요한 역할을 한다고 하였다. 반면에 Ko 등[2000]은 flavonoid의 A 고리에 3-methoxyl기를 지니면서 C-8에 side-chain이 없는 화합물에서도 암세포 증식억제 효과가 나타났으며, 특히 B고리의 3'-hydroxyl기 대신 3'-methoxyl기가 치환된 화합물은 그 활성이 약해지는 것으로 확인되었다. 본 연구에서 분리된 화합물 1의 암세포 증식억제 효과는 C2-C3의 이중결합과 3-methoxyl기 등에 의한 것으로 사료되며, 3'-methoxyl기 등에 의하여 그 효과가 감소된 것으로 사료된다. 그럼에도 불구하고 화합물 1은 강한 암세포 증식억제 효과를 보였으며, 특히 여러 암세포 중 HT1080에 특이적으로 작용하는 것으로 여겨진다.

추후 강한 암세포 증식억제 효과를 보이는 분획물의 지속적인 연구를 통하여 유사한 계열의 화합물, 특히 AGS 세포에 대하여 강한 활성을 띄는 화합물을 추가로 분리할 수 있을 것으로 사료된다. 더 나아가 순비기나무 추출물 및 화합물을 이용한 유전자 단계 혹은 *in vivo* 단계의 생리활성 검증을 통해 항발암 활성을 가진 건강기능성 식품 및 의약품으로서의 개발이 기대되어지며, 염생식물 중에서 식용 및 약용으로의 가치성을 인정받고 있는 함초, 나문재, 갯방풍 등과 함께 새로운 생리활성물질 소재군으로서의 가치를 기대해본다.

초 록

본 연구에서는 염생식물의 한 종인 순비기나무의 추출 · 분획물 및 화합을 이용하여 항발암성 및 생체방어 물질로서의 유

용성을 검토하고자 4종의 인체 암세포(HT1080, AGS, MCF-7 및 HT-29)에 대한 증식억제 효과를 검토하였다. 추출물에 대한 암세포 증식억제능 측정 결과, 10, 50 및 100 µg/mL의 시료 처리 농도에서 농도 의존적으로 암세포의 생존율이 감소하는 경향을 확인하였으며, 모든 세포주에 대하여 methanol 추출물 보다 methylene chloride 추출물이 뛰어난 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 따라서, 물질의 극성도에 따른 암세포 증식억제능을 확인하고자 추출물을 순차적으로 용매 분획하여 H₂O, *n*-BuOH, 85% aq. MeOH 및 *n*-hexane의 네 가지 분획층을 얻었으며, 추출물과 동일한 조건하에서 암세포 증식억제 효과를 재검토하였다. 그 결과, 비교적 극성이 덜한 85% aq. MeOH 분획층에서 우수한 암세포 증식억제능이 확인되었다. 100 µg/mL의 농도에서 85% aq. MeOH 분획층의 시료를 처리한 결과 HT1080, AGS, MCF-7 및 HT-29 세포는 각각 93.8, 91.6, 90.9% 그리고 82.7%의 강력한 억제 효과를 나타내었으며, 낮은 농도의 시료(10 µg/mL)를 처리한 결과에서도 HT1080과 AGS 세포에서 주목할 만한 억제효과를 보여 주었다. 생리활성 결과를 바탕으로 85% aq. MeOH 분획층의 분리를 통해 1종의 화합물을 분리할 수 있었으며, artemetin으로 알려진 화합물로 확인되었다. 분리된 화합물의 암세포 증식억제 효과를 확인해 본 결과 HT1080 세포에 선택적으로 효과를 보임을 확인하였으며, 그 효과는 항암제인 doxorubicin에 상응하는 결과였다. 따라서 본 연구를 통해 염생식물 순비기나무의 각종 인체 암세포에 대한 높은 증식억제 효과와 함께 암예방을 위한 기능성 소재로서의 개발 가능성이 확인되었다. 추후 순비기나무의 85% aq. MeOH 분획층 및 분리된 화합물에 대한 집중적인 연구를 통해 새로운 생리활성물질의 개발이 기대되어진다.

Key words: anticancer, artemetin, human cancer cells, *Vitex rotundifolia*

감사의 글

본 연구는 국토해양부 해양생명공학사업의 해양바이오프로세스연구단 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- Ahmad VU, Khan MA, Baqai FT, and Tareen RB (1995) Santoflavone, a 5-deoxyflavonoid from *Achillea santolina*. *Phytochemistry* **38**, 1305-1307.
- Doll R (1992) The lessons of life. *Cancer Res* **52**, 2024S-2029S.
- Hansen MB, Nielsen SE, and Berg K (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* **119**, 203-210.
- Hernández MM, Heraso C, Villarreal ML, Vargas-Arispuro I, and Aranda E (1999) Biological activities of crude plant extracts from *Vitex trifolia* L. (Verbenaceae). *J Ethnopharmacol* **67**, 37-44.
- Hirobe C, Qiao ZS, Takeya K, and Itokawa H (1997) Cytotoxic flavonoids from *Vitex agnus-castus*. *Phytochemistry* **46**, 521-524.
- Iinuma M, Matsuura S, and Kusuda K (1980) ¹³C-Nuclear magnetic resonance (NMR) spectral studies on polysubstituted flavonoids. I. ¹³C-NMR spectra of flavones. *Chem Pharm Bull* **28**, 708-716.
- Jo KJ, Yoon MY, Lee MR, Cha MR, and Park HR (2007) The anticancer effect of extracts from *Vitex rotundifolia* on human colon carcinoma cell lines. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **50**, 228-232.
- Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, and Yano M (1999) Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**, 896-899.
- Ko WG, Kang TH, Lee SJ, Kim NY, Kim YC, Sohn DH, and Lee BH (2000) Polymethoxyflavonoids from *Vitex rotundifolia* inhibit proliferation by inducing apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Food Chem Toxicol* **38**, 861-865.
- Kong CS, Yeom YR, Lee JI, Kim YA, Lee JS, and Seo Y (2008) Inhibition effects of extracts and its solvent fractions isolated from *Limonium tetragonum* on growth of human cancer cells. *Korean J Biotechnol Bioeng* **23**, 177-182.
- Lee YN (2002) In *Flora of Korea*, p 241, Kyo-Hak Publishing Co. Ltd., Seoul, Korea.
- Ng TB, Liu F, and Wang HX (2004) The antioxidant effects of aqueous and organic extracts of *Panax quinquefolium*, *Panax notoginseng*, *Codonopsis pilosula*, *Pseudostellaria heterophylla* and *Glehnia littoralis*. *J Ethnopharmacol* **93**, 285-288.
- Ono M, Yanaka T, Yamamoto M, Ito Y, and Nohara T (2002) New diterpenes and norditerpenes from the fruits of *Vitex rotundifolia*. *J Nat Prod* **65**, 537-541.
- Park EJ and Pezzuto JM (2002) Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer Metast Rev* **21**, 231-255.
- Park JG, Frucht H, LaRocca RV, Bliss DP, Kurita Y, Chen TR, Henslee JG, Trepel JB, Jensen RT, Johnson BE, Bang YJ, Kim JP, and Gazdar AF (1990) Characterization of cell lines established from human gastric carcinoma. *Cancer Res* **50**, 2773-2780.
- Rahman AU, Ahmed D, Choudhary MI, Turkoz S, and Sener B (1988) Chemical constituents of *Buxus sempervirens*. *Planta Med* **54**, 173-174.
- Sadhu SK, Okuyama E, Fujimoto H, Ishibashi M, and Yesilada E (2006) Prostaglandin inhibitory and antioxidant components of *Cistus laurifolius*, a Turkish medicinal plant. *J Ethnopharmacol* **108**, 371-378.
- Seo Y, Lee HJ, Kim YA, and Park KE (2004) Antioxidative effect of glasswort (*Salicornia herbacea*) extract from Daebudo. *Proceeding of Current Biotechnology and Bioengineering* **10**, 1-7.
- Shin TY, Kim SH, Lim JP, Suh ES, Jeong HJ, Kim BD, Park EJ, Hwang WJ, Rye DG, Baek SH, An NH, and Kim HM (2000) Effect of *Vitex rotundifolia* on immediate-type allergic reaction. *J Ethnopharmacol* **72**, 443-450.
- Shur YJ (2004) Cancer chemopreventive effects of dietary phytochemicals. *J Korean Assoc Cancer Preven* **9**, 68-83.
- Stan SD, Kar S, Stoner GD, and Singh SV (2008) Bioactive food components and cancer risk reduction. *J Cell Biochem* **104**, 339-356.
- Wang HY, Cai B, Cui CB, Zhang DY, and Yang BF (2005) Vitexicarpin, a flavonoid from *Vitex trifolia* L., induces apoptosis in K562 cells via mitochondria-controlled apoptotic pathway. *Yao Xue Xue Bao* **40**, 27-31.
- Yoshioka T, Inokuchi T, Fujioka S, and Kimura Y (2004) Phenolic compounds and flavonoids as plant growth regulators from fruit and leaf of *Vitex rotundifolia*. *Z Naturforsch* **59**, 509-514.
- You KM, Son KH, Chang HW, Kang SS, and Kim HP (1998) Vitexicarpin, a flavonoid from the fruits of *Vitex rotundifolia*, inhibits mouse lymphocyte proliferation and growth of cell lines *in vitro*. *Planta Med* **64**, 546-550.