

항암성 천연물 및 그 유사체(XI)

한약재 및 민간약의 L1210세포에 대한 세포독성

이 정 형 · 강 석 균* · 안 병 준

충남대학교 약학대학 · 대전 한방병원*

Antineoplastic Natural Products and the Analogues (XI)

Cytotoxic Activity against L1210 Cell of Some Raw Drugs from the Oriental
Medicine and Folklore

Jeong Hyung Lee, Suck Kyun Kang* and Byung Zun Ahn

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 300-31 and

*Taejon Hospital of the Oriental Medicine, Taejon 300, Korea

Abstract—Forty herbal drugs which are described to have potential antitumor activity were solvent-fractionated with petroleum ether, ether and ethyle acetate in sequence. The cytotoxic activity was mostly shown in the ether fraction(40.54%) and petroleum ether fraction (35.15%), but scarcely in the water phase (10.8%), meaning that most of the active components had less polar property. Twenty-seven percent of the drugs tested were active, which is higher value than 10.4% of the random sampled drugs. The drugs possessing the ED₅₀ values less than 10 μ g/ml were the roots of *Lithospermum erythrorhizon*, *Curcuma domestica*, *Salvia miltiorrhiza*, *Astragalus membranaceus* and *Scutellaria indica*, the leaves of *Panax ginseng*, *S. indica* and *Liriodendron tulipifera*, the barks of *Picrasma ailanthoides* and *Rhus vernifera*, the herbs of *Agrimonia pilosa* and *Siegesbeckia pubescens* the seeds of *Tricosanthes kirilowii*, *P. ailanthoides*, and the stem of *P. ginseng*.

Keywords—Herbal drugs · L1210 cell · cytotoxicity

본 연구는 한방과 민간에서 암 또는 그 유사체에 대하여 효과가 있다고 주장되고 있는 생약 또는 야생동식물을 그 대상으로 하고있다. Hartwell등¹⁾은 민간에서 사용하는 항암식물 226종을 대상으로 스크리닝을 행하였던바 그중 19.9%에 해당하는 생약이 유효하다고 보고하였다. 이 수치는 Spjut등²⁾이 무작위 스크리닝하여 얻은 10.4%보다 높다. 유 등³⁾은 한방에서 백혈병 및 유사질환에 사용되었다고 주장되는 약재를 모아 마우스 백혈세포인 L1210세포에 대하여 그 성장 저지효과를 관찰하였는데 유효하다고 생각되는 생약이 18.2%라고 보고하였다. 이 수치는 무작

위 스크리닝의 경우보다 높고 Hartwell의 그것에 접근하고 있다.

장 등⁴⁾은 34종의 생약을 선택, 이들의 AC glioma에 대한 항암성 및 세포독성을 관찰하였던 바, 사용한 식물중 독활, 구기자, 음양각, 길경, 황금, 종대황 및 적하수오가 유의한 항암작용을 나타낸다고 하였고 뚜렷한 세포독성을 나타내는 식물은 없다고 하였다. 이 보고중의 항암성 식물의 빈도는 20.5%로 전술한 수치보다 높다.

저자들은 한국의 전통한방과 민간으로 부터 제보받은 생약에 대하여 그 항암성을 확인하고

흥미 있는 대상에 대하여는 구체적인 약화학적 연구를 행하고 있다.

본 보고는 현재까지 행한 스크리닝의 방법과 결과, 그리고 이들 중 이미 약화학적 연구가 진행된 것도 있는데 그 결과에 대하여도 기술한다

재료 및 방법

1. 생 약

대진소재 건재상으로 부터 양질의 약재를 구입하여 확인후 사용하였다.

2. 시약 및 기구

사용한 시약은 모두 EP, GR급이며 추출용매도 시약급을 사용하였다. 공업용용매인 경우, 3차증류분을 사용하였다.

Incubator는 동양과학제품이고, 세포배양용

screw cap tube 및 bottle은 Kimax사 제품을 사용하였다. 모든 유리기구는 cleaning solution에 1일 이상 담근후, 상수, 1, 2, 3차증류수 순으로 세척한 다음 멸균하여 사용하였다.

3. 배양액의 조제

1L의 비커에 3차증류수 800ml를 가하고 자석 교반기로 교반한다. 여기에 한봉지의 Fischer씨 배지(10.5g, 1L용), 말혈청 100ml, 증조 1.125g, 페니시린 10만 단위, 스트렙토마이신 100mg을 차례대로 가하여 용해시킨 다음 0.1-N HCl로 pH 7.2가 되게 조정하고 전량이 1L가 되게 3차증류 수를 가한다. 이액을 세균여과하여 냉장고에 보관하면서 사용하였다.

4. L1210세포의 유지 및 배양

DBA/2 생쥐의 백혈병세포인 L1210세포는 한국과학원으로부터 분양받았다. 세포는 둥글고,

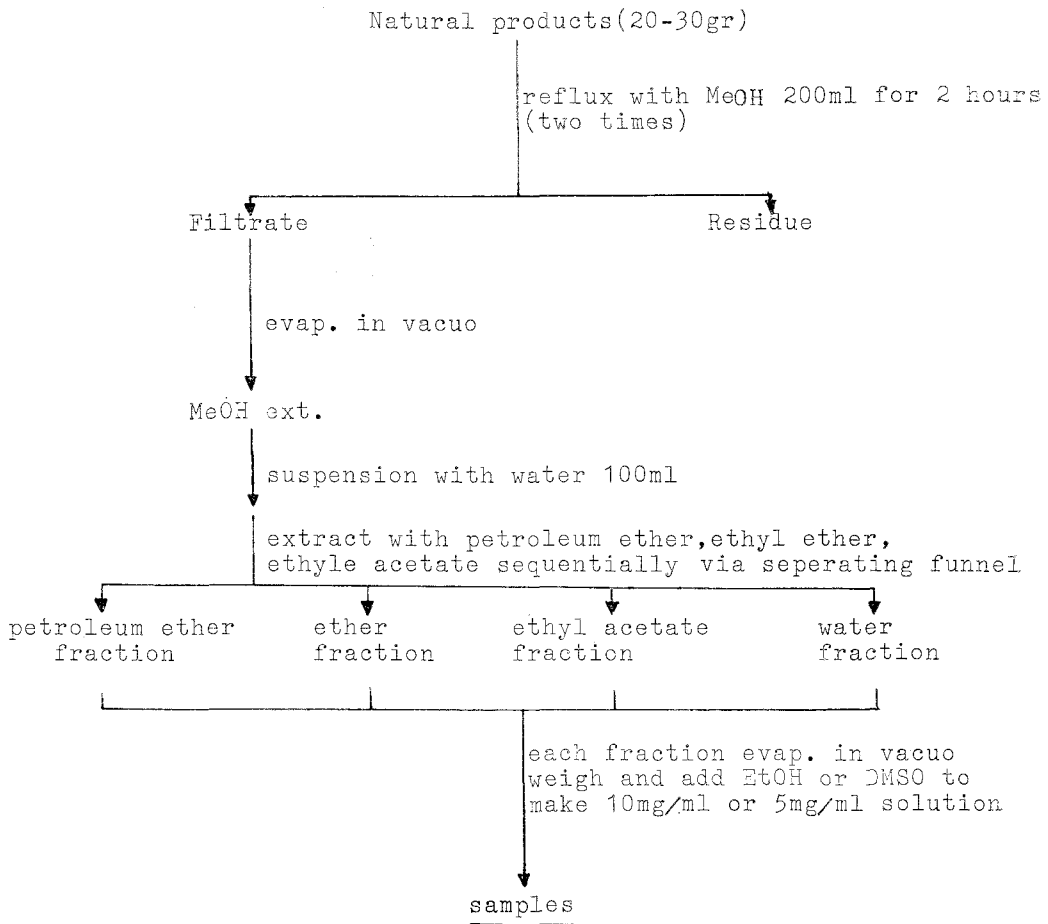


Fig. 1. Preparation of samples

이분법으로 성장하며 12~18시간의 doubling time 을 갖고있다. 배양액이 들어있는 screw cap tube 에서 1주일에 2회 계대배양하여 유지하였다.

5. 시료의 조제

생약 20~30g을 세말로 하여 후라스크에 넣고 메탄올 200ml 씩으로 환류하면서 2회 추출하였다. 추출액은 합한 후 메탄올을 감압하에 제거한 후 증류수 100ml를 가하여 현탁시키고 분액 여두에 넣어 석유에테르, 에테르 및 초산에칠의 순으로 추출하였다. 유기용매 및 물을 제거하여 석유에테르 분획, 에테르 분획, 초산에칠 분획 및 수용 분획을 얻었다. 각 분획을 평량하여 에탄올에 용해시켜 10mg/ml용액이 되게하였다. 에탄올 난용물은 dimethylsulfoxide를 용매로 사용하였다. 세포독성이 강한물질은 5mg/ml의 용액으로 하였다(fig. 1).

6. 세포독성실험⁵⁾

세포의 농도를 $2 \times 3 \times 10^5$ /ml배지가 되게 조정 한 후 24시간 배양하면 logarithmic phase에도달 한 세포가 $0.8 \sim 1.0 \times 10^6$ cells/ml배지의 농도로 자란다(spinner culture).

실험하기 직전에 37°C로 가온된 배지로 위의 spinner culture를 희석하여 5×10^4 cells/ml배지로 한다(run bottle).

시료 0.1ml와 배지 0.9ml를 cap tube에 가지고 잘 혼합한 후 100 μ l, 50 μ l, 20 μ l씩을 떨어내어 두개씩의 screw cap tube에 가한다. 이들로 채워진 screw cap tube 및 대조군 tube(갯수 : $2\sqrt{n}$, n=시료수)에 run bottle의 세포현탁액 5ml씩을 가하고 잘흔들어 준다. 이들을 배양기에 넣고 37°C에서 48시간 배양한다.

배양된 각 시험관내의 세포수는 hemacytometer로 계산하였다. ED₅₀값은 대조군의 50%수준으로 L1210세포의 성장을 억제하는 시료의 농도이다.

이 값을 구하는 과정을 올금의 석유에테르 추출물을 예로하여 구체적으로 기술하기로 한다.

성장을 Y(%)는 다음과 같이 구한다.

$$Y(\%) = (T - C_0) / (C - C_0) \times 100$$

이때 T는 48시간 배양후 작용량에 대한 1ml 당평균세포수, C는 48시간 배양후 대조군의 1ml 당 평균세포수, C₀는 배양시작시 ml당 평균세포수이다. 계산한 Y%값이 모두 55%보다 크든지

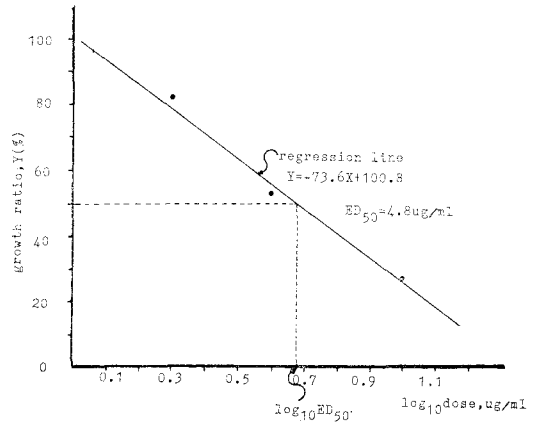


Fig. 2. ED₅₀ determination of petroleum ether fraction of *Curcuma domestica*.

45%보다 작으면 시료의 농도를 재조정하여야 한다. 올금의 석유에테르 액기스의 농도를 log₁₀ dose값으로 표시하고 이에 대응하는 Y(%)값을 계산해 보면 1 μ g/ml에서 27.2%, 0.6 μ g/ml에서 53.21% 그리고 0.3 μ g/ml에서 81.72%였다. log dose값을 X축으로하고 성장을 Y(%)을 Y축으로하여 최소자승법으로 회귀직선을 얻고 그 방정식을 도출하면 $Y = -73.6X + 100.8$ 이 된다. Y = 50%로 놓고 $X = \log_{10} ED_{50}$ 를 구하고, ED₅₀값을 계산하면 4.8 μ g/ml가 된다(fig. 2).

결과 및 고찰

각 생약을 석유에테르, 에테르, 초산에칠로 차례대로 추출한 후 남은 물층과 더불어 건조 액기스를 만들고 이들 각각의 L1210세포에 대한 세포독성을 측정하였다(Table I). 여기서는 ED₅₀ 값이 20이하이면 활성이 있다고 판정하였다.

유 등이 사용한 바와 같은 screening system을 사용하였으므로 그들이 선택하였던 약제는 제외시켰다. 그들은 몇가지 약제를 제외하고는 약제의 알콜액기스의 효과를 보았는데 이 경우 알콜에 용출되어 나오는 물질의 양 즉 액기스의 수율에 따라 ED₅₀값이 달라진다. 그러므로 실제상 유효한데도 불구하고 활성을 놓칠 가능성이 크다. 본 실험에서 용매분획을 세분화한 이유는 활성성분을 한 용매에 축적하여 작용강도를 높임으로써 활성생약의 탐색에 있어서 확실성을 기하자는 데에 있다.

Table I. ED₅₀ values of drug extracts

Scientific name	ED ₅₀ (μ g/ml)			
	P.E	E	E.A	W
<i>Lithospermum erythrorhizon</i> (Rh, 차근)	10	10	>20	10
<i>Agrimonia pilosa</i> (H, 선학초)	>20	>20	20	10
<i>Rumex japonicus</i> (R, 양제)	20	>20	—	>20
<i>Curcuma domestica</i> (R, 울금)	5	10	>20	>20
<i>Arisaema amurense</i> (Rh, 천남성)	>20	20	>20	>20
<i>Tropa bispinosa</i> (F, 마름)	>20	>20	>20	>20
<i>Asparagus cochinchinensis</i> (R, 철문둥)	15	>20	>20	>20
<i>Akebia quinata</i> (L, 목통)	>20	>20	>20	>20
<i>Trogopterium xanthipes</i> (Fc, 오령지)	>20	>20	>20	>20
<i>Tricosanthes kirilowii</i> (S, 팔루인)	>20	>20	10	>20
<i>Lonicera japonica</i> (Fl, 금은화)	>20	>20	15	>20
<i>Batrytis bassiana</i> (B, 떡강잠)	20	>20	>20	>20
<i>Pharbitis nil</i> (S, 견우자)	>20	>20	20	10
<i>Salvia miltiorrhiza</i> (R, 단삼)	10	15	>20	>20
<i>Rhus vernicifera</i> (C, 칠피)	>20	>20	10	>20
<i>Scutellaria indica</i> (R, 한신초)	10	>20	>20	>20
<i>Scutellaria indica</i> (Fo, 한신초)	>20	10	>20	>20
<i>Picrasma ailanthoides</i> (F, 고목)	>20	5	5	20
<i>Picrasma ailanthoides</i> (C, 고목)	>20	10	>20	>20
<i>Poncirus trifoliata</i> (RF, 지각)	20	>20	>20	>20
<i>Poncirus trifoliata</i> (UF, 지실)	15	10	>20	>20
<i>Euonymus alatus</i> (C, 귀전우)	>20	>20	>20	>20
<i>Scolopendra subspinipes</i> (B, 지네)	>20	>20	>20	>20
<i>Albizia julibrissin</i> (C, 함환피)	>20	20	20	>20
<i>Albizia julibrissin</i> (Fo, 함환엽)	>20	>20	>20	>20
<i>Miscanthus sinensis</i> (H, 망경)	>20	>20	>20	>20
<i>Acorus calamus</i> (Rh, 창포)	20	>20	>20	>20
<i>Campsis grandiflora</i> (Fl, 능소화)	>20	>20	>20	>20
<i>Hedyotis diffusa</i> (H, 백화사설초)	>20	>20	>20	>20
<i>Buthus maritensi</i> (B, 전갈)	>20	>20	>20	>20
<i>Morus bombycis</i> (RC, 상백피)	>20	20	>20	>20
<i>Panax ginseng</i> (St, 인삼)	10	15	5	>20
<i>Panax ginseng</i> (Fo, 인삼)	20	10	>20	>20
<i>Astragalus membranaceus</i> (R, 황기)	>20	20	10	>20
<i>Magnolia officinale</i> (C, 후박)	>20	>20	>20	>20
<i>Liriodendron tulipifera</i> (Fo, 목백합)	10	5	>20	>20
<i>Siegesbeckia pubescens</i> (H, 희침)	15	10	>20	>20
<i>Russula nigricans</i> * (Mycelia)	20			
<i>Boletus poroporus</i> * (Mycelia)	>20			
<i>Russula</i> spp.* (Mycelia)	20			

P.E: Petroleum ether fraction, E: Eher fraction, E.A: Ethyle Acetate fraction, W: Water fraction Rh: Rhizoma, H: Herba, R: Radix, F: Fructus, L: Lignum, FC: Faeces, S: Semen, FL: Flos, B: Body, C: Cortex, FO: Folium, UF: Unriped Fructus, RF: Riped Fructus, RC: Radicis Cortex, St: Stem *: MeOH extract was tested

전체 생약에 대한 유효액기스의 활성빈도를 보면 석유에테르액기스 35.15%, 에테르액기스 40.54%, 초산에칠액기스 25%, 수용분 10.8%로 에테르층이 가장 높으며 물층이가장 적다. 말하자면 조사한 식물들의 세포독성 성분은 극성인 것보다 비극성인 것이 훨씬 많다. 에테르액기스층의 유효물질은 다소간 극성이나 대다수가 물에 용해되지 않은 페놀류, 중성 질소화합물등일 것으로 추측되며 초산에칠액기스는 분자량이 큰 페놀 및 질소화합물, 그리고 분자량이 적은 배당체들이 함유되어 있을 것이다.

한 생약의 여러 용매분획이 세포독성을 나타내는 경우, 용매분획이 엄격히 진행되었다면, 극성이 다른 여러종의 활성물질을 함유하고 있다는 것을 뜻한다. 자근, 단삼, 인삼줄기, 전학초, 저실이 여기에 속한다. 석유에테르에 추출되어 나오는 물질들은 정유, 탄화수소등 극성이 낮은 물질이 주축을 이룰것이므로 세포독성물질의 탐색을 위하여도 이들 물질군에 역점을 두어야 할 것이다.

활성생약의 빈도는 27.89%로서 전술한 수치들 보다 높다. 유 등의 빈도 보다 높은 주된 이유는 세분화된 용매분획에 있을 것이다. 이들 대상 생약중 부분적이며 그 항암성물질이 분리된 것은 인삼근, 울금, 자근, 팔루근, 목백합이다.

백합의 석유에테르 추출물이 암세포에 대하여 강한 세포독성을 나타낸다는 사실은 이미 알려졌다.⁶⁻⁹⁾ 최근 저자들은 이 석유에테르 추출물로부터 세포독성물질을 분리 구조를 동정하였던바, panaxydol임이 밝혀졌다. 이 물질은 L1210 세포에 대하여 0.03 μ g/ml의 강한 ED₅₀값을 나타내었다.^{10,11)} 인삼의 줄기 및 잎에서도 세포독성물질이 함유되어 있음을 확인하였다. 이들 물질의 TLC상의 성질이 다른 것으로 보아 각각 다른 물질을 함유하고 있었을 뿐만 아니라 panaxydol과도 같지 않았다. 또한 홍삼도 강한 세포독성을 나타내나 panaxydol의 함량은 미량이다. 홍삼의 경우 석유에테르에 추출되지 않는 분획에도 작용이 나타나는 것으로 보아 이에는 panaxydoli의 다른 항암성분이 함유되어 있음을 알수 있다.

자근은 색소물질인 naphthazarine계 화합물을

함유하는 식물로, 이들 중 shikonine은 S-180암에 걸린 생쥐의 수명을 90%연장한다고 되어있다.¹²⁾ 저자들은 이 식물로부터 L1210세포에 대하여 세포독성을 나타내는 acetylshikonin을 분리하였다.¹³⁾

울금은 붕출(*Curcuma zedoaria*)에 비하여 사용빈도가 적은 항암생약이다. 붕출로부터 분리한 항암물질은 curcumol, curdione이라고 보고되어있다.¹⁴⁾ 연구자들은 울금으로부터 L1210세포에 독성을 나타내는 β -sesquiphellandrene과 그의 작용을 증가시키는 ar-turmerone을 분리한바 있다.¹⁵⁾

저실의 메탄올액기스는 S-180암에 걸린 ICR 마우스의 수명을 26%연장시켰고 또 이 액기스 중에는 L1210세포에 대하여 세포독성을 갖는 3개의 물질이 함유되어 있음을 확인하였다. 이들 중 한물질을 분리하여 그 구조를 동정하였던 바 7-geranyloxy coumarin임이 밝혀졌다.¹⁶⁾

목백합은 미주 동북부에 자라는 목본인데 국내에서는 가로수용으로 이용되고 있다. 충남대 학구내의 관상수로 사용되는 나무로 부터 잎을 채취하여 L1210세포에 대한 독성실험을 행하였던 바 강력한 독성을 보였다. 이 식물로부터는 KB세포에 대하여 세포독성을 보이는 germacranolide계 물질이 함유되어 있음이 보고되었다.¹⁷⁾

한신초의 뿌리가 세포독성을 나타내고 있는데 그 작용물질은 식물화학적으로 파서 황금의 항암성분인 skullcapflavone II¹⁸⁾와 같은지 유사하리라 추측하였으나 잎의 석유에테르 추출물이 작용을 보이고 있어서 잎의 작용물질은 후라본이 아닐 가능성이 크다.

장 등⁴⁾의 결과에 따르면 황금이 AC glioma에 대하여 항암성을 보이고 있는데 그 성분이 L1210암에 대하여 작용을 보였던 skullcapflavone II¹⁸⁾와 동일물질인지를 규명하는 것은 흥미있는 일일 것이다. 저자들은 팔루근의 추출물이 L1210 세포 및 그 암, 그리고 S-180암에 대하여도 강한 작용을 보이고 있음을 발견하였다.¹⁹⁾ 그러나 이 식물이 AC glioma에 대하여 유의한 작용을 보이지 않고 있다. 이는 암종에 따라 작용여부가 달라지는 항암성물질의 일반적 성질이 하나라고 생각된다.

선학초의 항암성분은 ellagic acid계 탄닌임이 1986년 일본학자들에 의하여 밝혀졌다.²⁰⁾ 기타 백화사설초, 능, 단삼, 황기 등이 항암성을 보이고 있으나 이에 대한 약화학적 연구는 되어있지 않다.

결 론

한방과 민간에서 제보받은 생약 40종을 석유 에테르, 에테르, 초산에칠로서 차례로 추출하여 용매분획을 행한 후 각 분획의 L1210세포에 대한 세포독성을 관찰하였던 바 다음과 같은 사실을 발견하였다 :

1. 에테르 엑기스가 40.54%로서 가장 높은 작용빈도를 나타내었고, 용매추출후 남은 물층은 11.1%로서 가장 낮았다.

2. 대상생약에 대한 활성생약의 비는 27.89%로서 무작위 screening의 10.4%, 유등의 18.4%, Hartwell의 19.9%보다도 높았다.

3. ED₅₀의 값이 10 μ g/ml 이하인 생약은 자근, 울금, 인삼줄기, 인삼잎, 선학초, 단삼, 고목, 목백합, 회철, 한신초, 팔루인, 황기, 칠피이다
(1986년 8월 5일 접수 : 10월 26일 수리)

文 獻

- Hartwell, J.L.: *Lloydia* 30, 379 (1967); 34, 386 (1971).
- Spjut, R.W. and Perdue, R.E.: *Cancer Treatment Reports* 60, 979 (1976).
- Ryu, S.H., Moon, K.H. and Pack, M.Y.: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioen.* 10, 53 (1982).
- 장 일무, 지 형준 : 생약학회지, 13, 55 (1982).
- Thayer, P.S., Himmelfarb, P. and Watt, G.L.: *Cancer Chemoth. Rep.* 2, 1 (1971).
- Hwang, W.I. and Cha, S.M.: in *Proc. of 2nd International Ginseng Symposium 1978*, publ. by Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon 300-31, Korea, p. 43.
- Woo, L.K., Nakamura, Y. and Donat, L.: *Arch. Ital. Patol. Clin. Tumori* 8, 53 (1965).
- Oura, H., Hiai, S., Odaka, Y. and Nabetan, A.: *The 9th Herb Medicine Symposium*, p. 34.
- Gong, T.H. and Lee, W.Y.: *Archives of Dong Kook University* 18, 221 (1979).
- Ahn, B.Z. and Kim, S.I.: *Arch. Pharm. Res.* 8, 283 (1985).
- Ahn, B.Z. and Kim, S.I.: *Proc. 3rd Korean-Japan Seminar and 5th Symposium on Organic Chemistry 1986*, Taejon 300-31, Korea, p. 169.
- Sankawa, U., Ebizuka, Y., Miyajaki, T., Isomura, Y., Otsuka, H., Shibata, S., Inomata, M., Fukuoka, F.: *Chem. Pharm. Bull.* 25, 2392 (1977).
- 연구 중간 결과
- Lien, E.J. and Li, W.Y.: *Advances in Chinese Medicinal Materials Research* ed. by Chang, H. W., Yeung, H.H., Tso, W.W. and Koo, A. p. 433.
- 연구 중간 결과
- Kang, K.S., and Ahn, B.Z.: *Arch. Pharm. Res.* 8, 187 (1985).
- Raymond, W.D., Stanley, L.K. J.R., Charles, D. H. and Farouk, S. El-F.: *Phytochemistry* 14, 769 (1975).
- Ryu, S.H., B.Z. Ahn and Pack, M.Y.: *Planta Medica* 355 (1985).
- 이유희, 강석균, 안병준 : 약학회지, 30, 193 (1986).
- Koshura, R., Miyamoto, K., Iketani, Y. and Taguchi, H.: *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP* 60, 255, 727 (1985); *C.A.* 104, 155996u (1986).