

## Acetylshikonine 및 합성 Naphthazarin 유도체의 L1210 및 S-180 암에 대한 항암효과

김 현 · 안병준

충남대학교 약학대학

(Received June 12, 1990)

### Antitumor Effects of Acetylshikonine and some Synthesized Naphthazarins on L1210 and S-180 Systems

Hyun Kim and Byung-Zun Ahn

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

**Abstract**—Acetylshikonine, isolated from the root of *Lithospermum erythrorhizon* showed a strong cytotoxic activity ( $ED_{50} = 0.10 \text{ ug/ml}$ ) against L1210 cell and  $T/C = 182\%$  in ICR mice bearing S-180 at a dose of 5 mg/kg.

Administrations of 10 mg/kg and 15 mg/kg reduced the T/C values to 60 and 77% respectively. Higher doses reveal toxicity. Seven naphthazarin derivatives synthesized showed good cytotoxic activities against L1210 cell. Especially, naphthazarin and hydronaphthazarin have strong activities ( $ED_{50} = 0.05 \text{ ug/ml}$  for both). Naphthazarin showed a severe toxic effect on ICR mice bearing S-180; no significant toxic effect was observed at a dose of 1 mg/kg or 2 mg/kg, but a severe toxicity ( $T/C = 23\%$ ) by administration of 5 mg/kg. Alkylation of C-2 of naphthazarin is necessary for reducing the toxic effect on ICR mice bearing S-180.

**Keywords** □ Acetylshikonine, some synthesized naphthazarins, L1210, S-180 systems, lithospermum erythrorhizon, antitumor effect.

자근(*Lithospermum erythrorhizon*의 뿌리)은 한방에서 주로 양혈, 청혈, 해독의 목적으로 사용되고 있다. Sankawa 등<sup>1,2)</sup>은 자근의 색소물질인 Shikonine 류가 항암작용을 보인다는 사실을 보고한 바 있다. 최근 이 등<sup>3)</sup>은 자근의 석유에테르 추출물이 L1210 세포에 대하여 세포독성을 나타낸다고 보고하였다. 본 실험에서는 L1210 세포독성 시험과 연계하여 자근으로부터 세포독성 물질을 분리하고, 이 물질의 S-180 복수암에 대한 효과를 관찰하였고, 나아가서는 이 물질과 유사한 구조를 갖는 물질을 합성하여 그들의 구조와 L1210 세포독성간의 관계를 정립하고자 시도하였다.

#### 실험방법

시약 및 기기—합성원료는 시중에서 판매되는 유명회사 제품을 사용하였다. 크로마토그래피용 용매는 시중의 시약용 용매를 구입하여 재정제하여 사용하였고, 생약추출용 용매로는 공업용 용매를 두번 증류한 것을 사용하였다.

NMR-Spectra는 Varian Model EM-360 FT-80 spectrophotometer 를, IR-Spectra는 Perkin-Elmer Model 783 spectrophotometer 를, 그리고 UV-Spectra는 Pye Unicam PU 8800 spectrophotometer 를 사용하여 얻었다.

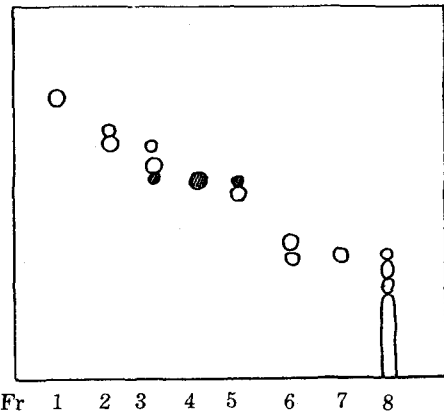
**Table I**—Cytotoxicities of fractions from the root of *Lithospermum erythrorhizon* on L1210 cells.

Fractions	ED <sub>50</sub> (μg/ml)
Methanol extract	>20.0
Petroleum ether extract	10.5
Ethyl ether extract	11.0
Ethyl acetate extract	>20.0
Water extract	10.0

**L1210 세포의 배양, 유지 및 세포독성 시험**—L1210 세포는 말혈청으로 보강된 Fischer's medium에서 배양한다. 일정한 세포농도가 되게 조절한 후 이를 screw capped tube에 가한 다음 실험군과 대조군으로 나눈다. 실험군에 물질의 여러 농도를 가하고 48시간 배양 후 대조군에 대한 세포의 성장비를 산출하여 세포독성을 결정한다. 자세한 조작은 문헌<sup>3)</sup>을 참조하기 바란다.

**자근으로부터 세포독성 물질의 분리**—대전시내 건재상으로부터 구입한 자근 100g을 분쇄하고 여기에 메탄올 300 ml를 가하고 2시간 환류한 후 추출액을 얻는다. 동일량의 메탄올로 다시 한번 추출한 후 추출액을 합한다. 메탄올을 제거하고 남은 연조액기스(약 10g)는 증류수 100 ml에 현탁시킨 후 percolator에 가하고 석유에테르, 에테르, 초산에 칠 순으로 추출하였다. 석유에테르 용분, 에테르 용분, 남아있는 물층에서 세포독성이 나타났다(Table I).

에테르 용분을 축적할 목적으로 분쇄한 자근 1000g을 Soxhlet 장치에 가하고 에테르로 72시간 추출하였다. 용매는 24시간마다 교환하였다. 추출용매를 제거한 후 20g의 흑자색 건조 잔사를 얻었다. 이를 Silica gel 칼럼(3×40 cm)에 넣고 벤젠/아세톤(99.5:0.5)로써 분획하여 8개의 분획을 얻었다(Fig. 1). Table II에서 볼 수 있는 바와 같이 분획 3에서 7까지는 모두 강한 세포독성을 나타내고 있다. 우선 이들 분획 중 단일 반점을 나타내는 분획 4(Fig. 1, Rf=0.65)의 물질을 분리하였다. 건조한 분획 4를 메탄올 0.8 ml에 용해시키고 여기에 증류수 0.2 ml를 가한 다음 가온하여 맑게 용해시킨 다음 섭씨 4도에 방치하여 결정을 얻었다. 한번 더 재결정하였다(약 50 mg, 고찰에서 기술되는 바

**Fig. 1**—Thin layer chromatogram of the chromatographic fractions from root of *Lithospermum erythrorhizon*

Adsorbent: silicagel 60. Solvent: benzene/acetone (9:5:0.5). Visualization: in I<sub>2</sub> vapor.

**Table II**—Cytotoxicities of chromatographic fractions from ethyl ether extract of *Lithospermum erythrorhizon* on L1210 cells.

Fractions	ED <sub>50</sub> (μg/ml)
Fr. 1	>20.0
Fr. 2	>20.0
Fr. 3	<1.0
Fr. 4	<1.0
Fr. 5	<1.0
Fr. 6	<1.0
Fr. 7	<1.0

와 같이 이 물질은 기지 물질이므로 그 화학적, 물리적 성질을 여기에서 언급하지 않았음.)

**Sarcoma 180 암에 걸린 ICR 마우스에 대한 생명 연장효과 관찰**—S-180 세포는 ICR 마우스의 복강내에서 주 1회 계대배양하면서 유지하였다. 마우스의 복강으로부터 S-180 세포를 얻어 정제하고 세포 10만개씩을 복강에 이식한다. 이식 24시간 후부터 약물을 1일 1회 연속 7일간 복강 주사한다. 28일째에 약물처리군의 비교군에 대한 생존비인 T/C 값을 계산하였다. 자세한 방법은 문헌<sup>4)</sup>를 참조하기 바란다.

**물질의 합성**—Naphthazarin 및 hydronaphthazarin... Zahn 등의 방법<sup>5)</sup>

Tetraacetoxynaphthalene·alkanine leucoacetate의 합성방법<sup>6)</sup>

Acetylnaphthazarin··· Paull 등의 방법<sup>7)</sup>

Naphthazarindimethylether··· Bruce의 방법<sup>8,9)</sup>

Ethlylnaphthazarin··· Brockmann의 방법<sup>10)</sup>에 의하였고 Propylnaphthazarin은 Brockmann의 ethlylnaphthazarin의 방법을 응용하여 합성하였다. Quinazarin은 Organicum<sup>11)</sup>의 방법에 따라 합성하였다.

### 결과 및 고찰

자근의 L1210 세포독성 물질—실험에서 언급하였던 바와 같이 자근의 메탄올 엑기스를 물에 현탁시킨 후 석유에테르, 에테르, 초산에틸로 차례로 추출하여 해당 분획을 얻었다. 각 분획의 L1210 세포에 대한 독성을 Table I에 나타내었다. 메탄올 엑기스 자체는 ED<sub>50</sub>값 20 μg/ml 이상이므로 실제로 유의한 세포독성권내에는 속하지 않는다. 그러나 용매 분획 후 작용물질은 석유에테르층과 에테르, 그리고 물층에 집중되어 있음을 볼 수 있다. 더구나 세포독성 물질은 에테르 정도의 극성을 가진 용매에 용해될 수 있는 정도의 비교적 약한 극성물질과 초산에틸에 용출되지 않고 물층에 용존해 있을 정도의 강한 극성을 갖고 있음을 이 데이터로부터 쉽게 알 수 있다. 석유에테르 및 에테르에 용해되는 물질을 동시에 다량 얻기 위하여 자근을 에테르만으로 추출하였다. 여기서 얻은 에테르 엑기스를 silica gel 칼럼에서 분획하여 7개의 분획을 얻었다(Table II). 이들 분획을 박층에 전개시켰던 결과를 Fig. 1에 표시하였다. 이 그림에서 볼 수 있듯이 분획 4는 한 개의 반점을 보이고 있어서 그 처리가 간단할 것으로 생각하였다. 이 분획을 메탄올과 물의 혼합용매계에서 재결정한 바 순수 자색결정을 얻었다. 이 결정성 물질의 ED<sub>50</sub>값은 0.10 μg/ml였다. 이 물질의 자외선, 적외선, 그리고 핵자기 공명스펙트럼은 이미 자근에서 분리된 acetylshikonine의 그것<sup>12,13)</sup>과 조금의 차이도 보이지 않았다. 그러므로 이 세포독성 물질은 acetylshikonine임이 확인되었다. 이 물질은 또 *Alkana tinctoria* 부터도 분리된 바 있다.<sup>14)</sup>

Naphthazarin 유도체들의 L1210 세포에 대한

Table III—Cytotoxicities of naphthazarins on L1210 cells.

Compounds	ED <sub>50</sub> (μg/ml)
Naphthazarin	0.05
Acetylnaphthazarin	0.10
Naphthazarin dimethyl ether	0.12
Ethlylnaphthazarin	0.15
Propylnaphthazarin	0.15
Hydronaphthazarin	0.05
Tetraacetoxynaphthalene	0.20
Quinazarin	5.70
Acetylshikonine	0.10

세포독성—Acetylshikonine의 구조는 naphthazarin계 화합물에 속한다. 그러므로 naphthazarin의 구조를 기본으로 하는 일련의 물질을 합성하여 그들의 세포독성을 관찰해 본다는 것은 흥미있는 일이라 생각된다.

Table III에 합성한 물질의 세포독성을 acetylshikonine의 그것과 같이 나타내었다. 열거한 9개의 naphthazarin 유도체 중 naphthazarin 자신과 hydronaphthazarin이 모두 ED<sub>50</sub>값이 0.05 μg/ml로 가장 강한 세포독성을 나타내었다. 이 사실만으로도 naphthazarin 유사체 중 이들 두 물질이 세포독성을 나타내기 위한 기본구조가 된다고 말할 수 있다. 상당히 강한 세포독성을 나타내는 tetraacetoxynaphthalene (ED<sub>50</sub>=0.20 μg/ml)은 hydronaphthazarin의 enol acetate임을 알 수 있다. 이 물질은 세포내에서 가수분해되어 hydronaphthazarin으로 변화된 후 세포독성 작용에 임한다고 추측할 수 있다. Naphthazarin 자신도 실제로는 세포내에서 2번 및 3번탄소가 수소화되어 화학적으로 보다 유연한 hydronaphthazarin으로 변화된 뒤 작용을 한다고 생각할 수 있다. 2번 및 3번탄소가 막혀있는 quinazarin은 비교적으로 약한 세포독성을 보이고 있는데 이 사실이 위의 가정을 더욱 정당화 해준다고 볼 수 있을 것이다. 기타 측쇄들은 세포내로의 물질운반기전과 관계되는 것으로 생각되며 세포독성을 위한 기본구조는 아닌 것으로 생각된다.

Acetylshikonine 및 naphthazarin의 S-180 암에 대한 효과—Table III에 표시한 세포독성 물질

**Table IV**— Effect of the i.p. administration of acetylshikonine on the life span of ICR mice bearing S-180

Dose (mg/kg)	Mean survival days	T/C (%)	S.A.*
0	18.4	100	0
5	33.5	182	2
10	11.2 (toxic)	60	0
15	14.1 (toxic)	77	0

S.A.\*: No. of the survived mice after 40 days

중 강한 작용을 보이는 acetylshikonine 과 naphthazarin 을 택하여 동물실험을 실시하였다. 실험 암으로는 비교적 쉽게 실험할 수 있는 Sarcoma-180 암을 사용하였다. 이 암세포를 ICR 마우스에 복강 주사하여 복수암을 형성시키고 비교군에 대하여 약물투여군의 생명연장효과를 관찰하였다. 그 결과를 Table IV와 V에 표시하였다.

Table IV에 보면 acetylshikonine 의 투여량은 5 mg/kg, 10 mg/kg 그리고 15 mg/kg 으로 하였는데 5 mg/kg 을 투여한 군에서 S-180 에 걸린 생쥐의 생명연장 효과가 T/C=182%로 가장 좋았다. 약물투여군 8마리 중 관찰기간인 40일 이상을 생존하는 쥐가 두 마리로 그 중 한 마리는 45일간, 다른 한 마리는 84일간 생존하였다. 약물을 계속 투여하면서 완전 치유율을 관찰하려 하였으나 한정된 물질량 때문에 가능하지 않았다. 그런데 투여량을 2배(10 mg/kg) 및 3배(15 mg/kg)로 올리면 생존비는 각각 60%와 77%로 떨어진다. 이는 이 물질이 생체독성을 보이고 있음을 증거하고 있다. 그러므로 투여량 5 mg/kg 을 기준으로 투여량을 정하여 투여량의 유효범위를 확정할 필요가 있다고 생각된다.

Table V에는 naphthazarin 의 S-180 암에 대한 작용을 표시하였다. 이 물질의 투여량 1 mg/kg 및 2 mg/kg 에서 생존비는 각각 105% 및 116%로 인정할만한 효과를 관찰할 수 없었다. 그러나 투여농도를 5 mg/kg 으로 상승시키면 평균 수명이 4일로 떨어져 강한 생체독성을 나타내었다.

구조를 비교하여 보면 acetylshikonine 은 naphthazarin 구조를 기본으로 하고 있으며 전자는 naphthazarin 의 탄소 2에 지방족 측쇄를 결합하고 있는 점이 다른 점이다. Naphthazarin 은 L1210 세포에 대하여 acetylshikonine 보다 훨씬 강한 세

**Table V**— Effect of the i.p. administration of acetylshikonine on the life span of ICR mice bearing S-180

Dose (mg/kg)	Mean survival days	T/C (%)
0	19.0	100
1	20.3	107
2	22.1	116
5	4.3 (toxic)	23

포독성을 갖고 있었으며, S-180 암에 걸린 ICR 마우스에 대하여도 강한 생체독성을 나타내었다. Sankawa<sup>1,2)</sup> 등은 shikonine 과 그 유도체의 S-180 복수암에 걸린 ICR 마우스에 대한 생명연장효과를 관찰한 바 T/C 값 192.5%임을 보고하였다. 이 값은 acetylshikonine 의 T/C=182%와 큰 차이를 보이지 않는다. 이는 결국 acetylshikonine 의 작용구조는 shikonine 임을 말해준다.

Lin 등<sup>13)</sup>은 2-alkyl benzoquinone 및 naphthoquinone 류의 항암기전을 생체내에서 중간체로 생성된 quinone methide 의 핵산 또는 Coenzyme Q enzyme 에 대한 알킬화능력이라고 설명하였다. 그러나 그들의 실험은 Coenzyme Q enzyme 저지작용을 명백하게 해주고 있으나 항암기전을 잘 설명해 주지 못하고 있다. 본 실험의 결과에서 보는 바와 같이 측쇄를 갖고 있지 않는 naphthazarin 류들이 세포독성 및 항암성을 나타내는 점으로 보아 quinone methide 의 알킬화작용의 다른 항암기전이 존재하고 있음이 분명하다.

Zee-Cheng 등<sup>14)</sup>은 몇 가지 naphthazarin 유도체를 합성하여 P388 및 사람의 상피암(epidermoid carcinoma) 세포에 대한 항암성을 관찰하였다. 이들 중 naphthazarin diacetate 는 사람의 상피 carcinoma 세포에 대하여 ED<sub>50</sub>=1.8 μg/ml 로서 강한 세포독성을 보였다. 그러나 L1210 및 P388 세포에 대하여는 작용이 없었다고 하였다. 이 결과는 본 실험에서 naphthazarin diacetate 가 L1210 세포에 대하여 ED<sub>50</sub>=0.10 μg/ml 의 강한 세포독성을 나타내고 있는 점과 대조적인 것이다.

Naphthazarin 은 adriamycin, daunomycin 등 실용화되고 있는 tetracyclinone 계 항암제의 기본 구조를 이루고 있다. 이들은 모두 핵산합성저지 작용을 갖고 있다. 특히 두드러진 작용은 핵산 헬릭스

형성을 저지하는 intercalating 작용이다. 그러나 이와 같은 작용은 이들 구조 중 daunosamine 등 아미노 당부분을 제거하면 나타나지 않는다.<sup>16)</sup> 그러므로 intercalating 효과를 위하여는 아미노당의 존재가 필수적이다. 이러한 현상으로 미루어 보면 단순 naphthazarin 류의 항암기전은 intercalating 과는 다른 것임에 틀림없다.

앞에서 hydronaphthazarin 이 L1210 세포독성의 기본구조일 것으로 가정하였다. 그렇다면 naphthazarin 의 탄소 2에 지방족 측쇄를 갖는 acetylshikonine 등은 그 측쇄로 인하여 naphthazarin 핵의 탄소 2, 3번이 hydronaphthazarin 으로 환원되는데 소요되는 시간 때문에 naphthazarin 에 비하여 세포독성 및 생체독성이 급격히 발현되지 않는 것으로 생각할 수 있다. 이와 같은 시간적 지연이 암세포에 대하여 선택적 독성을 나타내게 하는 원인이 될지도 모른다.

## 문 헌

- 1) Sankawa, U., Ebizuka, Y., Miyazaki, T., Isomura, Y., Otsuka, H., Shibata, S. and Inomata, M.: Antitumor activity of shikonine and its derivatives. *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 2392 (1977).
- 2) Sankawa, U., Otsuka, H., Kataoka, Y., Yoichi, I., Akio, H. and Kazuo, K.: Antitumor activity of shikonine, alkanine and their derivatives. *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 166 (1981).
- 3) 이정형, 강석균, 안병준: 한약재 및 민간약의 L1210 세포에 대한 세포독성. *생약학회지* **17**, 286 (1986)
- 4) Ryu, S.H., Ahn, B.Z. and Pack, M.Y.: Antitumor activity of skullcapflavone II. *Arch. Pharm. Res.*, **8**, 253 (1985).
- 5) Zahn, K. and Ochwat, P.: Constitution and mode of reaction of polynuclear polyhydroxyquinones. Naphthazarin and quinazarin. *Ann.* **462**, 72 (1928).
- 6) Shukla, Y.N., Tandon, J.S., Bhakuzi, D. S. and Dhar, M.M.: Naphthoquinones of *Arnebia nobilis*. *Phytochemistry*, **10**, 1905 (1971).
- 7) Paull, K.D., Zee-Cheng, R.K.Y. and Cheng, C.C.: some substituted naphthazarins as potential anticancer agents. *J. Med. Chem.*, **10**, 337 (1976).
- 8) Bruce, B. and Thomson, R.H.: Quinones V. the chemistry of naphthazarins. *J. Chem. Soc.*, 1088 (1955).
- 9) Brass, K., Pfluger, R. and Honsberg, K.: Mit einem Beitrag zur Chemie des Naphthazarins. *Ber.*, **69**, 87 (1936).
- 10) Brockman, H. and Muller, K.: Synthesis of alkanans and other alkynaphthazarins. *Ann.*, **540**, 51 (1939).
- 11) Hazzard, B.J.: ORGANICUM, academic press (1973).
- 12) Singh, I., Ogata, R.T., Moore, R.EE., Chang, C.W.J. and Scheuer, P.J.: electronic spectra of substituted naphthoquinones. *Tetrahedron*, **24**, 6053 (1968).
- 13) Papageorgious, V.P.: Proton NMR-spectra of naturally occurring isohexylnaphthazarin pigments. *Planta Med.*, **37**, 185 (1979).
- 14) Papageorgious, V.P., Winkler, A., Sagredos, A.N. and Digenis, G.A.: Studies on the relationship of structure to antimicrobial properties of naphthoquinones and other constituents of *Alkana tinctoria*. *Planta Med.*, **35**, 56 (1979).
- 15) Lin, A.J., Cosby, L.A., Shansky, C.W. and Sartorelli, A.C.: Potential bioreductive alkylating agents. 1. Benzoquinone derivatives. *J. Med. Chem.*, **15**, 1247 (1972).
- 16) Pigram, W., Fuller, W. and Hamilton, L.D.: *Nature New Biol.*, **234**, 78 (1971).