

생약으로부터 항암성분의 검색 및 분리(I)

박 신 영 · 김 진 응
서울대학교 약학대학

Screening and Isolation of the Antitumor Agents from Medicinal Plants (I)

Shin-Young Park and Jinwoong Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract—The cytotoxic activity of medicinal plants was screened using A549 human lung cancer cell line. Plant materials were extracted with 80% methanol and fractionated to chloroform and water layers. Each methanol, chloroform, and water extract of thirty-two medicinal plants was tested for cytotoxic activity in A549 cell culture system and the cell viability was measured by SRB assay.

Keywords—Screening • medicinal plants • A549 • cytotoxic activity • SRB assay

화학요법제를 이용한 악성 종양의 치료는 외과적 수술, 방사선요법과 함께 항암 요법의 중요한 분야를 차지하고 있다. 현재 사용되고 있는 60여종의 항암제는 증식속도가 빠른 혈액암 세포의 경우 상당한 치료효과를 보이는 반면 증식속도가 느린 고형암세포에 대해서는 뚜렷한 효과를 보이고 있지 못하는 한계를 가지고 있으며, 암세포외에 분열이 빠른 골수세포등도 파괴시키는 등의 부작용을 수반하므로 새로운 항암제의 개발이 요청되고 있는 현실이다. 따라서 최근에는 기존 항암제의 임상적 시도와 더불어 새로운 항암제 개발을 위한 전임상 시험방법 확립을 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다.¹⁾

전통의학 정보를 이용하여 천연물로부터 신의 약품을 개발하는 것은 오랜동안 축적되어온 임상 경험을 바탕으로 하기 때문에 많은 가능성을 가지고 있다. 현재 임상에서 사용하고 있는 항암제 중 천연물로부터 유도된 것으로는 *Catharanthus* alkaloid 및 유도체인 vinblastine, vincristine, vindesine, podophyllotoxin 유도체인 etoposide, teniposide가 있으며, 임상시험중인 것으로는 ellipticine, homoharringtonine, taxol 등을 들 수

있다.²⁾

우리나라에서도 천연물로부터 항암제를 개발하려는 노력이 지속되어 왔다. 즉, 장일무 등이 AC glioma cell system (9ASK)에서 생약의 항암작용을 검색³⁾ 및 P388 cell을 이용하여 생존 증감을 지표로한 *in vivo* 실험을 실시하였으며⁴⁾, 안병준 등이 L1210 세포 독성 시험을⁵⁻⁷⁾, 강운호 등이 NK세포파괴 능력실험⁸⁾을 실시하는 등 다양한 실험방법을 이용한 연구가 행하여졌다. 그러나 이러한 실험방법은 leukemia 이외의 다른 암세포에 특이적으로 작용하는 항암제를 알아내지 못하는 단점이 있다.⁹⁾ 최근에는 leukemia 이외의 고형암에서도 사용될 수 있는 항암제를 개발하고자 하는 연구에 초점이 모아지고 있으며, 기존의 방법은 적절한 screening model이 될 수 없다는 견해가 있다.¹⁰⁾ 이에 따라 1985년 부터 NCI는 P388 cell line을 이용한 *in vivo* 일차 검색에서 탈피하여 *in vitro* 일차 검색에 주력하게 되었다.¹¹⁾ 이를 위하여 NCI는 다양한 human tumor cell line을 이용한 검색법 확립에 많은 노력을 기울였고 1988년 60가지의 cell line을 제시하였다.¹²⁾ *In vivo*에 비하여 *in vitro* 검색은

여러 종류의 human tumor에 대해 비교적 저렴한 가격에 빠른 검색이 가능하며 따라서 human solid tumor에 대해 효과적인 약물을 찾아 내기가 용이하다. 이는 천연물로 부터 활성물질의 검색에 매우 유리한 점이라 할 수 있다.¹³⁾

세포수 측정에 널리 사용되고 있는 MTT assay¹²⁾는 신속하고 재현성있는 결과를 얻을 수 있으나 pH 변화에 매우 민감하고 반응 종말점이 분명치 않으며¹⁴⁾ 또한 cell line의 종류와 culture age에도 영향을 받는다는 것이 단점으로 대두되어 왔다.¹⁵⁾ 최근에 이러한 단점을 보완하며 보편적으로 사용할 수 있는 SRB assay법이 개발되었다.¹⁶⁾

본 실험에서는 고휘암에 효과적인 항암제를 찾기 위한 연구의 일환으로서 human lung cancer인 A549 cell culture system에서 32종의 생약 활성을 검색하였다.

실험 방법

재료—본 실험에서 사용된 식물은 경동시장, 광덕산, 광릉, 천마산, 울릉도, 서울대학교 부속 약초원 등에서 구입 또는 채집하였다. 각 식물을 음건후 세절, 초음파 추출기를 이용하여 80% MeOH로 추출하여 MeOH엑스를 조제하였고, 그 일부를 CHCl₃ 및 H₂O로 분획하여 CHCl₃ 및 H₂O 엑스를 조제하였다.

시료의 조제—각각의 엑스를 MeOH 혹은 10% DMSO에 녹여 1mg/ml로 만들었고, 이것을 단계별로 희석하여 최종농도가 100 µg/ml, 20 µg/ml, 4 µg/ml이 되도록 하였다.

세포배양—A549 cell을 5% heat-inactivated calf serum이 포함된 RPMI 1640 media에서 37°C, 5% CO₂, 100% relative humidity의 조건 하에서 배양하였다. 4일 마다 계대배양을 실시하였으며 이때 3 ml의 0.05% trypsin-EDTA용액을 사용하였다.¹⁷⁾

세포독성 검정—96 well plate에 식물 엑스를 4 replicate로 넣어준 다음 log phase에 있는 cell을 10×10,000cells/ml의 농도로 맞추어 medium과 같이 200 µl씩 넣어주었다. 각 plate에는 식물 엑스를 넣지 않은 것을 대조군으로 포함하였고

back ground level (media 자체내의 protein에 의한 흡광도)을 결정하기 위해 media도 포함시켰다.¹⁸⁾ 48시간 배양후 생존 세포수를 SRB assay로 결정하였다.¹⁷⁾

SRB assay—반응이 끝난 plate의 각 well에 50% TCA 50µl씩 넣어준 후 4°C에서 1시간 방치하여 세포를 고정하였고 증류수로 5회 세척하여 공기중에서 건조시켰다. 각 well에 0.4% SRB (wt/vol in 1% acetic acid) 용액 100µl씩 넣어 30분간 반응후 1% acetic acid로 5회 세척하고 공기중에서 건조시켰다. 고정 세포에 붙어있는 SRB를 70 µl의 10 mM Trizma base(pH 10.5)로 녹인 후 ELISA reader를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

32종의 식물 추출물의 A549 cell에 대한 50% 성장 저해 농도는 Table I과 같다. 본 실험에서는 32종 생약의 human lung cancer cell인 A549 cell line에 대한 항암활성을 검색한 바, 시호,

Table I. Cytotoxic activity of medicinal plants against A549 cell

식물명, 학명, 사용부위	Extract ^{a)}	ED ₅₀ ^{b)}
방풍 <i>Siler divaricatum</i> 근	M	>100
	C	>100
	H	>100
구릿대 <i>Angelica dahurica</i> 근	M	>100
	C	>100
	H	>100
복분자 <i>Rubus coreanus</i> 열매	M	>100
	C	>100
	H	>100
시호 <i>Bupleurum falcatum</i> 근	M	>100
	C	41.7
	H	43.3
오배자 <i>Rhus japonica</i> 별레집	M	53.8
	C	55.5
	H	85.9
오수유나무 <i>Evoidia officinalis</i> 미숙과실	M	>100
	C	68.2
	H	>100
지모 <i>Anemarrhena asphodeloides</i> 근경	M	>100
	C	40.6
	H	>100
감초 <i>Glycyrrhiza uralensis</i> 근	M	>100
	C	>100
	H	>100

식물명, 학명, 사용부위	Extract ^{a)}	ED ₅₀ ^{b)}
삼백초	M	>100
<i>Saururus chinensis</i>	C	>100
전초	H	>100
삼주	M	>100
<i>Atractylodes japonica</i>	C	>100
뿌리줄기	H	>100
건부자	M	>100
<i>Aconitum carmichaeli</i>	C	95.5
괴경	H	>100
대황	M	>100
<i>Rheum undulatum</i>	C	>100
뿌리줄기	H	>100
일활련	M	>100
<i>Coptis japonica</i>	C	>100
근경	H	>100
미역순나무	M	>100
<i>Tripterygium regelii</i>	C	>100
근, 경, 화	H	>100
독활	M	>100
<i>Aralia cordata</i>	C	54.0
근경, 근	H	>100
백굴채	M	>100
<i>Chelidonium majus</i>	C	96.4
전초	H	>100
향부자	M	>100
<i>Cyperus rotundus</i>	C	>100
근간	H	>100
황련	M	>100
<i>Coptis chinensis</i>	C	>100
근경	H	>100
까마중	M	>100
<i>Solanum nigrum</i>	C	>100
전초	H	>100
머위	M	>100
<i>Petasites japonicus</i>	C	>100
근경	H	>100
반하	M	>100
<i>Pinellia ternata</i>	C	>100
괴경	H	>100
삼릉	M	>100
<i>Sparganium stoloniferum</i>	C	>100
괴경	H	>100
상백피	M	>100
<i>Morus alba</i>	C	>100
근피	H	>100
세신	M	>100
<i>Asarum heterotropoides</i>	C	50.2
전초	H	>100
우슬	M	>100
<i>Achyranthes japonica</i>	C	>100
근	H	>100
음양곽	M	>100
<i>Epimedium grandiflorum</i>	C	>100
줄기, 잎	H	>100
죽여	M	>100
<i>Phyllostachys nigra</i>	C	>100
근간	H	>100
괭이밥	M	>100
<i>Oxalis corniculata</i>	C	>100
전초	H	>100

식물명, 학명, 사용부위	Extract ^{a)}	ED ₅₀ ^{b)}
마가목	M	>100
<i>Sorbus commixta</i>	C	>100
수피	H	>100
만병초	M	>100
<i>Rhododendron fauriae</i>	C	>100
가지	H	>100
섬초롱꽃	M	>100
<i>Campanula takesimana</i>	C	>100
근, 꽃	H	>100
주목	M	>100
<i>Taxus cuspidata</i>	C	>100
가지	H	>100

a) M : 80% MeOH 엑스

C : CHCl₃ 엑스

H : H₂O 엑스

b) 단위는 µg/ml

오배자, 오수유, 지모, 건부자, 독활, 백굴채, 세신의 CHCl₃ 엑스와 시호, 오배자의 H₂O 엑스, 오배자의 80% MeOH 엑스에서 ED₅₀이 100 µg/ml 이하로 나타났다. 본 연구 결과는 현재까지 빈번히 이용된 mouse leukemia cell인 P388 lymphocytic leukemia cell line에 대한 생약의 항암활성과는 다른 실험결과를 나타내었다. 따라서, 추후의 항암물질 검색 및 분리에 관한 연구 수행시 최소한 1종 이상의 human cell line을 이용하는 것이 바람직하다고 사료된다.

감사의 말씀—본 논문은 1991년도 교육부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구 조성비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드리는 바이다.

(1992년 11월16일 접수 : 11월30일 수리)

참 고 문 헌

1. Suffness, M. and Pezzuto, J.M.: *Methods in Plant Biochemistry*, ed. by K. Hostettmann, Vol. 6, Academic Press, London, Chap. 4, pp. 71-133 (1991).
2. Kinghorn, A.D.: *Pharmacy International* 3, 362 (1982).
3. Chang, I.M. and Chi, H.J.: *Kor. J. Pharmacogn.* 13, 55 (1982).
4. Chang, I.M., Kim, J.H. and Han, D.S.: *Kor. J. Pharmacogn.* 13, 62 (1982).
5. Ahn, B.Z. and Kim, S.I.: *Arch. Pharm. Res.*

- 8, 283 (1985).
6. Lee, J.H., Kang, S.K. and Ahn, B.Z.: *Kor. J. Pharmacogn.* 17, 286 (1986).
 7. Ahn, B.Z., Kim, S.I., Ryu, S.H., Kang, K.S. and Lee, Y.H.: *Kor. J. Pharmacogn.* 17, 168 (1986).
 8. Kang, Y.H., Kim, B.W., Ha, Y.M., Park, J.K., Nam, S.Y., Choi, K.C. and Choi, Y.M.: *Kor. J. Pharmacogn.* 18, 118 (1987).
 9. Boyd, M.R.: *Principles and Practice of Oncology Updates*, eds. by DeVita, Jr., V. T., Hellman, S., and Rosenberg, S.A., Vol. 3, pp.1-12 (1989).
 10. Johnson, R.K.: *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1082 (1990).
 11. Boyd, M.R.: *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 30, 652 (1989).
 12. Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H. and Boyd, M.R.: *Cancer Res.* 48, 589 (1988).
 13. Chabner, B.A.: *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1083 (1990).
 14. Plumb, J.A., Milroy, R. and Kaye, S.B.: *Cancer Res.* 49, 4435 (1989).
 15. Vistica, D.T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A. and Boyd, M.R.: *Cancer Res.* 51, 2515 (1991).
 16. Rubinstein, L.V., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Simon, R.M., Tosini, S., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A. and Boyd, M.R.: *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1113 (1990).
 17. Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J. and Boyd, M.R.: *J. Natl. Cancer Inst.* 83, 757 (1991).
 18. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M.R.: *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1107 (1990).