

파두와 황련의 수용성 혼합물(CP₂)부터 분리된 항암성분의 구조확인 및 세포독성에 대한 연구

김정환 · 이상준 · 한영복* · 김종배*

연세대학교 식품생물공학과, * 실험종양연구소, * 건국대학교 동물자원 연구소

(Received November 6, 1993)

Identification of Active Component Isolated from *Croton tiglium* and *Coptis japonica* Aqueous Mixture(CP₂) and Studies of Its Cytotoxic Effect

Jung Han Kim, Sang Jun Lee, Young Bok Han* and Jong Bae Kim*

*Department of Food and biotechnology, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea
Institute of Experimental Tumors, Seoul, Korea

*Animal Resource Research Center, Kon Kuk University, Seoul 133-170, Korea

Abstract—Active fraction, P₂, was isolated from natural anti-cancer drug, CP₂, by HPLC. We confirmed that P₂ includes most of the Isoguanosine and minor components, Berberine and other protoberberine alkaloids, by ¹H-NMR and ¹³C-NMR and measured the cytotoxicity of P₂ against various tumor cell-lines. P₂ was very effective to all tumor cell-lines, especially to human colon cancer SNU-C2A(ED₅₀; 24 μg) and liver cancer HEP-3B(ED₅₀; 27 μg).

Keywords □ CP₂, Isoguanosine, berberine, protoberberine alkaloids, cytotoxic effect.

최근에 본 연구의 저자들은 새로운 항암제 개발목적으로 2가지 전통적인 약용식물의 혼합물로부터 여러가지 암세포주에 대한 *in vitro*, *in vivo* 실험시 강한 항암효과를 나타내면서 부작용이 적은 생약제를 개발하고 CP₂로 명명하였다.^{1,2)} CP₂는 황련(*Coptis chinensis* FRANCH)와 파두(*Croton tiglium*)의 탈지층자를 혼합분쇄한 후 새롭게 개발된 추출방법에 의해 얻은 수용성 생약제제의 항암제이다. 본 연구에서 사용한 파두와 황련 각각에 대한 항암효과는 이미 여러문헌에 보고^{3,4)}되어 왔다. 파두에서 강력한 발암물질로 알려져있는 phobal ester⁵⁾의 지방성분을 제거한 추출물이 S-180, Ehrlich, JTC-26 등의 암세포주에 30~70% 성장효과를 보였다는 결과⁶⁾와 파두종자에서 항암효과를 나타내는 단일성분의 분리 및 그 구조결정에 대한 연구⁷⁾가 중국의 '항암본초'에 보고

된 바 있다. 또한 CP₂에 사용된 황련은 여러가지 생리활성 때문에 예로부터 한방에서 매우 귀하게 사용되어 오던 약제이다.⁸⁾ 그 주성분은 protoberberine alkaloids계통의 berberine, palmatine, coptisine 등, 구조내에 4°질소원자를 포함하는 물질로서 혈압강하, 항비열작용, 항균작용 등의 생리작용⁹⁾이 알려져 있고, 황련의 구성성분 중 7~9%를 차지하는 berberine은 그 항암효과¹⁰⁾도 보고된 바 있으나 이들 protoberberine alkaloids들은 혈액을 응고시키는 등의 부작용과 매우 강한 세포독성을 지닌다.¹¹⁾ 이상과 같이 주요한 전통약용식물로서 간주되어 온 파두와 황련은 실제로 다양한 약효를 지니 여러가지 증상에 사용되어 왔으나, 그 자체의 부작용과 독성 때문에 세심한 주의없이 실제로 약으로 사용하기는 어렵다. 그러나 이 두가지 식물로부터 특별한 추출과정을 거쳐 얻어진 항암제 CP₂는 여러 암세포주의 *in vitro* and *in vivo* 실험에서

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

강한 항암효과를 보이고 있을 뿐만 아니라 정상세포에 대해서는 암세포에 비해 같은 농도에서 1/10 이하의 약한 세포독성을 나타냈다.²⁾ 이러한 결과로 볼 때 항암제 CP₂에는 berberine alkaloids계통과 같이 이미 알려져 있는 항암성분 이외에 또다른 항암성분이나 이들의 부작용 및 독성을 감소시키는 성분들이 포함되어 있을 것으로 추정된다. 따라서 본 연구에서는, 여러 암세포주에 대해 낮은 농도에서 높은 세포독성을 나타내는 복잡한 혼합물로 구성된 생약제제 CP₂로부터 HPLC 등의 기기를 사용하여 세포독성효과를 보이고 있는 주물질을 분리한 후 분리된 항암성분을 NMR 등의 여러가지 기기를 이용하여 그 구조를 규명하고자 하였다. 그리고 분리된 성분이 실제로 항암제 CP₂와 같이 여러 암세포주에 대해 높은 세포독성을 나타내는지를 확인하기 위하여 여러가지 암세포주에 대하여 세포독성 실험을 하고 그 결과를 항암제 CP₂와 비교하였다.

실험방법

실험재료—본 연구에서 사용된 생약제제는 황련(*Coptis japonica*)과 파두(*Croton tiglium*)의 혼합제제로부터 추출된 수용성 성분, CP₂이며, CP₂의 제조방법은 문헌에 보고되어 있다.¹⁾

시약 및 기기—본 실험에서 암세포주에 세포독성을 나타내는 주성분의 분리에 사용된 MeOH 등의 용매는 Merck사의 HPLC급을 사용하였으며, 사용된 ¹H-NMR, ¹³C-NMR spectrum은 TMS를 내부표준물질로 사용하여 기초과학지원센터의 500 MHz FT-NMR Spectrometer (Bruker사)를 사용했다. IR Spectrometer는 Shimaduz' IR-435 기기를 사용하였으며 UV-spectrophotometer는 Kontron 860을 사용했다. Thin Layer Chromatography는 Merck 60F-254를 사용하였고, Detector는 UV 254, 360 nm를 사용하였으며 발색시약은 anisaldehyde, dragendorff시약²⁾을 사용하였다.

항암성분의 분리—CP₂는 prep. HPLC를 사용하여 분취하였다. 이때 사용한 HPLC의 조건은 Fig. 2에서와 같다. 15 mg/ml 농도의 시료 2 ml를 HPLC의 injector에 주입하고 유속 7 ml/min의 속도로 25% 메탄올을 이용하여 30분간 용출한 후, 용매를 100% 메

탄올로 바꿔서 20분간 컬럼을 통과시켜 25% 메탄올에 용출되지 않은 물질을 용출시키고 다시 처음의 용매 조건으로 바꿔주었다. 이러한 용매조건의 변화에 따라 시료의 분리되는 양상을 살펴본 후 상기과정으로 샘플량 12 g이 소진될 때까지 계속하였다.

세포주와 배양액—본 실험에서 사용된 세포주는 ATCC(America Tissue Culture Collection)에서 구입한 Sp2/O, P₀-GS5, HEP-3B, HEP-G2와 서울대학교 의과대학 암 연구소 종양세포학 연구실에서 수립한 SNU-1, SNU-C1, SNU-C2A들이다. 모든 세포주는 50 °C 수조에서 30분간 가온하여 불활성시킨 FBS를 10% 포함하고 streptomycin과 penicillin이 각각 0.1 mg/ml와 100 units/ml가 첨가된 RPMI 1640배지에서 5% CO₂, 37°C 와 완전 습윤상태가 유지된 배양기내에서 3일간 배양하면서 각 well에 존재하는 세포수를 측정하였다.

세포독성 실험방법—각각의 암세포주에 대한 세포독성실험은 건국대학교 동물자원연구센터에서 행하였다. CP₂로부터 HPLC방법에 의해 분리된 각 fraction의 세포독성실험에 murine의 myeloma세포주인 Sp2/O를 사용하였으며, 이 때 각 fraction의 농도는 1 mg/ml로 하였다. 여러가지 암세포주에 대한 P₂의 세포독성실험을 위해서 각각의 암세포 농도를 Table 2에서와 같이 96 well plate에 100 µl/well씩 접종하고 분리된 화합물 P₂를 1.5 mg/ml(final conc.)농도로부터 8차래 2배수 희석하여 100 µl/well씩 첨가하고 3일간 배양하면서 MTT방법¹³⁾으로 각 well에 존재하는 세포수를 측정하여 효과를 확인하였다.

실험결과 및 고찰

CP₂로부터 암세포주에 세포독성을 나타내는 주요 물질의 분리—CP₂는 황련과 파두 종자의 혼합물로부터 추출된 수용성 물질로서 그 성분은 Fig. 1의 HPLC chromatogram에서와 같이 매우 복잡한 형태로 나타난다. 이처럼 복잡한 시료 CP₂를 Fig. 2의 조건에서 HPLC로 분리했을 경우(column내에 주입된 시료를 25% 메탄올로 용출시킬 때), 용출시간 14.56분과 20.75분에서 명백한 2개의 주 피크와 몇가지 불순물들이 용출됐다. 이 때 2개의 주 피크는 용출되는 시간에 다소 차이가 있어서 HPLC로 직접 분취하는데 어려

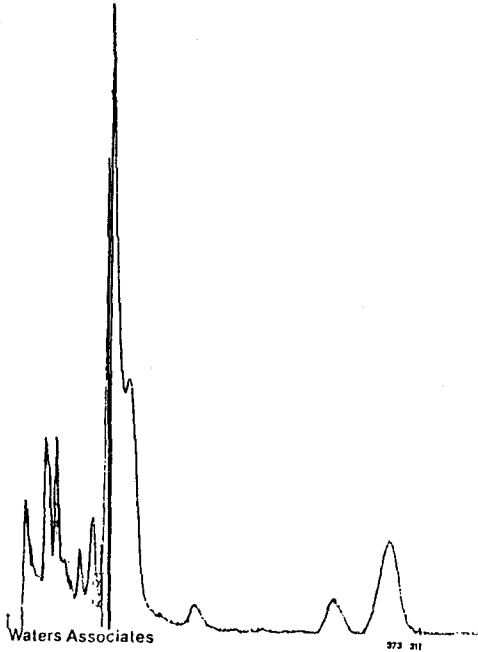


Fig. 1—Reverse-phase separation of CP₂. Column, 30 × 0.4 cm, μ -Bondpak-C₁₈; Mobile phase, 70% MeOH; flowrate, 1.0 ml/min; detector, UV, 254 nm, 0.4 AUFS; sample 10 ml.

움이 없었다. 그 뒤 HPLC 용매조건을 100% 메탄올로 바꿔주어 용출시킬 때 용출시간 40~50분 사이에서 분리되지 않은 여러가지 혼합물들의 물질군이 나오기 시작했다. 이러한 물질군은 25% 메탄올에서는 column내에 흡착되어 용출되지 않았으나 100% 메탄올에서는 빠르게 용출되어 나왔다. 이 물질군은 노란색을 띠는 물질들로서 주성분들은 아마도 황련에 존재하는 protoberberine alkaloids 성분들로 추정된다. 이 물질군을 시간별로 2개의 fraction으로 분취하여 각각을 C,D로 명칭하였다. 100% 메탄올로 노란성분을 다 용출시킨 후에 HPLC 용매조건을 처음과 같은 조건으로 바꾸주기 위하여 25% 메탄올을 다시 컬럼에 통과시킬 때 또 하나의 물질군이 용출되는데 이 물질군을 취하여 E fraction이라고 명명하였다.

이상과 같이 HPLC를 사용하여 분취한 A,B,C,D와 E로 Murine Myeloma세포주인 Sp2/O에 대하여 세포독성실험을 행하였다. 이 때 Table 1에서와 같이 B,C,D fraction에서 상당한 세포독성이 나타났으며 그 중에서도 단일 피크로 분리된 B fraction이 가장 높은

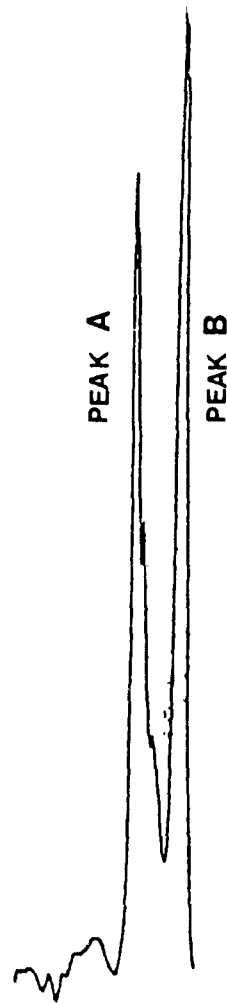


Fig. 2—Chromatogram of Peak A,B in CP₂. column, 50 cm × 21.2 mm, C₁₈; mobile phase, gradient elution, 25% MeOH; initial flowrate 7 ml/min; detector, UV 254 nm 0.4 AUFS; sample 2 ml.

세포독성을 나타냈다. 따라서 이 피크 B를 P₂로 명명한 후 이 fraction에 대해서 상세한 분석을 행하였다.

분리된 P₂성분의 분석 및 구조결정—분리된 P₂성분은 Fig. 3의 HPLC chromatogram에서 나타난 것과 같이 9분대 90% 이상의 주 물질과 여러 미량의 불순물들이 혼합된 형태로 나타나 있다. Fig. 4의 P₂를 UV-Vis spectrophotometer로 분석한 결과 이 peak를 구성하는 주물질은 nucleosides계통의 화합물로 추정되었다.

Table 2의 P₂의 ¹H-NMR을 분석한 결과, P₂는 거의

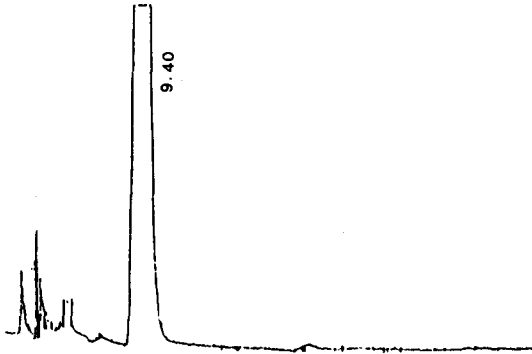


Fig. 3—Chromatogram of P_2 . Column, 30×0.4 cm, μ -Bondpak- C_{18} ; Mobile phase, 70% MeOH; flow-rate, 1.0 ml/min; detector, UV, 254 nm, 0.4 AUFS; sample 10 ml.

90% 이상의 순수한 단일 물질로 구성되어 있는 것으로 생각되었다. 85.6 ppm의 doublet peak는 전형적인 nucleoside화합물의 anomeric proton으로 추정되었으며, 83.5~4.5 ppm사이의 peak 양상으로 ribose당의 proton을 확인하였다. 그리고 down field의 8 ppm정도에 나타나 있는 singlet peak는 nucleoside purine base의 8번위치의 수소의 전형적인 peak로

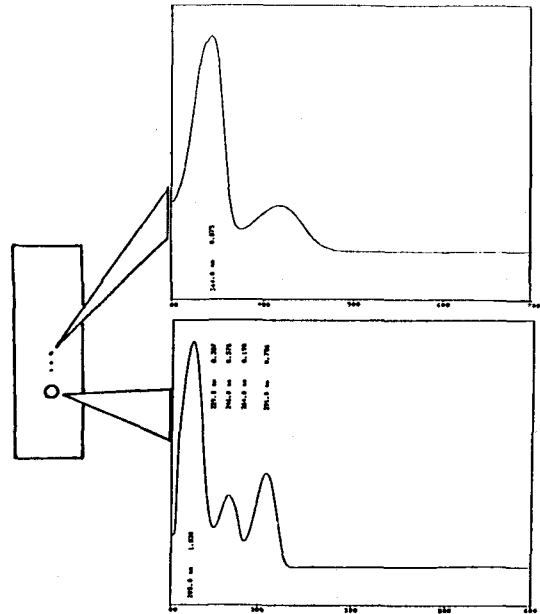


Fig. 4—Thin Layer Chromatogram and UV-VIS spectrum of P_2 Detector; uv 254 nm, Eluent; buthaol: AcOH: H_2O (5:2:3).

추정되었다.

Table 2에서 P_2 의 ^{13}C -NMR 분석결과가 나타나 있다. 60 ppm와 90 ppm사이에서 ribose당의 5개 탄

Table I—Cytotoxic Activity of Fractions of CP_2 against Tumor Cell-line Sp2/O

Fractions	Control	A	B	C	D	E
Murine Myeloma Sp2/O	—	+	+++	++	+	—

1) +++: When treated with drug 1 mg/ml, survival rate of tumor cell is below 5%
 ++: When treated with drug 1 mg/ml, survival rate of tumor cell is 5%~30%
 +: When treated with drug 1 mg/ml, survival rate of tumor cell is 30%~80%
 -: When treated with drug 1 mg/ml, survival rate of tumor cell is above 80%

Table II—Spectra Data for Major Component of P_2

IR, V_{max} (KBr)	Chemical shifts(δ) from Me ₄ Si	
	1H -NMR(D_2O)	^{13}C -NMR(DMSO- d_6)
3344 (NH_2 , NH, OH stretch)	3.56 (dd, 1H)	61.6, 70.7
3109 (NH_2 , NH, OH stretch)	3.66 (dd, 1H)	72.98, 85.94
2939 (C-H stretch)	3.9 (dd, 1H)	87.7, 107.7
1634 (C=O, C=N stretch)	4.11 (dd, 1H)	138, 153.6
1620 (C=O, C=N stretch)	4.6 (m, 1H)	156, 160.6
1531, 1400, 1087	5.6 (d, 1H) 7.98 (s, 1H)	

소의 전형적인 peak를 확인할 수 있었다. 100~160 ppm에 나타나있는 4개의 peak들은 상대적으로 크기가 작게 나타나있다. 이 peak들의 양상은 purine nucleosides들의 purine base의 탄소 signals로 추정된다. 실제로 guanosine이나 adenosine의 ¹³C-NMR spectrum을 살펴보면 purine base의 signals들이 상대적으로 ribose당의 signals에 비해 매우 적게 나타남을 확인할 수 있었다. 또한 IR spectrum에서도 purine nucleoside의 전형적인 spectrum을 보여주고 있다. 이상과 같이 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR Spectrum 그리고 IR spectrum의 전체양상을 볼때 adenosine, guanosine의 NMR spectrum과 IR spectrum의 그것과 전체적으로 매우 유사함을 알 수 있었고 purine base의 six membered ring의 탄소 signal만이 약간 차이를 보이고 있었다. 위의 결과들을 종합해 볼때 P₂의 주성분은 자연계에서 드물게 *Croton tiglium*에 존재하는¹⁰⁾ nucleoside analog인 isoguanosine(일명 crotonoside)¹⁴⁾으로 추정되었고, 이전에 보고된⁹⁾ isoguanosine의 NMR 등의 Data¹⁵⁾와 P₂의 분석 data를 비교하여 P₂의 주성분은 isoguanosine임을 확인하였다.

P₂의 구성성분 중 protoberberine alkaloids류의 확인—상기의 P₂ HPLC chromatogram과 NMR-spectrum을 볼때 P₂는 90% 이상의 isoguanosine과 10% 미만의 미량물질로 구성되어 있다. 이러한 미량물질은 HPLC 등의 분석기기가 분리능이 매우 떨어질 뿐만 아니라 특이적으로 확인할 수 있는 detector 역시 적절하지 못해 Thin Layer Chromatography를 사용하여 분리하였다. Fig. 4은 P₂의 TLC chromatogram이다. 90% 이상의 주물질인 isoguanosine을 Rf 0.27에서, UV 254 nm로 확인하였다. 또 UV 360 nm에서 Rf치가 0.3~0.4사이에서 각각 노란색의 형광색으로 발색하는 3개의 spots들이 확인되었다. 이 3개의 노란 spots들은 berberine에 특이적으로 발색하는 dragedorff시약¹¹⁾에도 노랗게 발색하였다. 이들 노란 spot들은 황련의 수용액 추출물에서 동일하게 나타나는 물질들로서 *Coptis japonica*의 주요성분인 protoberberine alkaloids인 것으로 추정되어, Sigma사로부터 구입한 berberine chlorride 비교물질과 비교 실험하였을때 3개의 spots중 상대적으로 양이 제일 많은 rf 0.4의 맨위 물질이 각기 다른 조건의 용매조건의 TLC에서 berberine과 동일한 rf치를 보여주었으며,

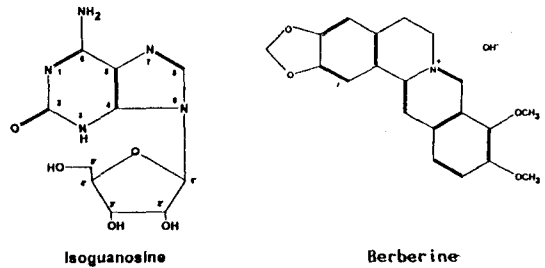


Fig. 5—Structure of Isoguanosine and Berberine.

Fig. 4에서 나타난 uv spectrum 역시 비교물질인 berberine chloride의 uv spectrum과 동일함을 확인하였다. 따라서 P₂에 존재하는 노란색의 미량물질들은 황련에 존재하는 berberine을 포함하는 protoberberine alkaloids화합물로 추정된다. 본 실험에서 isoguanosine과 berberine 두 화합물은 물리, 화학적 성질이 크게 다름에도 불구하고 HPLC분석시 P₂ peak에 항상 일정비율로 섞여 나옴을 확인할 수 있었다. 따라서 isoguanosine과 berberine 두 화합물이 물리, 화학적 상호작용을 할 가능성이 있을 수 있으며 이러한 상호작용은 P₂의 항암활성과 관련성이 있을 것으로 추정된다. 이상과 같이 P₂를 TLC, HPLC, NMR 등의 기기를 사용하여 분석해 본 결과, P₂는 90% 이상의 isoguanosine과 berberine을 포함한 3가지의 protoberberine alkaloids류가 적은양 포함되어 있음을 확인할 수 있었다.

P₂의 여러가지 암세포주에 대한 세포독성실험—분리된 P₂가 실제로 항암제 CP₂의 항암활성이 있는 주물질을 확인하기 위해서 여러가지 암세포주에 대해 P₂와 CP₂의 세포독성을 비교 검토하였다. Table 2에서 볼 수 있듯이 P₂와 CP₂의 여러가지 암세포주에 대한 세포독성은 대부분의 암세포주에 대해 거의 비슷한 정도로 나타났으며 사람의 간세포주인 HEP-G2, 장세포주인 SNU-C1에서는 오히려 P₂가 CP₂에 비해 훨씬 높은 세포독성을 보였다. 그리고 P₂가 가장 높은 세포독성을 나타낸 세포주는 사람 간세포주인 HEP-3B와 SNU-C2A로서 각각 ED₅₀값이 2.7×10^{-5} g과 2.4×10^{-5} g으로 나타났다. 이상과 같은 결과로 항암효과가 있는 CP₂의 항암활성의 주성분은 P₂임이 확실시되었다. 그러나 P₂의 암세포주에 대한 활성이 P₂의 주성분인 isoguanosine 단일 성분 때문인지, protoberberine alkaloids류 때문인지, 아니면 isogua-

Table III—Cytotoxicity of CP₂ and P₂ against Murine and Human tumor Cell-lines

Cell-lines	Doubling time	No. of cells /well	ID ₅₀ (g/48 hrs)	
			CP ₂	P ₂
Human				
Granulosa cell Po-GS5				6.0×10 ⁻⁵
Liver cancer Hep-G2	50	20,000	3.5×10 ⁻⁴	9.2×10 ⁻⁵
Hep-3B	70	30,000	2.8×10 ⁻⁵	2.7×10 ⁻⁵
Colon cancer SNU-C1	46	25,000	1.0×10 ⁻⁴	4.0×10 ⁻⁵
SNU-C2A	88	40,000	2.7×10 ⁻⁵	2.4×10 ⁻⁵
Stomach cancer SNU-1	25	15,000	7.7×10 ⁻⁷	1.7×10 ⁻⁴
Murine				
Myeloma Sp2/O	8	5,000	5.0×10 ⁻⁵	1.3×10 ⁻⁴

nosine과 protoberberine alkaloids 혼합액의 상승효과 때문인지에 대해서는 지금으로서는 알 수가 없으며 이후의 계속된 연구를 통해서 확인할 수 있을 것이다.

결 론

강력한 항암효과를 가지고 있는 파두와 황련의 수용성 혼합물 CP₂부터 높은 항암활성을 보이는 물질 P₂을 분리한 후 분석한 결과, P₂는 90% 이상의 isoguanosine과 미량의 berberine을 포함한 protoberberine alkaloids로 구성된 것을 확인하였다. 물질 P₂의 암세포주에 대한 세포독성을 확인한 결과, ED₅₀이 대개의 암세포주에 대해 수십 µg/ml의 높은 활성을 보이고있다. 따라서 분리된 P₂의 여러 암세포주에 대한 세포독성의 결과가 항암제 CP₂보다 다소 높은 것으로 보아서 CP₂의 항암효과는 주로 P₂성분에 의해서 일어나는 것으로 확실시 된다.

감사의 글

본 연구는 주) 녹십자의 연구비 지원에 의해 수행 되었으므로 이에 감사를 드립니다.

문 헌

- 1) 김춘원, 서경원, 조영호, 홍은경, 한영복, 문정조, 경흥기, 김정환, 김종배: 콩티스속 근경과 탈지된 크

로톤종자의 혼합추출물(CP-2)의 수종암세포에 대한 세포독성의 효과. 중양의학, 1993; Vol. 58. No. 3.

- 2) 김춘원, 문정조, 한영복, 경흥기, 홍은경, 조영호, 김종배: 콩티스속 근경과 탈지된 크로톤종자의 혼합추출물(CP-2)이 동물체내에서의 수종 암세포증식에 미치는 영향. 중양의학, 1993;
- 3) 장일무, 김영수, 한병훈: 한국산 생약의 약리작용 및 독성연구(제2보). 생약학회지, 1982; 13(1): 14-19.
- 4) 홍남주, 김종우, 두호경, 김남재: 생약복합제의 약효 연구(제4보). 생약학회지, 1982; 13(1): 20-25.
- 5) 常敏毅: 항암본초, 서울; 바람과물결, 1992; 376-377.
- 6) Boutwell ,R. K. Biochemical mechanism of tumor promotion. In. T. T. Slaga, A. sivak and R. K. boutwell(eds.): Carcinogenesis, Vol. 2. Mechanisms of tumor promotion and cocarcinogenesis. 1978; New York: Raven press, 49-57.
- 7) Uchida, I.,Branfman, A. R., Dailey, R. G. and Yu Fei, B.: Antileukemic principles isolated from euphorbiaceae plants. Science, 1976; 191: 571-572.
- 8) 송주택: 식물학 대사전. 서울; 한국도서출판 중앙회, 1991; 572.
- 9) Hahn, F. E., Ciak, J. In: Corcoan, J. W., Hahn, F. E.(eds.): Antibiotics Vol.III, Mechanism of Action of Antimicrobial and Antitumor Agents. Spinger-Verlag,Berlin, 1974; 577-584.
- 10) Amporn, R., Prapin, W. and Bhinyo, P. In: The PH dependence of binding of berberine to DNA. J. Pharm. Pharmacol, 1981; 3: 125-127.
- 11) Tetsuro, I. and Yoshiaki, I: Antitumor activity of 13-Methyl-berberubine derivatives. J. Pharm. Dyn., 1982; 5: 469-474.

- 12) Arnold, W: In Thin Layer Chromatography. John Wiley & Sons, U. S. A. 1978.
- 13) Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.*, 1983; **65**: 55-63.
- 14) Cherbuliez, E. and Bernhard, K.: Croton seed(1), crotonoside *Helv. Chim. Acta.*, 1932; **15**: 464.
- 15) Frederick, A. F. and Geraldine, J. F., Isoguanosine: Isolation from an Animal. *Science*, 1981; **212**(1): 357-358.