

## Isoguanosine과 Berberine 1 : 1 혼합물의 항암효과

김정환# · 이상준 · 한영복\*\* · 문정조\*\* · 김종배\*

연세대학교 식품 생물공학과, \*\*실험종양연구소, \*건국대학교 동물자원연구소

(Received February 3, 1994)

### Anti-tumor Activity of Isoguanosine and Berberine 1 : 1 mixture

Jung Han Kim#, Sang Jun Lee, Young Bok Han\*\*, Jung Jo Moon\*\* and Jong Bae Kim\*

Department of Food and Biotechnology, Yonsei Univ., Seoul 120-749, Korea

Institute of Experimental Tumors\*\*, Seoul,

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

**Abstract**—Isoguanosine and berberine 1:1 mixture[1:1(mole:mole)] has been prepared and evaluated by measuring antitumor effects against various tumor cell lines in culture and in mice. We reported that the synergistic effect of isoguanosine and berberine mixture has been revealed compared with each of isoguanosine and berberine increased by 3~8 times than that of each components in various tumor cell lines *in vitro*. The most effective dose of isoguanosine and berberine mixture was 60 mg/kg/day in mice bearing S-180 solid tumor, the % (1-T/C) values were 70%. Against the P-388 leukemia, isoguanosine-berberine mixture was the most effective at the dose of 60 mg/kg/day, the %T/C values were 163%.

**Keywords** □ Isoguanosine-berberine mixture, antitumor activity, cytotoxicity, synergistic effect.

Isoguanosine은 자연계에서 드물게 존재하는 nucleoside analogs중에 하나로서 1932년 Cherbuliez and Bernhard가 *Croton tiglium* L.로부터 처음 발견한<sup>1)</sup> 이래 그 생리활성에 대한 많은 연구가 활발히 진행되어 오고 있다. 이러한 isoguanosine은 대부분의 nucleoside analogs가 그러한 것처럼 여러가지 다양한 생리활성을 가지고 있으며 그 효과 역시 매우 강하고 지속적으로 나타나는 것으로 알려져있다.<sup>2)</sup> 특히 isoguanosine은 뇌의 cyclic AMP의 축적을 자극하고 IMP pyrophosphorylase와 glutamic dehydrogenase를 억제 한다는 보고가 있으며 isoguanosine의 항암 효과에 대해서는 최근 들어서 본 연구실에서 밝힌 바 있다.<sup>3)</sup>

Berberine은 protoberberine alkaloids류의 하나로서 자연계에서 널리 분포되어 있는 노란색을 띠는 isoquinoline alkaloids으로서 다양한 생리작용 때문에

예로부터 항생제 등의 약제로서 많이 사용되어온 성분이다.<sup>4)</sup> 특히 berberine은 S-180 tumor cell에서 DNA, RNA 합성을 억제함으로써 그 항암효과가 보고된 바<sup>5)</sup> 있으나 독성이 매우 강한것으로 알려져 실제로 항암제로서의 사용은 불가능한 것으로 알려져 있다. 본 연구실에서는 전통적인 약용식물인 *Croton tiglium* L과 *Coptis japonica*로부터 새로운 항암제를 개발하는 연구중 두 가지 식물의 혼합물로부터 추출한 수용성물질(CP<sub>2</sub>)가 *in vitro*와 *in vivo*에서 항암효과가 있음을 밝혀내고,<sup>6)</sup> 그 CP<sub>2</sub>로부터 분리한 nucleoside analogs인 isoguanosine과 berberine이 여러가지 암세포주에 대해 *in vivo*와 *in vitro*에서 항암효과가 있음을 밝혀내었다.<sup>9)</sup> 특히 이들 혼합물이 isoguanosine과 berberine 단독으로 사용했을 때에 비하여 여러가지 tumor cell-line에 대해 *in vitro*, *in vivo*에서 항암효과가 증진됨을 확인하였다. 뿐만 아니라 단순한 두 화합물의 혼합물이 berberine이 가지고 있는 독

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

성을 상당히 완화시킴을 확인하였다.

### 실험방법

**실험재료**—본 연구에 사용된 isoguanosine은 저자가 J. Divarker가 보고한 isoguanosine의 합성방법을<sup>7)</sup> 이용해 직접 합성하였다. 합성한 isoguanosine은 문헌에 나와있는 NMR 등의 data와 비교하여 구조를 확인하였으며 순도는 HPLC를 이용하여 99% 이상의 순도임을 확인하였다. berberine은 Sigma사로부터 berberine chrolide 형태로 구입하였다. Isoguanosine-berberine 혼합물은 isoguanosine과 berberine을 mole비로 1:1 혼합하였다.

**세포독성 실험을 위한 세포주와 배양액**—*In vivo* 실험에 사용된 실험동물은 Clea Japan Co.로 부터 분양받아 실험종양연구소에서 25대 이상 근교시킨 DDY계와 DBA계 생쥐를 사용하였다. 본 실험에 사용된 세포주는 ATCC(America Tissue Culture Collection)에서 구입한 P388, L578Y, MCF-7, Raji, HL-60, SK-HEP-1, Sp2/O 등을 사용하였으며 모든 세포주는 RPMI 1640 배지에 50°C 수조에서 30분간 가열하여, 불 활성화시킨 FBS를 10% 포함하고 streptomycin과 penicillin이 각각 0.1 mg/ml와 100 units/ml을 첨가한 배양액을 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 와 완전 습윤상태가 유지된 배양기내에서 3일간 배양하면서 각 well에 존재하는 세포수를 측정하였다.

**세포독성 실험**—여러가지 암세포주에 대한 isoguanosine-berberine 혼합물의 세포독성 실험을 위해서는 각각의 암세포의 농도를 96 well plate에 100 µl/well씩 접종하고 실험하고자 하는 isoguanosine-berberine 혼합물을 1.5 mg/ml(final conc.)농도로 부터 8차례 2 배수 희석하여 100 µl/well씩 첨가하고 3일 배양하면서 MTT방법<sup>8)</sup>으로 각 well에 존재하는 세포수를 측정하여 효과를 확인하였다.

**실험동물에 대한 isoguanosine과 berberine 혼합물의 항암효과**—고형암에 대해 isoguanosine-berberine 혼합물의 항암효과를 살펴보기 위한 실험세포주는 생쥐 육종세포주인 S-180(ATCC NO. TIB66)을 사용하였다. DDY계 생쥐(♂, 21±1g, group별 6마리)에 계대접종한지 7일만에 일회용 주사기를 이용하여 건강한 암세포를 얻었다. 마리당 1×10<sup>7</sup>개의 S-180 암세포들을 left flank 피하에 이식시켰다. 24시간 후

부터 대조군은 0.9% 생리식염수 그리고 치료군은 시험물질을 복강내에 1일 1회씩 12일간 투여하였다. 그 후 부터 종양의 성장과 상태를 관찰하며 이식 후 15일에 고형암의 크기를 측정하여 대조군과 치료군을 비교하여 항암효과를 평가하였다. 형성된 고형암의 크기측정은 실험동물의 지속적인 관찰을 위하여 실험동물을 치사시키지 않고 일정한 기간이 지난 후 외부에서 caliper를 이용하여 고형화된 암종의 길이와 폭을 측정하여 아래의 식에의하여 무게로 환산하는 방법을 사용하였다.<sup>10)</sup>

—평가방법:

$$\text{Tumor Weight(mg)} = 1/2 \times \text{길이(mm)} \times \text{폭2(mm)}$$

$$\text{Growth inhibition(\%)} = (1 - \text{mean tumor weight. T/mean tumor weight. C}) \times 100$$

Leukemia에 대한 isoguanosine과 berberine 혼합물의 항암효과를 알아보기 위해 사용된 실험세포주는 P-388(ATCC NO. CCL46)로서 DBA/2계 생쥐(♀ 20 ± 1g, group별 6마리)에 계대접종된지 10일만에 일회용 주사기를 이용해 건강한 암세포를 얻었다. P388은 마리당 1×10<sup>6</sup>씩 복강내에 접종시켰다. 그 후 24시간 부터 대조군은 0.9% 생리식염수를 치료군은 시험물질을 1일 1회씩 5일간 각각 투여하였다. 항암효과 평가방법은 P-388 또는 L-1210 세포주는 치사율이 대단히 높으므로 치료군이 대조군에 비한 연명 정도로서 항암효과를 판정한다.

$$\text{MST (mean survival time) ratio(\%)} = (\text{MST of T/MST of C}) \times 100$$

### 결과 및 고찰

**여러가지 암세포주에 대한 isoguanosine-berberine 혼합물의 세포독성 실험**—Table I에서 볼수 있듯이 isoguanosine과 berberine의 각각의 세포독성 정도는 대체로 실험에 사용된 모든 암세포주에 대해서 berberine이 isoguanosine보다 비교적 높은 것으로 보이고 있으나 isoguanosine의 경우 P388에 대해서 EC<sub>50</sub> 값이 21 µM정도로 가장 높은 결과를 보이고 있으며 berberine의 세포독성과 비교해 볼때도 다소 높은 결과를 보이고 있다. P388과 HL-60을 제외하곤 모든 암세포주에 대해서 isoguanosine 단독으로 사용했을 때 대체로 EC<sub>50</sub>값이 수십 µM부터 수백 µM에서 결

**Table I**—Cytotoxicity of isoguanosine, berberine and isoguanosine-berberine mixture against various tumor cell-lines

Cell-line	isoguanosine (EC <sub>50</sub> )	berberine (EC <sub>50</sub> )	isoguanosine-berberine mixture(1:1) (EC <sub>50</sub> )
P388	2.1 × 10 <sup>-5</sup> M	3.3 × 10 <sup>5</sup> M	1.3 × 10 <sup>6</sup> M
L578Y	3.7 × 10 <sup>4</sup> M	2.3 × 10 <sup>-5</sup> M	9 × 10 <sup>-5</sup> M
MCF-7	7.06 × 10 <sup>-4</sup> M	3.3 × 10 <sup>-4</sup> M	1.1 × 10 <sup>-4</sup> M
Raji	4.0 × 10 <sup>-4</sup> M	1.0 × 10 <sup>-6</sup> M	2 × 10 <sup>-7</sup> M
HL-60	7.0 × 10 <sup>-5</sup> M	3.5 × 10 <sup>-5</sup> M	1.5 × 10 <sup>-5</sup> M
SK-HEP-11.7	1.7 × 10 <sup>-4</sup> M	7.5 × 10 <sup>-5</sup> M	3 × 10 <sup>-6</sup> M
Sp2/O	1.5 × 10 <sup>-4</sup> M	1.5 × 10 <sup>-4</sup> M	2.7 × 10 <sup>-5</sup> M

정된다. 반면 berberine은 Raji 세포주에 대해서 EC<sub>50</sub> 값이 1 μM로 대단히 낮은 농도에서 EC<sub>50</sub> 값이 나타났으며 나머지 세포주에 대해서는 대개 수십 μM에서 EC<sub>50</sub> 값이 결정되어 isoguanosine 보다는 다소 높은 세포독성을 나타내었다. 이들 두 화합물은 각각 여러 암세포주에 사용했을 때 기존에 보고된 여러 항암제의 세포독성에 비해서는 다소 낮은 효과를 보이고 있다. 그러나 isoguanosine-berberine 혼합물의 여러 암세포주에 대한 세포독성을 살펴보았을 때 Table I의 결과에서 볼수 있듯이 isoguanosine과 berberine 단독으로 사용했을 때에 비해 실험에 사용된 모든 암세포주에 대해 그 세포독성이 상당히 증가했음을 알 수 있었다. P388 세포주에 대해서는 isoguanosine과 berberine의 세포독성에 비해서 각각 3.5배, 5.5배

증가하였으며, Raji 세포주에 대해서는 수십배 세포독성을 증가시켰다. 뿐만 아니라 대부분의 세포주에 대해서 수배에서 수십배의 세포독성의 증가를 가져왔다.

**실험동물에 대한 isoguanosine-berberine 혼합물의 항암효과**—Table II에는 malignant solid tumor인 S 180에 대해서 isoguanosine과 berberine 혼합물의 암세포주의 성장 억제율을 나타내었다. isoguanosine 단독으로 48 mg/kg 사용시 대조군에 비하여 60% 정도 tumor 성장을 억제하였으며 96 mg/kg 사용시 65% 정도 대조군에 비하여 고형암의 성장을 억제하였다. Berberine을 단독으로 사용하때 *in vivo*에서 고형암의 성장억제 정도는 10 mg~20 mg/kg 사용시 치료군이 대조군에 비하여 암성장억제율을 20~30% 정도 보였으며 30 mg/kg 사용하였을 때는 치료군이 대조군에 비하여 실험동물의 무게변화가 현저하게 줄어드는 등 toxic한 결과를 보였다. 반면에 isoguanosine-berberine 혼합물의 S-180 solid tumor에 대한 tumor 성장 억제율을 보았을때 45 mg/kg에서는 치료군이 대조군의 solid tumor의 무게에 비해 65%의 성장억제 효과를 보였으며 kg당 60 mg을 사용했을때 70%의 억제효과를 보였다. 이러한 결과는 isoguanosine-berberine 혼합물이 isoguanosine과 berberine을 단독으로 사용했을때 보다 적은 dose양에서 더 높은 암성장 억제효과를 보인 것으로 isoguanosine-berberine 혼합물이 각각의 화합물을 단독으로 사용했을 때에 비

**Table II**—Anti-tumor activity of isoguanosine, berberine and isoguanosine-berberine mixture against S-180 solid tumor in mice

Drug	dose mg/kg/day	weight change on 15 day (T-C)	growth inhibition % 1-T/C	Activity
Isoguanosine	12	+0.3	20	+
	24	+0.7	35	+
	48	+0.6	60	++
	96	+0.5	65	++
Berberine	5	+0.15	—	
	10	+1	20	+
	20	-0.15	30	+
Isoguanosine + Berberine (1:1)mixture	30	-0.25	Toxic	
	15	+0.2	10	+
	30	+0.15	30	+
Berberine (1:1)mixture	45	+0.05	65	++
	60	-0.13	70	+++

\* Criteria: + ≥20, ++ ≥50, +++ ≥70

**Table III**—Anti-tumor activity of isoguanosine, berberine and isoguanosine-berberine mixture against I.P implanted P388 leukemic mice

Drug	dose mg/kg/day	weight change on 8 day (T-C)	mena survival days (T/C)	% T/C
Isoguanosine	12	+2.0	16.10/15.60	—
	24	+0.09	17.16/15.60	110
	48	+0.09	18.09/15.60	116
	96	-1.24	18.40/15.60	118
Berberine	5	+2.0	16.20/15.60	—
	10	+1.2	17.16/15.60	110
	20	+1.5	17.16/15.60	110
	30	+2.0	13.49/15.60	Toxic
Isoguanosine	15	+0.06	19.50/15.60	125
Berberine	30	-0.54	21.84/15.60	140
1:1 mixture	45	-0.94	22.62/15.60	145
	60	-1.49	25.42/15.60	163

\*Mean survival days were calculated by the method in the NCI protocol

하여 solid tumor의 성장억제 효과에 대하여 명백한 증가를 가져왔다. 또한 isoguanosine-berberine 혼합물은 berberine이 지닌 독성을 상당히 완화시킬 수 있었다. berberine은 30 mg/kg 사용했을 때 실험에 사용한 마우스에 심한 독성을 가져와는데 같은 양의 berberine을 isoguanosine과 단순히 혼합하여 사용할 경우에는 이러한 독성이 나타나지 않고 오히려 증가된 항암효과를 보이고 있다. 이상과 같은 isoguanosine과 berberine혼합물의 상승효과는 solid tumor에 대해서만이 아니라 leukemia에 대해서도 동일한 결과를 보여준다. Isoguanosine 자체는 복수형암과 고형암에 대해서 상당한 항암효과를 보이나 leukemia에 대해서는 상대적으로 약한 항암효과를 보인다.<sup>3)</sup> Table III에서 보듯이 P-388 leukemia에 대해서 isoguanosine과 berberine을 단독으로 각각 실험 마우스에 투여했을 때는 isoguanosine의 경우 연명율이 대조군에 비해 10~18% 증가한데 그치고 berberine의 경우 solid tumor에 대한 실험시 나타났던 결과와 동일하게 적은 농도에서도 실험쥐에 대해 toxic한 결과를 가져왔다. 반면에 isoguanosine-berberine혼합물의 경우에는 kg당 45 mg 투여시 대조군에 대한 연명율이 45%나 증가했고 60 mg 투여시 isoguanosine 단독으로 사용했을 경우보다 65%나 연명율이 증가했다. 이상과 같이 isoguanosine과 berberine의 혼합물은 여러가지 암세포주에 대하여 *in vitro*와 *in*

*vivo*에서 모두 각각의 단일물질을 사용할 때 보다 상승된 항암효과를 보임을 확인 하였다. 또한 이러한 결과는 berberine이 isoguanosine뿐만 아니라 다른 여러가지 nucleoside 항암제와 병용 사용시 상승효과의 가능성도 보여주고 있다. 본 실험실에서는 최근 berberine과 여러가지 nucleoside항암제와의 혼합물이 *in vitro*에서 P-388 등의 암세포주에 대하여 상승효과를 보임을 확인 하였다. 따라서 본 연구실에서는 계속연구로서 berberine과 다른 여러가지 항암제와의 항암효과 증진에 대한 연구뿐 아니라 그 상승작용의 기작을 연구할 계획이다.

#### 감사의 말씀

본 연구는 (주) 녹십자의 지원에 의해 수행된 것으로 지원에 감사드립니다.

#### 문헌

- 1) Cherbuliez, E. and Bernard, K., Croton seed(1) crotonoside, *Helv. Chim. Acta.*, **15**, 464, 978 (1932).
- 2) Ronald, J. N. and Harry, S. M., Isoguanosine: isolation from an animal, *Science*, **212**, 557-558 (1981).
- 3) Kim, J. H., Lee, S. J. Han, Y. B., Moon, J. J. and Kim, J. B., Isoguanosine: isolation and antitumor activity studies, *Arch. Pharm. res.*, in print.

- 4) Maiti, M. and Keya. C., Interaction of berberine chrolide with naturally occuring deoxyribonucleic acids, *Indian J. Biochemistry & Biophysics*, 245-150, **18**, 245-250(1981).
- 5) Neidle, S. and Waring, M. J., In molecular aspects of anti-cancer drug action, P. 93, Maemillan Press Limited: London
- 6) 김춘원, 문정조, 한영복, 김윤규, 서경원, 김종배, 종양을 유발시킨 마우스에서 콩티스속 근경과 탈지된 크로톤 종자의 혼합추출물(CP<sub>2</sub>)이 면역계에 미치는 영향에 관한 연구, *중양의학*, **58**(3), 177-184(1993).
- 7) Divarker, K. J., Mina, M., Colin, B. R., Yogesh, S. S. and Karl, A. D. S., Conversion of guanosine into isoguanosine and derivatives, *J. Chem. Soc, PER-KIN-TRANS* **1**, 771-774 (1991).
- 8) Mosmman, T., Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity, *J. Immunol. Method*, **65**, 55-63 (1983).
- 9) Kim, J. H., Lee, S. J., Han, Y. B., Moon, J. J. and Kim, J. B., Identification of active compound isolated from natural anti-cancer drug CP<sub>2</sub> and studies of its cytotoxic effect, *J. Pharm. Soc.Korea*, **38**(1), 31-37 (1994).
- 10) Kyoichi, S., Toshitaka, M. and Sueo, M. U., Antitumor activity and hematotoxicity of a new substituted dihydrobenzo., FK 973, in mice. *Cancer Research*, **48**, 1168-1172 (1988).