

전통 약용식물 및 각종 식물의 항암효과에 대한 연구(II)

현진원 · 임경화 · 신진이 · 성민숙 · 오재환 · 양용만 · 원용진* · 김영식* ·
강삼식* · 장일무* · 백우현** · 김형자*** · 우은린*** · 박호균*** · 박재갑
서울대학교 의과대학 암연구소 및 암연구센터 세포생물학 연구부 · *서울대학교 천연물과학연구소 ·
보령제약 주식회사 중앙연구소 · *한국과학기술연구원

Antineoplastic Effect of Extracts from Traditional Medicinal Plants and Various Plants (II)

Jin-Won Hyun, Kyoung-Hwa Lim, Jin-E Shin, Min-Sook Sung, Jae-Hwan Oh, Yong Man Yang,
Yong-Jin Won*, Yeong-Shik Kim*, Sam Sik Kang*, Il-Moo Chang*, Woo-Hyun Paik**,
Hyoung Ja Kim***, Eun-Rhan Woo***, Hokoon Park*** and Jae-Gahb Park
Laboratory of Cell Biology, Cancer Research Institute and Cancer Research Center,
Seoul National University College of Medicine, *Natural Products Research Institute,
Seoul National University, Seoul 110-460, **Central Research Institute, Boryung
Pharmaceutical Co., Ltd., Kunpo-Si 435-050 and ***Division of Applied Science,
Korea Institute of Science and Technology, Seoul 136-791, Korea

Abstract—Antineoplastic activity against human gastric and colon carcinoma cell lines was measured in 49 extracts from 46 plants using the MTT(3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) method. Six extracts from five plants have been reported to have antineoplastic effects. Extracts from remaining the 41 plants failed to show significant cytotoxic effect at the concentration of less than 230 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Keywords—Antineoplastic activity · plant extract · cancer cell lines · MTT method · IC_{50} values

항암제의 개발에는 화학적 합성물질 또는 천연물로부터 유래하는 많은 후보물질의 약효여부를 조직적으로 검색하는 대량검색이 가장 널리 이용되고 있다. 대량검색을 위해서는 민감하면서도 실험조작이 간편한 능률적인 생물활성 대량검색 시스템이 중요한 요소로 되고있는데 사람의 암들로부터 수립된 암 세포주에 대한 생체의 세포독성 검사에 의해서 1차 검색을 실시하는 것이 일반적인 경향이다. 1차 검색에서 어느 특정한 암세포에 대해 선택적인 세포독성을 나타내면, 그 암세포를 누드 마우스에 이식하여

종양을 만들고 이에 대한 치료효과를 검색하는 이형이식 체내검사로 이행하는 것이 일반적으로 쓰이는 방법으로 이를 “질환-지향성” 항암제 검색 시스템 이라고 불리운다.¹⁾

본 연구팀은 최근 10여년간 생체의 세포독성 검사시에 필수적으로 요구되는 130여 종류의 암 세포주들을 수립하였다. 특히 한국인에 호발하는 위암, 간암, 자궁암, 대장암 등은 10여종이상이 수립되었고 이들 중 위암 및 대장암 세포주들은 다양한 특성 분석이 이루어진 후 보고되었다.²⁻⁸⁾ 본 연구팀이 개발한 세포주들은 현재

다른 신규 항암제 개발 및 검색에도 자주 사용되고 있다.⁹⁻¹⁴⁾

기존 항암제의 한계를 극복할 수 있는 새로운 개념의 항암물질을 개발함으로써 임상적으로 가장 흔한 성인 고형종양의 치료성적을 향상시키는데 기여하고자 본 연구팀은 전통의약서와 현대 생약학 등의 문헌정보를 근거로 하여 선정한 80종류의 전통약용 식물로부터 100종류의 추출물을 제조하고 그 효능을 3종류의 인체암세포주에 대하여 검색한 결과를 보고한 바 있다.¹⁵⁾ 또한 전통상용 생약이외에 좀 더 광범위한 식물들을 각지에서 구입 또는 채집하여 90종으로부터 추출한 100종류의 추출물을 대상으로 2종류의 인체 암세포주에 대하여 검색한 결과를 보고하였다.¹⁶⁾ 이번에는 전보의 후속으로 각지에서 구입 또는 채집한 식물엑스들을 2종류 인체 암세포주에 대하여 검색한 결과를 보고하고자 한다.

실 험

실험재료, 시료 및 활성 검사 모델

실험재료—본 실험에서 사용된 식물들은 천마산, 광덕산, 설악산, 청계산, 계룡산, 두물산, 검봉산, 치악산, 울릉도, 강화도 등에서 채집하거나 경동시장에서 구입한 50종류의 식물들을 대상으로 하였다.

시료의 조제—1차 검색을 위한 식물 추출물은 다음과 같이 제조하였다. 건조한 식물 100g을 세말로 하여 등근 플라스크에 넣고 메탄올 500ml씩으로 환류하면서 70~80°C에서 5시간씩 추출하였다. 추출액을 감압하에 농축한 후 동결 건조시켜 건조 분말로 만들었다. 건조 분말은 건조소(2~8°C)에 밀폐시켜 보관하며, 실험을 위해 용해시킬 경우에는 매번 당일 아침에 새로 꺼내 사용하였다.

세포주—실험에 사용한 세포주들은 성장 속도가 빠르고 비교적 항암제 감수성이 예민한 SNU-1(위암 세포주), 성장속도는 빠르나 일부분의 항암제에 내성을 갖는 SNU-C4(대장암 세포주)를 이용하였다. SNU-C4는 다중약제내성 유전자의 발현이 비교적 높은 편이나, SNU-1은 그 발현이 낮은 세포주이다.

실 험 방 법

식물 추출물들이 이들 암세포주에 대해 나타내는 세포독성을 항암작용의 한 지표로 삼았다. 세포독성을 관독하는 방법은 닦은 수의 시료를 단시간내에 대량 검색할 수 있고 검사 결과를 객관화할 수 있는 MTT 검색법으로 실시하였으며 실험방법은 다음과 같다.

MTT 검색법—실험에 사용한 적정세포수는 약물처리하지 않은 대조군에서 세포 접종 당시로부터 4일후 MTT 실험 종료시에 모두 세포가 지수 함수적으로 활발히 증식하면서, MTT 처리후의 OD₅₄₀ 값이 0.6~0.7에 이를 수 있는 세포수로 정하였다. 적정수의 세포를 180 μ l의 배지에 부유시켜 96-well plate의 12개 컬럼중 10개의 컬럼에 접종하였다. 난용성 시료는 0.02% DMSO(dimethyl sulfoxide)에 용해시키고, 수용성 시료는 PBS(phosphate buffered saline)에 용해시킨 후 20 μ l씩 각 well에 가하여 시료의 최종 농도는 well당 각각 300, 100 및 30 μ g/ml씩이 되도록 하였다. 한가지 농도군에 대해서는 1컬럼(8 wells)을 동일한 조건으로 사용하며, 나머지 한 컬럼에는 약물 대신 PBS만을 20 μ l 첨가하여 100% 생존군(control survival)으로 삼았다. 흡광도 측정시 사용할 blank에는 세포없는 배지만을 180 μ l 가하고 PBS 또는 약물을 20 μ l 첨가하였다. 암세포와 약물이 접종된 plate를 37°C, 5% CO₂하에서 4일간 배양 후 0.1 mg의 MTT(3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma M 2128)를 모든 well에 가해주고 다시 37°C에서 4시간 더 배양하였다. 배양 종료시 plate를 450 \times g에서 5분간 원심분리한 후 배지를 30 μ l 정도만 남기고 모두 빨아내었다(이때 각 well의 바닥에 형성된 formazan 결정이 흐트러지지 않도록 주의하였다). 배지가 제거된 각 well에 DMSO를 150 μ l씩 가한 후에 formazan 결정이 녹을 때까지 약 10분간 가볍게 진탕해 주고 바로 microplate reader(scanning multiwell spectrophotometer)로 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이 흡광도는 MTT가 세포에 의해 formazan(blue)으로 분

해된 양을 나타내며, 따라서 각 well에 살아있는 세포(viable cells)수와 비례한다.

결과분석—시험군에서 8개 well의 OD값으로부터 한 컬럼의 평균 OD₅₄₀ 값을 구하여 대조군(100% 생존군)의 평균 OD₅₄₀ 값에 대한 백분율을 산출하였다. 이 백분율은 대조군과 비교한 시험군의 세포 생존율에 해당하는 값이다. 50% 억제농도(IC₅₀)는 이 생존율이 50%가 되도록 하는 약물의 농도로 정의하였으며 이 IC₅₀값을 항암효과의 지표로 사용하였다.

실 험 결 과

한국인 위암 및 대장암 2종류 암세포의 IC₅₀의 값이 250 µg/ml 이상으로 나타난 추출물들에 대해서는 항암활성이 없거나 미약한 것으로 간주할 경우¹³⁾ 항암활성이 없거나 미약한 것으로 간주되는 추출물은 41종 식물로부터 온 43종의 추출물이었다(Table I).

또한 IC₅₀의 값이 230 µg/ml 이하이고 항암 작

Table I. Forty-three extracts (from 41 plants) without antineoplastic activity (IC₅₀>230 µg/ml)

학 명(식물명)	과 명	사용부위	IC ₅₀ (µg/ml)	
			SNU-1	SNU-C4
<i>Salix hulteni</i> (호랑버들)	Salicaceae	Herba	300 ↑	300 ↑
<i>Ambrosia trifida</i> (단풍잎돼지풀)	Compositae	Herba	300 ↑	300 ↑
<i>Metaplexis japonica</i> (박주가리)	Asclepidaceae	Herba	300 ↑	300 ↑
<i>Hydrangea macrophylla</i> (수국)	Saxifragaceae	Flos	293	300 ↑
<i>Calystegia soldanella</i> (갯메꽃)	Convolvulaceae	Radix	300 ↑	300 ↑
<i>Aconitum uchiyamai</i> (그늘돌쩌귀)	Ranunculaceae	Herba	300 ↑	300 ↑
<i>Morus bombysis</i> (산뽕나무)	Moraceae	Stem	279	272
<i>Salvia miltiorrhiza</i> (단삼)	Labiatae	Herba	300 ↑	285
<i>Chrysanthemum zawadskii</i> (구절초)	Compositae	Herba	253	300 ↑
<i>Veratrum maackii</i> (여로)	Liliaceae	Herba	300 ↑	300 ↑
<i>Atriplex gmelini</i> (가는 갯능쟁이)	Chenopodiaceae	Herba	300 ↑	300 ↑
<i>Pedicularis resupinata</i> (송이풀)	Scrophulariaceae	Herba	243	300 ↑
<i>Sorbus commixta</i> (마가목)	Rosaceae	Stem	299	300 ↑
<i>Menispermum dahuricum</i> (새모래덩굴)	Menispermaceae	Radix	300 ↑	279
<i>Rhododendron brachycarpum</i> (만병초)	Ericaceae	Radix	300 ↑	300 ↑
<i>Glehnia</i> spp. (해방풍)	Umbelliferae	Root	300 ↑	300 ↑
<i>Tillia amurensis</i> (피나무)	Tiliaceae	Cortex	300 ↑	300 ↑
<i>Carex parciflora</i> (보리사초)	Gramineae	Herba	300 ↑	290
<i>Artemisia scoparia</i> (비쭝)	Compositae	Herba	291	300 ↑
<i>Angelica tenuissima</i> (고분)	Umbelliferae	Herba	249	300 ↑
<i>Synurus deltoides</i> (수리취)	Compositae	Herba	300 ↑	300 ↑
<i>Polystichum tripterum</i> (실자고사리)	Ophioglossaceae	Herba	300 ↑	300 ↑
<i>Boehmeria platanifolia</i> (개모시풀)	Urticaceae	Herba	300 ↑	300 ↑
<i>Actinidia kolomikta</i> (퀴다래)	Actinidiaceae	Herba	300 ↑	300 ↑
<i>Artemisia montana</i> (산쭝)	Compositae	Radix	300 ↑	300 ↑
<i>Inula britannica</i> (금불초)	Compositae	Radix	300 ↑	300 ↑
<i>Inula britannica</i> (금불초)	Compositae	Herba	300 ↑	300 ↑
<i>Smilax sieboldii</i> (청가시나무)	Liliaceae	Herba	300 ↑	300 ↑
<i>Lindera obtusiloba</i> (생강나무)	Lauraceae	Herba	300 ↑	300 ↑
<i>Cornus officinalis</i> (산수유)	Cornaceae	Herba	300 ↑	300 ↑

(contd.)

<i>Sanicula chinensis</i> (참반디)	Umbelliferae	Herba	300 ↑	300 ↑
<i>Plantago asiatica</i> (질경이)	Plantaginaceae	Herba	300 ↑	300 ↑
<i>Hypericum ascyron</i> (물레나물)	Hypericaceae	Herba	300 ↑	300 ↑
<i>Adenocaulon himalaicum</i> (별가치)	Compositae	Herba	300 ↑	300 ↑
<i>Philadelphus schrenckii</i> (고광나무)	Saxifragaceae	Herba	300 ↑	300 ↑
<i>Glycine max</i> (콩)	Leguminosae	Herba	300 ↑	300 ↑
<i>Aconitum jaluense</i> (투구꽃)	Ranunculaceae	Herba	300 ↑	300 ↑
<i>Campanula punctata</i> (초롱꽃)	Campanulaceae	Herba	300 ↑	300 ↑
<i>Peucedanum terebinthaceum</i> (기름나물)	Umbelliferae	Radix	300 ↑	300 ↑
<i>Smilax sieboldii</i> (칭가시나무)	Liliaceae	Stem	300 ↑	300 ↑
<i>Prunus ansu</i> (살구나무)	Rosaceae	Semen	300 ↑	300 ↑
<i>Boschniakia rossica</i> (오리나무더부사리)	Orobanchaceae	Herba	300 ↑	300 ↑
<i>Polygonatum odoratum</i> (등골레)	Liliaceae	Radix	300 ↑	300 ↑

Table II. Six extracts (from 5 plants) with antineoplastic activity

학 명(식물명)	과 명	사용부위	IC ₅₀ (μg/ml)	
			SNU-1	SNU-C4
<i>Taxus caepitosa</i> (주목)	Taxaceae	Herba	69	155
<i>Geranium sibiricum</i> (쥐손이풀)	Geraniaceae	Herba	300 ↑	158
<i>Isodon japonicum</i> (방아풀)	Labiatae	Radix	300 ↑	187
<i>Isodon japonicum</i> (방아풀)	Labiatae	Herba	108	66
<i>Schizandra chinensis</i> (오미자)	Magnoliaceae	Herba	247	216
<i>Arisaema amurense</i> (천남성)	Araceae	Tuber	157	300 ↑

용이 있는 것으로 이미 밝혀진 6종의 추출물은 다음과 같다(Table II).

고 찰

전보에서 보고하였듯이 본 실험에 사용한 전통 약용식물들 중 이미 부분적이나마 현재 세포독성 물질이 분리된 것들로부터 제조한 추출물들의 경우 시험관내에서 본 연구팀이 수립한 위암 및 대장암 세포주들중 최소한 한 세포주에서는 IC₅₀값이 230 μg/ml 이하로 나타났다.^{15,16)} 그러므로 이번 실험에서도 생체의 실험시에 최소한 두 세포들 중 한 세포주에서 IC₅₀값이 230 μg/ml 이하로 나타난 값을 항암활성의 지표로 삼았다.

항암효과가 보고된 5종류의 식물 성분들을 보면 다음과 같다.

주목은 민간에서 기침약, 신경통 치료약으로

쓰이는 약재로써 분리된 taxol이 P388 leukemia, Waker carcinoma, Sarcoma 180에 대해서 항암작용이 있으며, 지사작용, 항염증작용 등이 알려져 있는 쥐손이풀으로부터 분리한 geraniol은 Sarcoma 180에 대해서 항암효과가 나타남을 보고하였으며, 천남성으로부터 분리한 D-mannitol 이 Hela 세포에 대해 강한 억제력이 있음을 보고하였다.¹⁷⁾ 방아풀로부터 분리한 oridonin과 enmein이 항암작용이 있음이 보고되었으며,¹⁸⁾ 오미자로부터 분리한 gomisins A가 항암작용이 있음이 보고되었다.¹⁹⁾

결 론

식물로부터 신규 항암물질을 개발하기 위하여 한국인의 종양에서 유래한 위암(SNU-1) 및 대장암(SNU-C4)들에 대한 세포독성 효과를 전통 상용 생약이외에 광범위한 식물들을 각지에

서 구입 또는 채집한 식물 46종으로부터 추출한 49종류의 추출물을 대상으로 MTT 분석법을 실시하여 50% 세포성장 저해농도(IC₅₀)를 측정하였다.

두 종류의 세포주 모두에 대한 IC₅₀의 값이 230 µg/ml 이상으로서 항암활성이 없거나 미약할 것으로 간주되는 추출물은 41종 식물로부터 온 43종류의 추출물이었다.

새로운 항암활성 효과를 가지는 항암물질의 개발을 위해서는 본 실험에서 사용한 식물들의 결과를 참고하여 좀 더 광범위한 식물들을 대상으로 향후 지속적인 검색이 필요할 것으로 생각된다.

감사의 말씀—본 논문은 선도기술개발사업(G7 과제)중 신동의약 과제의 지원에 의한 연구의 일부입니다. 본 연구를 수행함에 있어 식물의 동정 및 채집에 많은 도움을 주신 강원대학교 약대 김창민 교수님, 서울대학교 천연물과학연구소 김진숙 박사님, 유전공학연구소 이형규 박사님께 깊은 감사를 드립니다.

〈1994년 8월 9일 접수: 9월 16일 수리〉

참 고 문 헌

1. Boyd, M.R.: *Principles and practice of oncology* 3(10), 1~12 (1989).
2. Gazdar, A.F., Park, J.-G., and Oie, H.K.: *Colon cancer cell* (edited by Poste, G.), Academic Press, Orlando, FL, p.227 (1990).
3. Park, J.-G., Frucht, H., LaRocca, R.V., Bliss, Jr., D.P., Kurita, Y., Chen, T.-R., Henslee, J.G., Trepel, J.B., Jensen, R.T., Johnson, B.E., Bang, Y.-J., Kim, J.-P.: *Cancer Res.* 50, 2773 (1990).
4. Park, J.-G., Oie, H.K., Sugarbaker, P.H., Henslee, J.G., Chen, T.-R., Johnson, B.E. and Gazdar, A.F.: *Cancer Res.* 47, 6710 (1987).
5. 박재갑, 권남숙, 김진복, 오승근, 이진욱, 최국진, 김태수, 방영주, 김노경, 강순범, 신태우, 이상훈, 김주현, 이종욱, 김광현, 박명희, 김용일, 허버드 오이, 제인 트레펠, 아디 가즈다: *대한암학회지* 20, 105 (1988).
6. 박재갑, 권남숙, 노동영, 홍인규, 오승근, 이진욱, 박용현, 홍성국, 최국진, 김진복, 김수태, 허대석, 방영주, 박선양, 김노경, 고창순, 안효섭, 최영민, 강순범, 신희철, 이효표, 김승욱, 이상훈, 이한구, 왕규창, 정희원, 김현집, 한대회, 성숙환, 김주현, 이상은, 이종욱, 김시황, 김영균, 김광현, 유영석, 박명희, 박성희, 김용일, 허버드 오이, 아디 가즈다: *대한암학회지* 22, 1 (1990).
7. 박재갑, 전유미, 박규주, 양한광, 노동영, 김선희, 오승근, 이진욱, 박용현, 최국진, 김진복, 김수태, 허대석, 방영주, 박선양, 김병국, 김노경, 최규완, 김정룡, 고창순, 안효섭, 최영민, 강순범, 신희철, 이효표, 김승욱, 이상훈, 이한구, 왕규창, 정희원, 김현집, 한대회, 성숙환, 김주현, 이은식, 이상은, 최 황, 이종욱, 김시황, 김영균, 김광현, 민양기, 유영석, 박명희, 박성희, 김용일: *대한암학회지* 23, 169 (1991).
8. Park, J.-G., Lee, S.K., Hong, I.G., Kim, H.S., Lim, K.H., Choe, K.J., Kim, W.H., Kim, Y.I., Tsuruo, T. and Gottesman, M.M.: *J. Natl. Cancer. Inst.* 86, 700 (1994).
9. Gazdar, A.F., Kadoyama, C., Venzon, D., Park, J.-G., Tsai, C.-M., Linnoila, R.I., Mulshine, J.L., Ihde, D.C. and Giaccone, G.: *J. Natl. Cancer Inst Monogr.* 13, 191 (1992).
10. Gazdar, A.F., Tsai, C.M., Park, J.-G., Ihde, D., Mulshine, J., Carmichael, J., Mitchell, J. and Minna, J.D.: *Prediction of tumor treatment response* (edited by Chapman, J.D., Peters, L.J. and Withers, H.R.), Pergamon Press, New York, p.175 (1988).
11. Park, J.-G., Collins, J.M., Gazdar, A.F., Allegra, C.J., Steinberg, S.M., Greene, R.E. and Kramer, B.S.: *J. Natl. Cancer Inst.* 188, 1560 (1988).
12. Park, J.-G., Kramer, B.S., Lai, S.-L., Goldstein, L.J. and Gazdar, A.F.: *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 193 (1990).
13. Park, J.-G., Kramer, B.S., Steinberg, S.M., Carmichael, J., Collins, J.M., Minna, J.D. and Gazdar, A.F.: *Cancer Res.* 47, 5878 (1987).
14. Hay, R.J., Park, J.-G. and Gazdar, A.(eds.): *Academic Press, San Diego* (1994).
15. 박재갑, 현진원, 임경화, 신진이, 원용진, 이영득, 신국현, 장일무, 우원식: *생약학회지* 24, 223 (1993).
16. 현진원, 임경화, 신진이, 성민숙, 원용진, 김영석,

- 강삼식, 장일무, 우원식, 백우현, 김형자, 우은란, 박호균, 박재갑 : 생약학회지 25, 171 (1994).
17. 김수철 : 함암초본, 마람과 물결, 서울, pp.415, 213, 259, 93, 440 (1992).
18. 육창수 : 생화학회지모음집, 한국생화학회, 서울, p. 51 (1990).
19. 신동의약 개발사업 연구 기획 최종보고서, 서울대학교 천연물과학연구소, 서울, p.226 (1992).