

지모(知母)의 항암활성성분에 관한 연구

이승호* · 유시용 · 최상운 · 노재성 · 김성기 · 이정옥 · 안종웅
한국화학연구소, 영남대학교 약학대학*

Antitumor Agent from the Rhizome of *Anemarrhena asphodeloides*

Seung-Ho Lee, Shi Yong Ryu, Sang Un Choi, Zaesung No, Sung Ki Kim,
Chong Ock Lee and Jong-Woong Ahn

Korea Research Institute of Chemical Technology (KRICT), P.O. Box 107, Yuseong,
Daejeon 305-343 and *College of Pharmacy Yeung Nam Univ. 214-1 Dae Dong Gyong San
Gyong Book, 712-749, Korea

Abstract—EtOAc soluble part of MeOH extract of *Anemarrhena asphodeloides* rhizome was evaluated for the cytotoxicity against the five kinds of human tumor cell lines (A-549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498 and HCT15) *in vitro*. Bioassay-guided fractionation of EtOAc soluble part led to the isolation of active compound which was identified as timosaponin A-III showed potent cytotoxic activity, but its genin, sarsasapogenin, did not show cell growth inhibition.

Keywords—*Anemarrhena asphodeloides* · Liliaceae · steroidal saponin · timosaponin A-III · cytotoxicity, antitumor agent

현재 전세계적으로 항암성 항생물질류의 연구 개발이 활발히 진행되고 있고 최근에는 다수의 anthracycline계 화합물이 개발되어 왔다. 그러나 최근 taxol이나 camptothecin류 유사체의 예에서 볼 수 있듯이 고등식물 유래의 항암활성물질의 연구도 활발히 진행되고 있어 항암성 항생물질과 더불어 CPT-II(irinotecan), IST-622(charitreusin), navelbine, taxol 등과 같은 고등식물유래의 항암활성물질의 임상연구가 진행되고 있다.¹⁾

본 연구실에서는 수년전부터 고등식물유래의 항암활성 성분을 탐색하는 연구를 수행하고 있다. 즉 민간에서 구전되어 오고있는 항암식물(生藥) 혹은 문헌(各種漢方處方書) 등에서 암의 치료를 목적으로 사용된 식물을 중심으로 약 120여종의 식물(生藥)에 대하여 *in vitro*에서의 항암활성을 측정하였다. 그중 약 30%의 시료에서 유

의성있는 활성이 인정되었다.

지모(*Anemarrhena asphodeloides* Bunge)는 백합과(Liliaceae)에 속하는 다년생초본으로 근경은 원주형으로 상면에는 황갈색의 섬유가 조밀하게 붙어 있고, 하면에는 털뿌리가 많이 나있으며 神農本草經에는 中品으로 기재되어 있고 한방의 요약으로 잘 알려져 있다.²⁾ 지모의 성분으로는 saponin, xanthone류 등이 분리 보고되고 있으며, saponin으로는 timosaponin A-I-IV, B-I, B-II 등이,³⁾ xanthone류로는 mangiferin 등⁴⁾이 분리 보고되어 있다. 또 계절에 따라서 성분이 다르다는 보고가 있고,⁵⁾ 주 saponin인 sarsasapogenin, markogenin에 대해서는 여름에 채집한 것으로부터는 양자 모두가, 겨울에 채집한 것으로부터는 sarsasapogenin만이 확인되었다고 보고하고 있다. 지모의 약리 작용으로서는 혈당강하작용, 해열작용 등이 보고되었고,⁶⁾ 한방에서

는 소염, 해열, 지사, 이뇨, 진통약으로서 이용되고 있으며, 酸棗仁湯, 消風散, 滋陰降火湯, 白虎湯 등 많은 한방처방에 이용되고 있다.

한편 본 연구실에서 항암활성에 대한 예비실험의 결과 본 식물의 EtOAc soluble part에서 5종의 human tumor cell lines에 대하여 강한 cytotoxicity를 보였기 때문에 활성성분을 추적 단리하기 위하여 본 연구를 실시하였다.

실험재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용된 지모는 大田市에 있는 한약건재상에서 1993년 1월 건조품을 구입하여, 감정후 사용하였다.

활성성분의 분리 - 건조된 지모 3 kg을 MeOH로 80°에서 1시간씩 3회 반복 추출하였다. 추출액을 모아 감압하에서 MeOH를 제거하고 MeOH Ex.(295 g)를 얻었다. MeOH Ex.를 물에 현탁시킨 후 solvent partition하여 CH₂Cl₂(30 g), EtOAc(10 g), n-BuOH(155 g), H₂O(100 g) 분획을 얻었다. 각각의 분획에 대하여 5종의 human tumor cell lines에 대한 cytotoxicity를 *in vitro*에서 측정하여 강한 활성을 나타내는 EtOAc 분획에 대하여 활성성분을 추적 단리하였다. 즉 EtOAc 분획(10 g)을 silicagel(70-230 mesh) column에 loading한 후 MeOH-CH₂Cl₂을 gradient로 하여 elution시켜 나오는 분획을 TLC로 monitoring하면서 6개의 분획 Et1(0.37 g), Et2(0.98 g), Et3(2.0 g), Et4(1.87 g), Et5(1.25 g), Et6(1.94 g)을 얻었다. 이중 항암활성이 있는 Et5를 다시 MeOH-CH₂Cl₂를 solvent로 하여 silicagel column chromatography를 실시하여 active compound I(940 mg)을 얻었다.

Compound I: 무색무정형분말(MeOH), mp>300°, Rf=0.3(CHCl₃:MeOH:H₂O=4:1:0.1), [α]_D²⁰-44.2°(c 0.5, pyridine). Positive FAB-MS m/z 741(M+H)⁺. ¹H-NMR(pyridine-d₅): δ 0.82(3H, s, 18-CH₃), 0.95(3H, s, 19-CH₃), 1.08(3H, d, J=8.0Hz, 21-CH₃), 1.15(3H, d, J=7.5Hz, 27-CH₃), 3.33(1H, d, J=12Hz, 26b-H), 4.83(1H, d, J=7.5Hz, gal. 1-H), 5.15(1H, d, J=8Hz, glc. 1-H). ¹³C-NMR(pyridine-d₅): δ 30.9(C-1), 26.8(C-2),

75.2(C-3), 30.9(C-4), 36.9(C-5), 26.4(C-6), 26.4(C-7), 35.2(C-8), 40.2(C-9), 35.5(C-10), 21.1(C-11), 40.3(C-12), 40.9(C-13), 56.4(C-14), 32.1(C-15), 81.3(C-16), 62.9(C-17), 16.6(C-18), 24.0(C-19), 42.5(C-20), 14.9(C-21), 109.7(C-22), 26.2(C-23), 26.2(C-24), 27.5(C-25), 65.1(C-26), 16.3(C-27), 106.2(C-1'), 75.5(C-2'), 78.0(C-3'), 71.7(C-4'), 78.4(C-5'), 62.7(C-6'), 102.6(C-1''), 81.7(C-2''), 76.9(C-3''), 69.8(C-4''), 76.6(C-5''), 62.2(C-6'').

Compound I의 산가수분해 - Compound I(20 mg)을 HCl-dioxane(8%)에 현탁시킨 후 90°에서 1시간 reflux시킨다. 반응액은 농축후 H₂O를 가하고 CH₂Cl₂로 추출하였다. CH₂Cl₂층은 Na₂SO₄로 탈수한 후 농축하여 silicagel column chromatography (MeOH/CH₂Cl₂)를 실시하여 Ia(8 mg)을 얻었다. Ia: 鱗片狀結晶, ¹H-NMR(pyridine-d₅): δ 0.86(3H, s, 18-CH₃), 1.02(3H, s, 19-CH₃), 1.07(3H, d, J=8Hz, 27-CH₃), 1.16(3H, d, J=8Hz, 21-CH₃), 3.36(1H, d, J=11Hz, 26β-H), 4.11(1H, m, 26α-H), 4.36(1H, brs, 3α-H), 4.58(1H, m, 16-H). ¹³C-NMR(pyridine-d₅): δ 30.6(C-1), 28.6(C-2), 66.1(C-3), 34.4(C-4), 37.0(C-5), 27.2(C-6), 26.9(C-7), 35.6(C-8), 40.4(C-9), 35.7(C-10), 21.2(C-11), 40.1(C-12), 40.9(C-13), 56.6(C-14), 32.2(C-15), 81.3(C-16), 63.0(C-17), 16.7(C-18), 24.3(C-19), 42.5(C-20), 14.9(C-21), 109.7(C-22), 26.4(C-23), 26.2(C-24), 27.5(C-25), 65.1(C-26), 16.3(C-27). 물층은 재차 농축하여 표품과 함께 TLC를 실시하여 glucose 및 galactose를 확인하였다. [Rf: 0.52(glucose), 0.50(galactose), cellulose F₂₅₄ plate, n-BuOH:pyridine:H₂O=6:4:3]

항암활성의 검색 - 1989년에 미국의 암연구소(NCI)에서 약물의 *in vitro*에서의 항암활성을 측정하기 위하여 개발된 sulforhodamine B(SRB) assay법을 사용하였다. 계대배양종인 A-549(lungcarcinoma), SK-OV-3(adenocarcinoma, ovary malignant ascites), SK-MEL-2(malignant melanoma, metastasis to skin of thigh), XF498(central nerve system tumor), HCT15(colon adenocarcinoma) 등 5종의 human

tumor cell lines를 trypsin-CDTA 용액으로 부착면으로부터 분리시키고, 96 well flat bottom microplate (Falcon)에 well당 세포수가 5×10^3 (A549, HCT15), 1×10^4 (SK-MEL-2, XF498), 2×10^4 (SK-OV-3)이 되도록 분주하였다. 여기에 6 농도의 log dose로 medium에 희석된 시료용액들을 well에 각각 100 μ l씩 넣어주고 48시간 더 배양하였다. 배양후 각 well의 medium을 제거하고 10% trichloroacetic acid(TCA)를 100 μ l씩 가하여 4 $^{\circ}$ 에서 1시간 방치하여 세포들을 plate 바닥면에 고정시켰다. 세포의 고정이 끝난후 plate를 물로 5~6회 세척하여 남아있는 TCA 용액을 완전히 제거하고 실온에서 남은 물기가 없도록 건조시켰다. 완전히 건조된 plate는 well당 100 μ l의 1% acetic acid 용액에 0.4% SRB를 녹인 염색용액을 가하여 30분간 세포를 염색하고 다시 1% acetic acid 용액으로 5~6회 세척하여 세포에 결합하지 않은 SRB를 제거하였다. 이렇게 염색된 cell plate들은 다시 실온에서 건조시킨뒤 well당 100 μ l의 10 mM tris base(unbuffered) 용액을 가하여 titer plate shaker로 10분간 shaking하여 염색약을 용출시킨후 microplate reader를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 암세포들에 대한 약물의 효과를 계산하기 위하여 약물을 가할 때의 세포수(Tz)와 약물이 들어있지 않은 medium을 가하여 48시간 배양했을때의 세포수(C) 및 각농도의 약물과 함께 48시간 배양했을때의 세포수(T) 등을 측정하여 다음의 수식에 의해 항암활성을 계산하였다. $Tz > T$ 인 경우에는 $[(T - Tz) / (C - Tz)] \times 100$ 으로 계산하고 $Tz < T$ 인 경우에는 $[1(T -$

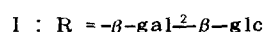
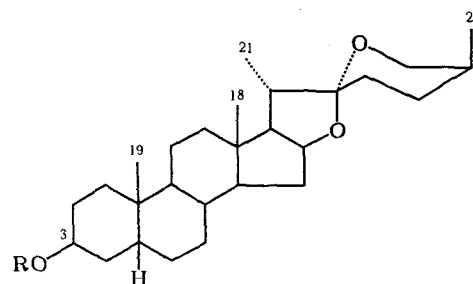


Chart 1

$Tz) / Tz] \times 100$ 의 수식으로 계산하였다. 이렇게 계산된 값들로부터 LOTUS program의 data regression을 이용하여 약물이 암세포의 성장을 50% 억제하는 농도인 50% effective dose(ED50)를 계산하여 각 약물의 항암활성도를 비교하였다.

결과 및 고찰

Active compound I의 화학구조 - Compound I은 ^1H - 및 ^{13}C -NMR spectrum의 검토 결과 분자내에 2개의 당을 갖는 5 β -spirostane type의 steroidal saponin으로 추정했다. ^1H -NMR spectrum에 있어서 4.83, 5.15 ppm에 두개의 anomeric proton signal이 관찰되고 coupling constant가 각각 7.5 Hz, 8.0 Hz인 점으로부터 두개의 당은 β -결합을 하고 있는 것으로 추정된다. 또 ^{13}C -NMR spectrum에 있어서는 aglycone 부분의 C-5 위치의 36.9 ppm, C-22 위치의 109.7 ppm, C-25 위치의 27.5 ppm 등이 sarsasa-

Table I. The cytotoxic activity of timosaponin A-III from the *Anemarrhena asphodeloides* against the human tumor cell lines *in vitro*.

Compound	ED50($\mu\text{g/ml}$)*				
	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT15
I	1.55	2.54	1.98	3.06	2.68
Ia	100<	100<	100<	100<	100<
Antimycin	0.48	5.50	0.27	0.39	0.41

*ED₅₀ value of the compound against each cancer cell lines, which was defined as a concentration ($\mu\text{g/ml}$) that caused 50% inhibition of cell growth *in vitro*.

pogenin(Ia)의 문헌치와 일치했다. 또 나머지 당 부분의 signal은 glucose와 galactose가 glc(1→2)gal 결합을 한 문헌치와 완전히 일치했다. 또 compound I의 3위의 carbon signal은 sarsasapogenin(Ia)의 3위의 수산기에 당이 결합했을 때의 glycosylation shift(+9 ppm)를 만족시켜주고 있다.

Compound I을 8% HCl-dioxane으로 가수분해해서 얻은 aglycone(Ia)의 ¹³C-NMR를 sarsasapogenin(Ia)의 문헌치와 비교했을때 완전히 일치했다. 또 당부분은 표품과 함께 TLC를 실시하여 glucose와 galactose를 확인했다. 이상의 결과로부터 compound I은 sarsasapogenin-3-O-β-D-glucopyranosyl(1→2)-β-D-galactopyranoside(timosaponin A-III)로 결정했다.

Compound I의 항암활성 - 지모로부터 분리한 항암활성성분 timosaponin A-III와 이로부터 유도한 sarsasapogenin(Ia)을 5종의 human tumor cell lines(A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498, HCT15)에 대한 *in vitro*에서의 cytotoxicity를 측정하고 그 결과를 Table I에 나타내었으며 genin인 sarsasapogenin은 활성을 나타내지 않았다. Timosaponin A-III는 특히 A-549에 대하여 가장 강한 활성을 보였으며, 또 일반적으로 천연으로부터 유래하는 항암활성성분들이 SK-OV-3에 대하여 가장 non-sensitive한 활성을 보이는데 비하여 timosaponin A-III의 경우는 다른

양상을 보였다.

Timosaponin A-III는 지모의 주 saponin으로 알려져 있고 최근 *Cornus florida*(Cornaceae)의 수피에서도 sarsasapogenin xylosylgalactoside와 함께 얻어져서 달팽이를 죽이는 작용이 있다는 것이 알려져 있으나 인체암세포에 대한 항암활성은 아직 보고된바 없다.

또한 Sarsasapogenin이 전혀 활성을 나타내지 않은 점으로부터 saponin의 경우에 있어서 활성의 발현과 당의 결합유무와의 관계에 대하여 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

<1995년 1월 14일 접수>

참고문헌

1. 塚越茂, 癌と化學療法, 20(4), 425 (1993).
2. 中藥大辭典, 上海科學技術出版社 小學館編, 1759.
3. T. Kawasaki and T. Yamauchi, *Chem. Pharm. Bull.*, 11, 1221 (1963).
4. 森田直賢, 清水嶺夫, 福田昌子, 藥誌, 85, 374 (1965).
5. 武田健一, 岡西爲人, 島岡有昌, 藥誌, 73, 29 (1953).
6. 江田昭英, 日藥理, 67, 223 (1971).
7. K. Tori, S. Seo, Y. Terui, J. Nishikawa and F. Yasude, *Tetrahedron Lett.*, 22, 2404 (1981).