

약용식물 오수유로부터 다제약제 내성 조절물질의 분리

이성우* · 황방연* · 김세은 · 김환목 · 김영호 · 이경순* · 이정준 · 노재섭*
KIST 생명공학연구소, 충북대학교 약학대학*

Isolation of Modulators for Multidrug Resistance from the Fruits of *Evodia officinalis*

Sung Woo Lee*, Bang Yeon Hwang*, Se Eun Kim, Hwan Mook Kim, Young Ho Kim,
Kyong Soon Lee*, Jung Joon Lee and Jai-Seup Ro*

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, Yusong P.O.Box 115, Taejon, 305-600
and *College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea

Abstract—Preliminary screening test of modulators for multidrug resistance with 400 medicinal plants was carried out by using human multidrug resistance cell line, KB-V1. Among active medicinal plants, the unripe fruits of *Evodia officinalis* showed a potent modulating activity of MDR. From MeOH extract of this plant, we isolated two indole alkaloids, rutaecarpine (1) and evodiamine (2), by repeated silicagel column chromatography. Rutaecarpine increased the cytotoxicities of vinblastine and taxol against multidrug resistance cells, but evodiamine showed no modulating activity in spite of its potent cytotoxic activities.

Keywords—Multidrug Resistance · *Evodia officinalis* · rutaecarpine · evodiamine · cytotoxic activities

새로운 항암제의 개발과 암세포 배양기술의 발전으로 항암 화학 요법은 비약적인 발전을 거듭하여 왔다. 그러나 처음에는 탁월한 효과를 보였던 항암제가 치료를 계속하거나 재발시에 내성을 획득함으로써 치료를 불가능하게 한다. 이러한 약제내성은 구조나 작용기전이 상이한 adriamycin, colchicine, vinblastine, vincristine, taxol, actinomycin D 등의 항암제에 내성을 보이는 이른바 다제약제내성(multidrug resistance, MDR)의 성질을 나타낸다. 이러한 내성획득에는 MDR1 유전자 산물로 약물수송에 관련된 170 kD의 p-Glycoprotein이 세포막에 과잉발현 됨으로써 항암제를 세포밖으로 능동적으로 배출하여 세포내의 약물농도가 감소되기 때문인 것으로 알려졌다.¹⁾ p-Glycoprotein은 12개의 막통과부위와 2

개의 ATP 결합 부위를 가지고 있으며 energy 의존 약제 배출펌프로써 작용하고 있어 내성암에 대한 1차 표적이 되고 있다.²⁾ 항암 화학요법에서 약제내성을 극복하고 p-Glycoprotein의 작용기전을 연구하기 위하여 verapamil,³⁾ quinidine,⁴⁾ stipiamide,⁵⁾ sekothrixide⁶⁾ 등의 많은 chemosensitizers가 발견되었다. 또한 protein kinase activator들은 다제약제내성을 유도하고,⁷⁾ calmodulin의 길항제는 다제약제내성을 감소시킨다는 보고도 있어 다제약제내성과 세포내 정보전달물질과의 관련성도 밝혀지고 있다.⁸⁾

본 연구에서는 천연물로부터 항암제의 다제약제 내성을 극복할 수 있는 활성물질을 탐색하여 항암제와 병용투여 함으로써 암의 치료에 기여할 수 있는 활성물질을 개발할 목적으로, 대표적인

항암제인 vinblastine에 내성을 보이는 KB-V1세포와 감수성 세포주 KB-3-1세포를 이용하여 유용생약의 MeOH 추출물에 대한 항암제의 내성 조절활성을 검색하였다. 총 400종의 약용식물을 검색한 결과 높은 활성을 보인 吳茱萸(*Evodia officinalis*의 미성숙과실, Rutaceae)를 선택하고, 활성추적분리법(bioactivity-guided fractionation and isolation technique)에 따라 순수 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물은 기기분석을 통하여 구조를 동정한 후 대표적인 항암제인 vinblastine, taxol, adriamycin 등의 항암제에 대한 활성 증강정도를 조사하였다.

실험재료 및 방법

재료 - 본 실험에 사용한 식물들은 전국 각지의 산야에서 직접 채취하여 음건한 후 세절하여 사용하였으며, 오수유를 비롯한 일부 한약재는 대전과 청주의 건재상에서 구입하여 총 400종을 재료로 사용하였다.

기기 및 시약 - 용점은 Electrothermal IA 9100 Digital M.P. Apparatus를 사용하여 측정하였으며 보정하지 않았다. NMR은 Varian Unity 300 Spectrometer를 사용하였고, MS는 Hewlett-Packard 5989 A를 사용하였다. 세포배양에 필요한 배지와 시약 및 fetal bovine serum은 Gibco에서 구입하였으며, 기타 실험에 필요한 시약은 Sigma에서 구입하여 사용하였다.

세포주 및 세포배양 - 인체 구강암 세포주인 KB-3-1과 그 내성 세포주인 KB-V1세포는 2mM L-glutamine과 10% fetal calf serum(FCS)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's Medium (D-MEM)에서, 인체 유방암 세포주인 MCF7과 그 내성 세포주인 MCF7/ADR은 RPMI1640 medium을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하여 실험에 사용하였다. KB-V1 세포는 내성을 유지하기 위하여 1 µM vinblastine을 함유한 D-MEM배지에서 배양하였다.

시료의 조제 - 전국 각지의 산야에서 채집한 시료와 건재상에서 구입한 시료를 MeOH로 추출한 후 감압농축하고 이를 20 mg/ml의 농도로 DMSO에 녹여 최종농도가 100 µg/ml, 20

µg/ml, 4 µg/ml이 되도록 단계별로 희석하여 실험에 사용하였다.

In vitro 활성검색 - D-MEM medium 100 µl(10% FCS)에 96 well plate의 한 well당 대수 증식기에 있는 각 cell line의 세포수가 2,500~10,000 cells/well이 되도록 접종하여 24시간 배양한 후, 단계별로 희석한 시료와 일정농도의 항암제를 처리하여 최종 volume이 200 µl가 되도록 하였다. 이를 48시간 배양한 후 세포를 고정시키기 위하여 cold 50% trichloroacetic acid 50 µl를 가하고 4°C에서 1시간 동안 방치하였다. 고정된 세포는 물로 5회 세척한 후에 0.4% sulforhodamine B(SRB) 용액 100 µl를 가하여 30분 동안 반응시킨 후, 1% acetic acid용액으로 세척하여 건조한 후 10 mM Tris 용액(pH 10.5)으로 용해시켜 570 nm에서 microtiter plate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.⁹⁾

MDR 조절활성 - 다제약제내성의 조절활성은 단계별로 희석한 시료에 대하여 vinblastine을 처리한 군과 처리하지 않은 군의 cytotoxicity를 비교하여 시료자체의 세포독성이 없으면서 vinblastine의 항암활성을 유의성 있게 증가시키는 활성을 측정하였다. 분리한 화합물의 각 세포주에서의 항암제 활성에 대한 영향을 측정하기 위하여 IC₁₀ 이하 농도의 화합물과 단계별로 희석한 각 항암제를 함께 처리하였다. 화합물의 내성 세포주에 대한 항암제의 세포독성 증가정도를 degree of potentiation(D. P.)로 나타내었다.¹⁰⁾

$$D.P. = \frac{IC_{50} \text{ value of anticancer drugs } per \ se}{IC_{50} \text{ value of anticancer drugs with chemosensitizers}}$$

추출 및 분리정제 - 다제약제내성 세포주에 대한 항암활성을 유의성 있게 증가시킨 오수유 3 kg을 MeOH로 2회 초음파 추출하고 감압농축하여 MeOH 엑스를 얻었다. 이 MeOH 엑스를 dichloromethane과 H₂O로 분획하여 dichloromethane 분획, H₂O 분획 및 경계면에 생성된 interphase 분획을 얻었다. 이 interphase 분획을 농축하여 CH₂Cl₂-MeOH (40:1)의 전개용매로 silicagel column chromatography를 실시하여 Fr. 1에서 Fr. 15까지를 얻었다. Fr. 7을 CH₂Cl₂로

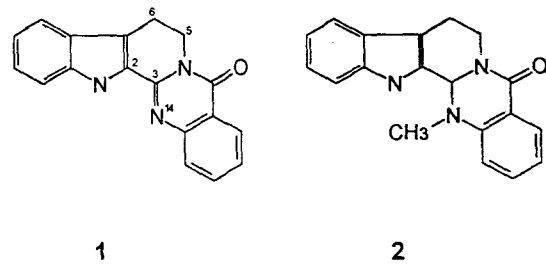
로 다시 silicagel column chromatography를 실시하여 compound 1 (120mg)을 얻고, Fr. 12를 $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-AC}_2\text{O}$ (4:1)의 전개용매로 silicagel column chromatography를 실시하여 황색의 반점을 나타내는 분획을 얻고, 이를 CHCl_3 과 MeOH의 혼합용매로 재결정하여 침상결정인 compound 2 (500mg)을 얻었다.

Compound 1: yellow crystal, mp 264-266°; IR, $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}) 3345, 1650, 1600; MS: m/z 287 [M^+]; $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ : 3.24 (2H, m, CH_2), 4.59 (2H, m, CH_2), 7.1-7.8 (7H, m, Ar-H), 8.32 (1H, d, $J=7.9\text{Hz}$, Ar-H), 9.64 (1H, brs, NH)

Compound 2: yellow needle crystal, mp 269-271°; IR, $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}) 1510, 1630, 1606; MS: m/z 303 [M^+]; $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ : 2.52 (3H, s, N- CH_3), 2.98 (2H, m, H-5), 3.29 (1H, m, H-6eq), 4.89 (1H, m, H-6ax), 5.95 (1H, s, H-3), 7.15-7.61 (7H, m, Ar-H), 8.13 (1H, dd, Ar-H), 8.38 (1H, brs, NH)

실험결과 및 고찰

생약시료 400종에 대하여 인체 상피암 내성 세포주인 KB-V1 세포주와 감수성 세포주인 KB-



3-1을 이용하여 다제약제내성 극복효과를 조사하여 보았다. 높은 활성을 보인 생약으로 오수유를 비롯하여 10종이 있었으며 중정도의 활성을 보인 생약으로는 연교, 청피, 아출, 후박, 오약, 하고초, 현호색, 백두구, 참배암차즈기, 고추나물 등 20여종이 있었고, 그 외의 대부분의 생약은 대체로 낮은 활성을 나타내었다. 유의성 있는 활성을 나타낸 오수유로부터 두 가지 alkaloid 화합물을 분리정제하였다. 각 화합물의 물리화학적 성질과 spectral data로부터 compound 1은 오수유에서 이미 분리 보고된 rutaecarpine으로, compound 2는 evodiamine으로 동정하였다.¹¹⁾

Rutaecarpine은 Fig. 1에서와 같이 KB-3-1과 MCF7 및 내성 세포주인 KB-V1, MCF7/ADR 세포주에 대하여 세포독성을 거의 나타내지 않았으나, 내성세포주에 대하여 항암제인 vinblastine, taxol 등과 함께 처리할 때 현저하게 세포독성이

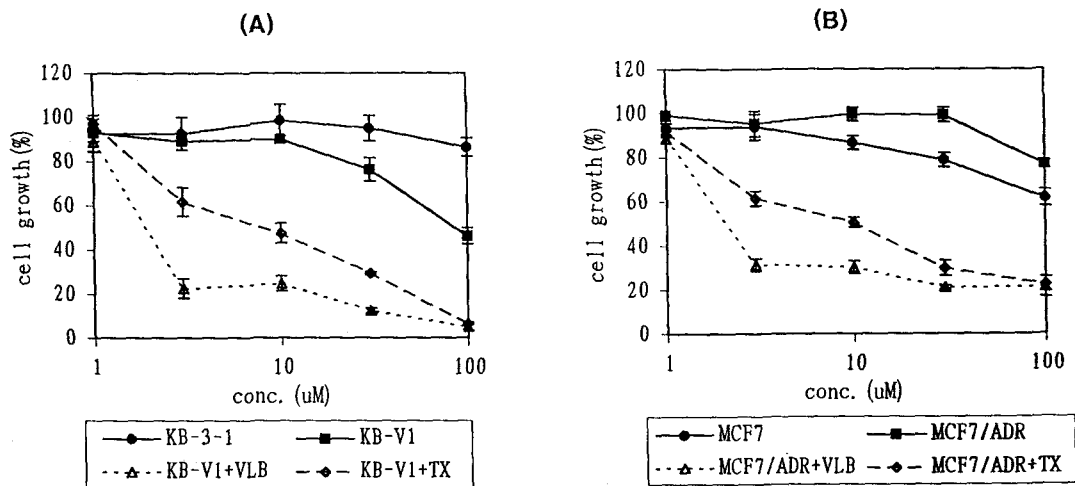


Fig. 1. *In vitro* sensitivities of compound 1 on (A) KB cells and (B) MCF7 cells. Multidrug-resistance cells (KB-V1 and MCF7/ADR cells) were determined in the absence-or presence of anticancer drugs. *points are mean \pm S.E. *concentrations of cotreated anticancer drugs are a tenth of IC_{50} which are nontoxic to multidrug-resistant cells.

Table I. Effects of compound 1 on potentiating cytotoxicities of anticancer drugs on multidrug resistant cells and their respective sensitive cells

cell line drugs + 1 (conc.)	KB-3-1 ^{a)}	KB-V1 ^{b)}	MCF7 ^{a)}	MCF7/ADR ^{b)}
Vinblastine + 1 (10 mM)	1.0 ^{c)}	24.4	1.6	1.4
Taxol + 1 (10 mM)	2.5	27.4	1.6	7.4
Adriamycin + 1 (30 mM)	1.1	5.6	0.5	1.5

a) sensitive cells, b) Multidrug resistance cells, c) Degree of Potentiation (D. P.)

Table II. *In vitro* test results for compound 2 against several human cancer cell lines

Panel/Cell Line	GI ₅₀ ^{a)} (μg/ml)	Panel/Cell Line	GI ₅₀ (μg/ml)
Breast Cancer		Colon Cancer	
MCF7	1.0 X 10 ⁻¹	HT29	3.6 X 10 ⁻¹
MCF7/ADR	1.9 X 10 ⁻¹	SW620	2.1 X 10 ⁰
Renal Cancer		KM12	1.5 X 10 ⁰
UO-31	1.4 X 10 ¹	HCT15	2.7 X 10 ⁻¹
ACHN	6.1 X 10 ⁰	Non-Small Cell Lung	
Prostate Cancer		Cancer	
PC-3	6.3 X 10 ¹	NCI-H23	2.1 X 10 ⁰
CNS Cancer		NCI-H522	5.3 X 10 ⁻¹
SF-539	2.8 X 10 ⁻¹	A549	8.0 X 10 ⁰
SNB-75	1.6 X 10 ⁰	NCI-H226	7.4 X 10 ⁰
Colon Cancer		Melanoma	
HCT116	2.6 X 10 ⁰	M14	3.6 X 10 ⁰
COLO205	9.0 X 10 ⁻¹	LOXIMVI	1.3 X 10 ⁰

a) GI₅₀ is the concentration which inhibits growth to 50 % of vehicle treated controls.

증가하는 것으로서 다제약제내성 조절작용이 있음을 알 수 있었다. Evodiamine의 경우는 감수성세포주 및 내성세포주 모두에 높은 세포독성을 나타내었으나, 내성세포주의 다제약제내성을 조절하는 활성은 보이지 않았다. 다음으로 rutaecarpine의 다제약제내성 극복효과를 측정하기 위하여 항암제 vinblastine, taxol에 대한 세포독성 증강정도(D.P.)를 측정해 본 결과 10 mM의 농도에서 각각 KB-V1 세포에 대하여 vinblastine과 taxol의 세포독성을 24배, 27배 증가시켰으며, adriamycin의 경우는 30 mM의 농도에서 6배 정도의 세포독성을 증강시켰다. KB-V1 세포주 대신 MCF7/ADR의 경우는 거의 유의성 있는 reversal activity를 나타내지 않았다(Table I). 일반적으로 이러한 계열의 alkaloid 화합물은 고농

도의 경우 용해도가 낮아 실험도중 침전으로 석출되는 경향이 있어 용량의존적으로 항암제의 내성 극복효과는 나타나지 않았다. 추후 이 화합물의 용해도를 개선함으로써 활성의 증강효과가 기대된다. 한편 rutaecarpine의 14번 NH가 N-CH₃로 치환된 evodiamine의 경우 구조적인 유사성에도 불구하고 인체암 세포주에 대하여 상대적으로 높은 cytotoxicity를 나타내는 반면 vinblastine이나 taxol과 함께 처리했을 때 항암제의 내성 극복효과는 전혀 나타나지 않는 것이 흥미롭다. Evodiamine의 경우 높은 세포독성을 나타내었으므로 그 자체의 항암활성을 조사해 보기 위하여 20여종의 인체암 조직암 세포주에 대한 항암활성을 조사하여 본 결과 대체로 여러 조직 암세포주에 대하여 강한 세포독성을 나타내었으며 특히

HCT 15 colon cancer에 대해 아주 낮은 GI₅₀ 치를 나타내었다(Table II). 오수유는 한방에서 溫中, 散寒, 理氣, 止嘔의 효능과 자궁수축작용, 항진균작용 및 혈압강하작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 달이거나 환제 또는 산제로 하여 복용하거나 煎液으로 하여 환부를 찜질하는 등 널리 이용되어져 왔다.¹²⁾ 최근 evodiamine을 포함한 indole alkaloid들이 강력한 cardiotonic 활성,¹³⁾ antianoxic action,¹⁴⁾ 혈압조절작용¹⁵⁾ 등 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 현재 많은 연구가 진행되고 있다. 본 연구를 통하여 오수유의 두 가지 주성분 중에서 rutaecarpine은 항암제의 내성을 극복하는 활성을 나타내고 또 다른 성분인 evodiamine은 여러 인체조직특이암 세포주에 대하여 강한 세포독성을 나타냄으로서 추후 오수유가 항암생약으로 개발될 가치가 있는 중요한 자원생약으로 사료된다.

감사의 말씀 - 이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 일부가 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

〈1995년 12월 1일 접수〉

참고문헌

- Bradley, G., Julanka, P.F. and Ling, V.: Mechanism of Multidrug Resistance, *Biochem. Biophys. Acta.* **948**, 87 (1988).
- Pastan, I., Willingham, M.C. and Gottesman, M.M.: Molecular Manipulations of the Multidrug Transporter; A New Role for Transgenic Mice, *FASEB J.* **5**, 1523 (1991).
- Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y.: Reduced Drug Accumulation in Multiply Drug-resistant Human KB Carcinoma, *Cancer Res.* **45**, 3002 (1985).
- Tsuruo, T., Iida, H., Kitatami, Y., Yokota, Y., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y.: Effects of Quinidine and Related Compounds on Cytotoxicity and Cellular Accumulation of Vincristine and Adriamycin in Drug-resistant Tumor Cells, *Cancer Res.* **44**, 4303 (1984).
- Kim, Y.J., Furihata, K., Yamanaka, S., Fudo, R. and Seto, H.: Isolation and Structural Elucidation of Stipiamide, A New Antibiotic Effective to Multidrug Resistant Cancer Cells, *J. Antibiot.* **44**, 553 (1991).
- Kim, Y.J., Furihata, K., Shimazu, A., Furihata, K. and Seto, H.: Isolation and Structural Elucidation of Sekothrixide, A New Macrolide Effective to Overcome Drug-Resistance of Cancer Cells *J. Antibiot.* **44**, 1280 (1991)
- Palayoor, S.T., Stein, J.M. and Hait, W.N.: Inhibition of Protein Kinase C by Antineoplastic Agents Implications for Drug Resistance, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **148**, 718 (1987).
- Tsuruo, T. et. al.: Antitumor Effect of CPT-11, A New Derivatives of Camptothecin, against Pleiotropic Drug-resistant tumors *in vitro* and *in vivo*, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **21**, 71 (1988).
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D.A. et. al.: New Clorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer Drug Screening, *J. Natl. Cancer. Inst.* **82**, 1107 (1990).
- Kawada, M., Sumi, S. and Umezawa, K. : Circumvention of Multidrug Resistance in Human Carcinoma KB Cells by Polyether Antibiotics, *J. Antibiot.* **45**, 556 (1992).
- Itokawa, H., Inamatsu, M. and Takeya. : A Cytotoxic Principle from *Evodia rutaecarpa*. *Shoyakugaku Zasshi.* **44**, 135 (1990).
- 鄭普燮, 辛民教: 圖解 鄉藥(生藥)大事典(植物篇), 永林社, 서울, p. 786-787 (1990).
- Shoji, N., Umeyama, A., Takemoto, T., Kajiwara, A. and Ohizumi, Y.: Isolation of Evodiamine, a Powerful Cardiotonic Principle, from *Evodia rutaecarpa* Bentham (Rutaceae), *J. Pharm. Sci.* **75**, 612 (1986).
- Yamahara, J., Tamada, T., Kitani, T., Naitoh, Y. and Fujimura, H.: Antianoxic Action and Active Constituents of *Evodiae Fructus*, *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 1820 (1989).
- Haji, A., Momose, Y., Takeda, T. and Nakanishi, S.: Increased Feline Cerebral Blood Flow Induced by Dehydroevodiamine hydrochloride from *Evodia rutaecarpa*, *J. Nat. Prod.* **57**, 387 (1994).