

L1210 및 HL60 Cell에 대한 연교의 세포독성 성분

이준성 · 민병선 · 배기환*
충남대학교 약학대학
(Received April 16, 1996)

Cytotoxic Constituents from the Forsythiae Fructus against L1210 and HL60 cells

Jun Sung Lee, Byung Sun Min and Ki Hwan Bae*
College of Pharmacy, Chungnam National Univ., Taejon 305-764, Korea

Abstract—Forsythiae Fructus was studied on cytotoxic activities for the purpose of finding out active constituents against L1210 and HL60 cells. To isolate the active ones, the methanolic extract was partitioned into water insoluble and water soluble fractions. Furthermore, the water soluble fraction was fractionated into four parts, n-hexane, benzene, ethylacetate and water fractions. Among these, the water insoluble fraction showed the most potent cytotoxic activities on L1210 and HL60 cells *in vitro*. The water insoluble fraction was applied to silica gel column chromatography and divided into 5 fractions (fr. 1-5). The active constituents I and II were isolated from fr. 2 and 3, respectively, by repeated silica gel column chromatography and recrystallization. The constituents were identified as 3 β -acetylbetulinic acid and betulinic acid by means of physicochemical data. The ED₅₀ values of 3 β -acetylbetulinic acid and betulinic acid were 9.10 and 16.43 μ g/ml against L1210 cells and 2.72 and 2.41 μ g/ml against HL60 cells, respectively.

Keywords □ Forsythiae Fructus, cytotoxic activities, L1210 cells, HL60 cells, 3 β -acetylbetulinic acid, betulinic acid.

난치병으로 분류된 암을 정복하기 위한 인간의 노력이 수십년 동안 계속되어 왔음에도 불구하고 각종 암은 여전히 현대 의학의 난제 중의 하나로 인식 되어 있다. 중공의 항암처방집¹⁾에는 암이나 기타 종양치료에 쓰이는 많은 천연물들이 소개되어 있고, 우리나라에서도 옛날부터 한방과 민간에서 암의 치료에 생약이 사용되어 왔다. 따라서 천연물은 항종양성 생리활성 물질을 찾기 위한 귀중한 자원이라 할 수 있다. 우리나라를 비롯한 동양권에서는 옛날부터 암 또는 기타 종양 치료에 사용되어온 생약들에 대한 세포독성 스크리닝 및 활성물질 탐구가 진행되고 있다. 이 등²⁾은 40여종의 생약에 대하여 L1210 cells에 대한 세포독성 스크리닝을 행하여 울금, 지

실, 자근, 털진득찰, 연교 등이 좋은 작용을 나타낸다고 보고한 바 있다. 이들 생약중 연교는 몰푸레나무과(Oleaceae)에 속하는 개나리속(*Forsythia*)식물의 열매로서 한방에서는 해열, 소염, 배농, 이뇨 및 해독에 효과가 있다하여 옛날부터 빈용되어온 중요한 것 중의 하나이다. 연교에 대한 성분연구로는 triterpenoid화합물(betulinic acid, oleanolic acid, ursolic acid)³⁻⁵⁾, lignan계 화합물(arctigenin, matairesinol, phillygenin, (+)-pinoresinol)³⁻⁵⁾, lignan배당체(arctiin, matairesinoside, phillyrin, (+)-pinoresinol-D-glucoside)³⁻⁶⁾, phenylpropanoid 배당체(suspensaside, β -hydroxy-acteoside, forsythiaside, acteoside)⁷⁻¹⁰⁾ 및 flavonol 배당체(rutin)³⁻⁵⁾ 등이 보고되어 있다. 생리활성에 관한 연구로는 phenylpropanoid 배당체(suspensaside, β -hydroxyacteoside, forsythiaside, ac-

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-821-5925 (팩스) 042-821-5903

teoside)가 항균작용을 나타낸다고 보고되어 있다.⁹⁾

본 연구에서는 연교의 메탄올 추출물중 물불용분획이 쥐에서 유래된 L1210 cells와 인체에서 유래된 HL60 cells에 대하여 높은 활성을 나타냄을 관찰하고 세포독성 성분을 단리하여 화학 구조를 동정하고 세포독성을 측정하여 유의성있는 결과를 얻었기에 보고한다.

실험재료 및 방법

실험재료 - 실험에 사용된 연교는 1991년 10월 대전광역시 대성 건재 한약방에서 구입하여 사용하였다.

시약 및 기기 - column chromatography용 silica gel 60 (Merck, 70~230, 230~400 mesh ASTM), precoated silica gel 60 GF₂₅₄ T.L.C. plate (Merck, 20×20 cm), dimethyl sulfoxide, NaHCO₃ (Sigma), absolute ethanol (Merck), penicillin G 10만 unit/g, streptomycin 10만 unit/g (Sigma), Fisher's medium, horse serum (GIBCO), RPMI 1640 medium, fetal bovine serum (Flow Lab.) 기타 시약 및 용매는 특급 또는 일급을 사용하였고, 공업용인 경우에는 증류하여 사용하였다. 융점은 Thiele melting-point apparatus를 사용하여 측정하였으며 온도는 보정하지 않았다. IR spectrum은 JASCO Infrared spectrometer IR Report-100를 사용하여 KBr disc법으로 측정하였다. UV는 Milton Roy UV/Visible Spectrophotometer Spectronic 3000 array를 사용하여 200에서 400 nm까지 scanning하였다. ¹H-NMR spectrum (270 MHz)은 JEOL GSX 270 spectrometer를 사용하였고, ¹³C-NMR spectrum (75 MHz)은 Bruker AC 300F를 사용하여 측정하였으며, 내부표준물질로서 tetramethylsilane (TMS)을 사용하였다. GC-Mass spectrum은 JEOL JMS-DX-303 spectrometer를 사용하여 EI법으로 측정하였다.

L1210 cells와 배양액 - 마우스 백혈병 세포인 L1210 cells¹¹⁾는 주 2회 계대 배양하였다. 이 세포는 구형이고 이분법에 의하여 성장한다. 배양액은 증류수에 Fisher's medium¹²⁾ 10.5 g, NaHCO₃ 1.125 g, penicillin G (100,000 Units) 59.8 mg 및 streptomycin 100 mg을 넣어 용해시키고 pH를 7.2로 조절하여 전체량을 1 l로 한 다음 세균여과기로 여과하고 최종 농도가 10%되도록 horse serum을 첨가하여 사용하였다.

HL60 cells와 배양액 - 인체의 말초 혈액에서 분리한 전골수성 백혈병(promyelocytic leukemia) 세포주인 HL60¹³⁾ cells는 충남대학교 의과대학에서 분양받은 것을 실험실에서 48시간에 한번씩 계대 배양하여 사용하였다. 배양액은 L-glutamine이 포함된 RPMI 1640 배지에 56°C 수조에서 30분간 가온하여 불활성화시킨 fetal bovine serum (FBS, Flow Laboratories Inc., Mclean, VA)을 10% 포함하고 1% 항생제 (penicillin 10만 units/streptomycin 100 mg)와 NaHCO₃ 2 g을 첨가하여 제조하였다. HL60 cells는 tissue culture flask를 사용하여 37°C에서 5% CO₂로 유지된 CO₂ incubator에서 배양하였다.

L1210 cells에 대한 세포독성 실험¹⁴⁾ - 세포 독성 실험에 사용되는 logarithmic phase에 도달한 L1210 cells를 얻기 위하여 실험 24시간 전에, 36~37°C로 가온한 Fischer medium을 넣은 250 ml screw-capped Erlenmeyer flask에 L1210 cells를 가해 2~3×10⁵ cells/ml 농도가 되게 조정 한 후 배양시켰다(spinner culture). 이렇게 배양한 배양액의 농도는 약 0.8~1.0×10⁶ cells/ml가 된다. 이 spinner culture한 세포를 세포독성 실험을 하기 바로 전에 미리 36~37°C로 가온한 fresh medium으로 희석하여 5×10⁴ cells/ml의 농도가 되도록 L1210 cells 현탁액(run bottle)을 만들었다. 시료는 실험을 하기 바로 전에 일정 농도의 에탄올 또는 DMSO에 녹여 만들었고, 이 시료용액 0.1 ml에 fresh medium 0.9 ml를 가해 10배 희석하였다. screw-capped tube에 희석액을 각각 60, 30, 15 μl를 가하고 위에서 조제한 세포 현탁액(run bottle)을 3 ml씩 넣고 대조군 tube에는 3 ml의 현탁액만을 넣어 37°C, CO₂ incubator (5%)에서 48시간 배양 후 hemacytometer를 사용하여 세포수를 계산하였다.

HL60 cells에 대한 세포독성 실험 - 상기의 L1210 cells에 대한 세포 독성 실험과 마찬가지로 시료를 일정 농도가 되도록 DMSO에 용해시키고, fresh medium을 넣어 10배 희석액을 만들었다. 이 희석액을 각각 40, 20, 10 μl씩을 micropipette으로 취하여 각각 2개 씩의 24-well plate에 가한다. 이 culture tube 및 대조군 tube에 10⁵ cells/ml로 희석한 세포 현탁액 2 ml를 가하고 잘 흔들어 섞은 다음, 이들을 37°C, CO₂ incubator(5%)에 넣고 72시간 배양한 후 hemacytometer를 사용하여 세포수를 계산하였다.

ED₅₀ 값의 결정과 세포독성의 판단 - ED₅₀값은 대조

군의 50% 수준으로 세포의 성장을 억제하는 시료의 농도 ($\mu\text{g/ml}$)로 주어지며, Thayer 등의 방법¹⁵⁾에 의해 결정하였다.

물질의 물리화학적 분석 - IR, UV/VIS 스펙트럼 측정에 있어서 고체 시료는 2~3%되게 KBr로 희석하여 disk를 만들어 $4000\sim 600\text{ cm}^{-1}$ 영역의 스펙트럼을 얻었으며, UV cell은 10 mm를 사용하였다. NMR 스펙트럼은 chloroform- d_1 , dimethyl sulfoxide- d_6 을 용매로 사용하였고, 내부 표준물질로 사용한 tetramethylsilane (TMS)을 기준으로 chemical shift를 δ (ppm)로 나타내었다.

활성물질군의 Screening test - 연교(Forsythiae Fructus) 100 g을 취하여 메탄올로 환류하면서 3시간씩 2회 추출하여 여과한 후, 추출액을 감압 농축하여 메탄올 추출물을 얻고 증류수 200 ml를 가해 용해시켰다. 물불용물을 여취하고 여액에 대하여 n-헥산, 벤젠, 초산에틸의 순으로 추출, 용매를 유기하여 각각 용매분획군을 만들었다. 각 용매분획에 대해 L1210 및 HL60 cells에 대한 독성실험을 행하였다.

추출 및 세포독성 물질의 분리 - 연교 1.5 kg을 메탄올 10리터로 환류시키면서 12시간씩 2회 추출하여 여과한 후, 추출액을 감압 농축하여 210 g (14%)의 메탄올 추출물을 얻었다. 이 메탄올 추출물에 물 2리터를 가하여 용해시키고 물불용물을 여취하고 여액에 대하여 n-헥산, 벤젠, 초산에틸의 순으로 용매분획하였다. 각 분획의 L1210 및 HL60 cells에 대한 세포독성을 실험한 결과(Table I), 물불용분획에서 세포독성이 강하게 나타났다. NCI manual에 따르면 L1210 cells에 대한

세포독성 평가는 식물 추출물인 경우 $20\ \mu\text{g/ml}$ 이하, 합성품인 경우 $4\ \mu\text{g/ml}$ 이하일 경우 항암작용이 있다고 규정하고 있으므로¹⁶⁾, 이 물불용분획의 세포독성작용은 유의성이 있다고 판단된다. 물불용분획(67 g)을 silica gel (70~230 mesh) 1 kg을 충전시킨 지름 6.7 cm의 column에서 톨루엔/아세톤(100:1 \rightarrow 10:1)을 용매로 column chromatography하여 TLC로 확인시 Liebermann-Burchard 시약에 양성을 나타내는 주반점에 따라 5개의 분획으로 나누었다(fr. 1~5). 이들 5개 분획을 bioassay해 본 결과 fr. 2와 fr. 3이 L1210 및 H6L60 cells에 대하여 세포독성을 나타내었으므로 fr. 2를 다시 톨루엔-아세톤(95:5)의 용매로 column chromatography하여 4개의 소분획중 세포독성을 나타내는 3번 소분획을 농축후 방치, 생성되는 침전물을 메탄올로 재결정하여 순수한 compound I (20 mg)을 얻었다. fr. 3으로 부터는 톨루엔-아세톤 (10:1)의 용매로 다시 column chromatography하여 3개의 소분

Table I - Cytotoxicity of the fractions against L1210 and HL60 cells

	ED ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	
	L1210 cells	HL60 cells
water insoluble fraction	9.27 \pm 1.34	6.21 \pm 0.98
n-hexane fraction	18.57 \pm 1.88	14.37 \pm 1.26
benzene fraction	>20.00	>20.00
ethyl acetate fraction	>20.00	>20.00
water fraction	>20.00	>20.00

L1210 and HL60 cells were cultured in 5% CO₂ incubator at 37°C for 48hrs. and 72hrs., respectively. The data represent the mean \pm SE from 5 experiments.

Table II - ¹³C-NMR spectral data for compound I and II in DMSO- d_6 (δ)

Carbon	Compound I	Compound II	Carbon	Compound I	Compound II
C-1	37.5	38.2	C-17	55.4	55.4
C-2	16.4	27.1	C-18	46.6	46.6
C-3	79.7	76.7	C-19	48.5	48.5
C-4	37.7	38.5	C-20	150.3	150.3
C-5	54.6	54.9	C-21	29.2	29.2
C-6	17.7	17.9	C-22	36.3	36.3
C-7	33.7	33.9	C-23	27.6	28.0
C-8	40.2	40.2	C-24	15.6	15.7
C-9	49.6	49.9	C-25	15.8	15.9
C-10	36.6	36.7	C-26	15.8	15.9
C-11	20.9	20.4	C-27	14.3	14.3
C-12	25.0	25.0	C-28	177.2	177.2
C-13	37.3	37.6	C-29	109.6	109.6
C-14	42.0	42.0	C-30	18.9	18.9
C-15	30.1	30.1	Acetyl CH ₃	23.3	-
C-16	31.8	31.7	Acetyl C=O	170.0	-

획중 세포독성을 나타내는 2번 소분획을 농축후 방치, 생성되는 침전물을 메탄올로 재결정하여 순수한 compound II (60 mg)를 얻었다.

Compound I - 백색침상정: Liebermann-Burchard test: 황갈색; m.p: 262~264°C; UV (nm) λ_{\max} (MeOH): 212; IR $\lambda_{\max}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1730, 1690 (C=O), 1640, 880 (C=C); $^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, DMSO- d_6) δ : 0.79, 0.80, 0.87, 0.87, 0.94 (each 3H, s, CH_3), 1.65 (3H, s, CH_3 -30), 1.99 (3H, s, CH_3CO -3 β), 2.95 (1H, m, H-19), 4.56 (1H, s, H-29a), 4.69 (1H, s, H-29b), 12.09 (1H, s, H-28).: EI-MS, m/z : 498 (M^+), 438 ($\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}$), 248, 203 (248-COOH), 189 (249- CH_3COOH).: $^{13}\text{C-NMR}$ Table II 참조.

Compound II - 백색침상정: Liebermann-Burchard test: 갈색; m.p: 297~298°C; UV (nm) λ_{\max} (EtOH): 202.9; IR $\lambda_{\max}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3450 (OH), 1680 (carboxylic C=O), 1640, 880 (C=C).: $^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, DMSO- d_6) δ : 0.65, 0.76, 0.87, 0.87, 0.93 (each 3H, s, CH_3), 1.64 (3H, s, CH_3 -30), 2.96 (1H, m, H-19), 3.16 (1H, dd, $J=10.0$ and 4.5 Hz, H-3 α), 4.56 (1H, s, H-29a), 4.69 (1H, s, H-29b), 12.09 (1H, s, H-28).: EI-MS, m/z : 456 (M^+), 438 ($\text{M}-\text{H}_2\text{O}$), 248, 203 (248-COOH), 207 ($\text{M}-248$), 189 (207- H_2O).: $^{13}\text{C-NMR}$ Table II 참조.

실험결과 및 고찰

세포독성물질의 구조분석 - MeOH로 재결정하여 얻은 compound I은 백색의 침상결정이었고, m.p.는 262~264°C이었다. Liebermann-Burchard 반응에 양성이었다고 UV spectrum에서 212 nm의 흡수극대를 나타내었으며 IR spectrum에서 1690 cm^{-1} (COOH)와 1730 cm^{-1} (CH_3CO)에 나타난 흡수 band는 C=O stretching vibration에 기인한 것이고 1640 cm^{-1} 와 880 cm^{-1} 에 나타난 흡수 band는 C=C의 stretching vibration에 기인한 것으로 보아 이 화합물이 triterpenoids계통의 물질로 추정되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum을 보면 0.79 ppm과 0.94 ppm 사이에서 methyl기에 의한 5개의 signal이 singlet로 나타나며, 1.65 ppm (CH_3 -30)과 1.99 ppm (CH_3CO -3 β)에서도 me-

thyl기에 의한 signal이 각각 singlet로 나타난다. 또한 olefinic proton인 H-29a의 signal이 4.56 ppm에서, H-29b의 signal이 4.69 ppm에서 각각 broad singlet로 나타나는 것으로 보아 이 화합물이 lupane계의 triterpenoid화합물임을 추정할 수 있다.¹⁷⁻¹⁸⁾ 이 물질의 EI-Mass spectrum을 보면 $[\text{M}]^+$ 의 molecular ion peak가 m/z 498에서 나타나고, CH_3COOH 가 떨어져서 생성된 fragment ion peak가 m/z 438에서, 그리고 ring C에서의 proton transfer에 의해서 생성된 fragment ion peak가 m/z 248에서 나타나며 또한 COOH가 탈락되어 생성된 fragment ion peak가 m/z 203에서 나타나며¹⁹⁾, 나머지 fragment ion peak가 m/z 249에서, 한 분자의 CH_3COOH 가 탈락된 fragment ion peak가 m/z 189에서 base peak로 관측되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 32개의 signal이 관찰되었다. 따라서 이상의 기기분석결과 및 문헌²⁰⁾과의 비교로 compound I을 3 β -acetyl betulinic acid로 확인동정하였다.

compound II는 백색의 침상결정이었고, m.p.는 297~298°C이었다. 이 물질은 Liebermann-Burchard test에 양성을 나타내었고 UV spectrum에서 202.9 nm의 흡수극대를 나타내었으며 IR spectrum에서 3450 cm^{-1} 의 흡수로 OH기의 존재를 예측하였고, 1680 cm^{-1} 의 흡수로 C=O기의 존재를 알 수 있었다. 1640과 880 cm^{-1} 에 나타난 흡수 band는 C=C의 stretching vibration에 기인한 것으로 보아 이 화합물이 triterpenoids계통의 물질로 추정되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum을 보면 0.65 ppm과 0.93 ppm 사이에서 methyl기에 의한 5개의 signal이 singlet로 나타나며, 1.64 ppm에서도 methyl기에 의한 signal이 singlet로 나타난다. 또한 olefinic proton인 H-29a의 signal이 4.56 ppm에서, H-29b의 signal이 4.69 ppm에서 각각 broad singlet로 나타나는 것으로 보아 이 화합물이 lupane계의 triterpenoids 화합물임을 추정할 수 있다.¹⁷⁻¹⁸⁾ 이 물질의 EI-Mass spectrum을 보면 $[\text{M}]^+$ 의 molecular ion peak가 m/z 456에서 나타나고, ring C에서의 proton transfer에 의해서 생성된 fragment ion peak가 m/z 248에서, 그리고 COOH가 탈락되어 생성된 fragment ion peak가 m/z 203에서 나타난다.¹⁹⁾ 또한 나머지 fragment ion peak가 m/z 207, 한 분자의 H_2O 가 탈락된 fragment ion peak가 m/z 189에서 base peak로 나타나므로 A/

- (II). Comparative Examination on Lignan Glucosides of Forsythiae Fructus of the Original Plants listed in the Japanese Pharmacopoeia Ed. IX. *Shoyakugaku Zasshi* **31**, 131 (1977).
- 7) Nishibe, S., Okabe, K., Tsukamodo, H., Sakushima, A., Hisada, S., Baba, H. and Akisada, T. : Studies on the Chinese Crude Drug "Forsythiae Fructus" (VI). The Structure and Antibacterial Activity of Suspensaside isolated from *Forsythia suspensa*. *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 4548 (1982).
 - 8) Kitagawa, S., Tsgamodo, H., Hisada, S. and Nishibe, S. : Studies on the Chinese Crude Drug "Forsythiae Fructus" (VII). A New Caffeoyl Glycoside from *Forsythia viridissima*. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 1209 (1984).
 - 9) Kitagawa, S., Nishibe, S. and Baba, H. : Studies on the Chinese Crude Drug "Forsythiae Fructus." VIII. On Isolation of Phenylpropanoid glycosides from Fruits of *Forsythia koreana* and Their Antibacterial Activity. *Yakugaku Zasshi* **107**, 274 (1987).
 - 10) Nishibe, S., Okabe, K., Tsukamodo, H., Sakushima, A. and Hisada, S. : The Structure of Forsythiaside isolated from *Forsythia suspensa*. *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 1048 (1982).
 - 11) Low, L. W., Dunn, T. B., Boyle, P. Z. and Miller, J. H. : *J. Natl. Cancer Inst.* **10**, 179 (1949).
 - 12) Fisher, G. A. : *Ann. N. Acad. Sci.* **76**, 673 (1958).
 - 13) Collins, S. T., Gallo, R. C. and Gallagher, R. E. : Continuous growth and differentiation of human myeloid leukemic cells in suspension culture. *Nature* **270**, 347 (1977).
 - 14) Thayer, P. S., Himmelfarb, P. and Watt, G. L. : *Cancer chemother. Rep.* **2**, 1 (1971).
 - 15) Thayer, P. S., Himmelfarb, P. and Watts, G. L. : *Cancer Chemother. Rep.*, (Part 2), **2**, 1 (1971) cited from Lee *et al.* *Kor. J. Pharmacogn* **17**, 286 (1986).
 - 16) National Cancer Institute USA : Cell culture technical procedures (1972).
 - 17) Monaco, P. and Previtiera, L. : Isoprenoids from the leaves of *Quercus suber*. *J. Nat. Prod* **47**, 673 (1984)
 - 18) Siddiqui, S., Hafeez, F., Begum, S. and Siddiqui, B. S. : Oleanderol, A New Pentacyclic Triterpene from the Leaves of *Nerium Oleander*. *J. Nat. Prod.* **51** 229 (1988).
 - 19) Budzikiewicz, H., Wilson, J. M. and Carl Djerassi : Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3688 (1963).
 - 20) Mclafferty, F. W. and Stauffer, D. B. : NBS Registry of Mass spectral data.
 - 21) Kang, S. S. and Soo, W. S. : Synthesis of Epialeuritolid acid, *Arch. Pharm. Res.* **9**, 153 (1986).
 - 22) Lee, J. H., : Studies on the cytotoxic principles of the rhizoma of *Curcuma domestica* and the cytotoxicity-potentiating substance against L1210 and S-180 cells. 충남대학교 석사 학위 논문 (1987).
 - 23) Kang, K. S. and Ahn, B. Z. : Antineoplastic natural products and the analogues VIII. Synthesis of some coumarins and their cytotoxic activities on L1210 cell. *Arch. Pharm. Res.* **9**, 115 (1986).