

天然植物資源(韓藥材)으로부터 生理活性 物質의 探索

유시용*

I. 緒論

人類보다도 훨씬 오래 전부터 이 땅 위에서 살아온 植物들은 오늘날 우리 인류가 살아가기 위하여 活用하고 있는 거의 大部分의 資源들을 供給하고 있는 最大의 天然寶庫라고 할 수 있다. 이들은 무엇보다도 먼저 인간이 삶을 유지하기 위하여 꼭 필요로 하는 각종 營養素를 공급하여 주는 食品으로서 利用되어지고 있을 뿐만 아니라 木材, 고무 및 化石燃料 등 이루 말할수 없이 多様な 分野에서 廣範圍하게 사용되어 지고 있어 만약 하루라도 이들 植物의 存在가 없어진다면 우리 인류는 더 이상 살아갈 수 없을 것이다.

한편 이와 같이 植物들이 우리 人類에게 주고 있는 수많은 혜택 중에서 결코 看過하여서는 아니될 부분은 인간이 살아가면서 부닥치게되는 각종 疾病들에 대한 解決策의 대부분이 植物들 속에 숨겨져 있다는 사실이다. 다시 말하자면 오늘날 모든 疾病의 豫防 및 治療에 사용되고 있는 각종 醫藥品들의 起源을 살펴보면 大部分의 경우 이들은 植物體가 含有하고 있는 固有成分들이거나, 혹은 이들을 基礎로하여 模倣된 類似化合物들이라는 사실이다. 따라서 植物은 모든 醫藥品의 倉庫이고 모든 醫藥品은 바로 植物에서 由來한다고 하여도 결코 지나친 말이 아니다.

실제적으로 現在 範世界的으로 行하여지고 있는 여러가지 醫藥品의 開發方法中

가장 廣範圍하게 採擇되어지고 있는 方法은 다음과 같다. 우선 開發하고자하는 特定한 藥理效果를 測定할 수 있는 方法을 考案(design)하고 이 方法에 準하여 여러 가지 植物들 혹은 微生物들을 하나하나씩 test하여 그 結果를 聚合한 다음 그 중 優秀한 效果를 나타내는 植物들을 選別하는 screening 作業이 先行되어야 한다. 이 screening 段階에서 얼마나 많은 종류의 有效한 sample種이 채택되어지는가 하는 점은 藥理效果를 測定하는 方法에 따라 얼마든지 달라질 수 있다. 예를 들어 1960년대 前半부터 약 20여년간에 걸쳐 美國 NCI (National Cancer Institute)의 주관 下에 실시된 抗癌活性 screening test의 경우에 있어서는 무려 10-20萬 종의 植物種들이 test되었으며 그 중 약 4.3 %에 該當되는 植物種들이 일차적으로 有效判定을 받았는가 하면 抗virus 效果를 指標로 하여 數千 種의 植物 혹은 微生物培養液을 對象으로 screening한 結果 불과 10종 안팎의 sample 들만이 陽性效果를 나타낸 경우등도 있다.

이와 같이 screening 作業을 통하여 有效한 sample들이 選別되고 나면 그 다음으로 選別된 植物들로부터 그 속에 含有되어 藥理作用을 나타내는 活性成分을 追跡하여 分離하는 研究를 遂行하게 된다. 마지막으로 분리된 活性化合物을 각종 分光學的 혹은 有機化學的 techniques을 이용하여 正確하게 그 化學構造를 identification을 하게 되고 藥效를 再檢討하는 段階를 거치게 된다. 이와 같이 여러 段階를 거쳐 어렵게 얻어진 最終活性物質이라 할

* 韓國化學研究所 天然物研究室

지라도 이들은 醫藥品으로서의 開發價値, 經濟性, 商業性 등 면밀한 檢討를 거친후 마지막 관문으로 각종 安全性test 및 臨床試驗등을 通過한 후에야 비로서 새로운 의약품으로 誕生할 수 있게 된다. 따라서 하나의 새로운 의약품이 탄생되기까지에는 무수한 植物資源들을 일일이 採集하고 抽出하여야하는 엄청난 勞動力 및 經濟力의 뒷바침뿐만 아니라 어느정도의 幸運까지도 따라주어야만 可能하다고 할 수 있겠다. 또, 이제 先進國의 문턱에 겨우 들어섰다고 自負하는 우리나라에서는 부끄럽게도 아직껏 新藥 즉 앞서 敘述한 手順에 依據하여 얻어진 새로운 醫藥品의 開發에 관한 前例가 없는 實情이다.

따라서 우리의 技術 및 資源에 의한 새로운 의약품의 開發을 이룩하여 보고자 하는 熱望을 하루라도 빨리 實現하고자 한다면 다음의 몇가지 基本的인 事項에 대한 研究들이 先行되어야 한다. 우선 먼저 여러가지 植物 혹은 微生物(버섯류)들에 대한 精確한 동정 및 이들을 必要시에 適切하게 提供할수 있는 情報體系의 確立이 이루어져야 하겠다. 다행하게도 우리의 先祖들은 오랜 歷史와 經驗들을 바탕으로 하여 여러가지 疾病들에 有效한 각종 植物들을 體系的으로 整理하여 東醫寶鑑, 本草圖鑑, 方藥合編 등 훌륭한 醫書들을 통하여 後孫들에게 남겨주었고 그 밖에 體系的인 整理가 未洽한 부분들도 각종 民間療法등의 形態로 면면히 이어져 내려오고 있다.

다음으로 重要한 事項은 여러가지 다양한 生理活性을 쉽게 test할수 있는 bioassay方法(生理活性測定法)들의 수립이 切實히 必要하다고 할 수 있겠다. 이들 Bioassay方法은 實驗動物에게 직접 試料를 處置한 후 生理活性의 變化를 觀察하는 生體內 (in vivo) 實驗方法과 生體內環境을 試驗管 內에서 비슷하게 simula

tion하여 間接的으로 試料에 의한 生理活性의 變化를 測定할수 있도록 考案한 試驗管內 (in vitro) 實驗法이 있을수 있다. 한편, 窮極的으로 각종 植物試料를 對象으로하여 一次的인 藥效screening test를 하기 위한 研究目的을 短時日內에 經濟的으로 成就하기 위하여서는 實驗動物에게 직접 試料를 적용하는 in vivo 방법은 여러가지의 制約點이 많으므로 현실상 거의 不可能하며 次善策으로 in vitro 방법을 採擇할 수 밖에 없는 實情이다. 또, 이 In vitro 방법은 우선 실험 protocol상의 모든 操作이 簡便하고 시료로서 食物extract를 쉽게 適用할 수 있어야만 하며 이 모든 操作이 自動化가 可能하다면 더욱 便利하게 使用할 수 있다. 일단 이와같은 모든 要求條件을 充足시켜 줄 수 있는 바람직한 bioassay 방법이 確立되고 이 방법에 適用시켜 볼 시료식물들이 選定이 되고나면 연구자의 노력여부에 따라 많은 시료에 대하여 生理活性test를 測定하여 볼 수도 있고 또 우수한 活性을 보여준 시료로부터 그 活性本體를 分離하는 作業 또한 쉽게 推進하여 나갈 수 있을 것이다. 따라서 實驗操作이 簡便하고도 합리적이며 또 여러가지 食物extract를 쉽게 적용할 수 있는 理想的인 in vitro 生理活性測定法을 確立하는 일이야말로 신약開發의 成功을 좌우할 수 있는 key step이라고 할수 있겠다.

II. 抗腫瘍物質의 探索

악성종양 (惡性腫瘍, 癌, tumor, cancer, malignancy, oncology)은 아직껏 그 發生原因 및 治療法이 뚜렷하게 밝혀지지 못한 상황속에서 汎世界的으로 급속하게 확산되고 있는 무서운 질병의 하나로 成人死亡을 惹起하는 가장 중요한 원인으로 알려져 있다. 1994년 美國癌協會(American

Table 1. Currently available antitumor drugs

1. Cytotoxic drugs
 - 1-1 antimetabolites
 - folate antagonist : MTX
 - purine & pyrimidine antagonist : 5-FU, Ara-C
 - 1-2 DNA-damaging agents
 - nitrogen mustard derivatives, Platinum analogues, nitrosoureas,
 - Antibiotics (anthracyclines, bleomycin, dactinomycin)
 - imidazoles, other DNA-damaging agents
 - 1-3 Antimitotics
 - vinca alkaloids, taxol and taxotere, combrestatin,
 - dolastatin-10, rhizoxin.
 - 1-4 Intercalators (topoisomerase inhibitors) / epipodophyllotoxins
 - podophyllotoxin, etoposide, teniposide, camptothecins
2. Hormones and hormone-antagonists
 - estrogens, androgens stilbesterol, tamoxifen
3. Adjuvants
 - ganisetron, tropisetron, antiemetics (5-HT3 antagonist)
4. Biological reponse modifiers
 - interferons and interleukin-2

Cancer Society)의 조사에 의하면 해마다 전세계 인류의 0.6%에 해당하는 사람들에게서 癌질환이 새롭게 발생되며 이중 절반이상이 5년이내에 결국 이 질병으로 사망한다고 한다. 만약 癌에 대한 획기적인 치료법들이 가까운 장래에 발견되지 못할 경우 그리하여 이러한 추세로 癌질환이 계속하여 발생할 경우 우리모두는 60평생 동안 36%라고하는 무서운 癌발생확률을 안고 살아가야만 한다.

한편 만족스럽지는 못하지만 이제까지 알려져있는 癌疾患의 治療法으로서는 早期診斷에 의한 外科的 手術方法이나 放射線治療法 그리고 抗癌化學療法이 가장 잘 알려져 있으며 그 밖에 免役療法과 溫熱療法등도 종종 시도되어지고 있다. 현재 臨床에서 사용되어지고있는 항암화학요법제들은 그 作用mechanism에 따라 Table 1.과 같이 要約할수 있다. 이들 항암제들은 대부분 여러가지종류를 동시에 혹은 일정 시간간격을 두고 각각을 따로따로

투여하는 竝用療法(combination chemo therapy)으로 환자에게 투여되어지고 있다. 이러한 병용요법 혹은 단독투여요법등이 효과적으로 이루어지기 위하여서는 毒性和 藥劑耐性은 물론 작용mechanism이 서로 다른 다양한 항암제가 필요에 따라 적합하게 사용되어져야 할것이다. 이러한 側面에서 볼때 현재 사용되어지고 있는 항암제들은 대부분의 경우 독성 혹은 약제내성의 발현등의 심각한 副作用을 가지고 있는 脆弱點을 內包하고 있다. 이와 같은 기존항암제의 부작용을 경감시키기위하여 여러가지의 시도 즉 독성을 輕減시킬수 있는 다른 약물과의 병용투여 혹은 약제내성발현을 이겨낼수 있는 또다른 약물과의 병용투여등을 試圖하고있으나 큰 성과를 얻지 못하고 있는 실정이며, 결국 오늘날의 항암제 개발의 추세 역시 지난 數十年간 전세계적으로 행하여져왔던 연구방향과 크게 달라진바가 없이 기존의

Table II. Bioassay method for the estimation of antitumor activity

1. *in vivo* experiment
 - 1-1. ILS test : survival test with tumor-bearing mouse
 - 1-2. TWI test : tumor weight regression with sarcoma mouse
 - 1-3. Xenograft with human tumor cell in athymic mouse
 - a) microencapsulated tumor assay
 - b) subcutaneous xenograft assay
 - c) orthotopic xenograft assay
 - d) subrenal capsule assay(SRCA)
2. *in vitro* experiment

Estimation of cytotoxicity (inhibition of cell growth)

 - a) dye (trypan blue) exclusion assay
 - b) coulter counter assay
 - c) MTT(tetrazolium) assay
 - d) SRB(sulforhodamine B) assay

항암제들이 안고 있는 副作用을 더이상 나타내지 않고 동시에 우수한 抗癌效果를 가질수 있는 새로운 항암제의 탐색으로 초점이 맞추어지고 있다. 이러한 상황속에서 실제로 현재 범세계적으로 이루어지고 있는 항암제개발연구현황을 살펴보면 크게 두가지 방향으로 大別할수 있는데 우선 그 첫째로 종래의 항암제의 화학구조를 화학적으로 변화시킨 analog의 개발방향과 둘째로 종래의 항암제와 비교하여 전혀 새로운 化學構造 혹은 作用기전을 가진 약제를 陸上 혹은 海洋植物이나 微生物資源들로부터 廣範圍하게 探索하여보고자 하는 방향이라고 할수 있다. 이와같이 天然資源을 대상으로 유용한 항암제를 찾아내고자하는 연구approach는 지난 수십년간 전세계적으로 엄청난 연구인력과 연구비용을 投資하여 massive한 연구가 이루어진 결과 오늘날까지 약 2,000여 종의 항암성 천연화합물(natural products)들의 보고가 행하여졌고 이중 약 30종이 動物實驗을 통한 前臨床실험 및 安全性試驗 혹은 臨床實驗의 段階에까지 進展되어 이

들 중 vinblastine, taxol, adriamycin등 10여종이 시판되고 있는 실정이다.

그러나 前述한바와 같이 이들 약제들 역시 심한 頭痛, 오심 및 腎臟毒性등 심각한 부작용을 수반하고 있어 보다 안전하고 藥效가 卓越한 새로운 藥劑를 천연자원으로부터의 찾아보고자하는 探索 approach는 영원히 계속될 전망이다.

이러한 항암제개발연구의 추세에 副應하여 韓國化學研究所 天然物研究室에서는 지난 수년간 東醫寶鑑, 本草圖鑑, 中藥大辭典 등 각종 醫藥古書 혹은 여러가지 口傳의 民間療法들을 基礎로하여 韓國, 日本 및 中國等地에서 옛부터 널리 抗癌植物로 일컬어지고 있는 300여종의 식물을 對象으로하여 A-549, SK-OV-3등 5종의 human tumor cell line을 이용한 시험관내 (*in vitro*) 항암효과측정법에 따라 이들 식물의 抗癌效果를 再檢討하였으며, 특히 이들 중 두드러진 항암효과를 나타내는 10여종의 식물중에 대하여는 항암효과를 나타내는 有效成分들을 活性誘導 分割法 (activity-guided fractionation)에 따라 追

Table III. Comparison of some methods for measurement of anticancer activity *in vitro*

방법	내용	장점	단점
Dye (trypan blue) exclusion assay	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 세포 배양액에 Trypan blue solution 을 처리하여 Trypan blue 로 염색 되지 않는 세포(viable cell) 수 측정 ▶ 살아있는 세포는 Trypan blue를 exclusion 하는 원리 이용 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 살아 있는 세포와 죽은 세포를 구분 하여 counting 할 수 있음 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 다량의 Sample을 처리하기에 부적합 ▶ Anchorage dependent cell에 대해 Trypan blue 자체의 독성에 의해 시간의 경과에 따라 오차발생
Coulter counter assay	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 세포나 Particle등을 셀 수 있도록 특수하게 고안된 Coulter counter를 이용하여 세포 수 측정 ▶ 일정크기의 pore 를 세포가 지날 때 전기 저항이 생기는 것을 이용 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 다량의 Sample 처리가 용이함 ▶ 세포의 크기를 구분할 수 있음 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 살아 있는 세포와 죽은 세포를 구분 할 수 없음 ▶ Anchorage-dependent cell에 부적합
MTT (tetrazolium) assay	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 살아있는 세포의 Mitochondrial dehydrogenase가 Tetrazolium (yellow)을 Formazan(blue)으로 Reduction 시키는 현상을 이용 ▶ Spectrophotometer를 이용하여 540nm에서 측정 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Assay가 비교적 간단하고 용이함 ▶ Anchorage dependent cell에 적용이 용이 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 세포의 Metabolic condition에 따른 오차 발생가능 ▶ Anchorage non-dependent cell에 적용시 오차를 증가요인 ▶ 시간의 경과에 따라 세포의 Metabolic rate가 떨어짐으로 측정상에 시간적 제약
SRB (sulforhodamine B) assay	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 세포의 Membrane Protein에 SRB가 pH에 따라 Binding 또는 Reasing 되는 현상 이용 ▶ Spectrophotometer를 이용하여 520nm에서 측정 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Assay가 간단하고 용이함 ▶ Anchorage dependent cell에 적용이 용이 ▶ 측정시 시간에 따른 제약이 없음 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Anchorage non-dependent cell에 적용시 오차를 증가요인

跡分離하였다.

본 seminar에서는 이 연구를 수행하는 동안 본 研究室에서 試圖하였던 각종 항암활성 측정법의 概括的인 紹介와 아울러 最終採擇된 항암활성측정법(SRB assay)에 따라 각종 식물체로부터 抗癌活性有效成分으로 分離한 몇가지 天然物質(natural products)들을 소개하고자 합니다.

Ⅲ. 항암활성 검색방법

3-1. 개요

항암제 개발전략에서 가장 중요한 要素는 단기간에 많은 檢體의 항암활성여부를 test할수 있는 敏感하면서도 實驗操作이 간편한 항암활성검색system의 확보라고 할수 있다.

과거에는 주로 Rat나 mouse에서 유래한 白血病腫瘍細胞인 L1210이나 P388 등을 mouse 등 실험동물에 이식한후 검체의 항암효과를 測定하는 *in vivo* 방법이 널리 이용되어왔다. 그러나 이방법은 비용과 시간이 막대하게 소요될 뿐 아니라 실험에 사용하는 실험동물의 백혈병암세포종은 주로 사람에게서 흔히 발생하는 인간암세포종과는 약제에 대한 내성 및 감수성등이 크게 상이하기 때문에 이러한 실험방법으로서의 사람의 암세포에 선택적으로 효과를 나타내는 약제를 찾아 내기 어렵다는 관점에서 요즈음은 별로 많이 사용되고 있지 않는 실정이다. 따라서 요즈음은 사람에게 발생하는 대표적인 암종들로부터 채취되어 수립된 암세포 panel에 대하여 시료에 의한 암세포성장저해효과를 측정하므로써 일차적인 항암효과검색을 실시하고 있는 경향이다. 이와 같이 암세포성장저해효과를 지표로하여 시험관 내에서 항암효과를 간접적으로 측정하는 생체외항암활성검색법(*in vitro* antitumor test)으로는 주로 增殖力이 큰 stem cell을

對象으로 하여 검체의 투여에 따른 집락형성의 억제효과를 측정하는 집락형성 분석법(clonogenic assay, human tumor colony forming assay)과 각종 암세포에 대한 성장저해효과 혹은 세포독성(cytotoxicity)을 측정하는 단기적 항암제 감수성 검사(short term chemosensitivity test)로 대별할수 있다. 집락형성 분석법은 검사결과를 얻는데 소요되는 긴시간과 몇가지 기술상의 난점들이 많아 일차 검색방법으로는 적합하지 못하다. 단기검사법은 검체처리후에 생존 암세포(viable cell)의 수를 검체비처리 대조군의 그것과 비교하는 것으로서 生存細胞數를 count하는 방법에 따라 色素排除法(dye exclusion assay), 同位元素使用法(⁵¹Cr release assay), 대사효소 측정법(SDI inhibition

test) 등 여러가지 방법등이 과거에 많이 사용되어져왔으나 시간과 노력이 많이 필요하고 실험조작의 자동화(automatization)가 곤란하여 많은 수의 검체를 단시간 내에 검색하기에는 적합하지 못하였다. 현재는 주로 96-well microtiter plate를 사용하고 검사결과를 쉽게 ELISA reader(multiwell microplate reader)를 이용하여 신속하고 객관성 높게 판독할수 있는 SRB 검색법이나 MTT검색법 등이 범세계적으로 가장 널리 쓰이고 있다.

Table II.는 현재 혹은 지금껏 널리 사용되어져온 각종 항암활성 측정법을 간략하게 정리한 도표이고 Table III.은 지금 현재 가장 널리 사용되는 생체의 항암활성 검색법(*in vitro* assay)의 간략한 소개와 더불어 각 방법의 장점 및 단점들을 요약정리한 도표이다.

Table IV.는 현재 미국 國立癌研究所(National Cancer Institute)에서 각종 검체의 항암효과를 일차적으로 test하는데 사용하고 있는 암세포주를 각 장기부위별

Table IV. Tumor cell line panel in *in vitro* testing
(National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program)

Leukemia	Non small cell lung	Colon	CNS	Melanoma
CCRF-CEM	A549/AATC	COLO 205	SF-295	LOX IMVI
HL-60 (TB)	HOP-62	HCC-2998	SNB-19	MI 4
K-562	HOP-92	HCT-116	SNB-75	SK-MEL-2
MOLT-4	NCI-H226	HCT-15	U251	SK-MEL-28
RPMI-8226	NCI-H23	HT29		SK-MEL-5
SR	NCI-H460	SW-620		UACC-257
	NCI-H522			

Ovarian	Renal	Prostate	Breast
IGROV 1	A498	PC-3	MCF7
OVCAR-3	ACHN	DU-145	MCF7/ADR-RES
OVCAR-4	CAKI-1		MDA-MB-231/AATC
OVCAR-5	SN12C		HS 578T
OVCAR-8	TK-10		MDA-MB-435
SK-OV-3	UO-31		MDA-N
			T-47D

* Cell lines designated in bold letter were currently adopted in Korea Research Institute of Chemical Technology as standard cell lines for the estimation of preliminary antitumor activity of crude plant materials *in vitro*.

로 정리한 도표이다.

참고로 現在 美國 國立癌研究所(NCI)에서는 Table IV.에 나열한 60여종의 human tumor cell line을 사용하여 Table II. 및 III.에 소개한 SRB assay에 준하여 각종 검체의 일차적 항암효과를 test하고 있으며 韓國化學研究所에서는 이들 암세포 중 각 장기별로 1종씩의 癌細胞種(총 5종)만 選擇하여 역시 SRB assay에 따라 一次的 抗癌活性檢索을 하고 있다.

한편 일차항암검색에서 어떤 검체가 어느 特定癌細胞에 대하여 選擇의인 細胞毒性을 보이거나 혹은 항암활성이 전반적으로 두드러지게 나타날 경우에는 該當癌細胞를 nude mouse 혹은 scid mouse에 移植하여 腫瘍을 만들고 검체를 투여하여 항암효과를 평가하는 생체내 (*in vivo*) xenograft test를 이행하는 것이 수순이라고 할 수 있다.

그러나 이 *in vivo* xenograft 방법은 human tumor cell을 mouse에 이식한 후 腫瘍을 誘發시키는데 많은 技術상의 問題點이 야기되고 있어 현재 이분야의 연구가 활발하게 이루어지고 있는 실정이다.

다음으로 現在 美國癌研究所(NCI) 및 韓國化學研究所에서 실시하고 있는 생체외 (*in vitro*) 항암활성검색법인 SRB(sulforhodamine B)방법과 이 방법만큼 널리 이용되고 있는 MTT방법에 대하여 보다 상세히 알아보겠다. 우선 SRB 방법의 실험 protocol에 대한 개괄적인 소개를 Fig.1에 나타내었다.

3-2. SRB assay

3-2-1. 암세포 배양

실험에 사용하는 암세포들은 A-549(non small cell lungcarcinoma), SK-OV-3(adenocarcinoma, ovary malignant asc

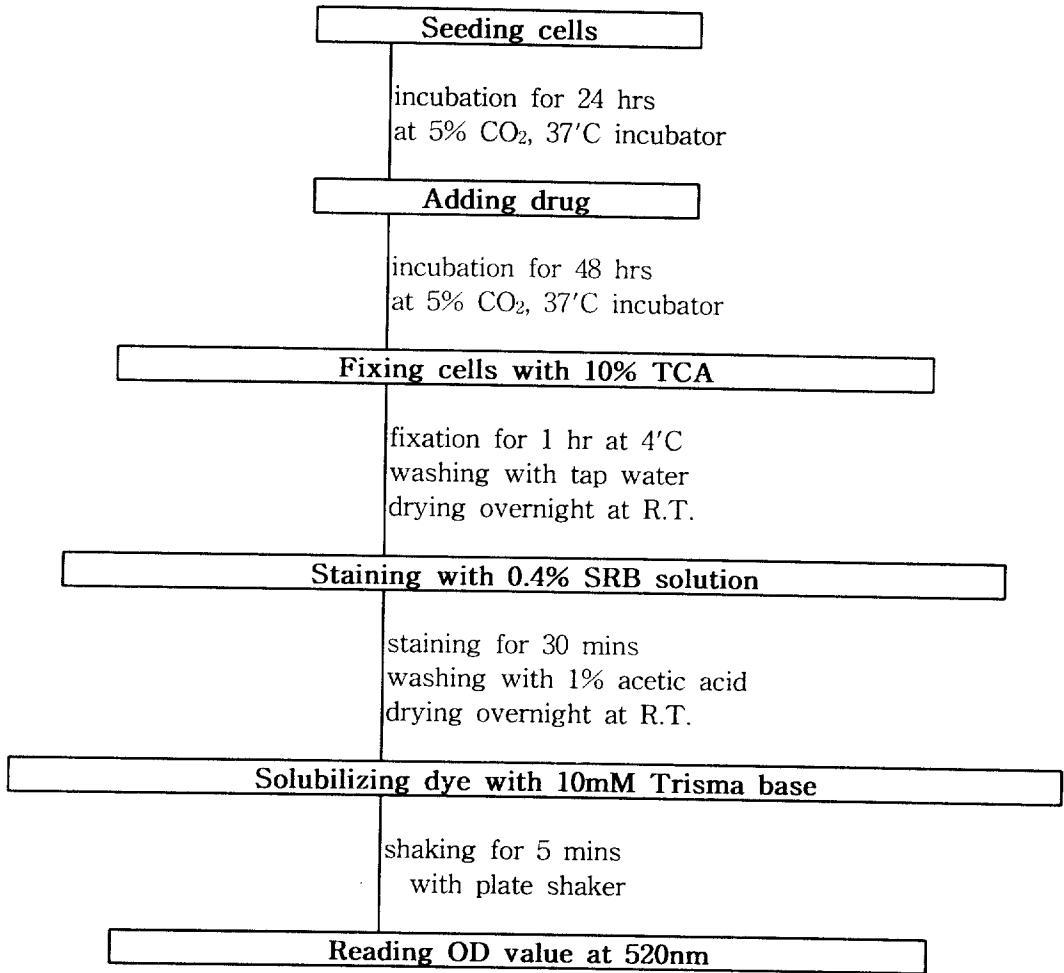


Figure I. SRB method for the test of cytotoxicity

ites), SK-MEL-2 (malignant melanoma, metastasis to skin of thigh), XF498 (central nerve system tumor), HCT25 (colon adenocarcinoma)로 이들은 모두 미국 국립암연구소(NCI)로부터 분양받아 계대배양하여 사용하였다. 배양액은 5% fetal bovine serum으로 보강된 RPMI 1640 medium을 사용하였으며, 37°C 항온 항습 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포의 계대는 3-4일에 한번씩 하였고 세포를 용기부착면으로부터 분리하기 위하여 phosphate buffered saline 용액에 0.2

5% trypsin과 3mM *trans*-1, 2- diamino cyclohexane-*n,n,n,n*-tetraacetic acid (CDTA)를 녹인 용액을 사용하였다.

3-2-2. 항암활성 측정

1989년 미국 국립암연구소에서 약물의 항암활성을 생체외 (*in vitro*) test 방법으로 측정하고자 개발한 Suforhodamine B (SRB) assay법을 채택하였으며 본 방법의 protocol은 다음과 같다. (Figure I. 참조)

1) 계대중의 암세포들을 trypsin-CDTA 용액으로 처리하여 용기 부착면으로부터 분리시키고, 96-well flat bottom micro

plate (Falcon)에 각 well 당 세포수가 각각 5×10^3 (A549, HCT15), 1×10^4 (SK-MEL-2, XF498), 2×10^4 (SK-OV-3)이 되도록 희석하여 분주한다. 이들을 CO₂ incubator속에서 24시간 배양하여 cell이 well의 바닥면에 부착(anchor)되도록 한 후 aspirator로 media를 제거하고 media에 녹여둔 검체를 농도별로 각각의 well 속에 넣어주고 48시간동안 계속 배양한다.

검체용액을 조제할 때는 검체를 media만을 사용하여 녹이는 (dissolve) 것을 원칙으로 하지만 경우에 따라서는 특히 검체가 난용성일 경우에는 소량의 EtOH 혹은 DMSO (dimethylsulfoxide)를 가하여 줄수도 있으나 EtOH 혹은 DMSO의 최종 농도가 1%를 초과하지 않아야 한다. 또 검체용액을 암세포에 가할때는 미리 filter로 여과하여 무균상태를 유지시켜준다.

2) 48시간동안의 배양을 마친후 각 well 속의 media를 aspiration으로 제거하고 10% trichloroacetic acid (TCA)용액을 각 well당 10 μ l 씩 가하고 1 시간동안 상온에서 방치하여 세포들을 고정시킨 다음 물로 5-6회 세척하여 과잉의 TCA용액을 완전제거하고 건조시킨다.

3) 각 well당 100 μ l 씩의 SRB 염색용액 (0.4% sulforhodamine in 1% acetic acid)을 가하여 30분간 염색하고 과잉의 염색액은 1% acetic acid로 5-6회 반복 세척하여 제거한 후 상온에서 건조시킨다.

4) 각 well당 100 μ l 씩의 10mM Tris base (unbuffered) 용액을 가한후 titer plate shaker로 10분간 진탕하여 cell에 염색된 염색액을 용출시키고 microplate reader를 이용하여 520nm의 흡광도치 (absorbance)를 측정한다.

5) 검체용액을 넣어준 검체군의 암세포 증식율 (% cell growth, 항암활성의 역)는 다음 수식에 따라 산출한다. 즉 검체용액

대신 동양의 media를 넣어준 대조군의 세포수(C)와 zero time의 세포수(T_z) 및 검체군의 세포수(T)를 각각 각군의 흡광도치로부터 환산한다. 검체군의 암세포 증식율(% cell growth)는 T_z>T인 경우에는 $[(T-T_z)/(C-T_z)] \times 100$ 으로, T_z<T인 경우에는 $[(T-T_z)/T_z] \times 100$ 의 수식으로 계산한다.

6) 각각의 농도에서 측정된 검체군의 암세포증식율을 바탕으로하여 LOTUS program의 data regression을 사용하여 검체가 해당암세포의 성장을 50% 저해하는 농도 (ED₅₀)를 계산하고 이 ED₅₀ 치를 기준으로 하여 각 검체의 항암효과의 potency를 상호비교하는 지표로 삼는다.

3-3. MTT assay

SRB assay와 함께 가장 널리 사용되는 MTT assay법은 전반적인 실험방법 및 요령은 SRB assay법의 그것들과 대동소이하다. 단지 SRB assay법이 viable cell을 count할 때 SRB 염색액을 사용하는 반면 MTT assay법에서는 viable cell들이 분비하는 enzyme에 의하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)가 환원되어 formosan crystal 을 형성하는 정도를 흡광도로 측정하여 이로부터 검체에 의하여 암세포가 사멸 또는 증식억제되는 정도를 결정하는 실험법으로서, 96-well plate를 이용하면 모든 실험조작의 자동화가 가능하고 실험결과와 재현성과 객관성이 우수하여 대량검체의 검색에 적합하다. 본 방법의 protocol을 Figure II.에 요약하였다.

3-4. 기 타

전술한 바와 같이 생체의 항암활성 측정법(*in vitro* antitumor activity test)로는 현재 SRB assay혹은 MTT assay가 가장 popular한 방법으로 널리 사용되고 있으나

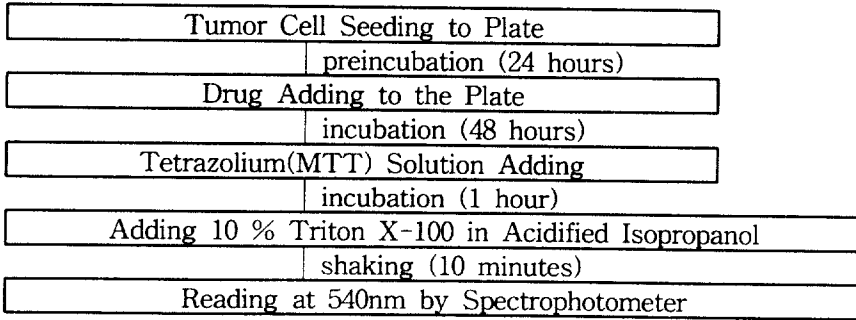


Fig II. Flow scheme of tetrazolium(MTT) assay

Table IV. The inhibitory activity of some cucurbitacins from *Trichosanthes kirilowii* toward the growth of tumour cells *in vitro*.

COMPOUND	ED ₅₀ (µg/ml)*				
	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT15
I	4.1x10 ⁻⁵	6.2x10 ⁻⁵	1.0x10 ⁻⁵	7.1x10 ⁻⁵	8.2x10 ⁻⁵
II	0.05	0.10	0.06	0.08	0.20
III	4.6x10 ⁻³	3.5x10 ⁻³	0.1x10 ⁻³	2.0x10 ⁻³	5.3x10 ⁻³
IV	0.2	1.2	0.06	0.6	0.8
V	7.7x10 ⁻³	40 x10 ⁻³	1.2x10 ⁻³	86 x10 ⁻³	52 x10 ⁻³
VI	0.7	3.7	0.2	2.2	1.8
VII	3.5	9.8	0.7	7.8	6.3
VIII	0.8	2.6	0.4	1.2	1.0
adriamycin	0.1	0.2	0.1	0.2	2.4

Ref) Arch. Pharm. Res. 17(5), 348 (1994), Arch. Pharm. Res. 18(1), 60 (1995)

이 방법들은 leukemia (백혈병)와 같은 부유 암세포종 (anchorage non-dependent cell)에 대한 항암효과를 test하기에는 미비한 점이 많으며 이와 같이 부유암세포종에 대한 항암효과를 test하고자 할 때는 trypan blue등을 사용한 dye exclusion method등을 사용하는 것이 상례로 되어 있다 (Table III. 참조).

4. 天然植物資源(韓藥材)으로부터 抗癌性物質의 探索

4-1. 植物抽出物의 抗癌活性 檢索

우리나라 및 中國, 日本등지에서는 옛부터 여러가지 植物들을 각종 疾病의 豫防 및 治療 목적으로 널리 사용하여 왔으

며 여러가지 秘方들이 文書(東醫寶鑑, 本草綱目, 方藥合編 등) 혹은 口傳(民間療法) 등의 형태로 오늘날까지 전해져 내려오고 있다. 본연구실에서는 이들 각종 문헌 및 민간요법을 토대로하여 옛부터 癌疾患 및 類似疾病의 治療 혹은 豫防目的으로 頻用되었던 植物들을 收集하여 이들의 抽出物들의 일차적 항암효과를 前述한 SRB assay법으로 검색하여 보았으며 현재까지 약 200종의 植物體(韓藥材)들의 물 추출물, 혹은 MeOH추출물을 각각 3가지 용매분획으로 나누어 얻어진 각 분획물들의 일차 항암효과 결과를 database 화 하였다. 또, 이들 중 항암활성이 두드러진 品目들은 따로 選別하여 活性成分의 分離研究를 Table V.와 같은 手順에 따라 수

행하였으며 이중 대표적인 몇가지의 예를 紹介하고자 한다.

Table V. Search for Antitumor agents from natural resources (from higher plants)

1. Establishment of Bioassay system estimating the antitumor activity of test materials
 SRB method : cytotoxicity against cultured human tumor cells *in vitro*.
2. Random Screening of crude plant material
 Database on cytotoxicity of plant
3. Selection of Candidate plant
4. Isolation of active constituents by way of activity-guided fractionation.
5. Characterization of isolates
 structure identification,
 estimation of antitumor activity

Table.VI. Inhibition of various triterpenes of plant origin against the growth of human tumor cells, *in vitro*.

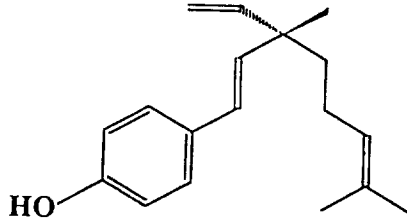
COMPOUND	ED ₅₀ (μg/ml)*				
	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT15
I	11.6	29.2	9.3	11.9	15.6
II	81.8	>100	>100	>100	>100
III	3.5	14.6	10.1	11.8	2.1
IV	22.2	59.3	12.5	32.0	27.7
V	15.1	54.7	14.6	21.1	20.8
VI	12.7	30.0	6.4	27.1	34.6
VII	50.1	>100	50.5	>100	>100
VIII	2.0	3.8	2.5	4.8	5.3
IX	15.2	11.4	17.5	16.2	24.1
X	1.1	2.3	2.6	2.5	0.8
XI	2.7	11.2	3.1	5.0	3.3
XII	18.4	35.2	6.9	19.6	30.2
XIII	38.8	>100	>100	>100	>100

* ED₅₀ value of compound against each cancer cell line, which was defined as a concentration (μg/ml) that caused 50% inhibition of cell growth *in vitro*.

Ref) Arch.Pharm. Res. 17(5), 375 (1994)

4-2. 抗癌性 植物로부터 活性成分의 分離

4-2-1. Monoterpene : (+) -bakuchiol
from *Psoralea corylifolia*



(+) -Bakuchiol

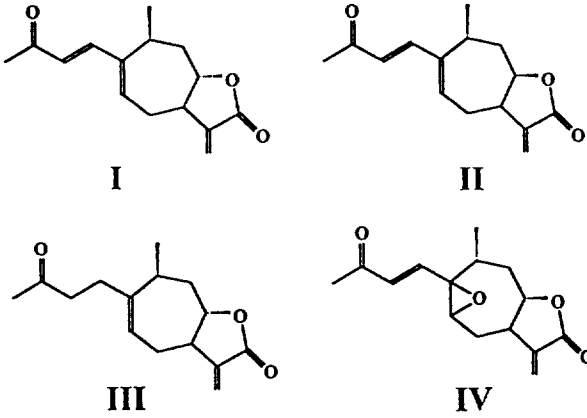
Net growth As % of control

Conc. (μg/ml)	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF-498	HCT15
3.0	101.98	101.73	98.78	97.03	94.57
10.0	79.34	95.28	76.42	81.38	74.72
30.0	11.52	57.34	0.63	39.57	36.45
100.0	-98.98	-95.12	-97.65	-95.86	-94.94
ED ₅₀	11.40	14.75	10.45	12.42	11.65

Ref) Arch. Pharm. Res. 15 (4), 356 (1992)

4-2-2. Sesquiterpenes

1. Xanthanolide (seco-4,5-guaianolide) from *Xanthium strumarium*



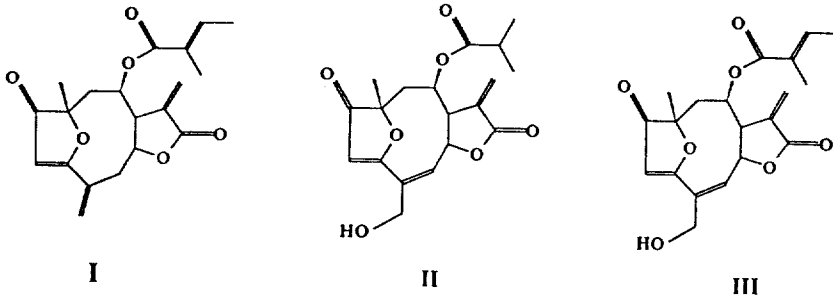
Antitumor activity of some xanthanolide from *Xanthium strumarium* against cultured human tumor cells *in vitro*

	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT15
I (xanthatin)	1.3*	1.6	0.5	1.7	1.1
II (epi-xanthatin)	1.1	1.5	0.2	1.3	0.1
III (epi-tomentosin)	>5.0	>5.0	>5.0	>5.0	>5.0
IV (epoxy-xanthatin)	0.8	1.1	0.2	0.8	0.1

* ED₅₀ value, which was defined as a concentration of test material (μg/ml) that caused 50% inhibition of cell proliferation *in vitro*.

Ref) J. Kor. Pharmacog. *in press* (1995)

2. Heliangolide from *Helianthus tuberosus*



Cytotoxicity of some Heliangolide from *Helianthus tuberosus*

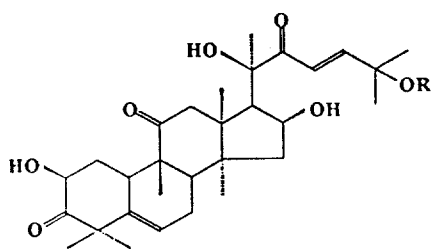
	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT15
I	0.5	0.8	0.2	0.2	0.1
II	1.2	1.8	0.2	1.5	0.3
III	2.4	1.4	0.2	1.5	0.3
adriamycin	0.1	0.2	0.1	0.2	1.2

* ED₅₀ value, which was defined as a concentration of test material (μg/ml) that caused 50% inhibition of cell proliferation *in vitro*.

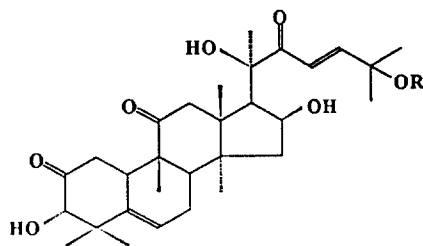
Ref) J. Kor. Pharmacog. *in press* (1995)

4-2-3. Triterpenes

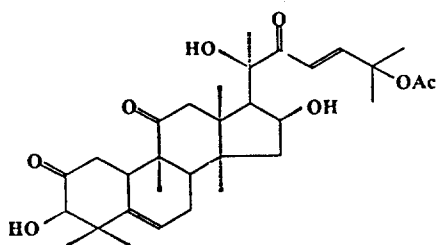
1. Cucubitane triterpenes from *Trichosanthes kirilowii*



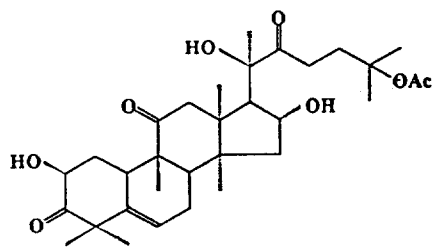
I. cucurbitacin B, R = -Ac
 III. cucurbitacin D, R = -H



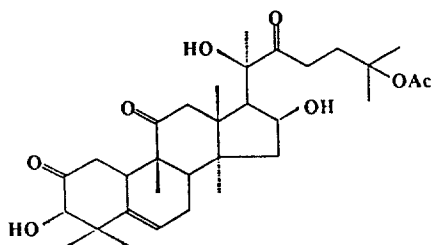
II. isocucurbitacin B, R = -Ac
 IV. isocucurbitacin D, R = -H



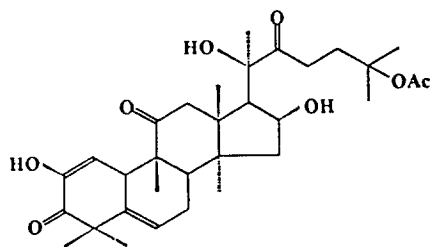
V. *epi*-isocucurbitacin B



VI. 23,24-dihydrocucurbitacin B



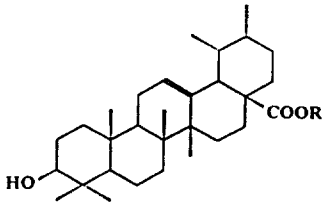
VII. 23,24-dihydroisocucurbitacin B



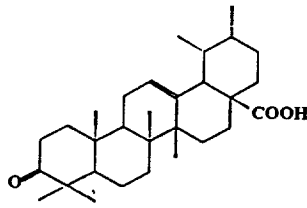
VIII. 23,24-dihydrocucurbitacin E

Ref) *Arch. Pharm. Res.* 17(5), 348 (1994)

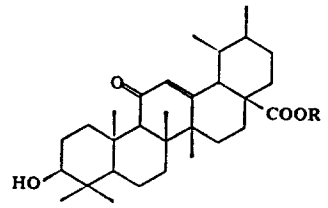
2. Triterpenoid in ursane, oleanene and lupan series



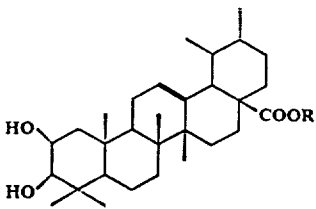
I. R = -H
II. R = -CH₃



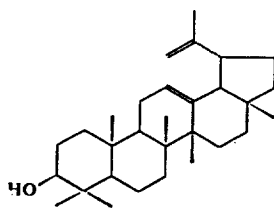
III



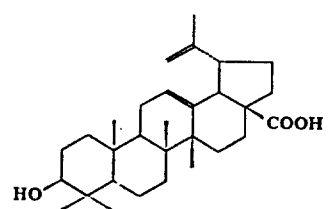
IV



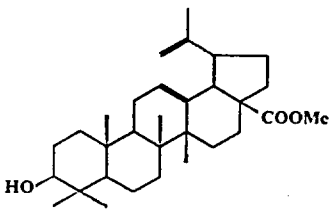
V. R = -H
VI. R = -CH₃



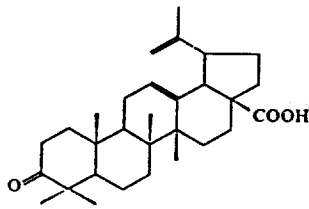
VII



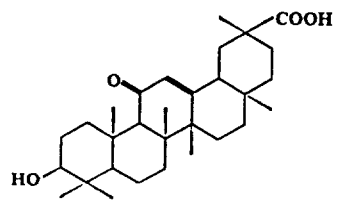
VIII



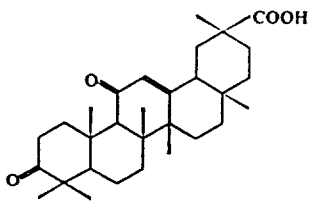
IX



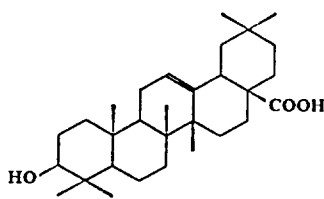
X



XI

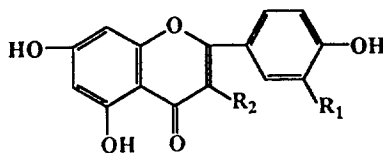
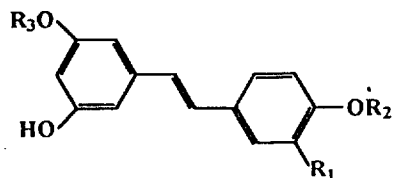


XII



XIII

4-2-4. Phenolics



	R1	R2	R3
I	-H	-Me	-H
II	-OH	-Me	-H
III	-H	-H	-H
IV	-OH	-Me	-Glu
V	-H	-H	-Glu

	R1	R2
VI	-H	-H
VII	-OH	-H
VIII	-OH	-OH
IX	-OH	-O-Rut

Cytotoxicity of some phenolics from plants

	AS49	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT15
I	3.8	5.7	3.2	5.6	6.7
II	3.9	4.6	3.1	7.9	3.0
III	3.5	3.7	2.4	3.8	3.5
IV	48.5	>50	35.4	>50	>50
V	50.4	>50	42.8	>50	>50
VI	7.8	7.5	4.3	6.0	6.5
VII	3.4	4.4	1.9	2.8	4.4
VIII	5.8	6.3	4.7	6.0	4.8
IX	>50	>50	>50	>50	>50
adriamycin	0.1	0.2	0.1	0.2	1.2

* ED₅₀ value, which was defined as a concentration of test material (μg/ml) that caused 50% inhibition of cell proliferation *in vitro*

Ref) *Arch. Pharm. Res.* 17(1), 42 (1994)