

저근백피성분의 생리활성에 관한 연구(III) -디클로로메탄분획의 항암작용-

김 중, 이정규*

경성대학교 약학대학

Studies on the Biological Activities of the Constituents of Ailanthi Cortex Radicis III. -Antitumor activities of dichloromethane fraction-

Jong Kim and Chung Kyu Lee*

College of Pharmacy, Kyungshung University, Pusan 608-736, Korea

Abstract - The cytotoxic activities of methanolic extract and its fractions of Ailanthi Cortex Radicis and column chromatographic eluates of its dichloromethane fraction (DCM fr.) were investigated. DCM fr. showed the strongest cytotoxicity against hepatoma cells. Furthermore, the active eluates 1-3, 8 and 9 were obtained. Effects on free radical generation and the growth of vascular endothelial cells were tested to elucidate the action mechanism of anticancer activity. Eluates 1-3 stimulated free radical generation, while eluates 8 and 9 showed no changes. Especially, eluates 8 and 9 effectively inhibited the proliferation of vascular endothelial cells in a dose-dependant manner. It is speculated that the anticancer effects of eluates 1-3, 8 and 9 might be due to free radical generation and inhibition of endothelial cell growth, respectively.

Key words - Ailanthi Cortex Radicis; anticancer; hepatoma cell; endothelial proliferation.

저근백피의 유효성분과 약리작용을 구명하기 위한 일련의 연구로서 메탄올추출물과 분획의 간 epoxide분해제에 미치는 영향과 급성 및 신장에 대한 독성을 보고한 바 있고,^{1,2)} 민간 및 한방에서 응용하는 자궁염, 장염, 장출혈, 장관염증, 식도염증, 신경통, 간장 비장질환, 촌충구제, 고초열, 치질, 적백리 및 지사 등 효능의 본질을 구명하고자 우선 예비실험에서 항산화활성을 가진 분획을 대상으로 간암세포에 대한 독성기전을 구명하고 세포독성의 농도의 존성, 내피세포의 증식과 유리기생성 등에 미치는 영향을 검토하여 보고한다.

재료 및 방법

*교신저자 : Fax 051-628-6540

추출·분획·크로마토그래피 - 전보^{1,2)}의 방법과 같이 국산 저근백피(*Ailanthus altissima*의 근피, 경성대학교 생약표본실에 표준품 보관)로부터 메탄올추출물(MeOH ex.)을 얻은 다음, 디클로로메탄(DCM), 에틸 아세테이트(EtOAc) 및 부탄올(BuOH) 등의 용매로 분획을 조제하였고 마지막 수층은 물분획(Water)으로 하였다. 전보에서는 클로로포름분획을 이용하였으나 TLC 패턴이 유사하며 독성이 적은 DCM을 분획용매로 이용하였다. 실리카 겔(Kiesel gel, E. Merck) 칼럼 크로마토그래피의 용매는 클로로포름-메탄올(10-1 → 2-1) 혼합용매를 사용하였다.

시료의 조제 - 물에 불용인 시료는 0.1 ml의 에탄올에 녹여 사용하였으며, 맹시험 및 대조군에서도 동일조건을 반영하였다.

간암세포의 배양-10%의 calf serum을 함유한 DMEM배지에 간암세포주(dRLh-84, JCRB 0410)를 이식하고 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다. 플라스틱 플라스크(바닥면적 25 cm²)에 2~3일 마다 subculture하여 세포주를 유지하였으며, 24-well plate를 이용하여 세포독성을 검토하였다.

혈관 내피세포의 배양-간암세포의 배양과 같은 배지와 조건으로 혈관내피세포(CPAE, CCL 209)를 이식하여 배양, 유지 및 검토하되 세포독성과 세포수축정은 MTT assay(tetrazolium derivative reduction assay)를 이용하였다.

세포독성시험³⁾-살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 mitochondrial dehydrogenase에 의해 MTT[3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]가 형성하는 blue formazan을 비색정량(570 nm)하였다.

Free radical 생성량 측정⁴⁾-Postmitochondrial fraction 회석액에 각 분획을 전처리하고 5분 방치한 다음 25 µM의 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)를 가하면 세포내 esterase 활성에 의하여 형성된 DCFH가 free radical과 반응하여 DCF가 생성되고, 이때 발하는 형광을 485 nm(excitation) 및 530 nm(emission)에서 측정하여 산정하였다.

결 과

저근백피의 메탄올추출물과 각 분획이 간암세포독성에 미치는 영향-Fig. 1에 나타난 바와 같이 MeOH ex.(100 µg/ml) 처리군의 세포생존율은 대조군(0.15 ml 에탄올)의 56%에 지나지 않아 세포독성을 인정할 수 있었다. 분획들(50 µg/ml) 중 BuOH fr. 및 Water fr.에서는 세포독성이 나타나지 않았으나 DCM fr. 및 EtOAc fr.은 각각 56% 및 81%의 생존율을 나타내었다. DCM fr.의 강한 세포독성이 확인되었으므로 유효성분을 분리하기 위하여 칼럼 크로마토그래피를 실시하였다.

DCM분획의 유효물(eluate)이 간암세포독성에 미치는 영향-DCM fr.을 칼럼 크로마토그래피로 얻은 32종의 eluate를 대상으로 간암세포독성을 검토한 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같다. Eluate 1~3, 8, 9, 10, 13, 19, 및 20~25 등이 각각 25

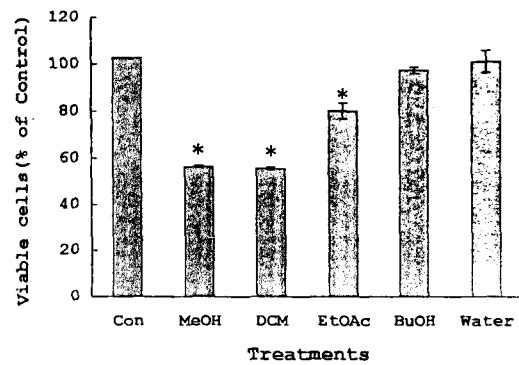


Fig. 1. Effects of methanolic extract and its fractions of Ailanthi Cortex Radicis on the cytotoxicity against hepatoma cell (dRLh-84 and JCRB0410).

Final concentration: methanol ex., 100 µg/ml and each fraction, 50 µg/ml. MeOH, methanol ex.; DCM, dichloromethane fr.; EtOAc, ethyl acetate fr.; BuOH, butanol fr. and Water, final water phase. Values are mean±S.E. of three tests. *Significantly different from control as P<0.01 by student *t*-test.

µg/ml의 농도에서 강한 세포독성을 나타내었으며 특히 eluate 3, 8 및 9에서 강한 활성을 보였다.

DCM분획의 유효물이 free radical 형성에 미치는 영향-간암세포독성을 나타낸 15종의 유효물의 작용기전을 구명하기 위하여 free radical 형성에 미치는 영향을 검토하였다. Fig. 3과 4에 나타난 바와 같이 eluate 1~3은 10~250 µg/ml의 농도에서 농도의존적으로 free radical의 생성을 증가시켰으며 8 및 9는 영향을 미치지 않았다. 반면에 eluate 10, 13, 19, 20, 21, 23, 24 및 25는 약한 소거작용(free radical scavenging effect)을 나타내었다. 이상의 결과에서 보듯이 eluate 1~3은 기존의 몇몇 항암제와 같이 free radical 생성을 촉진시켜서 세포독작용을 나타낼 가능성이 있고, eluate 10을 비롯한 8종은 다소간의 소거작용과 함께 강한 세포독성을 나타내었으므로 서로 다른 작용기전에 의해 활성을 나타내는 것으로 생각된다.

유효물 8 및 9가 혈관 내피세포 성장에 미치는 영향-유효물 8 및 9는 강한 세포독성은 있으나 free radical 형성에는 영향을 미치지 않아 혈관내피세포의 성장에 미치는 영향을 검토하였다. Fig. 5에 나타난 결과와 같이 유효물 8 및 9는 조직의 혈관성장과 관련이 있는 내피세포의 성장을 현저히 저해하였고

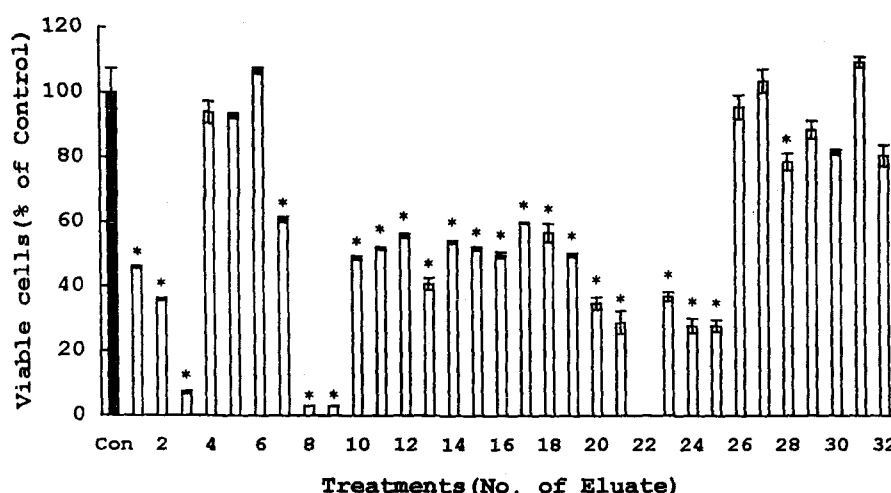


Fig. 2. Effects of column chromatographic eluates of dichloromethane fraction of *Ailanthi Cortex Radicis* on the cytotoxicity against hepatoma cell (dRLh-84 and JCRB0410). Final concentration: 50 $\mu\text{g/ml}$. Con., control and 01~32, numbers of eluates. Values are mean \pm S.E. of three tests. *Significantly different from control as $P < 0.01$ by student *t*-test.

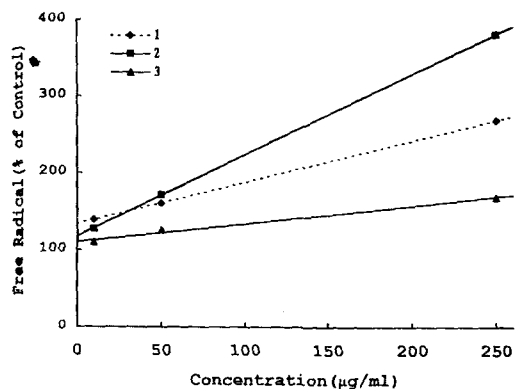


Fig. 3. Effects of column chromatographic eluates 1~3 of dichloromethane fraction of *Ailanthi Cortex Radicis* on free radical generation by DCF method. Values are mean of duplicated tests.

50% 저해농도(IC_{50})는 약 1 및 0.08 $\mu\text{g/ml}$ 수준으로 유하물 9가 훨씬 강력한 성장저해 효과를 보였다.

고찰

강한 활성을 나타내는 유하물 1~3, 8 및 9의 작용기전을 규명하기 위하여 DCF법으로 free radical 생성에 미치는 영향을 검토한 결과, 1~3이 강한 촉진효과를 나타내었고 8 및 9는 별다른 영향을 나타내지 않았다. 반면에 유하물 10 등 8종은 오히려

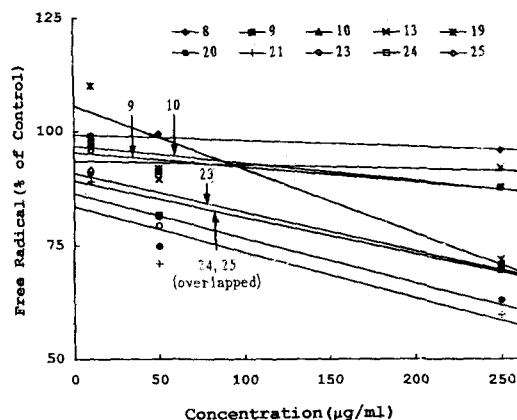


Fig. 4. Effects of column chromatographic eluates 8~10, 13, 19~21 and 23~25 of dichloromethane fraction of *Ailanthi Cortex Radicis* on free radical generation by DCF method. Values are mean of duplicated tests.

려 생성을 억제시키는 경향을 보였다. 이는 유하물 1~3이 기존의 항암제 adriamycin이나 mitomycin 등과 같이 대사과정에서 free radical 생성을 촉진시켜 항암활성을 나타낼 것으로 사료된다.

임상적으로 널리 이용되고 있는 adriamycin과 mitomycin 등 quinone계 항암제는 NADH 탈수소효소에 의하여 semiquinone radical을 형성하고, 이것이 산소분자에 전자를 공여하여 $\cdot O_2^-$ 와 H_2O_2 를 생성하여 항암활성을 나타낸다고 알려져 있다.⁵⁾

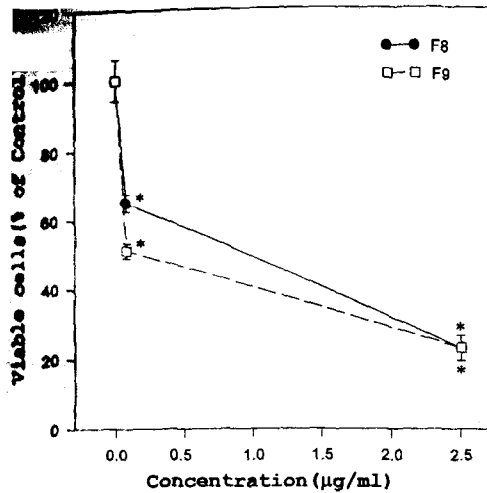


Fig. 5. Effects of column chromatographic eluates 8 and 9 of dichloromethane fraction of *Allanathi Cortex Radicis* on proliferation of vascular endothelial cell(CPAE and CCL209). Values are mean±S.E. of three tests. *Significantly different from control as P<0.01 by student *t*-test.

항균. 항*Trypanosoma* 및 항암작용을 나타내는 β -laphachone(*o*-naphthoquinone)은 4~5 μ M 및 5 μ M 이하의 농도에서 각각 농도의존적으로 $\cdot O_2$ 와 H_2O_2 의 생성을 촉진한다.⁶⁾ 또한 이 물질은 7 mg/kg의 농도에서 Sarcoma 및 Walker carcinoma 256에 유효하다고 한다. NADPH의존성 microsome 환원효소에 의해 dihydroquinone 형으로 되며 이러한 변환에 병행하여 Adenocarcinoma 755 및 Sarcoma 180에 대한 항암효과가 나타난다.⁷⁾ 다른 퀴논화합물, 예를 들면 diaziquone과 그 유도체 RQ14 및 RQ₂는 free radical을 생성하기 때문에 항암작용을 나타낸다고 알려져 있다.⁸⁾ 나프토크논유도체는 enterovirus 특히 echovirus 19에 대하여 항바이러스 활성을 나타내었으며,⁹⁾ 이들의 작용기전으로는 바이러스 입자에 직접 영향을 미치는 것이 아니라 세포의 방어기전의 변화에 기인할 것¹⁰⁾이라고 하였으며, polio virus, stomatitis virus 및 influenza strain의 적혈구응집 작용에 대한 억제효과도 있다고 보고되었다.¹¹⁾ 또한 lapachol 유도체들은 항균 및 항말라리아 활성을 가지고 있으며 HeLa cell에 대해서도 강력한 항암 효과를 나타낸다고 보고되었다.⁹⁾ Boothman 등¹²⁾은 1,4-naphthoquinone 유도체가 Sarcoma

180 종양에 대하여 억제작용을 나타내어 수명을 연장시켰으며, 이들의 작용기전으로 mitochondrial respiration chain의 저해에 의한 것이라 하였다. 또한 Dubin 등¹³⁾은 나프토크논 유도체가 NADPH 및 iron으로 유도된 지질과산화를 억제하였으나, ascorbate 및 *t*-butyl hydroperoxide의존성 지질과산화는 억제하지 못하였다고 주장하였다. 이상의 여러 보고에서와 같이 free radical의 생성촉진을 통하여 항암활성을 나타내는 약물들이 많이 알려져 있다.

저근백피 DCM fr.의 칼럼 크로마토그래피 유하물 8 및 9는 free radical 생성과는 무관한 어떤 기전으로 간암세포독성을 나타내는 것으로 생각된다. 또한 유하물 10 등 8종은 free radical 소거작용을 나타냄으로써 항산화작용을 가지고 있으면서 어떤 다른 기전에 의해 간암세포독성을 나타내는 것으로 생각된다. 특히 유하물 8 및 9는 혈관내피세포의 성장을 현저히 감소시켰는데, 이는 암조직에서 혈관신생을 억제하여 암조직의 성장을 억제할 가능성을 시사한다. 따라서 혈관신생억제능에 대한 검토가 필요한 것으로 판단된다. 이상에서 저근백피의 항암작용 발현에 유하물 1~3의 free radical 생성촉진 기전과 유하물 8 및 9의 혈관형성저해 기전에 의한 것으로 생각할 수 있다.

결론

저근백피의 메탄올추출물과 그 분획 및 크로마토그래피 유하물에서 간암세포에 대한 세포독성과 그 기전에 대해 검토하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 저근백피의 추출물은 강한 간암세포에 대한 세포독성을 나타내었는데 그 분획 중 디클로로메탄분획이 대조군의 56%에 해당하는 세포생존율을 보여 이 분획이 추출물 효과의 주체로 생각된다.
2. 디클로로메탄분획의 32 종 칼럼 크로마토그래피 유하물 중 1~3, 8 및 9가 대조군에 비해 각각 3~46%의 세포생존율을 나타내어 이들 중에 이 분획이 가진 간암세포 독성의 유효성분이 함유된 것으로 보인다.
3. 유하물 1~3은 free radical 생성촉진에 의해, 유하물 8 및 9는 혈관내피세포 성장억제를 통한 기전으로 항암활성이 나타날 가능성이 시사되었다.

사 사

본 연구의 진행 중 활성실험을 도와 주신 부산대학교 정해영 교수님과 대학원생, 부경대학교 최재수 교수님과 대학원생 여러분께 감사드립니다.

인용문헌

1. 김 중, 최종원, 김혜경, 박수완, 이정규 (1994) 저근백 피성분의 생리활성에 관한 연구(I) 메탄올추출물과 클로로포름분획이 epoxide분해제에 미치는 영향. 생약학회지 25: 47-50.
2. 김 중, 김혜경, 박수완, 최종원, 이정규 (1994) 저근백 피성분의 생리활성에 관한 연구(II) 클로로포름분획의 급성 및 신장에 대한 독성. 생약학회지 25: 140-143.
3. Tim, M. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Method* 65: 55-63.
4. Thomas, P., Herbert, D. G. and James, P. K. (1992) Production of reactive oxygen by mitochondria from normoxic and hypoxic rat heart tissue. *Free Radical Biol. & Med.* 13: 289-297.
5. Berlin, V., and Haseltine, D. G. (1981) Reduction of adriamycin to a semiquinone-free radical by NADPH cytochrome P-450 reductase produces DNA cleavage in a reaction mediated by molecular oxygen. *J. Biol. Chem.* 256: 4747-4752.
6. Docampo, R., Cruz, F. S. and Boreris, A. (1979) β -Lapachon enhancement of lipid peroxidation and superoxide anion and hydrogen peroxide formation by Sarcoma 180 ascites tumor cells. *Biochem. Pharmacol.* 28: 723-729.
7. Lin, A. J. and Sartorelli, A. C. (1976) Potential bioreactive alkylating agents VI. *Biochem. Pharmacol.* 25: 206-211.
8. Gutierrez, P. L. and Bachur, N. R. (1983) Free radical in quinone containing antitumor agents. *Biochem. Biophys. Acta* 758: 37-41.
9. Pinto, A. V., Pinto, M.C.F.R. and Lagrota, M.H. C. (1987): Antiviral activity of naphthoquinone I. *Rev. Lantionan Microbiol.* 29: 15-31.
10. Lagrota, M.H.C., Wigg, M.D. and Fonseca, M.E. F. (1983) Antiviral activity of lapachol. *Rev. Microbiol.* 41: 2143.
11. Chen, C. and Lee, M. H. (1986) Constituent of *Markhamia hildebrandtii* (Baker) Sprague and their antitumor activity. *Hua Hsueh* 44: 61-68.
12. Boothman, D., Greer, S. and Pardee, A. B. (1987) Potentiation of thalognated pyrimidine radio-sensitizers in human carcinoma cell by β -lapachon, a novel DNA repair inhibitor. *Can. Res.* 47: 5361-5369.
13. Dubin, M., Villamil, S.H.F. and Stoppani, A.O. M. (1990) Inhibition of microsomal lipid peroxidation and cytochrome P-450 catalized reactions by β -lapachon and related naphthoquinones. *Biochem. Pharmacol.* 39: 1151-1157.

(1997년 3월 5일 접수)