

# 白花蛇舌草로부터 分離한 ursolic acid의 自然殺害效果와 抗轉移作用\*

金聖勳\*\*

## ABSTRACT

### Apoptic and antimetastatic effects of ursolic acid isolated from *Oldenlandia diffusa* Herba

Kim, Sung-Hoon

College of Oriental Medicine, Taejon University, Korea

Ursolic acid(UA) was isolated from *Oldenlandia diffusa* Herba, one of the commonly used medicinal herbs for the treatment of cancer. IC<sub>50</sub> of UA against cancer cell lines as SNU-1, B16-Fo, SK-OV3, HCT15, XF498, SK-MEL and A549 was 6 $\mu$ g/ml, 4.4 $\mu$ g/ml, 4.5 $\mu$ g/ml, 4.6 $\mu$ g/ml and 4.2  $\mu$ g/ml respectively suggesting cytotoxicity against cancer cells. DNA fragmentation was expressed from the concentration of 5.5 $\mu$ g/ml of UA by agarose electrophoresis. In the observation of morphological changes by phase contrast microscope, SEM and TEM, cell injury and condensation of cytoplasm from nucleus began 4 hr after UA treatment, fragmentation of nucleus and injury of cell membrane was shown 24 hr after UA treatment with SNU-1 cells. Aurin tricarboxic acid as endonuclease inhibitor, and nicotinamide as poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor protected over 50% of cytotoxicity of UA against SNU-1 was at the concentrations of 3 $\mu$ M and 300 $\mu$ M respectively suggesting UA acts on nucleus. These results suggest that UA had antimetastatic effect and induced apoptosis.

**Keywords:** Ursolic acid, *Oldenlandia diffusa* Herba, T/C %, Apoptosis, Morphological changes, Aurin tricarboxic acid, Nicotinamide

## I. 緒 論

백화사설초는 꼭두서니과에 속하는 1년생 초본인 쌍낚시돌풀(백운풀)의 전초로서<sup>1-3)</sup> 습기가 많은 산기슭에 자라는데 중국에서는 복건, 광둥, 광서, 운남 및 양장강 남쪽지방에 주로 분포하며<sup>1-4)</sup>, 우리나라에서는 전남의 백운산, 제주도에 자생하고 있으며 최근에는 진주에서 재배하고 있다<sup>1-3)</sup>.

백화사설초의性は寒, 平, 無毒하며 맛은 달고 쓰며, 본초학적으로 淸熱解毒, 利水通淋, 活血化癥, 消癰의 효능이 있어 폐열기침, 편도선염, 인후염, 충수염, 이질, 황달, 자궁부속기염, 각종 염증 및 뱀에 물린 곳에 전탕하여 내복하거나 외용하고 있으며<sup>1-6)</sup>, 최근에는 소화기암, 임파암 및 인후암 등에 응용되고 있다<sup>3-8)</sup>.

백화사설초 전탕액의 약리 작용으로는 in vitro에서 황색포도상구균과 적리균에 대해 미약한 작용<sup>10-12)</sup>이 있으며, 소아폐염과 충수염에 임상에서 효과적인 것으로 보고되었고, 세망내피계와 백혈구의 탐식능을 촉진하여 종양세포를 억제한다고

\* 본 논문은 논문분량관계로 상당부분이 생략되었습니다.

\*\* 大田大學校 韓醫科大學 病理學敎室

Table 12. Cytotoxic effect of ursolic acid on human cancer cell lines(%control)

Conc.( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	SK-OV-3	HCT15	XF498	SK-MEL-2	A549
3.125	88.9282	83.6423	85.6563	83.5410	83.3538
6.25	-66.8593	22.6675	26.5270	30.9186	8.6910
12.5	-92.6012	-80.4726	-85.0559	-56.2630	-42.3370
25.0	-94.1426	-84.8259	-96.6173	-84.8674	-87.2079
50.0	-91.5222	-95.1493	-97.2751	-96.1246	-87.4047
100.0	-81.1946	-97.1393	-96.7113	-96.4014	-94.6863
ED <sub>50</sub>	3.5651	4.4060	4.4816	4.6142	4.2536

알려졌고<sup>7)</sup>, in vitro에서 사람 백혈병과 간암세포에 대해, in vivo에서 Walker -256, cervical carcinoma 14, sarcoma-180 및 간암세포에 대해 항종양 효과가 있다고 보고되었으며<sup>4-9)</sup>, 송<sup>9)</sup>은 백화사설초가 시험관내에서 대식세포의 탐식능과 반응질소 중간물질의 형성능을 촉진하여 P815 murine mastocytoma 암세포의 성장을 억제하였다고 보고 하였다.

백화사설초는 일반적으로 4-70g의 용량<sup>14-15)</sup>으로 처방에 가미되어 사용되는 경우가 많은데 식도에 응용되는 海花夏糖漿에 백화사설초 24g, 장암에 응용되는 蛇龍湯에 백화사설초 30g 등이 가미되는 등 각종 암에 활용되고 있다.

성분으로 전초에서 hentriacontane, stigmat-  
-serol, ursolic acid<sup>5,7,8)</sup>, oleanolic acid,  $\beta$ -  
-sitosterol,  $\beta$ -sitosterol-d-glucoside, p-cou-  
-maric acid 등이 밝혀졌고<sup>2,4,7,8,13)</sup>, Huang<sup>16)</sup>  
은 새로운 iridoids로서 oldenlandoside를 분리  
하였으며, Wong등<sup>17)</sup>은 백화사설초가 Aroclor  
1254에 의한 hepatic S-9에 의해 활성화된  
benzo [a]pyrene(BaP)과 aflatoxin B1(AFB1)  
에 의한 mutagenesis, DNA binding 및 대사를  
억제한다고 하였고, 본인이 제1보에서 백화사  
설초의 주요항암물질인 ursolic acid를 이용하여  
항암효과를 보고한외에는, in vitro와 in vivo에서  
자연살해효과와 항전이 작용을 종합적으로 검  
토한 연구는 없다.

이에 저자는 백화사설초로부터 항암활성물질을  
분리하고, 이 항암 물질을 이용하여 in vitro에서  
수종의 사람 암세포에 대한 세포독성,  $\alpha, \beta$ -  
-glucosidase 저해작용, 세포외산화율(extracell-  
-ular acidification rate), 자연살해작용(apopt-  
-osis), 생화학적 효소저해작용, F-actin에 대한  
작용 및 세포 형태학적 변화 등을 살펴보았고, in  
vivo에서 pulmonary colonization assay, 혈

소판응집 저해작용 및 폐장조직변화 등을 검토하  
였던 바 유의성있는 결과를 얻었기에 보고하는 바  
이다.

### III. 결 과

#### 1. Ursolic acid의 L1210와 SNU-1 암세포 에 대한 세포독성 효과

SNU-1에 대한 세포독성에서 6.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , L1210  
에 대한 세포독성에서도 6.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 ED<sub>50</sub>값이 나  
타났다(Table 11).

Table 11. Cytotoxic effect of ursolic acid  
on the L1210 cells

Conc.( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Viability (% of control)
Control	100.0 $\pm$ 7.68
3.1	106.5 $\pm$ 7.31
6.2	47.2 $\pm$ 5.46
12.5	26.2 $\pm$ 4.72***
25.0	0 $\pm$ 0.0***
50.0	0 $\pm$ 0.0***
100.0	0 $\pm$ 0.0***

\* : Statistically significant as compared  
with control by T test  
(\*:<0.05, \*\*:<0.01, \*\*\*:<0.001)

#### 2. Ursolic acid, Ursolic acid-methyl ester 및 ursonic acid의 수종 암세포에 대한 세포독성 효과

Ursolic acid와 그 유도체인 Ursolic acid-  
methyl ester 및 ursonic acid의 다양한 암주  
(SK-OV-3, HCT15, XF498, SK-MEL-2, A  
549)에 대한 세포독성 측정에서 ursolic acid의  
ED<sub>50</sub>값은 각각 3.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 4.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 4.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  
4.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 4.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$  등으로(Table 12). Ursolic  
acid에 methyl기를 가한 Ursolic acid -methyl  
ester의 ED<sub>50</sub>값은 각각 6.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 6.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 7.3

Table 13. Cytotoxic effect of ursolic acid methyl ester on human cancer cell lines(%control)

Conc.( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	SK-OV-3	HCT15	XF498	SK-MEL-2	A549
3.125	92.4498	99.3777	96.3387	92.7964	85.0446
6.25	62.7289	67.0160	75.2599	31.6430	44.9705
12.5	-96.5785	-95.4436	-90.0019	-94.7248	-92.0992
25.0	-96.0438	-95.4436	-96.3440	-95.2599	-94.4060
50.0	-92.8361	-96.2430	-93.6579	-95.1835	-93.5986
100.0	-88.7731	-94.3245	-88.8081	-93.2722	-91.6378
ED <sub>50</sub>	6.9985	6.3814	7.2749	4.6467	4.6655

Table 14. Cytotoxic effect of ursonic acid on human cancer cell lines(%control)

CONC.( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	SKOV-3	HCT15	SK-MEL-2	XF498	A549
0.3	96.3172	78.7297	94.7016	96.7297	96.8458
1.0	87.3574	55.4505	83.8493	90.5979	63.8090
3.0	73.1758	41.3838	69.9330	84.6704	56.8790
10.0	66.5274	31.9246	59.5914	63.5156	32.3511
30.0	36.4024	16.6985	36.2911	32.1410	0.9338
100.0	18.4279	0.3128	7.2455	5.1610	-1.3196
ED <sub>50</sub>	11.3765	2.1094	10.1161	11.8728	3.4736

$\mu\text{g}/\text{ml}$ , 4.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 4.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등으로(Table 13), ursolic acid의 ED<sub>50</sub>값은 11.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 2.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 11.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 3.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등으로 나타났다(Table 14).

### 3. Ursolic acid의 CHO-k1 암주에 대한 세포 외산화율 억제효과

Ursolic acid를 4가지 농도(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 CHO-k1 암주에 1차 처리한 실험군의 세포외산화율은 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 2분부터 증가하여 1시간에는 111%로 증가하였으며, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 2분부터 증가하여 8분에 204%까지 증가한 후 다시 하강하여 1시간 후에는 111%가 되었고, 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 2분부터 증가하기 시작하여 6분에 223%까지 이른 후 다시 하강하여 1시간 후에는 48%에 이르렀고, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 처치후 12분부터 하강하기 시작하여 28분에는 -60%까지 하강하였으나 1시간 후에는 0%에 이르렀다. 다시 medium으로 1시간 안정시킨 CHO-k1 암주에 2차적으로 ursolic acid를 상기한 농도로 처리한 실험군의 세포외산화율은 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 8분에 145%로 증가한 후 1시간에는 128%가 되어 전체적으로 100% 이상을 유지하였고, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 6분에 204%까지 증가한 후 36분부터 100% 이하로 하강하여 1시간 후에는 74%가 되었으며, 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$

농도에서는 6분에 165%까지 이른 후 24분부터 100% 이하로 하강하여 1시간 후에는 9.2%에 이르렀고, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 1차에서 이미 세포사하여, 100%를 중심으로 약간의 승강만 되풀이하여 medium만 처리한 결과와 같았다.

### 4. Ursolic acid의 $\alpha$ , $\beta$ -glucosidase 활성저해효과

Ursolic acid의  $\alpha$ -glucosidase 활성저해작용은 1, 5, 10, 20, 40, 80, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각각 13.2%, 18.2%, 23.9%, 22.3%, 34.7%, 84.3%, 100%로,  $\beta$ -glucosidase 활성저해작용은 1, 5, 10, 20, 40, 80, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각각 0.28%, 16.4%, 61.6%, 62.2%, 83.3%, 96.2%, 100%로 억제율을 나타냈다.

### 5. Ursolic acid의 B16-F0에 대한 glucosidase 활성저해효과

B16-F0에 대한  $\alpha$ -glucosidase 활성변화에서는 ursolic acid 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 15분, 30분, 45분, 60분 동안 대조군의 96.8%, 88%, 93%, 95%로, 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에선 93%, 69%, 54%, 35%로 활성을 억제하였고(Table 15.),  $\beta$ -glucosidase 활성변화에서는 ursolic acid 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에선 15분, 30분, 45분, 60분 동안 88%,

Table 15. Inhibitory effect of ursolic acid on  $\alpha$ -glucosidase in B16-F0 melanoma cells.

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Fluorescence intensity/mg protein per time(min)			
	15 min	30 min	45 min	60 min
0	125	170	233	400
1	121	150	219	383
4	116	117	125	141
7	Not detected(all cells dead)			

Table 16. Inhibitory effect of ursolic acid on  $\beta$ -glucosidase in B16-F0 melanoma cells.

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Fluorescence intensity/mg protein per time(min)			
	15 min	30 min	45 min	60 min
0	108	250	375	508
1	96	216	358	483
4	43	83	125	192
7	Not detected(all cells dead)			

Table 17. Protective effect of ursolic acid combined with biochemical inhibitors on the cytotoxicity against SNU-1

UA & Biochemical Inhibitors	Concentration ( $\mu\text{M}$ )	Viability	Protection rate to UA
Ursolic acid	13	48.3 $\pm$ 3.34	
UA & Aurin tricarboxic acid	1	60.4 $\pm$ 1.24	23.4
	3	75.3 $\pm$ 3.34	52.2
	10	83.2 $\pm$ 2.11	67.5
UA & Nicotinamide	100	53.5 $\pm$ 1.87	1.0
	300	77.2 $\pm$ 2.41	55.9
	1000	98.8 $\pm$ 3.04	97.8

86%, 95%, 95%로, 4 $\mu\text{g/ml}$ 농도에선 40%, 33%, 33%, 37.8%로 억제하였다(Table 16.).

6. Ursolic acid와 효소저해제 병용시 SNU-1 암세포에 대한 세포독성 보호효과

Ursolic acid 세포독성의 생화학적 작용기전을 밝히기 위해 aurin tricarboxic acid와 nicotinamide를 UA(12 $\mu\text{M}$  농도별로 함께 처리하였던 바 aurin tricarboxic acid의 여러 농도(1 $\mu\text{M}$ , 3 $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$ )에서 세포독성 보호율이 23.4%, 52.2%, 67.5%등으로 나타났으며, nicotinamide의 여러 농도(100 $\mu\text{M}$ , 300 $\mu\text{M}$ , 1000 $\mu\text{M}$ )에서 세포독성 보호율이 각각 1%, 55.9%, 97.8%등으로 나타났다(Table 17).

7. Ursolic acid의 HL-60과 SNU-1세포에 대한 DNA fragmentation 변화

SNU-1 암주에 대해 UA 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 까지의 DNA fragmentation ladder 관찰에서 대조군에 비하여 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 부터 DNA 분리

현상이 나타나기 시작하여 5.5 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 DNA ladder가 보이다가 그 이상 농도에서는 점차 DNA band가 굵고 진하게 나타났으며, HL-60에 대해서는 positive control인 1 $\mu\text{M}$  retinoic acid에서 나타나는 정도로 UA 8 $\mu\text{g/ml}$ 에서 DNA fragmentation ladder가 나타났으나, ADP-ribose inhibitor인 nicotinamide 1 mM을 함께 처리해도 apoptosis는 저해하지 못하였다.

8. Ursolic acid에 의한 F-actin 변화

Fibroblast 세포인 B16-F0 세포와 suspension 세포인 SNU-1 세포를 이용하여 30분간의 단기 실험은 B16-F0 세포를, 24시간의 장기 실험은 SNU-1세포를 사용하였다. B16-F0 세포에 대해 배지만 처리한 대조군과 6 $\mu\text{g/ml}$  ursolic acid로 처리한 실험군, 세포활성물질인 1 $\mu\text{g/ml}$  lysophosphatidic acid(LPA)를 처리한 대조군과 LPA와 6 $\mu\text{g/ml}$  ursolic acid를 처리한 실험군으로 구분하고 30분 동안 배양하였으며, 세포를 ursolic acid 6 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 다음 lysophosphatidic

acid에 의한 actin polymerization에 대한 영향을 조사하였는데, B16-F0 세포에서 관찰된 microfilament는 일반적인 fibroblast와 다른 형태를 보였다. Fibroblast의 microfilament는 주로 stress fiber와 ruffling membrane(cortical microfilament)으로 구성되어 있는데 B16-F0세포는 stress fiber가 없는 cortical microfilament만으로 구성되어 있었다. Fibroblast에서 stress fiber를 형성하는 것으로 알려진 lysophosphatidic acid<sup>42)</sup>는 B16-F0세포에서 microfilament를 증가시켰으나 stress fiber의 형성을 촉진시키지 않았으며 30분간의 ursolic acid의 처리는 lysophosphatidic acid에 의한 microfilament의 증가에 영향을 미치지 않았다.

SNU-1 세포에 ursolic acid 1 $\mu$ g/ml, 4 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml 등의 농도를 처리하고 24시간 후에 microfilament의 구성에 대한 관찰에서는, 배지만 처리한 대조군은 suspension cell의 배양에서 볼 수 있는 cortical microfilament로 구성되었으나, UA를 다양한 농도로 처리한 군에서는 microfilament에 영향이 없었다.

9. Ursolic acid의 SNU-1세포에 대한 형태학적 변화

Ursolic acid를 처리하고 4시간 후와 24시간 후의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 위상차현미경으로 SNU-1 암주를 관찰한 바, Fig. 23에서 SNU-1 암주가 세포막을 유지하며 둥근 원형의 세포모양을 유지하고 있으나 Fig. 24에서는 UA처리 후 4시간에 핵의 응축이 시작되었으며 Fig. 25에서는 UA처리 후 24시간에 핵막과 세포질의 응축이 현저함을 보여주고 있다.

주사전자현미경에 의한 SNU-1의 외형 관찰에서는 Fig. 26에서 세포 외형이 원형을 유지함을 볼 수 있으며, Fig. 27에서는 UA처리 후 4시간에 세포막의 파사가 시작되고 울퉁불퉁한 외형이 시작되었고, Fig. 28에서는 UA처리 후 24시간에 세포막이 파괴되고 한쪽이 튀어나와 점차 세포사에 이르는 것을 볼 수 있었다.

투과전자현미경에 의한 SNU-1관찰에서는 Fig. 29에서는 세포내 핵은 거의 반을 차지하며 정상적 모양을 보여주고 있으며, Fig. 30에서는 UA처리 후 4시간에 세포질이 한쪽으로 밀려 튀어나오고 있으며, Fig 31에서는 UA처리 24시간에 핵이 여러 조각으로 분리되고 있으며, Fig 32에서는 역시 UA처리 24시간에 세포막이 파괴되고 핵이 파괴되며 세포사에 이르는 모양을 보여주고 있다.

12. OF-4와 ursolic acid의 B16-F0에 의한 pulmonary colonization 억제 효과

B16-F0 암주를 5 $\times$ 10<sup>5</sup>개 이식시 폐장으로 전이된 colony수는 대조군에서 61개인데 비해, 백화사설초 OF-4 처리군은 20개, UA 처리군은 4개로 모두 유의성있게 감소하였고, 2차로 가장 효과적으로 나타난 UA 처리군으로 1 $\times$ 10<sup>6</sup>개를 이식하여 실험한 경우는 대조군이 107개인데 비해, UA 처리군은 10.1개로 유의성있게 감소하였다 (Table 21).

13. OF-4와 ursolic acid가 혈소판수 및 혈소판응집반응에 미치는 영향

백화사설초 UA와 OF-4는 모두 대조군에서 B16-F0 암세포에 의해 이상적으로 증가된 백혈

Table 21. Effect of OF-4 and ursolic acid on lung colonies in C57BL/6 injected i.v. with B16-F0.

Group	Number of Sample	Lung colonies	
		1st. inoculation (5 $\times$ 10 <sup>5</sup> cells)	2nd. inoculation (1 $\times$ 10 <sup>6</sup> cells)
Normal	6		0.00 $\pm$ 0.00
Control	6	61.0 $\pm$ 3.42	107 $\pm$ 7.2
UA	6	4.15 $\pm$ 2.14***	10.1 $\pm$ 0.32***
OF-4	6	20.0 $\pm$ 2.89***	no data

Normal: Non-treated group

Control: Saline-treated group after i.v. injection of B16-F0

UA : 50mg/kg UA of ODH treated group after i.v. injection of B16-F0

(\*: < 0.05, \*\*: < 0.01, \*\*\*: < 0.001)

OF-4 : 50mg/kg OF-4 fraction of ODH treated group after i.v. injection of B16-F0

Table 22. Effect of OF-4 and ursolic acid on WBC, platelet and platelet aggregation

Group	WBC ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	Platelet ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	Platelet Aggregation (inhibition %)
Normal	$6.7 \pm 0.09^a$	$926.5 \pm 34.7$	$69.2 \pm 0.90$
Control	$25.1 \pm 2.11$	$447.0 \pm 11.2$	$29.0 \pm 0.90$
OF-4	$17.3 \pm 1.14^{**}$	$869.5 \pm 25.7^{***}$	$38.3 \pm 1.28^{***}$
UA	$17.4 \pm 1.38^{**}$	$563 \pm 37.2^{**}$	$39.6 \pm 1.41^{***}$

Normal: Non-treated group

Control: Saline-treated group after i.v. injection of B16-F0

OF-4 : 50mg/kg OF-4 fraction of *ODH* treated group after i.v. injection of B16-F0

UA : 50mg/kg UA of *ODH* treated group after i.v. injection of B16-F0

(\*: < 0.05, \*\*: < 0.01, \*\*\*: < 0.001)

\* : Statistically significant as compared with control by T test

(\*: < 0.05, \*\*: < 0.01, \*\*\*: < 0.001)

Table 23. Antimetastatic effect of ursolic acid on infiltration of B16-F0 into lungs.

Group	Degree infiltration of B-16 melanoma cell line	Site for infiltration of B-16 melanoma cell line			Inflammation	Hemorrhage
		periva scullar	Peribro nchiole	alveolar sepa		
Normal	-	-	-	-	-	
Control	+++	-	+++	-	-	
UA	-	-	-	-	-	

Normal : Non-treated group

Control : Saline treated group after i.v injection of B16-F0 cells.

UA : Ursolic acid treated group after i.v injection of B16-F0 cells.

구수를 유의성있게 억제하였으며, 대조군에서 B16-F0 암세포에 의해 이상적으로 감소되었던 혈소판수와 혈소판응집반응을 유의성있게 증가시켰다(Table 22).

14. Ursolic acid의 B16-F0에 의한 폐장 조직전이 억제효과

B16-F0 암주를 정맥 주사한 후 조직 전이를 관찰하였던 바 폐장의 조직 변화는 암세포가 주로 폐포에 전반적인 침윤이 있었지만 UA 처리군에서는 상대적으로 기관지 주위에 소수의 암세포 침윤이 있었다(Table 23).

IV. 고 찰

암이란 조직의 자율적인 과잉성장으로 인구가 극복해야 할 난치병중의 하나이다. 암의 치료는 대개 국소과피요법, 수술요법, 방사선요법, 화학요법 및 면역요법 등이 있는데<sup>43)</sup>, 현재 가장 다용되는 화학요법과 방사선요법은 암세포뿐만 아니라 정상 세포까지 독성을 나타내어 소화장애, 간장장

애, 탈모, 혈액학적 변화, 면역기능저하, 골수조혈장애, 생식기 장애, 유전인자장애, 피부변화 및 폐섬유증 등의 부작용을 초래하는 경우<sup>44,45)</sup>가 많아, 부작용이 적은 복합 한약이나 단미 한약을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다.

암에 대한 연구 동향은 주로 세포독성(cytotoxicity), 자연살해(apoptosis), 세포노화(cell senescence), 세포분화(cell differentiation) 및 면역조절(immune modulation) 등에 관한 연구가 진행되고 있다.

한의학에서는 암의 치료에 활용되는 한약을 항암 본초라고 하는데, 이 중 청열해독약이 실험 및 임상에서 가장 많이 활용되고 있다<sup>78)</sup>.

청열해독약으로 분류되는 백화사설초는 성미가 苦甘寒하며 清熱, 利濕, 解毒하는 효능이 있어 폐열기침, 편도선염, 인후염, 충수염, 이질, 황달, 자궁부속기염등의 각종 염증<sup>1,2,3,5,15,16)</sup>과 압증<sup>4,6-14)</sup>에 4~70 g의 용량으로 다용되고 있다.

지금까지 백화사설초를 이용한 항암연구는 in vitro에서 사람 백혈병과 간암 세포, in vivo에서 Walker-256, cervical carcinoma 14, sarcoma

-180 및 간암 세포에 대한 항종양 효과<sup>8,14-16)</sup>, 항돌연변이 작용<sup>19)</sup>, 세망내피계와 백혈구의 탐식능을 촉진작용<sup>7)</sup>, NO생성 촉진<sup>17)</sup> 등의 작용이 밝혀졌으며, 성분으로 ursolic acid, oleanolic acid, hentriacontane, stigmatserol,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitosterol-d-glucoside, p-coumaric acid 및 oldenlandoside 등이 분리<sup>2,4,7,8)</sup>되었지만, 백화사설초 용매분획과 활성성분을 이용하여 in vitro와 in vivo에서 항암 및 항전이 작용기전을 중심으로 검토한 연구는 많지 않다.

이에 본 연구는 백화사설초 용매분획과 활성물질의 항암 및 항전이 작용기전을 평가하기 위해 in vitro에서 백화사설초 용매분획의 항암성 및 세포부착 저지작용을 검색하였고, 항암활성 물질을 분리하여 구조를 동정하였으며, 이 항암물질의 작용기전을 밝히기 위해 in vitro와 in vivo에서 연구하였다.

먼저 in vitro 에서 백화사설초의 항암성 탐색을 위해 용매 분획을 이용 L1210와 A549 암세포에 대한 세포독성 측정에서 핵산층과 에테르층이 모두 유효한 것으로 나타났지만, 그 중 핵산층이 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도에서 대조군에 비해 유의성있는 세포독성을 나타내어 가장 가능성을 보이는 분획으로 판정되었다.

이에 백화사설초 핵산층을 다시 column chromatography로 추출하여, L1210 암세포에 대한 세포독성을 측정하였는데, 핵산층으로부터 TLC를 찍어 적색 spot이 포함된 subfraction인 OF-4가 L1210에 대한 수차례의 세포독성 실험에서 ED<sub>50</sub>이 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하로 나타나 가장 유효한 세포독성을 나타내는 분획층으로 나타났다 (Fig. 2).

전이는 암세포가 이차적으로 다른 부위에 전이되어 암의 증상을 악화시킴으로써 결국 사망에 이르게 한다는 점에서 암의 병리기전상 중요하게 인식되고 있다. 전이의 병리기전은 세단계로 설명되고 있는데<sup>46,47)</sup>, 첫째, 암세포가 세포외기질에 부착하면 laminin이나 fibronectin 등의 특이 glycoprotein과 암세포 plasma membrane 부착 인자가 작용하고, 둘째, 암세포와 관련된 단백질 분해효소에 의해 기질의 부착단백과 구조적 교원질성 단백을 퇴화시키고 단백질 분해가 암세포 표면에서 일어나며 이 곳에서 다량의 활동성 효소가 기질내에 있는 자연적 단백질 효소저해제를 능가

하며, 셋째, 단백질용해에 의해 변형된 기질내로 화학주성인자에 의해 암세포가 이주하고 있다.

Liotta 등<sup>48)</sup>도 암세포의 전이는 일차적으로는 laminin과 fibronectin 등 세포부착에 관여하는 단백질이 증개하고 이어서 암세포와 관련된 부착 단백질과 collagen 단백질을 protease에 의해 변형시키고, 단백질용해가 발생되어 암세포가 침투하므로 전이에는 암세포가 조직기저내피에 부착하는 세포외기질 단백질의 역할이 매우 중요하다고 하였다.

세포외기질 단백질은 일반적으로 laminin, fibronectin, collagen I, collagen IV 등으로 세포의 기저세포막을 형성하고 있다<sup>49-51)</sup>.

항전이 연구로 Vollmers 등<sup>52)</sup>은 7종의 항체의 B16 melanoma cell 부착저지작용과 폐암전이 억제효과를, Ikuo등<sup>53)</sup>은 Arg-Gly-Asp의 순서로 된 polymeric peptides의 항전이 및 부착저지효과를, Lin 등<sup>27)</sup>은 selenite의 HeLa cell에 대한 부착저해작용을 보고하였다.

백화사설초의 물 추출액은 10<sup>-3</sup>g/ml의 농도에서 B16-F0와 A549의 복합세포외기질에 대한 세포부착을 40% 이상, 백화사설초 메탄을 추출액은 4 $\times$ 10<sup>-4</sup>g/ml 농도에서 A549의 단미세포외기질중 laminin, collagen I, collagen IV에 대한 세포부착을 50% 이상, B16-F0의 collagen IV에 대한 세포부착을 50% 이상 억제하여 백화사설초 메탄을 추출액은 collagen IV에 대해 특이한 억제효과를 보였다.

혈소판수는 혈액질환, 간질환, 교원병, 악성종양, 염증성질환 및 약물 등의 영향으로 변화하며, 골수기능이 항진될때나 항암제 사용후, 방사선장애, 암의 골수전이 및 혈소판의 생산저하시에 감소하는데<sup>54)</sup> 최근에는 혈소판이 암세포주에 대해 혈전을 형성하여 암세포를 보호하고 세포기저막의 침투를 용이하게 하여 암환자에 있어 혈소판수가 적어지고 혈소판 응집력이 촉진되어 혈전을 형성하는 경우가 많다는 보고<sup>55,56)</sup>가 있다.

따라서 암의 전이여부에는 혈소판수와 혈소판 응집력이 중요한 지표가 되어 본 연구에서 백화사설초 메탄을 추출액의 혈소판응집 촉진제인 A에 (adenosine diphosphate)에 대한 혈소판응집 억제작용을 검토하였는데, 50 $\mu\text{l}/\text{ml}$  농도에서 35.6%, 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$  농도에서 42.5%로 농도에 비례한 억제효과가 나타났다.

동물 실험에서는 백화사설초 물추출액과 핵산층이 S-180이 이식된 생쥐의 생존비에 미치는 영향을 측정하였던 바, 대조군의 MST가 17.1일인 반면, 백화사설초 물추출액 투여군은 24.4일, 백화사설초 핵산층 투여군은 27.1일로, T/C%는 백화사설초 물추출액 투여군이 142.6%, 백화사설초 핵산층 투여군이 158%로 나타나 유의성있는 생명연장 효과가 있었다(Fig. 12-13).

세포독성에서 가장 효과적인 층으로 밝혀진 백화사설초 핵산분획을 SiO<sub>2</sub> column chromatography를 통해 항암물질을 분리 후 실시된 구조분석에선 30개 탄소와 -COOH기를 가진 α-amyrin계에 속하며, C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>의 구조를 가진 ursolic acid(3β-Hydroxyurs-12-en-28-oic acid)임이 확인되었다(Fig. 3-6).

Ursolic acid의 세포독성을 평가하기 위하여 L1210, SNU-1에 대한 항암활성을 측정하였는데, L1210와 SNU-1 암주 모두에서 ED<sub>50</sub>이 6.0μg/ml로 나타나 항암활성이 인정되었다.

Ursolic acid와 그 유도체인 UA-methyl ester 및 ursonic acid의 다양한 사람암주(SK-OV-3, HCT15, XF498, SK-MEL-2, A549)에 대한 세포독성 측정에서 ursolic acid의 ED<sub>50</sub>값은 각각 3.6μg/ml, 4.4μg/ml, 4.5μg/ml, 4.6μg/ml 및 4.3μg/ml 등으로 5μg이하의 ED<sub>50</sub>값을 나타내어 항암성이 인정되었는데(Table 12), 이 결과는 Young<sup>57)</sup>와 Shen<sup>58)</sup>의 ursolic acid의 항암효과 보고, 손등<sup>59)</sup>의 ursolic acid가 embryo chorioallantoic membrane assay에서 IC<sub>50</sub>이 5μg/ml으로 강한 항암성이 있다는 보고와 일치되며, Young등<sup>60)</sup>이 Eriobotrya japonica에서 분리한 UA가 aflatoxin B1에 의한 mutagenicity를 억제하였다는 보고와 상관된 내용으로 볼 수 있다.

UA에 methyl기를 가한 UA-methyl ester의 여러 암주에 대한 ED<sub>50</sub>값은 6.9μg/ml, 6.4μg/ml, 7.3μg/ml, 4.6μg/ml, 4.7μg/ml 등으로 모두 8μg/ml이하로서 ursolic acid보다는 다소 약하지만, 유효한 세포독성을 보였는데(Table 13), 이는 Es등<sup>61)</sup>의 Calluna vulgaris (heather flowers)에서 분리한 UA가 HL-60와 HGT(위암주)의 성장을 억제하였고, pH 9에서 soybean 15-lipoxygenase activity를 억제하였지만, UA의 항암작용은 C-28과 관련이 있으므로 이의 methyl 화와 C-19 대신에 C-20을 methyl화한 oleonic

acid는 효과가 감소되었다는 보고와, Lee등<sup>62)</sup>의 Prunella vulgaris로부터 분리한 ursolic acid는 50mg/ml의 농도에서 P388 암주에 대해 T/C%가 125%로 항암성을 나타냈고, C-3의 hydroxyl기와 C-17의 carboxyl기를 ester화 하면 세포독성이 다소 떨어지지만 L1210와 P388 백혈병 암주에 대한 항암활성은 증가한다는 보고와 일치한 결과이며, ursonic acid의 여러 암주(SK-OV-3~A549)에 대한 ED<sub>50</sub>값은 11.4μg/ml, 2.1μg/ml, 10.1μg/ml, 11.9μg/ml, 3.5μg/ml 등으로 12 μg/ml이하로 ursolic acid보다 세포독성이 다소 떨어지지만 폐암주와 대장암주에 대해서는 보다 효과적인 것으로 나타났다(Table 14).

세포외산화도는 세포대사 기능을 평가하는 지표인데, 일반적으로 세포는 몇가지 예외를 제외하고 주위 환경을 산화하며, ATP 생산은 에너지대사에 의하며 세포의 ATP 소모와 밀접한 관련이 있다<sup>63-64)</sup>. 세포외산화율은 배지의 흐름이 잠시 중단 되면 형성되는 산성대사물로서 pH가 감소하는 것을 측정한다. H<sup>+</sup>의 생산은 glucose가 glucose transport protein을 통해 들어가 glycolysis에 의해 lactic acid로 대사화되거나 호흡을 통해 CO<sub>2</sub>로 산화되며 약산은 계속 유리된다(Fig. 11). 이와 같이 세포의 산화는 대사정도를 나타내므로 산화도의 심각한 저하는 세포사에 이르는 과정으로 판정할 수 있다.

Ursolic acid를 4가지 농도(5μg/ml, 10μg/ml, 15μg/ml, 20μg/ml)를 CHO-k1 암주에 1차 처리한 후 세포외산화율은 5μg/ml에서 1시간 후에 111%, 10μg/ml에서 8분에 204%까지 증가한 후 하강하여 1시간 후에는 111%, 15μg/ml에서 6분에 223%까지 이른 후 하강하여 1시간 후에는 48%, 20μg/ml에서는 처치후 12분부터 하강하기 시작하여 28분에는 -60%까지 하강하였으나 1시간 후에는 0%에 이르렀다(Fig. 14). 배지로 1시간 안정화 시킨 UA를 CHO-k1 암주에 2차 처리한 세포외산화율은 5μg/ml에서 1시간에 128%가 되어 계속 100% 이상을 유지하였고, 10μg/ml에서 6분에 204%까지 증가한 후 1시간 후에는 74%까지 하강하여 1차 처리에 비해 세포외산화율이 하강하였으며, 15μg/ml에서 24분부터 100% 이하로 하강하여 1시간 후에는 9.2%에 이르러 역시 1차 처리에 비해 세포외산화율이 하강한 것이 주목되고, 20μg/ml은 1차에서 이미 세포사하여 대조군과 변화가 없었다(Fig. 15). 따



라서 ursolic acid의 CH0-k1에 대한 세포외산 화율은 대조군에 비해 5 $\mu$ g/ml은 변화가 없었고, 10 $\mu$ g/ml은 2차 처리 후 1시간에 74%, 15  $\mu$ g/ml은 1차 처리 후 1시간에 48%, 2차 처리 후 32 분에 0%까지 하강한 후 세포사, 20  $\mu$ g/ml은 1차 처리 후 28분에 -60%까지 하강하여 세포사가 나 타난 것으로 볼 수 있었다.

Glucosidase는  $\alpha$ -1, 6-glucosidase와  $\beta$ -1, 4-glucosidase로서 glucoside를 가수분해하는 효소인데<sup>65)</sup>, Alhadef등<sup>66)</sup>은 암세포 표면에 부착 된 탄수화물의 잔기가 악성암주내의 glycoprotein (당단백)과 phenotype(표현형인자)을 변형시키 면 전이를 억제할 수 있다고 하였으며, Bernacki 등은 glucosidase 저해제가 암세포의 생합성과 과당구조(oligosaccharide structure)를 방해하여 전이를 억제하는 효과가 있다고 보고하여, 현재 glucosidase 저해제로는 casranospermin<sup>67)</sup> 과 ND2001<sup>68)</sup> 등이 보고되었다.

Glucosidase assay에서 ursolic acid가  $\alpha$ ,  $\beta$  -glucosidase를 50% 이상 저해한 농도는  $\alpha$  -glucosidase의 55 $\mu$ g/ml,  $\beta$ -glucosidase의 9.5  $\mu$ g/ml로 나타나 ursolic acid는  $\alpha$ -glucosidase 보다  $\beta$ - glucosidase에 대해 특이적 저해 작용 을 보였다(Fig. 16). Ursolic acid가 2일간 처 리된 B16-F0에서의  $\alpha$ -glucosidase 활성변화에 선 1시간 동안 ursolic acid 1 $\mu$ g/ml은 대조군과 차이가 없었지만 ursolic acid 4 $\mu$ g/ml은 glucos -idase활성을 15분, 30분, 45분, 60분에 각각 대조군의 93%, 69%, 54%, 35%로 시간이 경 과함에 따라 활성을 억제하였고,  $\beta$ -glucosidase 활성변화에서는 1시간동안 ursolic acid 1 $\mu$ g/ml 은 대조군과 차이가 없었지만 ursolic acid 4 $\mu$ g/ml은 glucosidase활성을 15분, 30분, 45분, 60 분에 각각 대조군의 40%, 33%, 33%, 37.8% 로 억제하였으나, ursolic acid 7 $\mu$ g/ml은 모든 세 포가 죽어 활성측정이 불가능하였다(Fig. 17-18 ). 이상의 결과는 ursolic acid의 glucosidase 활성 억제작용과 전이억제작용을 시사하고 있다.

Ursolic acid의 작용부위를 밝히기 위하여 UA 와 효소저해제 병용시 SNU-1 암세포에 대한 세 포독성 보호작용을 측정하였는데 효소저해제로 endonuclease inhibitor인 aurin tricarboxic acid<sup>69)</sup>와 poly (ADP-ribose)-polymerase 억 제제인 nicotinamide<sup>70-72)</sup>를 UA (12 $\mu$ M)와 농 도별로 함께 처리하였던 바 aurin tricarboxic

acid의 여러 농도(1 $\mu$ M, 3 $\mu$ M, 10 $\mu$ M)에서 세 포독성 보호율이 23.4%, 52.2%, 67.5% 등으 로, nicotinamide의 여러 농도(100 $\mu$ M, 300 $\mu$  M, 1000 $\mu$ M)에서도 세포독성 보호율이 1%, 55.9%, 97.8% 등으로 농도에 비례하여 증가하 였다. Aurin tricarboxic acid는 DNA 분해 효 소의 저해 작용으로 apoptosis를 부분적으로 저 해하고, 핵에 작용하여 간접적으로 DNA synth -esis 작용을 억제하고, nicotinamide도 세포막 의 보호와 ATP synthesis을 촉매하고 apopto -sis시에 활성화 되는 ADP-ribosylation을 방지 하는 작용이 있다는 보고를 참조하면 UA는 세포 내 핵을 중심으로 작용하는 물질로 추정할 수 있 다. Ursolic acid의 작용에 관하여 Lee등<sup>73)</sup>은 UA가 F9 tetratocarcinoma stem cells의 분 화를 유도하고 GRE (glucocorticoid respons -ive element)에 결합하는 핵단백인자를 생산한 다고 하였으며, Simon등<sup>74)</sup>은 UA의 IC<sub>50</sub>는 0.3mM 수준으로 감자의 5-lipoxygenase과 soybean 15-lipoxygenase에 대해 저해작용을 하고, 1 $\mu$ M에서 생쥐 복수대식세포내의 lipoxy -genase 활성을 억제하고, 0.85 $\mu$ M에서 HL-60 을 억제하며, 1 $\mu$ M에서 DNA synthesis를 억제 하였다고 하여 UA가 nucleus에 작용할 가능성을 시사하고 있다.

Apoptosis는 gene에 의해 능동적인 세포자체 파괴로서 많은 일련의 분절들을 산출하는 nucleo -some 사이의 연결부위에서 일어나는 핵 DNA의 분열과 상관이 있는데<sup>75)</sup>, apoptosis의 생화학적 기전은 일반적으로 agarose gel electrophoresis 에 의해 암주에서 추출한 DNA의 internucleo -somal DNA cleavage가 endonuclease에 의 해 나타나는 현상을 ladder상의 DNA 분리상을 통해 관찰할 수 있다. Ursolic acid의 SNU-1과 HL-60 세포에 대한 DNA fragmentation 변화 의 측정에서 SNU-1암주에 대해 UA는 대조군에 비하여 2.5 $\mu$ g/ml부터 DNA 분리현상이 나타나기 시작하여 5.5 $\mu$ g/ml에서는 DNA ladder가 보이다 가 그 이상 농도에서는 점차 DNA band가 굵고 진하게 나타났으며(Fig. 19), HL-60에 대해서는 positive control인 1  $\mu$ M retinoic acid에서 나타나는 정도로 UA 8 $\mu$ g/ml에서 DNA fragmentation ladder가 나타났으며(Fig. 20), ADP-ribose polymerase 저해제인 nicotinamide 1mM을 UA 8 $\mu$ g/ml과 함께 처리해도 apoptosis

를 저해하지 못하는 것으로 보아 ursolic acid는 ADP-ribosylation과 관계가 적다고 볼 수 있다.

Ursolic acid가 cytoskelton에 미치는 영향을 판정하기 위하여 다양한 농도의 UA를 처리하고 F-actin의 중합(polymerization)을 관찰하였다. 구상형 단백질인 actin이 사상형의 actin으로 중합되는 것은 세포형태학적 변화에서 중요하게 인식되고 있다<sup>76)</sup>.

Fibroblast 세포인 B16-F0 세포와 suspension 세포인 SNU-1 세포를 이용하여, 30분간의 단기 실험은 B16-F0 세포를, 24시간의 장기 실험은 SNU-1 세포를 사용하였는데, 장단기 시간에서 모두 세포억제 및 활성물질에 의해 빠르게 반응하는 구성성분인 microfilament에 영향을 주지 않는 것으로 보아(Fig. 21-22), ursolic acid는 cytoskelton에 손상을 주지 않는 것으로 볼 수 있다.

Ursolic acid를 SNU-1 암주에 처리하고 위상차현미경과 전자현미경에 의해 형태학적 변화를 관찰하였는데, 위상차현미경 관찰에서는 UA처리 후 4시간에 핵의 응축이 시작되었으며(Fig. 24), 24시간에 핵막과 세포질의 응축이 현저하게 나타났고(Fig. 25), 주사현미경에 의한 관찰에서는 SNU-1의 외형변화로 4시간에 세포막의 파사가 시작되어 울퉁불퉁한 외형으로 변형되었고(Fig. 27), 24시간에는 세포막이 파괴되고 한쪽이 튀어나와 점차 세포사에 이르는 것을 볼 수 있었고(Fig. 28), 투과현미경에 의한 관찰에서는 UA처리 후 4시간에 세포질이 한쪽으로 밀려 튀어나오고(Fig. 30), 24시간에는 핵이 여러 조각으로 분리되었으며, 점차 세포막이 파괴되고 핵이 파괴되며 세포사에 이르는 모양이 관찰되었다(Fig. 31-32). 이상의 결과를 종합하면 ursolic acid는 4시간 후에 핵과 세포질간의 분리를 유도하며, 24시간 후에는 핵이 여러조각으로 분리되어 세포사에 이르는 apoptosis의 형태학적 변화를 초래하는 것으로 사료된다.

항암 동물실험에서는 ursolic acid와 OF-4의 항전이효과를 살펴보기 위해, C57BL/6의 미정맥에 B16-F0을 이식하고 pulmonary colonization assay, 혈소판수, 혈소판응집반응 및 폐장조직변화 등을 측정하였다.

Pulmonary colonization assay<sup>35-37)</sup>는 폐장에 전이되는 colony의 수를 계산하는 것으로 전

이여부의 판정에 사용되는데 본 연구에서  $5 \times 10^5$  cells이 처리된 대조군은 평균 61개인데 비해, 백화사설초 OF-4층 처리군은 20개, UA 처리군은 4개로 모두 유의성있게 감소하였으며(Fig. 35),  $1 \times 10^6$  cells이 처리된 대조군은 평균 107개인데 비해, UA 처리군은 10.1개로(Fig. 36) 유의성있게 감소하여 백화사설초 OF-4와 ursolic acid의 항전이 효과가 人定되었다.

B16-F0 암세포를 미정맥으로 이식한 후 실시한 혈액검사에선 이상적으로 감소되었던 혈소판수와 저하된 혈소판응집억제율을 OF-4층 처리군과 UA 처리군에서 모두 유의성있게 증가시켰다(Fig. 37-39).

B16-F0 암주를 C57BL/6 생쥐의 미정맥으로 이식한 후 21째 실시한 폐장 조직변화에서는 흑색종이 생쥐의 폐암주인 까담에 대조군의 폐장에서 폐포를 중심으로 전반적인 전이가 있었으나, UA 처리군에서는 기관지 중심으로 적은 수의 암주가 전이되어 전이억제 효과가 인정되었다(Fig. 40-41).

이상의 결과를 종합하면 ursolic acid는 백화사설초의 주요 항암물질로서 자연살해작용을 유도하고 항전이 효과는 나타내므로, 백화사설초는 암치료에 널리 활용될 수 있다고 사료된다.

## V. 결 론

백화사설초 항암활성 물질을 이용하여 in vitro와 in vivo에서 자연살해작용과 및 항전이 효과를 측정하여 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. L1210, SNU-1, SK-0V3, HCT15, XF498, SK-MEL, A549 등 암세포에 대한 ED<sub>50</sub>은 ursolic acid가 6 $\mu$ g/ml이하, ursolic acid methyl ester는 8 $\mu$ g/ml이하, ursonic acid는 12 $\mu$ g/ml이하로 유효한 세포독성을 보였다.

2. Ursolic acid의 CHO-k1에 대한 세포외산화율은 대조군에 비해 5 $\mu$ g/ml은 하강이 없었고, 10 $\mu$ g/ml은 2차 처리후 1시간에 74%, 15 $\mu$ g/ml은 1차 처리 후 1시간에 48%, 2차 처리 후 32분에 0%까지 하강한 후 세포사, 20 $\mu$ g/ml은 1차 처리 후 28분에 -60%까지 하강한 후 세포사가 나타났다.

3. Glucosidase assay에서 ursolic acid가

$\alpha, \beta$ -glucosidase활성을 50% 이상 저해한 농도는  $\alpha$ -glucosidase의  $55\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $\beta$ -glucosidase의  $9.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났으며, ursolic acid  $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 은 B16-F0에서 glucosidase활성을 40%이상 억제한 경우는  $\alpha$ -glucosidase활성에 대해 60분제한,  $\beta$ -glucosidase활성에 대해서는 15분부터 60분까지 억제하였다.

4. Ursolic acid는 SNU-1세포에 대해  $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터 DNA fragmentation이 발현되기 시작하였으나 HL-60에 대해  $8\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 retinoic acid 수준으로 apoptosis를 나타냈지만 ADP-ribosylation에 관여하지 않는 것으로 나타났다.

5. Ursolic acid를 B16-F0에 30분, SNU-1세포에 24시간 처리하여도 microfilament에 영향이 없었다.

6. Ursolic acid를 SNU-1세포에 처리하고 위상차현미경과 전자현미경(SEM & TEM)에 의한 형태학적 관찰에서 ursolic acid를 처리 후 4시간에는 세포막의 손상과 핵과 세포질의 응축이 시작되고, 24시간 후에는 핵의 분리와 세포막의 파괴가 나타났다.

7. Ursolic acid와 효소저해제를 SNU-1 암세포에 함께 처리하면 aurin tricarboxic acid는  $3\mu\text{M}$ 부터, nicotinamide는  $300\mu\text{M}$ 부터 50% 이상의 세포독성 보호작용을 나타내어 ursolic acid는 주로 핵과 세포막에 작용한다고 볼 수 있었다.

8. Ursolic acid와 OF-4 처리군에서 폐장 colony수는  $5 \times 10^5$  세포가 처리된 대조군에서 평균 61개인데 비해, 백화사설초 핵산 OF-4층 처리군은 20개, UA 처리군은 4개로 모두 유의성있게 감소하였으며,  $1 \times 10^6$  세포가 처리된 대조군에서 평균 107개인데 비해, UA 처리군은 10.1개로 유의성있게 감소하여 백화사설초 핵산층과 ursolic acid의 항전이 효과가 인정된다.

9. Ursolic acid와 OF-4는 모두 대조군에 비해 혈소판수는 OF-4군만, 혈소판응집반응 억제는 모든 실험군에서 유의성 있게 증가되었다.

10. B16-F0을 미정맥에 주사한 후 폐장 조직 변화에서 대조군은 주로 폐포를 중심으로 전반적인 전이가 있었으나, UA처리군에서는 기관지 주위에만 소수 암세포 전이가 있었다.

이상의 결과로 보아 ursolic acid는 백화사설초의 주요 항암물질로서 항암 및 항전이 효과를 나타내므로, 백화사설초는 암치료에 널리 활용될 수