

## Hollow Fiber 검색법과 Xenographic Animal Assay를 이용한 생약재의 암세포 저해활성 비교

이경호\* · 조좌형<sup>1</sup> · 윤원호<sup>2</sup>

코오롱중앙기술원, <sup>1</sup>국립익산대학 식품공업과, <sup>2</sup>서일대학 식품가공과

## Comparative Activity of Medicinal Herbs Between Hollow Fiber Assay and Xenographic Animal Assay

Keyong Ho Lee\*, Choa Hyung Cho<sup>1</sup>, and Won Ho Yoon<sup>2</sup>

Kolon Central Research Park, Yongin-city, 449-910 Korea

<sup>1</sup>Department of Food Engineering Iksan National College, Iksan 570-752, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science & Technolgy Seoil College, Seoul 131-702, Korea

**Abstract** – We compared the antitumor activity between hollow fiber assay and xenographic animal assay on thirty herbal plants. It is evaluated that the antitumor activity of above 30% is regarded as “positive response”, and its of below 30% is regarded as “negative response”. The two herbal plants extracts (*Ulmus davidiana* and *Hedyotis diffusa*) among thirty herbal plants show to be positive in xenographic animal assay and they were also correctly identified as positive by the hollow fiber assay. The correlation of the hollow fiber assay data with xenographic animal assay would suggest that hollow fiber assay presents a potentially unique tool to develop the herbal medicine for cancer.

**Key words** – Hollow fiber, xenographic, antitumor, correlation, herbs, *Ulmus davidiana*, *Hedyotis diffusa*

### 서 론

천연물로부터 항암성 물질의 개발에 있어서 어떤 재료로부터 물질을 얻는가 하는 것이 중요하겠지만 이에 못지 않게 어떤 방법으로 유효한 물질을 탐색 할 것인가하는 방법론 역시 중요한 문제이다. 이러한 검색법의 이상적인 조건은 임상효과를 고도로 예언할 수 있고, 경제적이고, 간편하고, 신속한 결과가 얻어져야 할 것으로 사료된다. 이러한 검색법으로 많이 사용되고 있는 것은 MTT 법,<sup>1)</sup> SRB 법<sup>2)</sup> 및 neutral red 법<sup>3)</sup> 등이 있으며 이들의 특징은 대량으로 신속한 검색을 할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 그러나 이러한 검색법은 실험동물을 직접 사용하는 *in vivo* animal model과 같이 생체내의 pharmacokinetics에 가까운 조건이라 할 수 없다. 초기 물질탐색과정부터 동물을 이용한 기존의 물질 검색은 많은 시간 및 비용이 소모되는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 Hollingshead 등은 실험동물을 이용하면서 기존의 동물모델보다 경제적인 검색법(Hollow fiber assay)을 개발하였다.<sup>4-12)</sup> 배양세포를 polyvinylidene fluoride(PVDF) 막으로 만들어진 hollow fiber에 주입하여 실험동물의 복강이나 피부에 이식하여 마치 기존 동물모델에서 복강이나 피부에 종양을 이식한 것과 유사한 모델을 형성시키는 것이며, 미국의 국립암연구소에서 항암제 검색에 사용되어 왔다.<sup>13)</sup>

본 연구에서는 전통의약서와 문헌정보를 근거로 하여 항암성이 있거나 혹은 항암평가에 시도되었던 약용식물 중에서 수십 종에 대하여 hollow fiber 을 이용한 검색법과 누드 마우스를 이용한 xenographic animal 검색법으로 약용식물 추출물의 항암활성을 비교검색 하였다.

본 연구에서는 전통의약서와 문헌정보를 근거로 하여 항암성이 있거나 혹은 항암평가에 시도되었던 약용식물 중에서 수십 종에 대하여 hollow fiber 을 이용한 검색법과 누드 마우스를 이용한 xenographic animal 검색법으로 약용식물 추출물의 항암활성을 비교검색 하였다.

### 재료 및 방법

**실험재료** – 마우스에 세포이식을 위한 hollow fiber (500,000 Da molecular weight cut-off, 1.0 mm ID, USA) 는 polyvinylidene fluoride (PVDF)로 되어 있고 열에 의하

\*교신저자(E-mail) : khlee67@kolon.com  
(FAX) : 031-280-8999

여 봉합이 가능한 재질로 spectrum laboratories Inc.로 부터 구입하였고, 약제는 서울 소재 한약유통상으로부터 구입하였다. Paclitaxel은 sigma로 부터 구입하였다.

**시료 조제** - 시료는 건조 분쇄한 약재를 methanol를 가하여 24시간 동안 상온에서 추출한 후, 감압건조하여 10 mg/ml DMSO로 만들었으며, 주사시는 cremophore EL/ethanol (1:1, v/v)에 녹여 최종 5% cremophore EL/ethanol 함유 PBS에 녹여 주사용으로 사용하였고, paclitaxel 주사도 위와 같은 방법으로 하였다.

**종양세포주** - 종양세포주는 인간 자궁내막암 세포주인 HeLa와 흑색종인 SK-MEL-2를 이용하였으며, 배양 배지로

는 RPMI1640에 10% FBS가 함유된 배지를 이용하였다.

**실험동물** - Blab/c nu/nu (male, 5weeks) 마우스는 일본의 SLC 사의 동물을 중앙실험동물로 부터 공급받아 사용하였다. 사육조건은 표준사육조건으로 온도는 23±2°C, 상대습도 50±5%, 조명은 12시간으로 하였고, 음수는 UV 살균물을, 사료는 방사선멸균 사료를 자유공급하였다.

**In vivo hollow fiber assay** - 항암활성 측정은 Hollingshead 등의 방법을 이용하였다.<sup>4)</sup> 즉, 세포를 1×10<sup>6</sup> cells/ml로 하여 미리 한쪽 끝이 봉인된 멸균된 hollow fiber에 5 cc 주사기를 이용하여 세포현탁액을 주입한 후, 세포 현탁액이 세어나오지 못하도록 열을 가하여 hollow fiber 나머지 한쪽

**Table I.** Hollow fiber assay에 의한 종양세포 성장저해효과

일반명	학 명	부 위	저해율 (%)	
			HeLa	SK-MEL-2
가시오가피	<i>Acanthopanax senticosus</i>	줄기껍질	0	4
갈근	<i>Pueraria lobata</i>	뿌리	4	9
계피	<i>Cinamomum japonicum</i>	줄기껍질	10	14
구절초	<i>Chrysanthemum zawadskii</i>	전초	8	7
귀전우	<i>Euronymus alatus</i>	가지	12	11
노회	<i>Aloe vera</i>	잎	4	17
누로	<i>Echinops setifer</i>	뿌리	5	10
독활	<i>Aralia cordata</i>	종자	27	14
동과	<i>Benincasa hispida</i>	종자	14	19
마황	<i>Ephedia sinica</i>	지상부	19	20
느릅	<i>Ulmus davidiana</i>	줄기껍질	37	46
백렴	<i>Ampelopsis japonica</i>	뿌리	19	4
백작약	<i>Paeonia japonica</i>	뿌리	11	5
백화사설초	<i>Hedyotis diffusa</i>	전초	30	37
사간	<i>Belamcanda chinensis</i>	뿌리줄기	4	11
산사자	<i>Crataegus pinnatifida</i>	열매	8	7
산수유	<i>Cornus officinalis</i>	열매	14	10
상기생	<i>Hyphear tanakae</i>	전초	24	17
소엽	<i>Perilla frutescens</i>	잎	23	19
어성초	<i>Houttuynia cordata</i>	전초	4	10
여정실	<i>Ligustrum lucidum</i>	열매	12	20
울금	<i>Curcuma longa</i>	뿌리	22	24
지모	<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	뿌리줄기	11	14
천문동	<i>Asparagus cochinchinensis</i>	비늘줄기	27	20
택사	<i>Plantago asiatica</i>	뿌리줄기	20	20
파두	<i>Crotis tinctoria</i>	종자	31	25
피마자	<i>Ricinus communis</i>	종자	14	10
하수오	<i>Pleuropterus meltiflorus</i>	덩이뿌리	23	14
황금	<i>Scutellaria baicalensis</i>	뿌리	21	22
황기	<i>Astragalus membranaceus</i>	뿌리	4	9

양성대조약물(paclitaxel 4 mg/kg)의 활성; 81% on HeLa, 57% on SK-MEL-2

를 봉하였고, 세포가 충전된 fiber를 2 cm 간격으로 가열 봉인하여 2 cm 길이의 macrocapsule를 만들었다. 이 세포 현탁액 캡슐을 24시간 동안 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 예비 배양한 후, 마우스의 좌우 옆구리 피하에 이식하였다.

활성을 측정하고자 하는 시료는 매일 1회씩 5일간 복강투여(25 mg/kg) 하였으며 양성대조물질인 paclitaxel(4 mg/kg)은 정맥주사하였다. 시료 투여일로부터 8일 후에 마우스로부터 hollow fiber 캡슐을 적출하여 캡슐내에 있는 세포 농도를 MTT 시약(1 mg/ml)으로 염색한 후, 형성된 formazan을 DMSO로 녹여 흡광도(540 nm)를 측정하여 저해율을 조사하였다.

**Xenographic animal assay** – 각 세포주를 적정 농도로 하여 Blab/c 누드 마우스의 옆구리에 이식하여 종양을 만든 후, 형성된 종양을 clean bench에서 적출하여 가로, 세로, 높이를 3 mm 정도로 일정하게 절단하여 새로운 마우스의 옆구리에 멸균 조직이식봉(직경 3 mm)으로 절단한 종양을 이식하였다. 이식후, 종양의 크기가 200–300 mm<sup>3</sup>가 되는 시점부터 시험시료 및 paclitaxel를 투여하였으며, 투여경로 및 용량은 hollow fiber assay에서 동일하게 하였다. 항종양효과의 판정은 투여시작일로부터 28일째까지의 종양의 크기를 대조군과 비교하여 측정하였다.<sup>14)</sup> 종양의 크기는 (단경×단경×장경)×1/2와 같은 식으로 계산하였다.

**Table II.** Xenographic animal system에 의한 종양세포 성장저해효과

일반명	학 명	부 위	저해율 (%)	
			HeLa	SK-MEL-2
가시오가피	<i>Acanthopanax senticosus</i>	줄기껍질	0	3
갈근	<i>Pueraria lobata</i>	뿌리	0	0
계피	<i>Cinamomum japonicum</i>	줄기껍질	5	9
구절초	<i>Chrysanthemum zawadskii</i>	전초	0	0
귀전우	<i>Euronymus alatus</i>	가지	11	10
노회	<i>Aloe vera</i>	잎	0	0
누로	<i>Echinops setifer</i>	뿌리	4	0
녹활	<i>Aralia cordata</i>	종자	12	10
동과	<i>Benincasa hispida</i>	종자	0	0
마황	<i>Ephedia sinica</i>	지상부	12	20
느릅	<i>Ulmus davidiana</i>	줄기껍질	46	50
백랍	<i>Ampelopsis japonica</i>	뿌리	0	0
백작약	<i>Paeonia japonica</i>	뿌리	11	10
백화사설초	<i>Hedyotis diffusa</i>	전초	30	38
사간	<i>Belamcanda chinensis</i>	뿌리줄기	0	5
산사자	<i>Crataegus pinnatifida</i>	열매	0	0
산수유	<i>Cornus officinalis</i>	열매	7	18
상기생	<i>Hyphear tanakae</i>	전초	10	15
소엽	<i>Perilla frutescens</i>	잎	15	11
어성초	<i>Houttuynia cordata</i>	전초	0	9
여정실	<i>Ligustrum lucidum</i>	열매	13	20
울금	<i>Curcuma longa</i>	뿌리	19	8
지모	<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	뿌리줄기	0	0
천문동	<i>Asparagus cochinchinensis</i>	비늘줄기	13	13
택사	<i>Plantago asiatica</i>	뿌리줄기	2	8
파두	<i>Crotis tinctoria</i>	종자	15	11
피마자	<i>Ricinus communis</i>	종자	14	20
하수오	<i>Pleuropterus meltiflorus</i>	덩이뿌리	15	11
황금	<i>Scutellaria baicalensis</i>	뿌리	16	18
황기	<i>Astragalus membranaceus</i>	뿌리	0	0

양성대조약물(paclitaxel 4 mg/kg)의 활성; 74% on HeLa, 60% on SK-MEL-2

**결과 및 고찰**

새로운 *in vivo* 평가 방법인 hollow fiber assay와 xenographic animal assay를 이용한 30종의 생약재에 대한 methanol 추출물의 항암효과는 Table I과 II와 같다.

Table I은 hollow fiber assay를 이용한 생약재 methanol 추출물의 인간의 자궁내막암인 HeLa와 흑색종인 SK-MEL-2에 대한 항암효과를 나타낸 것이다. 각 생약재 추출물의 활성 정도는 다양하게 나타났다. 여러 생약재 추출물의 활성 정도에 따라 암세포 성장억제율이 20% 미만, 20-29% 및 30% 이상 군 들로 나누어 보았다. 그 결과, 암세포 성장억제 효과가 30% 이상인 생약재 추출물로는 느릅(*Ulmus davidiana*)과 백화사설초(*Hedyotis diffusa*)가 HeLa와 SK-MEL-2에 대하여 모두 활성을 나타내었고, 파두(*Crotis tinctoria*)의 경우는 HeLa에 대하여 활성을 나타내었다.

암세포 성장억제 효과가 20-29% 군의 생약재로는 울금(*Curcuma longa*), 천문동(*Asparagus cochinchinensis*), 택사(*Plantago asiatica*) 및 황금(*Scutellaria baicalensis*)이 두 세포종에 대하여 항암활성을 나타내었고, HeLa에 대해서 활성을 나타낸 생약재는 독활(*Aralia cordata*), 상기생(*Hyphear tanakae*), 소엽(*Perilla frutescens*) 및 하수오(*Pleuropterus multiflorus*)이었으며, SK-MEL-2에 대한 활성을 나타낸 생약재는 마황(*Ephedia sinica*), 여정실(*Ligustrum lucidum*) 및 파두(*Crotis tinctoria*)이었다.

나머지 18종의 생약재는 암세포 성장억제 효과가 20% 미만으로 나타나 투여농도 25 mg/kg에서는 항암활성이 있다고 보기에는 무리가 있는 것으로 판단되었다. 따라서 hollow fiber assay를 이용한 생약재의 항암활성 검색으로 느릅, 백화사설초 및 파두가 투여농도 25 mg/kg에서 항암활성이 있는 것으로 나타났다.

Table II는 동 추출물을 지금까지 가장 “질환-지향적”인 평가법(disease-oriented screening system)인 xenographic animal assay를 이용하여 항암활성을 검색한 결과이다. Hollow fiber assay에서 얻어진 결과와 같은 식으로 암세포 성장억

제 효과가 20% 미만, 20-29%, 및 30% 이상의 세 개 군으로 나누어 비교하였다. 암세포 성장억제 효과가 20-29% 군의 생약재로는 마황(*Ephedia sinica*), 여정실(*Ligustrum lucidum*) 및 피마자(*Ricinus communis*)가 SK-MEL-2에서만 모두 20% 정도의 항암활성을 나타내었고, HeLa에 대해서 활성을 20% 미만으로 나타냈다. 암세포 성장억제 효과가 30% 이상 나타난 생약재로는 느릅(*Ulmus davidiana*)과 백화사설초(*Hedyotis diffusa*)가 HeLa와 SK-MEL-2에 대하여 모두 활성을 나타내었다. 나머지 25종의 생약재는 암세포 성장억제 효과가 20% 미만으로 나타나 투여농도 25 mg/kg에서는 항암활성이 나타나지 않았다.

Table III는 xenographic animal assay와 hollow fiber assay의 상관도를 알아보기 위하여 두 검색법의 결과를 바탕으로 활성의 정도에 따라 분류를 해 보았다. 독활(*Aralia cordata*), 상기생(*Hyphear tanakae*), 소엽(*Perilla frutescens*) 울금(*Curcuma longa*), 천문동(*Asparagus cochinchinensis*), 택사(*Plantago asiatica*) 파두(*Crotis tinctoria*), 황금(*Scutellaria baicalensis*) 및 하수오(*Pleuropterus multiflorus*)의 경우는 hollow fiber assay에서는 20-29% 사의 활성정도를 나타내었으나 xenographic animal assay에서는 20% 미만의 활성을 나타내어 약제의 감수성에 있어서 hollow fiber assay에서 좀더 민감하게 나타났고, 피마자(*Ricinus communis*)는 hollow fiber assay에서는 두종의 세포주에 대하여 20% 이하의 낮은 활성을 나타내었으나 xenographic animal assay에서 SK-MEL-2에서만 20%의 활성은 나타내었다. 마황(*Ephedia sinica*)과 여정실(*Ligustrum lucidum*)은 두 검색법 모두에서 활성 정도 20-29% 사이로 유사한 감수성을 나타내었다. 나머지 가시오가피를 포함한 16종에서는 두 검색법 모두에서 20% 미만의 활성을 나타내었다. 느릅(*Ulmus davidiana*)과 백화사설초(*Hedyotis diffusa*)의 경우, xenographic animal assay와 hollow fiber assay에서 두 세포종에 대하여 모두 30% 이상의 활성을 나타내었으며 활성의 정도에 있어서도 차이가 크지 않았다.

현재 천연물을 이용한 항암제 개발의 검색체계는 일반적

**Table III.** 활성정도에 따른 생약재의 분류

		Hollow fiber assay		
		20% 미만	20-29%	30% 이상
Xenographic animal assay	20% 미만	가시오가피, 갈근, 계피, 구절초, 귀진우, 노회, 누로, 동과, 백랍, 백작약, 사간, 산사자, 산수유, 어성초, 지모, 황기	독활, 상기생, 소엽, 울금, 천문동, 택사, 파두, 하수오, 황금	
	20-29%	피마자	마황, 여정실	
	30% 이상			느릅, 백화사설초

으로 MTT, SRB 및 neutral red(NR) 검색법 등과 같은 colorimetric assay를 1차 검색법으로 하여 어느 특정한 암 세포에 대해 선택적인 독성이 나타나면, 2차 검색법으로 그 암세포를 누드 마우스에 이식하여 이에 대한 치료효과를 검색하는 검색체계를 많이 사용하고 있다.<sup>15)</sup> 그러나 1차 검색법과 2차 검색법 사이에는 약물의 이용성에 있어서 상당한 차이가 있다. 즉, 1차 검색법의 전부는 생체의 약물의 대사, 흡수를 고려할 수 있는 체계이므로 2차 검색법인 동물 실험과는 약물의 활성에 있어서 많은 차이를 보인다.<sup>16)</sup>

본 연구에서 hollow fiber assay는 천연물을 이용한 항암제의 개발에 있어서 생체의 약물흡수 대사를 고려할 수 있는 1차 검색법의 보완 방법임을 증명하였다. 천연물 항암제 개발에 있어서 hollow fiber assay의 장점으로는 첫째 약물의 생체에서의 pharmacokinetics에 밀접한 검색법, 둘째 한 마리의 동물에 여러종의 세포주 이식가능, 셋째 기존의 누드 마우스를 이용한 평가기간이 최소 30일 이상인 데 비하여 10일 정도로 짧으며, 넷째 기존의 동물을 이용한 평가방법과 평가결과의 휴효성이 높은 것 등을 들 수 있겠다. 따라서 hollow fiber assay는 천연물의 항암성 검색에 있어서 1차 검색법 및 2차 검색법으로서의 사용시 검색결과의 예측성이 높아 보다 경제적이고 신속한 검색법으로 사용가능하다고 사료된다.

## 인용문헌

- Rubinstein, L.V., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Simon, R.M., Tosini, S., Skehan, P., Scudiero, D.A., Monks, A., and Boyd, M.R. (1990) Comparison of *in vitro* anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *J. Natl Cancer Inst.* **82**(13): 1113-1118.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., and Boyd, M.R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl Cancer Inst.* **82**(13): 1107-1112.
- Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1984) A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/Nr-90). *Tissue Culture Meth.* **9**: 7-9.
- Hollingshead, M.G., Alley, M.C., Camalier, R.F., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Malspeis, L., and Grever, M.R. (1995) *In vivo* cultivation of tumor cells in hollow fibers. *Life Sci.* **57**(2): 131-141.
- Freije, J.M., Lawrence, J.A., Hollingshead, M.G., De la Rosa, A., Narayanan, V., Grever, M., Sausville, E.A., Paull, K., and Steeg, P.S. (1997) Identification of compounds with preferential inhibitory activity against low-Nm23-expressing human breast carcinoma and melanoma cell lines. *Nat Med.* **3**(4): 395-401.
- Hall, L.A., Krauthauser, C.M., Wexler, R.S., Hollingshead, M.G., Slee, A.M., and Kerr, J.S. (2000) The hollow fiber assay: continued c characterization with novel approaches. *Anticancer Res.* **20**(2A): 903-911.
- Casciari, J.J., Riordan, N.H., Schmidt, T.L., Meng, X.L., Jackson, J.A., and Riordan, H.D. (2001) Cytotoxicity of ascorbate, lipoic acid, and other antioxidants in hollow fibre *in vitro* tumours. *Br. J. Cancer.* **84**(11): 1544-1550.
- Krauthauser, C.M., Hall, L.A., Wexler, R.S., Slee, A.M., Mitra, J., Enders, G.H., and Kerr, J.S. (2001) Regulation of gene expression and cell growth *in vivo* by tetracycline using the hollow fiber assay. *Anticancer Res.* **21**(2A): 869-872.
- Malone, C.C., Schiltz, P.M., Mackintosh, A.D., Beutel, L.D., Heinemann, F.S., and Dillman, R.O. (2001) Characterization of human tumor-infiltrating lymphocytes expanded in hollow-fiber bioreactors for immunotherapy of cancer. *Cancer Biother Radiopharm.* **16**(5): 381-390.
- Jayaraman, M., Fox, B.M., Hollingshead, M., Kohlhagen, G., Pommier, Y., and Cushman, M. (2002) Synthesis of new dihydroindeno[1,2-c] isoquinoline and indenoisoquinolinium chloride topoisomerase I inhibitors having high *in vivo* anticancer activity in the hollow fiber animal model. *J. Med. Chem.* **45**(1): 242-249.
- Monga, M. and Sausville, E.A. (2002) Developmental therapeutics program at the NCI: molecular target and drug discovery process. *Leukemia.* **16**(4): 520-526.
- Sadar, M.D., Akopian, V.A., and Beraldi, E. (2002) Characterization of a new *in vivo* hollow fiber model for the study of progression of prostate cancer to androgen independence. *Mol. Cancer Ther.* **1**(8): 629-637.
- Casciari, J.J., Hollingshead, M.G., Alley, M.C., Mayo, J.G., Malspeis, L., Miyauchi, S., Grever, M.R., and Weinstein, J.N. (1994) Growth and chemotherapeutic response of cells in a hollow-fiber *in vitro* solid tumor model. *J. Natl Cancer Inst.* **86**(24): 1846-1852.
- Maruo, K., Ueyama, Y., Inaba, M., Emura, R., Ohnishi, Y., Nakamura, O., Sato, O., and Nomura, T. (1990) Responsiveness of subcutaneous human glioma xenografts to various antitumor agents. *Anticancer Res.* **10**(1): 209-212.
- Fruebauf, J.P. and Bosanquet, A.G. (1993) *In vitro* determination of drug response: a discussion of clinical applications. *Principle and Practice of Oncology* **7**(12): 1-16.
- Berger, D.P., Fiebig, H.H., Winterhalter, B.R., Wallbrecher, E., and Henss, H. (1990) Preclinical phase II study of ifosfamide in human tumour xenografts *in vivo*. *Cancer Chemother Pharmacol.* **26** Suppl: S7-11.

(2003년 7월 3일 접수)