

韓國產 개비자나무(*Cephalotaxus koreana*) 8개 天然集團의 Homoharringtonine 含量變異

정명석^{1*} · 현정오¹ · 이위영² · 이재호¹ · 코살 살¹

¹서울대학교 산림과학부, ²국립산림과학원

Variation of Homoharringtonine Contents from Eight Natural Populations of Korean Native Plumyew Trees (*Cephalotaxus koreana*)

Myung-Suk Jung^{1*}, Jung-Oh Hyun¹, Wi-Young Lee², Ho-Jae Lee¹ and Sal Kosal¹

¹Department of Forest Science, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

²Korea Forest Research Institute, Suwon 441-350, Korea

요 약: 개비자나무로부터 추출한 HHT(homoharringtonine)는 현재 가능성 있는 암화학요법제로 주목받고 있다. 국내 개비자나무 8개 천연집단의 HHT 함량 변이는 HPLC(high performance liquid chromatography)를 이용하여 조사하였고, 집단간 변이와 개체내의 부위별(잎, 줄기, 뿌리 및 종자) 변이 및 수령과 성장특성에 따른 함량 변이를 비교 분석하였다. 개비자나무의 집단간 HHT 함량 변이는 집단간에 통계적으로 유의한 차이가 인정되었으며, 거창의 남덕유산 집단이 1,048 µg/g으로 가장 높았고 완도의 오봉산 집단이 가장 낮았다. 개체내 부위별 함량은 잎에서 874 µg/g으로 가장 높았으며, 다음으로 뿌리, 줄기, 종자 순으로 나타났다. 개비자나무의 HHT 함량은 수령이 증가하고 생장이 왕성해 질수록 대략 30% 정도 감소하는 것으로 나타났다.

Abstract: Homoharringtonine isolated from the plumyew tree (*Cephalotaxus koreana*) is currently considered as one of the most promising chemotherapeutic agents for anti-cancer. Variation of homoharringtonine contents from eight natural populations of Korean native plumyew trees was determined by HPLC (high performance liquid chromatography), and compared with the variation among populations, the variation of the different parts (needle, root, stem and seed), and the variation according to their ages and growth features. Homoharringtonine contents among populations were significantly different with Mt. South Dukyu (1,048 µg/g) having the highest and Mt. Obong having the lowest. The analyses of plant parts showed that the homoharringtonine contents were highest in plant needles (874 µg/g), and followed by roots, stems and seeds. Homoharringtonine contents of the plumyew trees decreased about 30% in increment with their ages and growth.

Key words : homoharringtonine, plumyew tree, population, part, age, site

서 론

개비자나무속(*Cephalotaxus*)은 중국과 동북아시아에 서식하는 상록 관목 또는 교목으로 8~9개의 종을 포함한다(van Gelderen, 1986). 국내에는 오직 개비자나무(*Cephalotaxus koreana* Nakai)만이 자생하는데 북위 38° 이남에 널리 분포하는 상록 관목이다. 꽃은 자웅이주로 4월에 피고, 육질종의로 둘러싸인 열매는 다음해의 8~9월에 익는다. 개비자나무의 잎은 3.5~4.0 cm 길이의 선형으로, 끝이

뾰족하면서 주맥이 뚜렷하여 비자나무(*Torreya nucifera*)와 차이를 보인다(이창복, 1980).

중국 한방에서 중앙치료제로 사용되어온 개비자나무의 추출액은 새로운 항암성분을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다(Ohnama와 Holland, 1985). Powell 등(1972)은 개비자나무의 추출액으로부터 homoharringtonine(HHT)을 분리하고 p388 Leukemia, L1210 Leukemia, B16 melanoma 세포에 대한 항암 활성을 확인하였다. Huang(1976)은 HHT와 개비자나무로부터 추출된 알칼로이드를 특정 진핵세포에서 단백질 생합성의 억제제로 보고하였고, 최근에 Visani(1997)는 HHT가 세포사멸을 유도함으로써 중앙

*Corresponding author
E-mail: jmsk0614@snu.ac.kr

성장을 저해한다고 제시하였다. 현재까지 약 40종 이상의 알칼로이드가 개비자나무 여러 종에서 분리되었고(Miah, 1998), 항암 활성을 갖는 개비자나무 알칼로이드는 모두 cephalotaxine 유도체로 harringtonine, homoharringtonine, isoharringtonine과 deoxyharringtonine 등이 있다(Zhou 등, 1995).

개비자나무에서 추출되는 항암물질은 기존의 항암제에 비하여 물에 대한 용해도가 높으며, 그 효능 또한 높아 상품화 가능성이 매우 높은 차세대 항암제로 주목받고 있다(Jingyi, 2000). Cephalotaxine과 그것의 esters 화학적 합성 방법이 보고(Wang, 1992) 되고는 있으나 수율이 낮아 여전히 개비자나무는 HHT의 중요한 자원이다(Jingyi, 2000). 국내에서는 박호일 등(1994)이 국내 개비자나무에서도 항암 활성을 가지는 homoharringtonine과 harringtonine이 존재한다는 보고가 있었고, 김상익 등(2000)은 소수의 표본을 이용하여 개비자나무의 지역별, 계절별 함량의 변화에 대해 보고하였다. 그러나 국내 천연집단의 서식지특성을 고려한 개비자나무의 HHT에 관련한 화학적 연구는 초기 단계이며 아직까지 많은 연구가 진행되지 않고 있다. 이 결과들은 향후 개비자나무의 HHT 연구에 기초자료가 될 뿐 아니라, 대량생산 방법을 확립하면 항암제로 가능성 있는 HHT의 학문적으로나 산업적인 면에서 중요한 가치가 있다고 생각된다. 그러므로 본 연구에서는 천연집단에 서식하고 있는 개비자나무를 대상으로 식물체 부위별, 수령별, 지역별 HHT 함량에 대한 기초조사를 수행하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 조사목 생장 특성 조사

공주의 계룡산, 거창의 남덕유산, 광양의 백운산, 완도의 오봉산, 해남의 두륜산, 구례의 지리산, 정읍의 내장산, 서울의 관악산 집단의 8개 집단에 대해서 집단 당 20개체씩 무작위로 택하여 수고, 직경, 수령을 조사하였다. 수고는 측고기를 이용하여 측정하였고, 직경은 개비자나무가 관목이므로 흉고 높이보다는 지상 50 cm 부위의 직경을 vernier calipers로 측정하였다. 그리고 줄기 시료를 채취하면서 수령도 측정하였다.

2. 시료채취 및 조제

2003년 9월부터 2004년 2월까지 국내의 8개 천연집단에서 각 집단 당 20개체를 임의로 선발하고 개체목 당 병충해의 피해를 입지 않은 정상 잎을 지닌 1년생 가지에서 잎을 채집하여 집단간 변이와 개체의 수령 및 생장특성에 따른 함량 변이 분석을 실시하였다(Figure 1).

개체 내 부위별 함량변이 분석을 위하여 정읍의 내장산

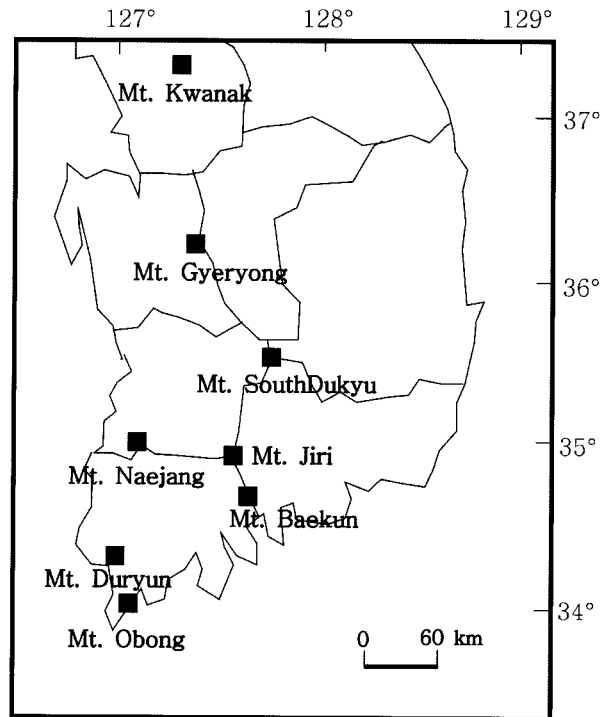


Figure 1. Location of sampling sites for studying HHT in *C. koreana* in Korea.

집단, 광양의 백운산 집단, 거창의 남덕유산 집단인 3개 집단에서 각각 7개체씩 택하여 줄기, 뿌리, 종자 부위를 추가로 채취하였는데, 줄기는 지상에서 50 cm 부위를 채취하여 다시 형성층을 포함한 수피와 목부로 나눴다. 종자는 종피를 제거하고 분석용 시료로 사용하였다.

3. 추출 및 함량분석

HHT 분석은 Wickremesinhe 등(1996)의 방법을 변형시켜 사용하였다. 식물체 시료를 60°C에서 16시간 동안 건조시킨 후 분쇄기로 분쇄하고 0.25 mm sieve에 통과시켜서 추출 분석용 시료로 조제하였다. 조제된 시료 1g에 methanol 50 ml를 첨가한 후 10 분간 sonication 하여 추출하였다. 추출액은 감압상태 하에서 Toyo NO₂을 이용해서 여과하여 여과액을 회수하고 rotary evaporator로 완전 농축건고 시켰다. 건고물을 0.5% ammonium hydroxide 20 ml/g에 녹인 후 동량의 chloroform을 가하여 분액하였다. Chloroform 층을 버리고 수층을 취하였으며 총 3회 분액을 실시하였다. 추출액을 다시 rotary evaporator (25-27"Hg, 40°C)로 감압농축 시킨 후 건고물을 methanol 3 ml/g에 녹인 후 syringe filtration(Whatman, 25 mm, 0.45 μm)을 하여 HPLC(TSP, CA, USA)로 HHT 함량을 분석하였다. HPLC 분석은 Lichrospher 60 RP-select B (4×250 mm, 5 μm) 컬럼을 사용하여 수행하였고 이동상으로는 methanol과 0.1M ammonium formate 용액을 사용했다. 용매의 gradient 조건은 0.8 ml/min 유속으로

methanol : 0.1M ammonium formate의 비율이 20 : 80에서 시작하여 40분 후 40 : 60 이 되도록 했다. UV검출기를 사용하여 290 nm 파장에서 흡광도를 측정하였고 정량에 사용한 HHT 표준물질은 Sigma 사에서 구입하였다.

4. 통계분석

수집된 자료는 SAS/SAST(ver. 6.12; SAS institute Inc. 1996) 프로그램을 이용하여 분산분석(ANOVA)을 통한 집단간 함량 변이와 개체내 부위별 함량 변이의 분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 개비자나무의 집단 간 HHT 함량 변이

개비자나무 8개 집단간 잎의 HHT 함량변이를 분석한 결과 거창의 남덕유산 집단이 1,047.7 µg/g으로 가장 높았고, 다음으로 정읍의 내장산 집단이 958.7 µg/g이며 완도의 오봉산 집단이 411 µg/g으로 가장 낮았다. 박호일 등(1996)은 위도상으로 남쪽보다는 북쪽으로 올라 갈수록 HHT 함량이 증가한다고 보고 하였는데, 본 연구 결과에서는 이러한 경향을 확인할 수 없었다.

개비자나무의 HHT 함량에 대해서 집단간 분산분석을 실시한 결과 집단간에는 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다(Table 1). Duncan의 다중검정(Duncan's Multiple Range Test)을 실시한 결과, 크게 A그룹(남덕유산, 내장산, 백운산)과 B그룹(내장산, 백운산, 지리산, 계룡산), 그리고 C그룹(백운산, 지리산, 계룡산, 관악산, 두륜산, 오봉산)으로 나뉘었다. 남덕유산은 지리산, 계룡산, 관악산, 두륜산, 오봉산과 유의적인 차이를 나타냈고, 내장산은 남덕유산, 관악산, 두륜산, 오봉산과 유의적인 차이를 나타냈으며, 백운산은 남덕유산, 내장산에서 유의적

Table 1. Contents of HHT in the needles of *C. koreana* according to the 8 different populations. Same letters are not significantly different (P<0.001) according to Duncan's Multiple Range Test.

Region*	Numbers of Samples	Latitude	Longitude	HHT contents(µg/g)
SD	20	35°45'N	127°40'E	1048 ± 491 ^a
NJ	20	36°21'N	127°13'E	959 ± 428 ^{ab}
BU	20	35°29'N	126°53'E	617 ± 309 ^{abc}
JR	20	35°15'N	126°31'E	587 ± 331 ^{bc}
GR	20	35°06'N	126°38'E	583 ± 258 ^{bc}
KA	20	34°29'N	126°37'E	546 ± 309 ^c
DR	20	34° 19'N	126° 42'E	467 ± 250 ^c
OB	20	36°26'N	126°57'E	411 ± 121 ^c

*: (SD, Mt. South Dukyu; GR, Mt. Gyeryong; NJ, Mt. Naejang; JR, Mt. Jiri; BU, Mt. Baekun; DR, Mt. Duryun; OB, Mt. Obong; KA, Mt. Kwanak)

인 차이를 나타냈다. 이러한 결과를 미루어 볼 때 환경인자 중 단순히 기온에 의해서 HHT의 함량 변이가 초래된다고 보기는 어려울 것으로 추정된다.

식물 2차대사산물의 변이는 많은 인자와 관계가 있다 (Berenbaum 등, 1986; Zangerl와 Bazzaz, 1992). Dudt 등(1994)은 미국산딸나무(*Cornus florida*)와 툼림나무(*Liriodendron tulipifera*)의 잎에 함유되어 있는 Phenol 함량과 일조량과의 관계를 연구한 결과, 일조시간이 길어질수록 Phenol 함량이 점차 증가한다고 보고 하였다. 또한 이진우 등(2004)은 세잎돌쩌기(*Aconitum triphyllum*)의 자근(daughter tuber)에서 알칼로이드 함량이 6월과 9월 사이에 가장 높게 나타난다고 보고 하였다. 따라서 HHT의 함량에 영향을 미치는 인자는 기온인자를 포함한 다양한 환경인자로 추정이 되고, 다양한 환경인자에 대한 세부적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

2. 개비자나무의 개체 내 부위별 HHT 함량 변이

개비자나무의 개체 내 부위별 HHT의 함량은 잎, 줄기, 뿌리 및 종자 부위별로 통계적인 유의성을 인정할 수 없었다(Table 2). 부위별 HHT의 함량은 잎에서 874.2 µg/g으로 가장 높았으며, 다음으로 뿌리에서 325.3 µg/g, 줄기에서 311.4 µg/g(수피 247.3 µg/g, 목질부 64.1 µg/g), 그리고 종자에서 180.4 µg/g으로 나타났다. 이러한 변이를 보다 세부적으로 알아보기 위해 Duncan 다중검정을 실시한 결과 뿌리, 줄기, 종자 간에는 함량의 차이가 없는 것으로 나타나 잎의 HHT 함량과 대별되었다. 이 결과는 종자를 제외한 잎, 줄기, 뿌리에 대해 부위별 함량을 비교 분석한 박호일 등(1996)의 연구결과와 유사하게 나타났다. 또한 김상익 등(2000)은 개비자나무의 잎이 줄기에 비해 약 2배 정도 높은 HHT 함량을 보인다고 보고 하였으나, 본 연구 결과에서는 약 3배 정도 높은 함량의 차이를 보였다.

Taxol 공급을 위해 상당량의 주목나무를 훼손하는 것에 대해 세계적으로 환경단체들이 문제를 제기하고 있다 (Walsh와 Jordan, 1999). 그러므로 개비자나무는 잎에서 HHT 함유율이 가장 높고 또 매년 재생이 가능하므로 다

Table 2. The variation of HHT contents in the different parts of *C. koreana* trees of 3 different populations. The contents (µg) of HHT in the needle, stem, root, and seed were shown as the gram dry weight (represent means ± standard deviation).

Location*	HHT contents(µg/g)				
	Leaf	Stem		Root	Seed
		Bark	Xylem		
SD	1048 ± 311	294 ± 71	90 ± 33	225 ± 145	172 ± 42
NJ	959 ± 186	304 ± 84	56 ± 17	394 ± 237	222 ± 84
BU	617 ± 95	145 ± 32	46 ± 13	356 ± 199	146 ± 39
Mean	874 ± 257 ^a	247 ± 64 ^b	64 ± 20 ^b	325 ± 178 ^b	180 ± 50 ^b

*: (SD, Mt. South Dukyu; NJ, Mt. Naejang; BU, Mt. Baekun)

Table 3. Relationship between the features of individual trees and HHT contents. This data was based on the features of 60 individuals and HHT contents (represent means \pm standard deviation).

Tree age (year)	Diameter (mm)	Height (cm)	HHT contents ($\mu\text{g/g}$)
2	6.9	72.0	944 \pm 426
3	10.5	85.6	833 \pm 371
4	10.8	92.0	791 \pm 594
5	11.7	123.2	566 \pm 356
6	16.4	188.2	115 \pm 73
7	16.6	196.5	230 \pm 215

Table 4. Relationship between Environmental factors and growth qualities from 8 different populations.

Region*	Tree age (year)	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Moisture (%)	Density (%)
OB	7.5	14.7	26.5	0.3
DR	5.1	14.1	33.4	0.5
NJ	3.8	13.8	40	4
BU	4.3	13.3	37.4	3.5
GR	3.3	13.2	35	2.9
JR	3.7	13.2	36.2	2.1
SD	3.6	12.6	38.1	2.7
KA	2.7	12.4	32.5	0.1

*: (SD, Mt. South Dukyu; GR, Mt. Gyeryong; NJ, Mt. Naejang; JR, Mt. Jiri; BU, Mt. Baekun; DR, Mt. Duryun; OB, Mt. Obong; KA, Mt. Kwanak)

른 조직에 비해 안정된 공급원으로 사용될 수 있을 것으로 판단된다(Rao, 1996).

3. 개체의 수령 및 생장특성에 따른 HHT 함량 변이

공주의 계룡산, 거창의 남덕유산, 광양의 백운산, 완도의 오봉산, 해남의 두륜산, 구례의 지리산, 정읍의 내장산, 서울의 관악산의 8개 집단에 대해서 각 개체별로 수고, 직경, 수령을 조사한 자료를 이용하여 HHT와의 관계를 분석하였다(Table 3).

개비자나무의 지역별 생장특성은 온도가 높은 완도의 오봉산이나 해남의 두륜산 등 남부지역으로 내려갈수록 수령이 4년에서 8년으로 오래되었고, 중부지역으로 올라갈수록 수령이 4년 이하였다. 습도가 40%로 가장 높은 정읍의 내장산은 서식밀도가 4%로 가장 높은 반면 완도의 오봉산은 이와 상반된 결과를 나타냈다(Table 4). Fu 등 (1999)에 의하면 개비자나무는 광량이 적고, 따뜻한 지역에서 생육이 왕성하다고 보고한 바 있다. 이러한 원인은 기온이 따뜻한 남부지역으로 내려갈수록 상층부에 활엽수림이 많이 분포함에 따라 빛의 노출에 약한 개비자나무에게 유리한 생육지를 만듦으로써 생장을 발달 시키는 것으로 추정된다. 따라서 개비자나무는 상층수관에 의하여

햇빛이 많이 차단되고, 기온이 따뜻하며, 습도가 높은 곳에서 생장이 좋은 것으로 판단된다.

개비자나무의 수령, 수고 및 직경과 HHT 함량과의 관계를 분석한 결과 2년생은 함량이 944.1 $\mu\text{g/g}$ 로 가장 높았고, 3년생에서 4년생까지 점차 함량이 감소하다가 5년생이 되면서 함량이 566.1 $\mu\text{g/g}$ 로 급격히 감소(대략 79.7%)되는 것으로 나타났다. 또한 직경은 6.9 mm에서 11.7 mm, 수고는 72 cm에서 123.2 cm까지는 함량이 점차 감소하다가 직경은 11.7 mm, 수고는 123.2 cm보다 커지면서 급격히 감소하였다(Table 3). 식물의 생장과 2차대사산물은 많은 식물 세포에서 부(-)의 관계가 있는 것으로 알려졌다(Phillips와 Henshaw, 1977). 이 연구에서도 개비자나무의 수령, 수고 및 직경과 HHT의 함량은 부(-)의 관계가 있는 것으로 나타났다. 따라서 식물의 생장이 왕성하고 세포분열이 활발한 유령목에서 높은 수율의 물질을 생산하는 것으로 판단되며, HHT 함량은 생장과 높은 관계를 있음을 제시하고 있다.

인용문헌

1. 김상익 · 최형균 · 송재영 · 김진현 · 이현수 · 홍승서. 2000. 한국산 개비자나무 (*Cephalotaxus koreana*)의 알칼로이드 함량분석 : 지역 및 계절에 따른 변화. 한국생물공학회지 15: 434-437.
2. 박호일 · 이연 · 이현채 · 윤차원 · 이계숙 · 권기락 · 이인 · 신동수 · 주우홍. 1996. 한국산 개비자(*Cephalotaxus koreana*)에서의 Harringtonine과 Homoharringtonine의 확인 및 함량 분석. 한국생물공학회지 11: 689-695.
3. 이진우 · 박종희 · 김혜경 · 이정규. 2004. 세잎돌쩌귀의 알칼로이드 성분과 함량의 계절적 변화. 한국생약학회지 35: 128-133.
4. 이창복. 1980. 한국수목도감. 향문사. 서울. pp. 58.
5. Berenbaum, M.R., A.R. Zangerl and J.K. Nitao. 1986. Constraints on chemical coevolution: wild parsnips and the parsnip webworm. *Evolution* 40: 1215-1228.
6. Dudt, J.F. and D.J. Shure. 1994. The influence of light and nutrients on foliar phenolics and insect herbivory. *Ecology* 75: 86-98.
7. Fu, L., N. Li and R.M. Robert. 1999. Pinaceae. In Wu Zheng-yi and Peter H. Raven (eds.). *Flora of China*, 4. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden, <http://www.botanik.uni-bonn.de/conifers/refs/fu99.htm> (2004. 8. 10).
8. Huang, M. T. 1976. Drug-mediated increase of tumor immunogenicity in vivo for a new approach to experimental cancer immunotherapy. *Molecular Pharmacology* 11: 511-519.
9. Jingyi, H., A.P. Cheung, E. Wang, E. Struble, K. Fang, N. Nguyen and P. Liu. 2000. Stability-indicating LC assay and impurity identification in homoharringtonine samples.

- Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis 22: 541-554.
10. Miah, M.A., J.T. Hudlicky and J.W. Reed. 1998. Cephalotaxus alkaloids, In Alkaloids. Academic Press. New York. 51: 199-265.
 11. Ohnamam, T. and J.F. Holland. 1985. Homoharringtonine as a new antileukemic agent. Journal of Clinical Oncology 3: 604-606.
 12. Powell, R.G., D. Weisleder and C.R. Smith. 1972. Antitumor alkaloids from *Cephalotaxus harringtonia*: structure and activity. Journal of Pharmaceutical Sciences 61: 1227-1230.
 13. Phillips, R. and G.G. Henshaw. 1977. The regulation of synthesis of phenolics in stationary phase cell cultures of *Acer pseudoplatanus*. Journal of Experimental Botany 28: 785-794.
 14. Rao, K.V., R.S. Bhakuni, J. Juchum and R.M. Davies. 1996. Taxanes from the bark of *Taxus brevifolia*. 1995. Phytochemistry 41: 863-866.
 15. van Gelderen, D.M. 1986. Conifers. Helm, London. pp. 107.
 16. Visani, G., D. Russo, E. Ottaviani, P. Tosi, D. Damiani, A. Michelutti, S. Manfroi, M. Baccarani and S. Tura. 1997. Effects of homoharringtonine alone and in combination with alpha interferon and cytosine arabinoside on 'in vitro' growth and induction of apoptosis in chronic myeloid leukemia and normal hematopoietic progenitors. Leukemia 11: 624-628.
 17. Walsh, V. and G. Jordan. 1999. Cancer chemotherapy, biodiversity, public and private property: the case of the anti-cancer drug Taxol. Social Science and Medicine 49: 1215-1225.
 18. Wang, D.Z., G.E. Ma and R.S. Xu. 1992. Studies on the alkaloids of cephalotaxus. IX. semi-synthesis of cephalotaxine esters and their anti-leukemic activity. Yaoxue Xuebao 27: 178-184.
 19. Wickremesinha, E.R.M. and R.N. Arteca. 1996. HPLC separation of cephalotaxine, harringtonine and homoharringtonine from callus and root cultures of *Cephalotaxus harringtonia*. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies 19: 889-897.
 20. Zhou, D.C., R. Zittoun and J.P. Marie. 1995. Homoharringtonine: an effective new natural product in cancer chemotherapy. Bull Cancer 82: 987-995.

(2005년 6월 22일 접수, 2005년 10월 10일 채택)