

개비자나무 유효성분인 homoharringtonine의 *in vitro* 항암활성 및 *in vivo* 만성 독성

유귀재¹ · 조철희¹ · 이건순² · 류재웅³ · 채희정^{1*}

¹호서대학교 식품생물공학과 및 식품기능안전연구센터, ²한국농업대학 교양공통학부, ³경북대학교 자연과학대학 생명공학부

in vitro Anticancer Activity and *in vivo* Chronic Toxicity of Homoharringtonine

Guijiae Yoo¹, Chul Hee Cho¹, Gun-Soon Lee², Zae Young Ryoo³ and Hee Jeong Chae^{1*}

¹Department of Food and Biotechnology, and Center for Food Function and Safety, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

²Department of Living Sciences, Korea National Agricultural Collage, Hwasung 445-760, Korea

³School of Life Science and Biotechnology, Kyung Pook National University, Daegu 702-701, Korea

Received February 25, 2008; Accepted April 10, 2008

Cell proliferation inhibitory effects of homoharringtonine (HHT), an active drug substance in *Cephalotaxus koreana*, against blood cancer cell line K562 were evaluated. In addition, *in vivo* chronic toxicity test with mouse was carried out. When K562 cell line was treated everyday for 9, 6, 3 days, IC₅₀ values of HHT were determined as 0.27, 0.37, and 1.10 mM respectively. The anticancer activity of HHT was comparable to adriamycin, a known anticancer drug compound for blood cancer treatment. *in vivo* chronic toxicity test of the HHT, the number of red blood cell (RBC) showed no significant difference. From the analysis of the liver-functional enzymes in blood, all of liver damage related enzymes such as glutamate-oxalate-transferase (GOT), glutamate-pyruvate-transferase (GPT), cholesterol (Chol) and alkaline phosphatase (ALP) showed no significant change. However, from the histologic test, a neutrophil of the band type in liver tissue was observed.

Key words: Anticancer Activity, Chronic Toxicity, Homoharringtonine

서 론

현대의학이 고도로 발달한 서구사회를 중심으로 동양의학에서 주로 이용되던 약용식물로부터 신약을 개발하려는 연구가 이루어지고 있으며, 이에 대한 관심이 집중되고 있다.¹⁾ 우리나라에서도 오래전부터 사용되어 온 약용식물을 각종 성인병 치료 또는 예방 용도로 처방, 이용되었으나, 효능에 대한 과학적 근거를 명확히 제시하지 못하여 상대적으로 그 활용도가 높지 않았다. 최근들어 이러한 약용식물이 생산하는 2차 대사산물의 생체에 대한 생리활성이 규명되면서 실용화 연구가 활발히 진행되고 있다.²⁾ 즉, 식물자원에서 항암, 항비만, 항산화, 항균 등의 기능성 물질 탐색에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는 가운데 이들 유용성분을 식품이나 의약품에 이용하려는 시도가 활발하게 진행되고 있다.³⁻⁵⁾

중국 한방에서 종양치료제로 사용되어온 개비자나무의 추출액은 항암성분을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다.⁶⁾ Powell

등은 개비자나무의 추출액으로부터 homoharringtonine(HHT)을 분리하고 p388 Leukemia, L1210 Leukemia, B16 melanoma 세포에 대한 항암 활성을 확인하였다.⁷⁾ Huang은 HHT와 개비자나무로부터 추출된 알칼로이드를 특정 진핵세포에서 단백질 생합성의 억제제로 보고하였고,⁸⁾ 최근에 Visani 등은 HHT가 apoptosis를 유도함으로써 종양성장을 저해한다고 보고하였다.⁹⁾ 현재까지 약 40종 이상의 알칼로이드가 개비자나무 여러 종으로부터 분리되었고,¹⁰⁾ 항암 활성을 갖는 개비자나무 알칼로이드는 모두 cephalotaxine 유도체로 harringtonine, homoharringtonine, isoharringtonine과 deoxyharringtonine 등이 있다(Fig. 1).¹¹⁾ 개비자나무에서 추출되는 항암물질은 기존의 항암제에 비하여 물에 대한 용해도가 높으며, 그 효능 또한 높아 상품화 가능성이 매우 높은 차세대 항암제로 주목받고 있다.¹²⁾

본 연구에서는 개비자나무의 유효성분으로 알려진 HHT의 항암활성 및 독성을 조사하기 위하여 HHT의 처리 시간에 따른 최적 투여조건을 결정하였고, 기존 항암제와 비교검토 하였다. 또한 마우스를 실험동물로 하여 HHT를 투여한 후 간에 대한 조직학적 관찰과, 간 기능 관련 효소분석을 통해 HHT의 만성 독성을 검토하였다.

*Corresponding author
Phone: +82-41-540-5642; Fax: +82-2-6280-6346
E-mail: hjchae@hoseo.edu

재료 및 방법

실험재료 및 시약. 개비자나무의 유효성분으로 알려진 homoharringtonine(HHT)는 Sigma사(MO, USA)로부터 구입하여 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4, GIBCO, MD, USA)로 희석하여 사용하였다. HHT의 순도는 Jingyi 등의 방법¹²⁾에 따라 HPLC(high performance liquid chromatography)로 분석한 결과 98.6%임을 확인하였다. 항암활성 분석에 사용된 혈액암 세포주(K562, blood leukemia, chronic myelogenous)는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)에서 분양받아 사용하였고, 배지는 RPMI-1640 배지(Hyclone, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS)와 1% penicillin-streptomycin(10,000 units/ml/ penicillin G sodium, 10,000 µg/ml/ streptomycin)을 혼합하여 사용하였다. 양성 대조군으로는 백혈병 치료제로 사용되고 있는 항암제 adriamycin(IL-Dong, Korea)을 사용하였다.

암세포 증식 저해율 분석. 암세포에 대한 증식 저해율을 분석하기 위한 실험에서는 sulforhodamine B(SRB)법¹³⁾을 사용하였다. HHT의 처리 시간에 따른 최적 투여조건 결정 실험에서는 계대배양한 K562 세포주를 6-well plate에 3×10^6 cells/well 수준으로 부유시키고 37°C, 5% CO₂가스 존재 하에 24시간 예비 배양하였다. 예비배양 후 K562 세포주 용액 10 ml에 HHT를 91.6, 183.3, 366.6, 733.1, 1466.2, 1832.8 µM의 농도가 되도록 1 ml씩 처리하고 3, 6, 9일 경과할 때까지 매일 정해진 동일 농도로 처리하면서 성장을 관찰하였다. 기존 항암제와 HHT의 비교 실험에서는 전 배양된 K562 세포주를 6-well plate에 5×10^6 cells/well 수준으로 부유시키고 37°C, 5% CO₂가스 존재 하에 24시간 예비배양하였다. 예비배양 후 K562 세포주 용액 10 ml에 HHT를 50, 100, 200, 400, 800, 1000 µg/ml의 농도가 되도록 1 ml씩 처리하고 48시간 더 배양하였다. 배양이 종료된 후 96-well plate로 옮겨 cold 50% TCA를 각 well에 50 µl씩 가하고 4°C에서 1시간 동안 고정시켜 주었다. 고정이 끝나고 PBS로 5회 세척하여 공기 중에서 건조하고 0.4% SRB 용액 100 µl를 가하여 상온에서 30분간 염색하였다. 염색이 끝난 후 1% acetic acid로 5회 세척하여 잘 건조시키고 150 µl의 10 mM unbuffered tris 용액으로 SRB dye를 잘 녹여내어 96-well plate용 ELISA reader(VERSAmix, Molecular Device, USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과 값은 세포에 대한 증식저해율(inhibition rate, %)로 나타냈으며 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}}\right) \times 100$$

여기서, A_{sample} : 시료 첨가 well의 흡광도(520 nm)

A_{blank} : PBS 완충용액 첨가 well의 흡광도(520 nm)

모든 실험구는 동일한 조건에서 동시에 3회씩 반복하여 측정하였다.

만성 독성 분석. 만성독성 실험에 사용할 8주령의 수컷 SPF ICR 마우스와 6주령 수컷 nude mice를 The Jackson Lab(Bar Harbor, MA, USA)으로부터 구입하여 사용하였다. SPF ICR 생쥐 20마리를 주 1회 90일간에 걸쳐 LD₅₀량 HHT(1.34 mg/ml)

을 미정맥에 투여 하고, 동수의 대조군에는 동량의 식염수를 투여하였다.

간 기능 관련효소의 혈액분석을 위하여 HHT를 주 1회 90일간 투여하고 5일 경과 후 heparine이 처리된 capillary tube를 이용하여 각 실험군 마우스의 후안외정맥총(retro-orbital sinus)으로부터 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액을 즉시 5,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층부의 혈장을 분리하여 혈액화학분석기(CIBA Coming 550 Express, USA)를 이용하여 간 기능과 관련된 효소인 glutamate-oxalate-transferase(GOT), glutamate-pyruvate-transferase(GPT), cholesterol(Chol) 및 alkaline phosphatase(ALP)를 혈액자동분석기(Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하여 실험군간의 차이를 분석하였다.

간의 조직학적 검사에서는 HHT를 주 1회 90일간 투여하고 5일 경과 후 마우스를 희생시켜 곧바로 복강을 절개하여 육안적으로 간 표면의 특이소견 유무를 확인한 다음, 10% 중성 포르말린에 넣어 24시간 이상 고정하였다. 고정시킨 후 각 조직들을 흐르는 물로 충분히 수세하고 70, 80, 90 및 100% 에틸알코올로 단계적으로 탈수시킨 다음 paraffin 투과과정을 거쳐 포매장치(Histocentre 2, Shandon, USA)를 이용하여 포매하고 박절편기(Leica, RM2045, Germany)로 약 4 µm의 두께로 조직 절편을 제작하여 Hematoxylin & Eosin(H & E) 염색을 하고 xylene으로 투명화 과정을 거친 다음 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

Homoharringtonine의 처리 시간에 따른 최적 투여조건 결정. Sulforhodamine B는 세포 단백질의 염기성 아미노산에 결합하는 염료로서 용해되었을 때 주어진 시료 안에 존재하는 세포의 수를 추정하게 한다.¹³⁾ HHT의 농도별 총 처리시간에 따른 K562 세포주의 저해 효과는 실험에 사용한 모든 농도 범위(91.6, 183.3, 366.6, 733.1, 1466.2, 1832.8 µM)에서 농도 의존적으로 저해현상을 나타냈고, Figure 1에서 보는 바와 같이 장기간 투여실험(9 day treatment)에서는 낮은 농도(183.3-366.6 µM)에서도 50%의 세포 성장 저해를 보였다. 즉 3일 동안 매일 처리한 후 50%의 성장 저해를 보인 농도(IC₅₀, 50% inhibitory concentration)는 1099 µM이었으며, 6일 동안 매일 처리한 후와 9일 동안 매일 처리한 후의 50%의 성장 저해를 보여주는 HHT 농도는 감소하여 각각 366.6 과 274.9 µM 수준이었다. 이것으로부터 K562 세포주에 HHT를 장기간에 걸쳐 처리(9 day treatment)할 경우 비교적 낮은 처리 농도(183.3-366.6 µM)에서도 K562세포주의 성장을 현저히 감소시킬 수 있다는 것을 알 수 있었다.

기존 항암제와 homoharringtonine의 비교실험. HHT를 항암제로 개발하기 위해 자궁경부암과 난소암, 백혈병 등의 항암치료제로 널리 사용되는 adriamycin과 비교실험을 하였다. 대조군인 adriamycin은 *Streptomyces peucetius*에 의해 생합성되는 안토시안계 Type II polyketide 화합물로서, DNA topoisomerase II의 작용을 저해하여 DNA double strand를 파괴하는 기작을 통해 항암제로서의 역할을 하는 것으로 알려져 있으며,¹⁴⁾ 백혈

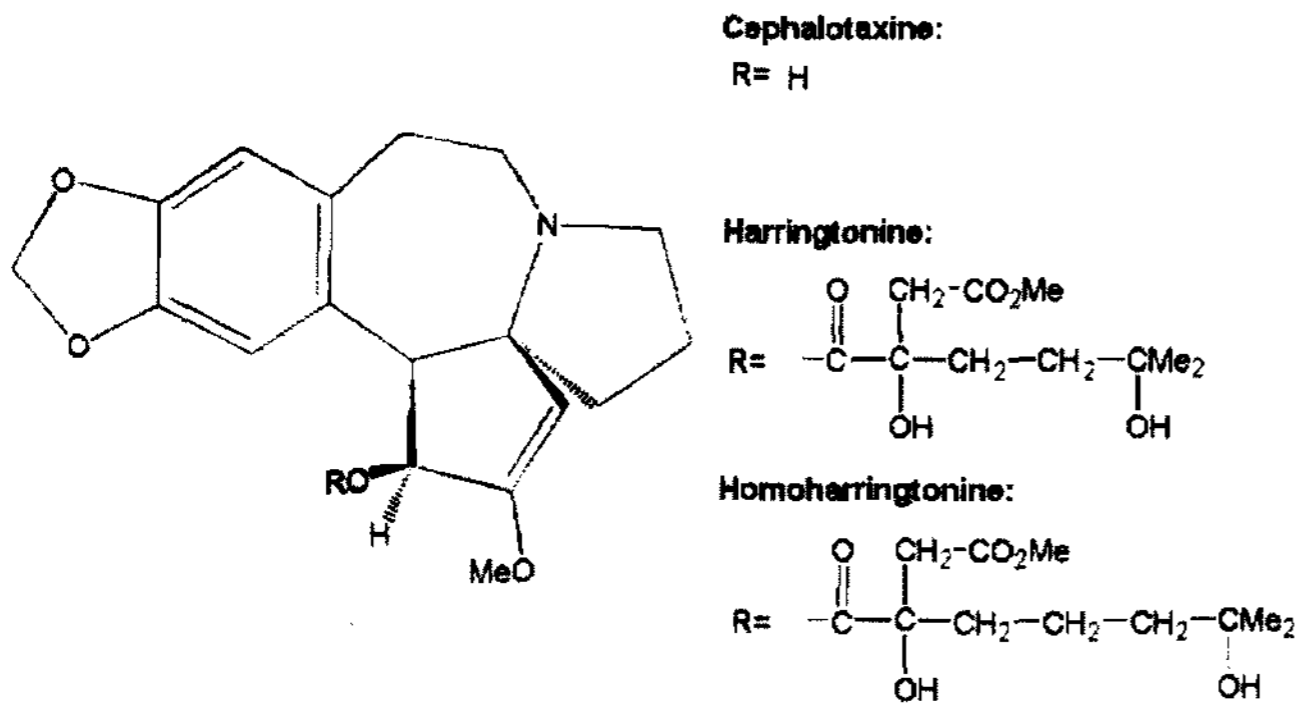


Fig. 1. Chemical structures of cephalotaxine esters in *Cephalotaxus* (Adopted from Zhou *et al.*, 1995).

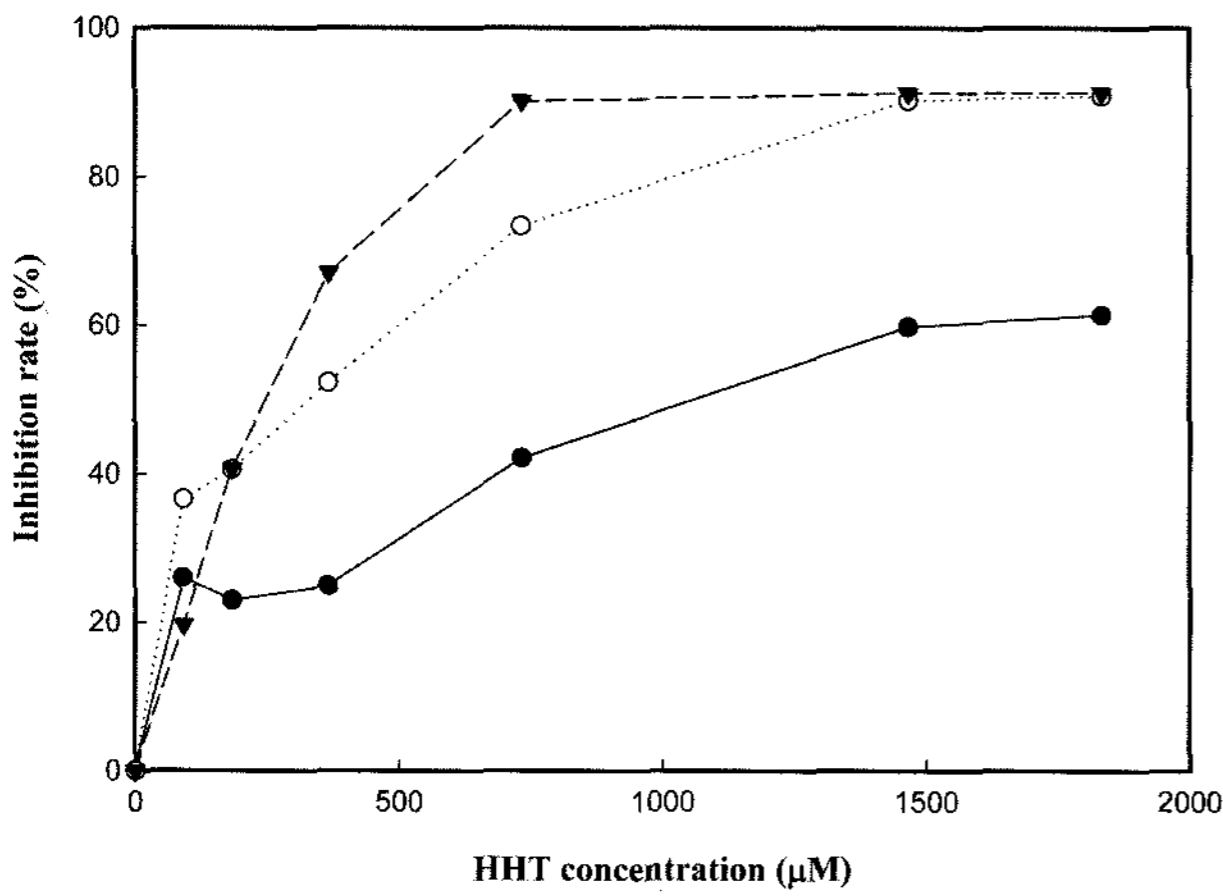


Fig. 2. Inhibition rate of K562 cell line by HHT treatment. —●—, Everyday treatment for 3 days; ...○..., Everyday treatment for 6 days; --▲--, Everyday treatment for 9 days.

병과 임파종, 육종 등 다양한 악성 종양 세포를 효과적으로 살상하는 효능이 보고된 바 있다.¹⁵⁾

실험 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 혈액암 세포인 K562 세포주에서 저해율이 HHT의 농도 693 µg/m과 adriamycin의 농도 400 µg/m에서 근사값을 나타냈다. 이는 HHT의 항암제로서의 응용 가능성을 시사하는 결과이다.

Homoharringtonine의 만성독성 평가. 모든 항암제는 암세포 뿐만 아니라 정상세포에도 손상을 주므로 항암제의 부작용은

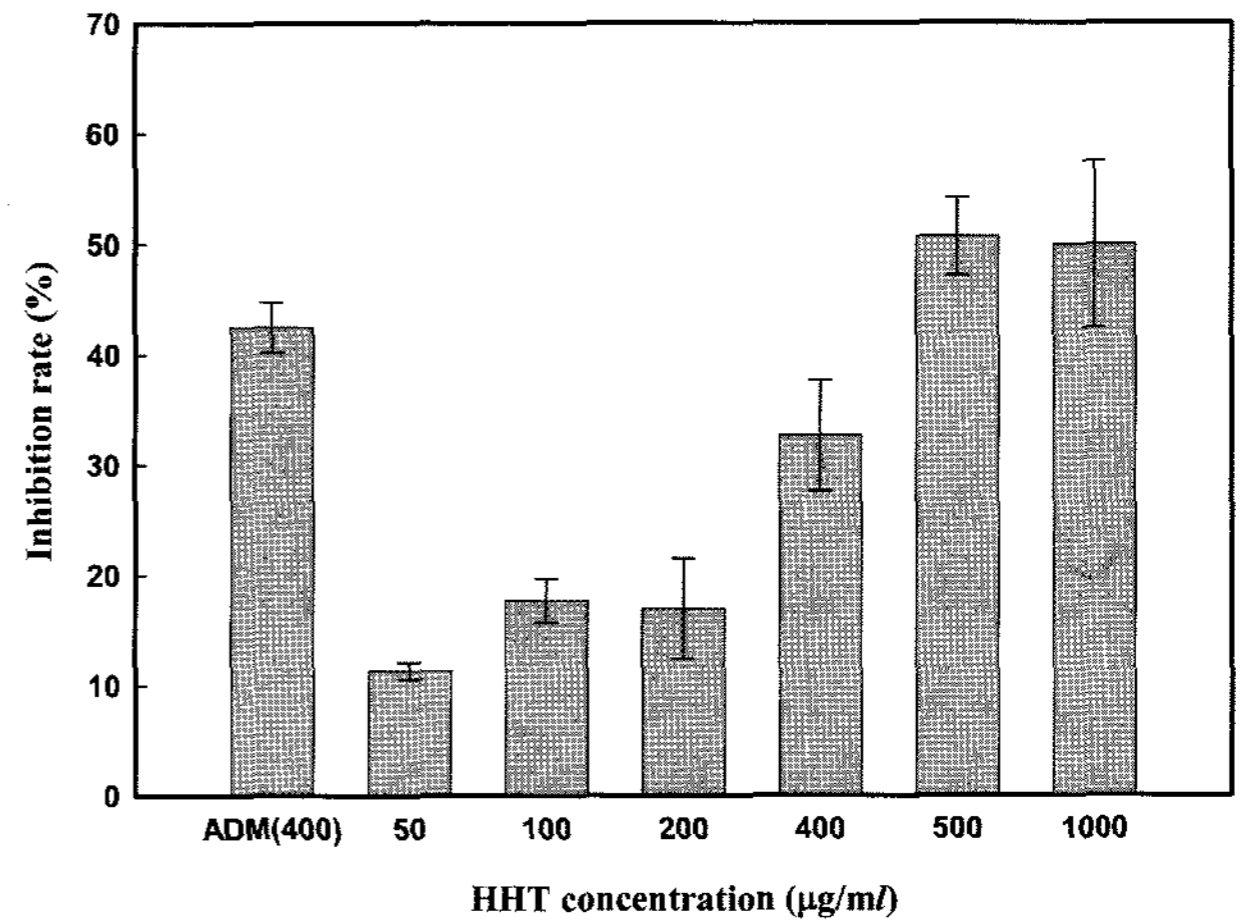


Fig. 3. Inhibitory effects of HHT and adriamycin on the growth of blood leukemia cancer cell line (K562). ADM and the number denotes adriamycin and the concentration of HHT.

불가피하다고 할 수 있다.¹⁶⁾ 항암제는 투여 용량이 증가되면 항암효과도 증가되지만 동시에 독성도 증가되기 때문에 항암요법으로 인한 암 환자의 삶의 질이 저하하는 것은 현 의학계의 난제이기도 하다.¹⁷⁾

HHT를 주 1회 90일간 투여하고 5일 경과 후 혈액 중 혈액학적 지표에 미치는 영향을 조사하였다. 각각의 생쥐를 마취한 다음 혈액을 3차에 걸쳐 채취하였다. 슬라이드에 스프레드한 다음 May-Grünwald-Giemsa 방법으로 염색을 한 다음 각각의 혈액 세포를 측정하였다. 혈액학적 지표 측정 결과 적혈구수(RBC)는 대조군과 HHT 투여군 사이에 유의성이 없었다(Table 1).

약물대사는 생체내 여러 장기에서 일어날 수 있으나 주로 대부분이 간에서 이루어진다. 즉, 간에서 약물의 약리학적 활성의 시작과 종료는 이루어진다는 관점에서 간은 약물대사, 약물의 독성 및 해독작용에 대한 연구의 중요한 대상이라 할 수 있다. 간 조직의 손상은 세포 내부에 존재하는 효소가 혈액으로 유출되는 것을 측정하거나 pericentral necrosis를 관찰함으로써 확인할 수 있다.¹⁸⁾ 따라서 간으로부터 혈액에 방출된 간의 효소활성도 측정은 간 손상 연구에 있어서 가장 유용한 방법 중의 하나이며, 특히 혈장중 glutamate-oxalate-transferase(GOT)와 glutamate-pyruvate-transferase(GPT) 등의 효소 level의 상승은

Table 1. Hematologic parameters of HHT treated mouse

Chronic toxicity	Control	HHT treated group		
		1st	2nd	3rd
WBC, no. ×10 ³ /µl	3.25±0.730	2.84±0.230	2.45±1.030	4.215±0.195
Neutrophils	0.555±0.045	0.335±0.095	0.425±0.305	0.52±0.520
Lymphocytes	0.68±0.680	2.47±0.150	1.89±0.620	3.765±0.205
Eosinophils	0±0.000	0±0.000	0±0.000	0.005±0.005
Monocytes	0.005±0.005	0.015±0.015	0.13±0.100	0.01±0.001
RBC, no. ×10 ⁶ /µl	7.87±1.050	8.96±0.520	9.8±1.100	9.235±0.195
Hematocrit (%)	42.45±3.650	49.8±1.000	51.45±4.350	50.55±1.350
Hb (g/dL)	13.1±1.700	14.3±0.500	15.25±1.250	14.7±0.500
Reticulocytes, % of Total RBC	2.62±0.550	3.6±3.600	3.08±0.800	2.475±0.355
Platelets, no. ×10 ³ /µl	521±148	656.5±59.5	808±40	555.5±0.5

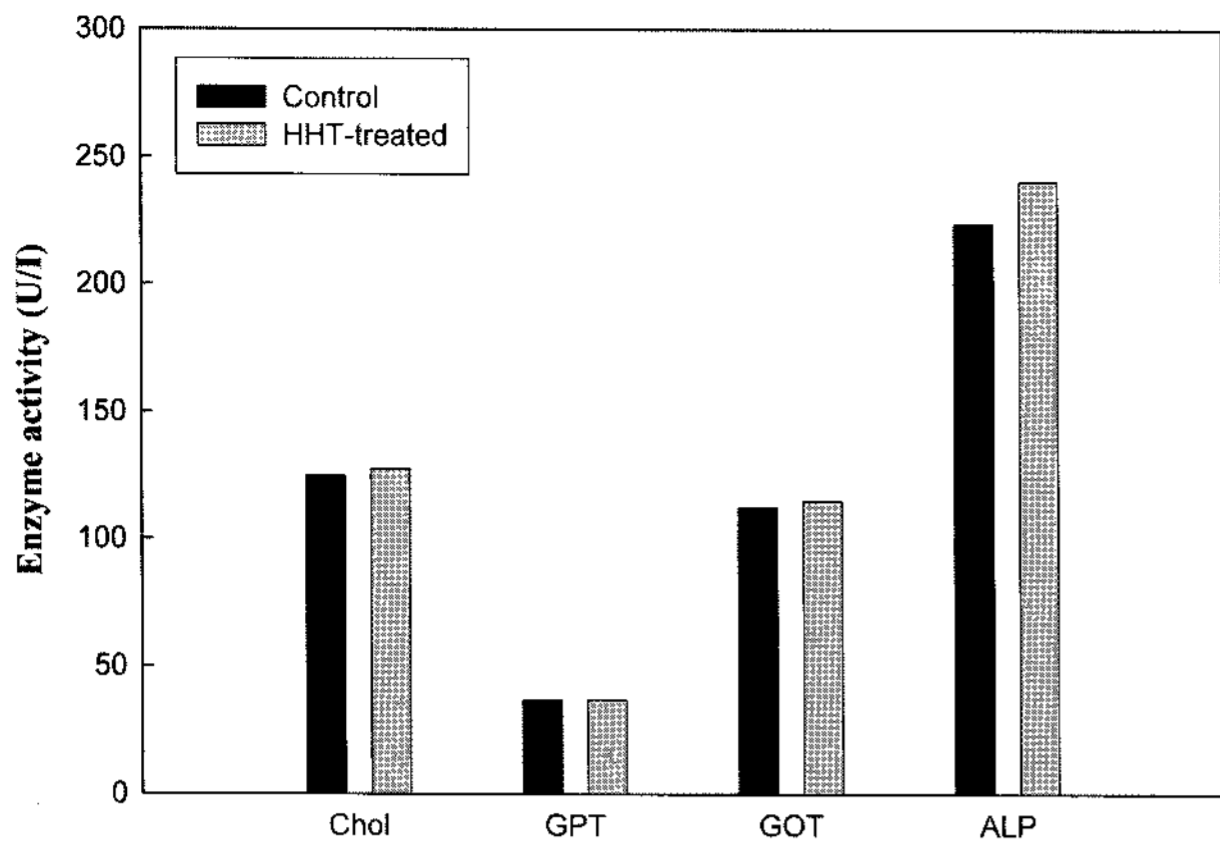


Fig. 4. The effects of HHT treatment on the enzyme activities in liver.

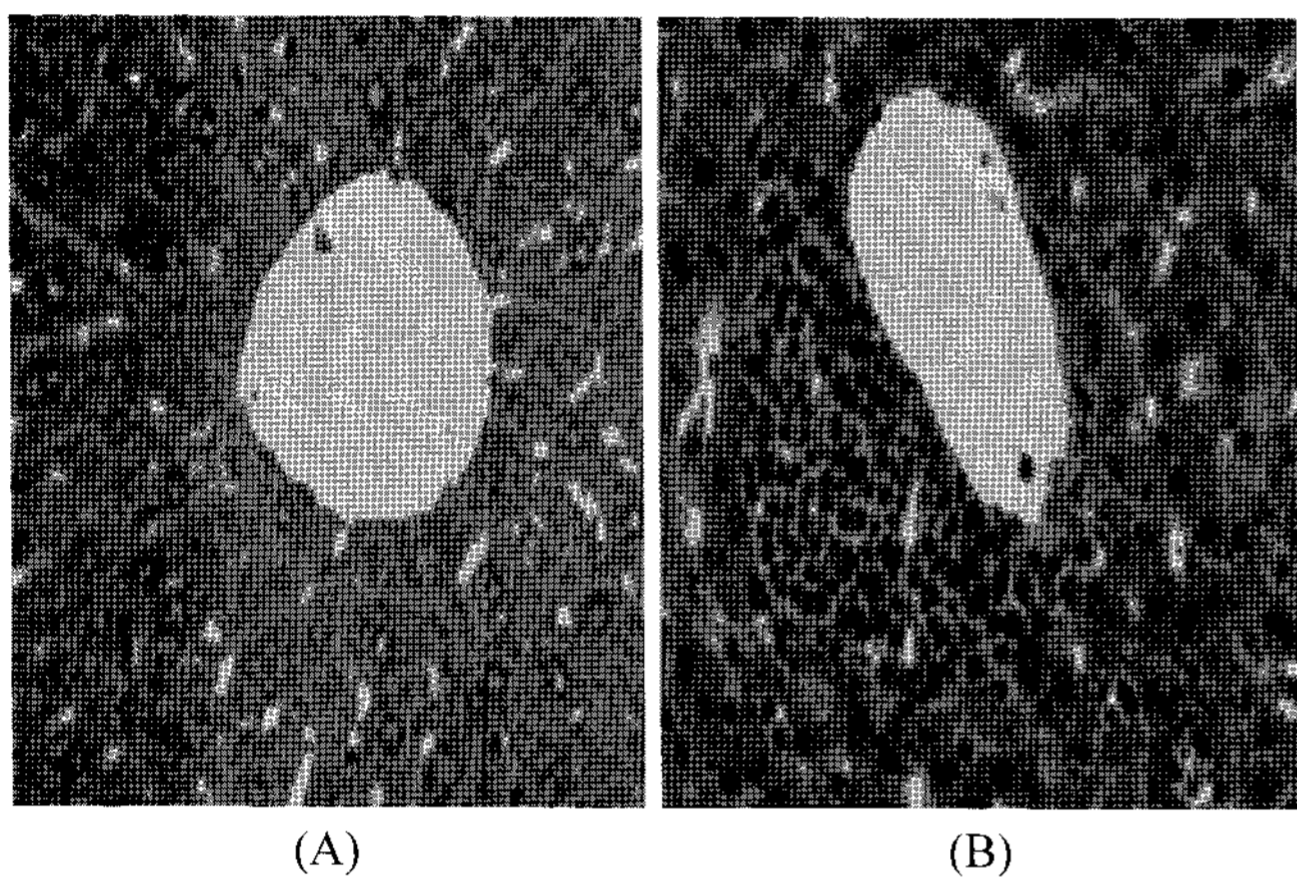


Fig. 5. Microscopic observation of liver tissue after the treatment by HHT. (A) control, (B) HHT-treated.

간 손상으로 인한 간세포의 괴사와 간조직의 파괴가 진행됨에 따라 아미노기 전이효소(transaminase)가 혈중으로 유리되어 높게 나타나는 것이므로 간세포의 변성 및 괴사의 지표가 될 수 있다.^{19,20)}

HHT를 주 1회 90일간 투여하고 5일 경과 후, 간기능 관련 효소의 혈액을 분석한 결과, 간 손상과 관련된 효소인 GOT, GPT, cholesterol(Chol) 및 alkaline phosphatase(ALP) 모두 정상 범위에 있었다(Fig. 4).

간의 조직학적 관찰을 위하여 육안적으로 부검을 한 결과, 대조군 마우스의 경우에는 간 표면에 이상을 발견할 수 없었으나, HHT 투여군 마우스의 경우에는 간 표면에 1 mm 내외의 hyperplastic nodules을 발견할 수 있었다. 또한 현미경으로 간에 대한 소견을 관찰한 결과, 대조군 마우스의 경우에는 별다른 이상을 발견할 수 없었으나, HHT 투여군 마우스의 경우에는 밴드형의 호중구를 침착시키는 것이 확인되었다(Fig. 5).

이상의 결과로부터 HHT로 혈액암 세포주에 장기간 반복처리시 혈액암의 증식을 효과적으로 저해하는 것을 확인하였고, 마우스를 이용한 독성시험결과 혈액학적 지표상으로는 특이적인 변화를 발견할 수 없었으나 조직학적인 관찰 결과상으로는 대조군에 비해 다소 차이있는 관찰결과를 얻을 수 있었다.

따라서 추가적이고 면밀한 독성학적 연구를 통하여 HHT를 항암제로서 개발할 수 있을것으로 판단된다.

요 약

개비자나무의 유효성분으로 알려진 homoharringtonine의 암세포주 K562에 대한 세포증식 저해 활성을 분석하였고, 마우스를 이용한 만성독성시험을 수행하였다. 총 약물처리 시간에 따른 최적 투여조건 결정 실험에서는 HHT를 9일, 6일, 3일 동안 매일 처리할 경우 각각 0.27, 0.37, 1.10 mM의 농도에서 K562세포의 성장을 50% 감소시킴을 확인하였다. 기존 백혈병 치료제로 사용되고 있는 adriamycin과의 비교실험 결과 HHT는 K562 세포주에 대하여 adriamycin보다 낮은 저해율을 나타냈으나 비교적 근사한 값을 가졌다. HHT의 만성독성 실험 결과 혈액학적 지표 측정 실험에서 적혈구수(RBC)는 대조군과 HHT 투여군 사이에 유의적인 차이가 없었고, 간 기능 관련 효소의 혈액을 분석한 결과, 간 손상과 관련된 효소 glutamate-oxalate-transferase, glutamate-pyruvate-transferase, cholesterol 및 alkaline phosphatase 모두 정상 범위에 있었다. 그러나 간 조직학적 검사에서는 HHT를 투여한 마우스의 간 조직에서 밴드형의 호중구를 침착시키는 것이 확인되었다.

Key words: 만성독성, 항암활성, 호모헤링토닌

감사의 글

본 연구는 농림부의 연구비 지원(2003-2006년)에 의하여 이루어진 내용의 일부로서 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Doll, R. (1992) The lessons of life. *Cancer Res.* **52**, 2024S-2029S.
- Wattenberg, L. W. (1997) An overview of chemoprevention: current state and future prospects. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **216**, 133-141.
- Yim, H. B., Lee, G. and Chae, H. J. (2004) Cytotoxicity of ethanol extract of *Raphanuse sativus* on human lung cancer cell lines. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 287-290.
- Doll, R. and Peto, R. (1981) The cause of cancer : Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.* **66**, 1191-1192.
- Park, J. B., Hyun, J. W., Lim, K. H., Shin, J. E., Won, Y. J., Yi, Y. D., Shin, K. H., Chang, I. M. and Woo, W. S. (1993) Antineoplastic effect of extracts from traditional medicinal plants. *J. Kor. Pharmacogn.* **24**, 223-230.
- Ohnamam, T. and Holland, J. F. (1985) Homoharringtonine as a new anticukemic agent. *J. Clin. Onco.* **3**, 604-606.
- Powell, R. G., Weisleder, D. and Smith, C. R. (1972) Antitumor alkaloids from *Cephalotaxus harringtonia*: structure and activity. *J. Pham. Sci.* **61**, 1227-1230.
- Huang, M. T. (1976) Drug-mediated increase of tumor immunogenicity *in vivo* for a new approach to experimental

- cancer immunotherapy. *Mol. Pharmacol.* **11**, 511-519.
9. Visani, G., Russo, D., Ottaviani, E., Tosi, P., Damiani, D., Michelutti, A., Manfroi, S., Baccarani, M. and Tura, S. (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.
10. Miah, M. A., Hudlicky, J. T. and Reed, J. W. (1998) Cephalotaxus alkaloids. Academic Press. New York. **51**, 199-265.
11. Zhou, D. C., Zittoun, R. and Marie, J. P. (1995) Homoharringtonine: an effective new natural product in cancer chemotherapy. *Bull Cancer.* **82**, 987-995.
12. Jingyi, H., Cheung, A. P., Wang, E., Struble, E., Fang, K., Nguten, N. and Liu, P. (2000) Stability-indicating LC assay and impurity identification in homoharringtonine samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **22**, 541-554.
13. Fricker, S. P. and Buckley, R. G. (1996) Comparison of two colorimetric assays as cytotoxicity endpoints for an *in vitro* screen for antitumor agents. *Anticancer Res.* **16**, 3755-3756.
14. Kang, S. H., Kim, M. G., Park, H. J. and Kim, E. S. (2005) Expression profiles of *Streptomyces* doxorubicin biosynthetic gene cluster using DNA microarray system. *J. Kor. Biotechnol. Bioeng.* **3**, 220-227.
15. Lee, S. C., Nam, S. C., Kim, C. S., Shin, H. J. and Paik, W. H. (1994) Stabilization of doxorubicin hydrochloride in injections. *J. Kor. Pharm. Sci.* **24**, 109-113.
16. Skeel, R. T. and Ganz, P. A. (1999) Systematic assessment of the patient with cancer chemotherapy. *Anticancer Res.* **19**, 34-35.
17. Ryu, S. H., Moon, K. H. and Pack, M. Y. (1982) Primary screening for growth inhibitors of L1210 cells from oriental herbs. *J. Kor. appl. Microbiol. Bioeng.* **1**, 53-58.
18. Nam, C. S., Kang, K. S. and Ha, B. J. (2007) Ulva lactuca fucoidan extract and its protective effects on CCl₄-induced Liver Dysfunction. *J. Kor. Biotechnol. Bioeng.* **2**, 73-77.
19. Ohkawa, A., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351-358.
20. Lawrence, R. A. and Burk, R. F. (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **71**, 952-958.