

한국산 생약의 약리작용 및 독성연구 (제 3 보)

세포독성 및 Glioma(9 ASK)에 대한 항암작용

장 일 무 · 지 형 준

서울대학교 생약연구소

Toxicological Evaluation of Medicinal Plants Used for Herbal Drugs (III)

Cytotoxicity and Antitumor Activities Against Glioma(9 ASK)

Il-Moo CHANG and Hyung-Joon CHI

Natural Products Research Institute, Seoul National University

Thirtyfour species of Korean medicinal plants which have been frequently used in oriental herb prescriptions were evaluated on their cytotoxicity and potential antitumor activities against AC glioma(9 ASK) *in vitro*. Dose of 100 μ g/ml of plant extracts appeared to exhibit slight cytotoxicity. Seven plant extracts, *Aralia continentalis* (Araliaceae), *Lycium chinensis*(Solanaceae), *Epimedium koreanum*(Berberidaceae), *Platyodon grandiflorum*(Campanulaceae), *Pleuropterus multiflorus*(Polygonaceae), *Rheum undulatum*(Polygonaceae) and *Scutellaria baicalensis*(Laminaceae) exhibited significant reversal(51~90%) of astrocyte formation into original neuroglial cells' morphology through the prescreen tests.

천연약물인 생약 및 약용식물의 약효와 독성을 정확히 평가하는 것은 매우 필요한 과제이다. 저자들은 이와 관련하여 천연약물의 보간, 간독성, 항암작용 및 세포독성과 조절기관에 미치는 영향등을 보고 한바 있다.¹⁻⁴⁾

천연약물을 시료로 할때 엑기스나 분획은 여러가지 물질이 공존하고 있는 것이 일반적이어서 그중의 어느 성분이 유효한 것인지 가려내기 위하여서는 많은 실험조작과 시간이 소요되며, 또한 함유성분이 시험하려는 약효나 독성에 특이적으로 예민하게 반응할 수 있는 실험동물모델(*in vitro*, *in vivo*)중 완벽한 것이 없다는 점이다.

한예로서 Walker 256 carcinoma는 원래 항암작용검색을 위한 동물암모델로 쓰여왔으나 천연약물의 엑기스나 분획을 시료로 하여 항암작용을 검색하기에는 적절하지 못한 점이 있다.

즉 식물체중에 흔히 함유되어 있는 탄닌과 같은 세포독성물질등에 너무 예민하게 반응하므로 탄닌 이외에 진정으로 항암작용을 나타낼 수 있는 성분이 들어 있다고 하더라도 이 성분이 나타내는 항암작용을 가려내기에는 부적합한 동물모델이다⁹⁾.

1980년에 개발된 AC glioma(9 ASK, neuroglioma cell)의 *in vitro* 모델은 미국 국립암연구소에서 새로이 천연약물의 항암작용 및 세포독성 검색용 실험모델로 채택된 바 있으며, 이 모델의 장점은 vincristine, colchicine과 같은 세포분열억제작용이 있는 물질들에는 아주 예민한 반응을 나타내는 반면, 탄닌과 같은 물질에는 별로 영향을 받지 않으므로 천연약물의 *in vitro* 조직배양의 실험모델로서는 적합한 것이다^{8,9)}.

본보에서는 이 실험모델을 사용하여 전보에 이어 34종(20과, 30속)의 천연약물시료에 대하

여 세포독성과 glioma(9 ASK)에 대한 항암작용을 검색하여 보고한다.

실험방법 및 재료

가) 시료의 제조

시중에서 구입한 생약을 식물학적으로 정확히 감별하여 전보에서와 같은 방법으로 엑기스를 만들어 시료로 하였다³⁾.

나) AC Glioma(9 ASK)의 기원

AC glioma는 1974년에 신경교세포를 조직배양하여 얻은 흰쥐 신경교암(rat glioma)으로서 본 실험에서도 SD-JCL rat에 ethylnitrosourea를 투여하여 생성된 미숙 신경교 세포(immature neuroglial cell)을 썼으며 이는 다형 회돌기교암세포(polymorphous oligodendroglyoma)의 세포학적 특성을 띠고 있는 것이었다.⁵⁻⁷⁾

다) 항암작용 실험모델

AC glioma의 배양액중에 NN⁶, O²¹-dibutyryl adenosin-3',5'-cyclic monophosphate 1mM을

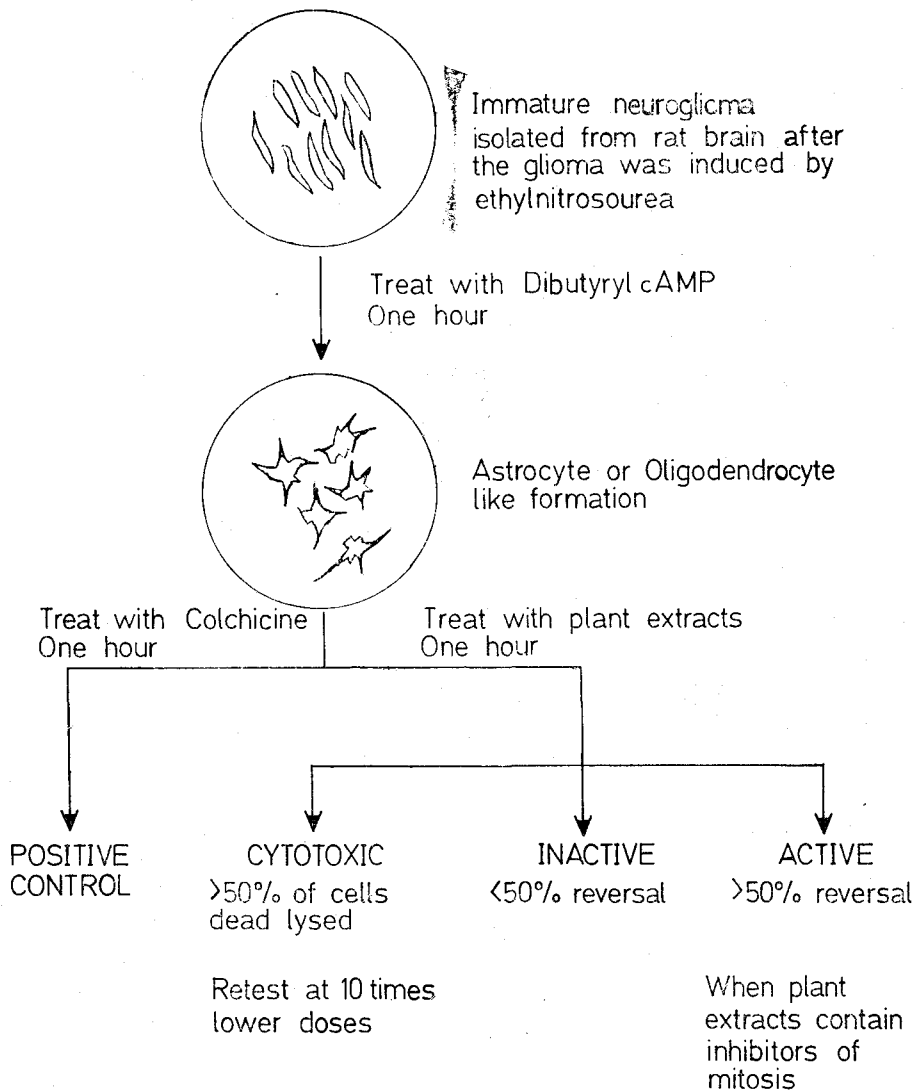


Fig. 1. Evaluation of potential antitumor activities against AC glioma(9 ASK)

첨가하면 약 1시간후에 세포의 모양이 희돌기교세포(oligodendrocyte)나 성상신경교세포(astrocyte)와 유사한 형태를 띠게 되며 여기에 다시 colchicine이나 vincristine과 같은 세포분열억제제를 투여할것 같으면 성상신경교세포와 유사한 세포의 형태가 원래의 미숙 신경교암세포(immature neuroglioma)의 형태로 복귀되는데 이와같은 현상을 이용하여 시료를 투여한 다음 복귀되는 정도를 관찰(visual inspection)하여 백분율로 나타내었다.

따라서 천연약물의 엑기스나 분획중에 항암작용을 나타내는 유효성분을 검색하기에는 적합한 *in vitro* 실험모델이다.

세포배양조건은 day 0에 1×10^5 AC glioma세포를 2 ml의 Eagle's MEM plus 10% new born calf serum에 이식하여 37°에서 5% CO₂를 통하면서 배양하고 day 2에 세포가 정상적으로 자랐으면 이 배양액을 0.3ml를 덜어낸후 0.1 ml의 N⁶, O²¹-dibutyryl cyclic AMP (20 mM)을 가한 다음 한시간후에 성상신경교세포 형성을 검사하여 80% 이상의 세포가 성상신경교세포로 되었을 때, 시료의 용액 0.2 ml를 첨가하여 한시간후에 성상신경교세포의 복귀율을 백분율로 표시하고, 세포독성 시험에 있어서는 시료의 독성에 의하여 세포가 파괴되었거나 분해가 일어난 것 또는 부유현상이 나타난 것은 시료의 농도를 10배율로 희석하여 재실험하였다.

라) 세포독성 및 항암시험

신경교세포(9 ASK) 모델의 세포배양액 1 ml에 대하여 시료 100 µg을 첨가하고 배양하였을 때 신경교세포의 과다한 파괴와 분해 및 부유세포(floating cell)가 나타났을 때에는 시료를 10 µg/ml로 줄여서 시험하므로써 세포독성과 항암작용을 동시에 관찰하였다.

마) 시험의 평가

Positive control로 세포배양액에 colchicine (NSC 757) 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0.1 µg/ml씩을 각각 첨가하였을 때 이중 하나에서 db-cyclic AMP에 의하여 성상신경교세포로 된 것이 다시 미숙 신경교세포로 복귀된 것이 ≥51% 이상일 때 이 실험은 정상적으로 실시되었다고 가정하

였으며, negative control은 db-cyclic AMP를 첨가하여 최소한 80% 이상의 성상신경교세포의 형성이 나타날 때 실험을 실시하였고 통상 8~10개 대조군의 배양기를 썼다(Fig. 1).

천연약물의 엑기스 즉 시료를 첨가한 배양액은 두개의 배양기(A, B dish)를 쓰고 항암작용 및 세포독성을 보기 위하여 각각 들씩(duplicate)으로 실험하였다.

세포독성은 시료에 의하여 세포가 단층융합성장(monolayer confluent growth)이 되지 못하고 파괴되어 부유할 때이며 시료는 처음에 100 µg/ml(log dose 2), 10 µg/ml(log dose 1), 1 µg/ml(log dose 0) 등으로 줄여 나가면서 세포독성이 나타나지 않는 농도에서 항암작용을 검색하였다.

검색결과의 평가는 Table I에서와 같은 기준으로 하였으며 세포독성 및 항암작용의 정도를 평가코드 0~6으로 구분하였을 때, 세포독성 시험결과가 ≥4(51~70%)인 경우에는 시료의 투여량을 10배수로 줄여 재시험하였고, 세포독성이 ≥3±1(16~70%)이고 항암작용이 ≤3±1인 경우에는 별 의미없는 항암작용물질이 시료중에 존재하는 것으로 음성(negative complete)로 평가하였다. 한편 세포독성이 ≤3±1이고 항암작용이 A, B dish에서 ≥4±1인 경우에, 즉 51~90%의 성상신경교세포의 복귀가 나타날 때에는 세포독성보다 항암작용이 큰 물질이 천연약물 엑기스중에 존재하는 것으로 평가하고 반복하여 확인하였다. 만일 세포독성이나 항암작용이 A, B dish의 각각 두개에서 서로 다르게 나타나고

Table I. Evaluation of cytotoxicity and antitumor activities.

Code	Cytotoxicity (%)	Astrocyte reversal (%)
0	0~5	0~5
1	6~15	6~15
2	16~30	16~30
3	31~50	31~50
4	51~70	51~70
5	71~90	71~90
6	>91	>91

그 차이가 평가코드 1 이상일 때에는 재실험을 실시하였다.

결과 및 고찰

생약으로 부터 34종의 시료를 조제하여 세포 독성 및 항암작용을 시험하여 종합평가한 바는 Table II와 같다.

대부분의 시료는 100 µg/ml 투여에서 미약한 세포독성을 나타내었으나 그 영향은 5% 이하이다. 평점 1~2인 것으로는 지모(*Anemarrhena asphodeloides*), 구맥(*Dianthus sinensis*), 백미(*Cynanchum wilfordii*)였으며 이들은 *in vivo* 시험에 있어서도 급성 독성을 나타낸 것이었다.³⁾ 그러나 100 µg/ml의 농도는 생쥐에 50~400mg/kg을 투여한 *in vivo* 시험에 비교하면 아주 낮은

농도이므로 1~100 µg/ml의 첨가농도에서는 미약한 세포독성을 나타낸 것으로 보인다.

항암작용은 독활(*Aralia continentalis*), 적하수오(*Polygonum multiflorum*), 종대황(*Rheum undulatum*), 음양곽(*Epimedium koreanum*), 황금(*Scutellaria baicalensis*), 구기자(*Lycium chinense*), 길경(*Platycodon grandiflorum*) 등이 유의성이 있었다.

그러나 동일한 시료를 약 6개월 후에 재차 시험하였을 때 대부분의 시료에서 세포독성 및 항암작용이 미약하거나 나타나지 않는 것으로 보아, 시료가 보관기간중 변화한 것으로 추정된다. 따라서 생약 엑기스나 분획을 시료로 쓸 때에는 이와같은 여건을 충분히 고려하여야 된다고 생각한다.

Table II. Cytotoxicity and antitumor activities against AC glioma(9 ASK)

Plant name (Family name)	Part	Drug name	Cytotoxicity % cell destruct		Astrocyte % reversal	
			Dish A	Dish B	Dish A	Dish B
<i>Aconitum koreanum</i> (Ranunculaceae)	Tb	白附子	0~5	0~5	6~15	6~15
<i>Anemarrhena asphodeloides</i> (Liliaceae)	Rh	知母	6~15	6~15	51~70	31~50
			16~30	31~50	31~50	31~50
<i>Angelica dahurica</i> (Umbelliferae)	Rt	白芷	0~5	0~5	0~5	0~5
<i>Angelica gigas</i> (Umbelliferae)	Rt	土當歸	0~5	0~5	16~30	16~30
<i>Angelica koreana</i> (Umbelliferae)	Rt	羌活	0~5	0~5	0~5	0~5
<i>Anthriscus sylvestris</i> (Umbelliferae)	Rt	前胡	6~15	6~15	51~70	51~70
			0~5	0~5	31~50	31~50
<i>Aralia continentalis</i> (Araliaceae)	Rt	獨活	0~5	0~5	71~90	71~90
			0~5	0~5	71~90	71~90
<i>Chaenomeles sinensis</i> (Rosaceae)	Fr	木瓜	0~5	0~5	51~70	31~50
			0~5	0~5	31~50	31~50
<i>Cnidium officinale</i> (Umbelliferae)	Rh	日川芎	0~5	0~5	0~5	0~5
<i>Corydalis ternata</i> (Papaveraceae)	Tb	玄胡索	16~30	16~30	16~30	16~30
<i>Crataegus pinatifida</i> (A) (Rosaceae)	Fr	土山楂子	0~5	0~5	31~50	31~50
<i>Crataegus pinatifida</i> (B) (Rosaceae)	Fr	唐山楂子	0~5	0~5	16~30	16~30
<i>Cynanchum atratum</i> (Asclepiadaceae)	Rt	白薇	0~5	0~5	0~5	0~5
<i>Cynanchum wilfordii</i> (Asclepiadaceae)	Rt	白何首烏	16~30	16~30	51~70	31~50
			6~15	6~15	31~50	31~50
<i>Dianthus sinensis</i> (Caryophyllaceae)	Pl	瞿麥	31~50	31~50	16~30	16~30
<i>Epimedium koreanum</i> (Berberidaceae)	Px	淫羊藿	6~15	6~15	51~70	51~70
			0~5	0~5	51~70	51~70

Table II. (Continued)

Plant name (Family name)	Part	Drug name	Cytotoxicity % cell destruct		Astrocyte % reversal	
			Dish A	Dish B	Dish A	Dish B
<i>Forsythia viridissima</i> (Oleaceae)	Fr	連翹	0~5	0~5	0~5	0~5
<i>Gentiana scabra</i> (Gentianaceae)	Rt	龍胆	0~5	0~5	0~5	0~5
<i>Glehnia littoralis</i> (Umbelliferae)	Rt	海防風	0~5	0~5	0~5	0~5
<i>Lycopus ramosissimus</i> (Labiatae)	Px	澤蘭	0~5	0~5	51~70	31~50
			0~5	0~5	31~50	31~50
<i>Lycium chinensis</i> (Solanaceae)	Fr	枸杞子	0~5	0~5	51~70	31~50
			6~15	6~15	51~70	31~50
<i>Machilus thunbergii</i> (Lauraceae)	Sb	厚朴皮	0~5	0~5	0~5	0~5
<i>Paeonia moutan</i> (Ranunculaceae)	Rb	牡丹皮	6~15	6~15	16~30	16~30
<i>Patrinia scabiosaeifolia</i> (Valerianaceae)	Rt	敗醬根	0~5	0~5	0~5	0~5
<i>Phlomis umbrosa</i> (Labiatae)	Rt	續斷	0~5	0~5	0~5	0~5
<i>Platycodon grandiflorum</i> (Campanulaceae)	Rt	桔梗	0~5	0~5	51~70	51~70
			0~5	0~5	51~70	31~50
<i>Polygonum multiflorum</i> (Polygonaceae)	Rh	赤何首烏	0~5	0~5	51~70	51~70
			0~5	0~5	71~90	71~90
<i>Rheum undulatum</i> (Polygonaceae)	Rt	種大黃	0~5	0~5	51~70	31~50
			0~5	0~5	51~70	31~50
<i>Scirpus martimus</i> (Cyperaceae)	Tb	荊三稜	0~5	0~5	0~5	0~5
<i>Scutellaria baicalensis</i> (Labiatae)	Rt	黃芩	0~5	0~5	71~90	51~70
			0~5	0~5	51~70	31~50
<i>Spirodela polyrhiza</i> (Lemnaceae)	Pl	浮萍草	0~5	0~5	51~70	31~50
			0~5	0~5	31~50	31~50
<i>Teucrium veronicoides</i> (Labiatae)	Px	藿香	0~5	0~5	31~50	16~30
<i>Trichosanthes kirilowi</i> (Cucurbitaceae)	Rt	栝樓根	0~5	0~5	31~50	31~50
<i>Torilis japonica</i> (Umbelliferae)	Fr	蛇床子	0~5	0~5	6~15	0~5

Parts: Fr; Fruit, Pl; Whole plant, Px; Aerial parts, Rh; Rhizome, Rt; Root, Tb; Tuber.

Log dose 2; 100 μ g/ml, 1; 10 μ g/ml, 0; 1 μ g/ml in the culture medium.

Vehicle: E; 1% ethylalcohol solution.

Type of administration: Sus; Suspension, Sol; Solution.

Table III. Dose-response studies

Plant name (Family name) Part of used Drug name	Log dose	Vehicle	Type of adminis- tration	Cytotoxicity % cell destruct		Astrocyte % reversal	
				Dish A	Dish B	Dish A	Dish B
<i>Aralia continentalis</i> (Araliaceae)	2	E	Sus	0~5	0~5	71~90	71~90
Root	2	E	Sus	0~5	0~5	71~90	71~90
獨活	*2	E	Sus	0~5	0~5	16~30	16~30
	*1	E	Sol	0~5	0~5	0~5	0~5
	*0	E	Sol	0~5	0~5	0~5	0~5

Table III. (Continued)

Plant name (Family name) Part of used Drug name	Log dose	Vehicle	Type of adminis- tration	Cytotoxicity % cell destruct		Astrocyte % reversal	
				Dish A	Dish B	Dish A	Dish B
<i>Epimedium koreanum</i> (Berberidaceae)	2	E	Sus	6~15	6~15	51~70	51~70
Aerial parts	2	E	Sus	0~5	0~5	51~70	51~70
淫羊藿	*2	E	Sus	0~5	0~5	16~30	6~15
	*1	E	Sol	0~5	0~5	0~5	0~5
	*0	E	Sol	0~5	0~5	0~5	0~5
<i>Lycium chinensis</i> (Solanaceae)	2	E	Sus	0~5	0~5	51~70	31~50
Fruit	2	E	Sus	6~15	6~15	51~70	31~50
枸杞子	*2	E	Sus	0~5	0~5	16~30	6~15
	*1	E	Sol	0~5	0~5	0~5	0~5
	*0	E	Sol	0~5	0~5	0~5	0~5
<i>Platycodon grandiflorum</i> (Campanulaceae)	2	E	Sus	0~5	0~5	51~70	51~70
Root	2	E	Sus	0~5	0~5	51~70	31~50
桔梗	*2	E	Sus	0~5	0~5	0~5	0~5
	*1	E	Sol	0~5	0~5	0~5	0~5
	*0	E	Sol	0~5	0~5	0~5	0~5
<i>Pleuropterus multiflorus</i> (Polygonaceae)	2	E	Sus	0~5	0~5	51~70	51~70
Root	2	E	Sus	0~5	0~5	71~90	71~90
赤何首烏	*2	E	Sus	0~5	0~5	6~30	6~15
	*1	E	Sol	0~5	0~5	0~5	0~5
	*0	E	Sol	0~5	0~5	0~5	0~5
<i>Rheum undulatum</i> (Polygonaceae)	2	E	Sus	0~5	0~5	51~70	31~50
Root	2	E	Sus	0~5	0~5	51~70	31~50
種大黃	*2	E	Sus	0~5	0~5	0~5	0~5
	*1	E	Sol	0~5	0~5	0~5	0~5
	*0	E	Sol	0~5	0~5	0~5	0~5
<i>Scutellaria baicalensis</i> (Labiatae)	2	E	Sus	0~5	0~5	71~90	51~70
Root	2	E	Sus	0~5	0~5	51~70	31~50
黃芩	*2	E	Sus	0~5	0~5	16~30	16~30
	*1	E	Sol	0~5	0~5	0~5	0~5
	*0	E	Sol	0~5	0~5	0~5	0~5

* Tested six months later with same extracts prepared.

감사의 말씀 : 이 실험을 하는데 도움을 주신
미국 국립암연구소의 M. Suffness 박사 및 Bristol
연구소의 J. Douros 박사께 감사드립니다.

<1982년 5월 21일 접수>

References

1. Woo, W.S., Lee, E.B. and Chang, I.M.: *J. Pharm. Soc. Korea*, 21, 177 (1977)

2. Chang, I.M. and Woo, W.S.: *Arch. Pharm. Res.*, **3**, 75 (1980)
3. Chang, I.M. and Chi, H.J.: *Kor. J. Pharmacog.*, **12**, 125 (1981)
4. Chang, I.M., Kim, Y.S. and Han, B.H.: *Kor. J. Pharmacog.*, **13**, 13 (1982)
5. Schubert, D., Heinemann, S., Carlisle, W., Tarikas, H., Kimes, B., Patrick, J., Steinbach, H., Culp, W., and Brandt, B.L.: *Nature*, **249**, 224 (1974)
6. Steinbach, J.H., and Schubert, D.: *Exp. Cell Res.*, **91**, 449 (1975)
7. Igarash, K., Ikeyama, S., Takeuchi, M., and Sugino, Y.: *Cell Struc. Funct.*, **3**, 103 (1978)
8. Instruction 14, Screening Data Summary Interpretation and Outline of Current Screen, Drug Evaluation Branch, Development Therapeutics Programm, Division of Cancer Treatment, National Cancer Institute, Bethesda, MD 20014, USA
9. Suffness, M. and Douros, J.: *J. Natural Products*, **45**, 1 (1982)