

주목류의 생물활성 연구*

김 태 희

숙명여자대학교 약학대학

A Study on the Biological Activity of *Taxus* spp.

Tae-Hee Kim

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea.

Abstract—Yew cortex, twigs and leaves(Florida yew, *Taxus floridana* Nutt et Champ; Pacific, yew *Taxus brevifolia* Nutt(Taxaceae)) were extracted with MeOH and CHCl₃, respectively, and then the chloroform extract was fractionated by silica column chromatography. As biologically active substances, taxol derivatives were identified and several biological activity tests were followed. The results showed that it had no antimosquito activity and inhibited the growth of root meristem of cress seeds. The chloroform ext. of Florida yew showed 91% inhibition rate at 400 ppm and the taxol fractions of Pacific yew did 91% at 200 ppm, 94% at 100 ppm. In the antitumor activity tests *in vitro* against a cultured cell line of L1210 mouse leukemia, Pacific yew showed 99% inhibition rate at 1.0 ppm and Florida yew did 97% at 10 ppm.

Keywords—*Taxus brevifolia* Nutt • *Taxus floridana* Nutt et Champ • Taxaceae • taxol • mosquito larvae test • cress seedling assay • L1210 cell • antitumor activity

주목나무목(Taxales)의 한과인 주목과(Taxaceae)에는 *Taxus* spp., *Pseudotaxus* spp., *Torreya* spp., *Austrotaxus* spp., *Amentotaxus* spp., 의 5속이 있으며 이중 주목속 *Taxus* spp.는 세계에 널리 분포되어 20여가지종 및 변종이 있다. 한국, 일본 등에 자생하는 Korean(Japanese) Yew¹⁾가 있고 유럽영역에 자생하는 Europe(English) Yew²⁾가 있으며, 미국지역에 자생하는 America(Canada, Pacific, Florida) Yew³⁾, 대만에 자생하는 Taiwan Yew 등이 있으며 주로 북반구에 분포하는 상록침엽수로 약용, 식용, 공업용 등의 자원으로 이용되고 관상용으로도 재배하고 있다.⁴⁾

우리나라에 자라고 있는 주목류는 주목(朱木, 一位葉, 慶木, 赤白松) *Taxus cuspidata* Sieb, et Zucc., 화솔나무(水松) *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. var. *latifolia* Nakai, 가라목(伽羅末) *Taxus cuspidata* Sieb, et Zucc. var. *umbraculitera* Makino, 눈가라목 *Taxus cuspidata* Sieb, et Zucc. var. *nana* Rebder, 눈주목(伽羅木) *Taxus caespitosa* Nakai 등 2종 3변종이 기록되어 있다.⁵⁻⁷⁾ 주목류의 성분연구로는 taxane derivatives I~VIII,^{6,7)} taxine, taxinine I~XI, taxinol^{8,9)} taxacin I. II, taxol I~III, taxusin^{10,11)} sciadopitsin, taxiphyllin, taxamairin I~III,¹²⁾ phyllanthin, dhurrin, taxagifine I. II, betuloside, ginkgetin, sequoiaflavone¹³⁾ secoisolaricinresinol, ponasterone A,¹⁴⁾ ecdysterone,¹⁵⁾ sorbitol, sapo-

* 전통약물에 관한 연구(I).

nin, bitter substance, sucrose, tannin, vanillin, isoliovil, α -conidendrin¹⁶⁾ 등이 보고 되어 있다.

주목류의 약효로는 강심이뇨, 당뇨, 진통, 진하, 혈압강하, 구충, 통경, 마취작용 등이 있다.^{17,18)} Huang²⁰⁾ 등은 taxane diterpenes가 KB cell culture로 세포독성시험을 하여 ED₅₀이 3×10^{-5} $\mu\text{g/ml}$ 이며 taxol 1×10^5 $\mu\text{g/ml}$ 보다는 약함을 관찰하였고 Wani¹⁹⁾ 등은 *Taxus brevibolia*에서 taxol를 분리하여 구조를 결정하였고 antileukemic, antitumor agent임을 확인하였다. Liang²¹⁾ 등은 *Taxus mairei*에서 antineoplastic diterpene: Taxamairin I. II를 분리하고 hepatoma cells의 antineoplastic activity는 IC₅₀이 30.21, 26.78 $\mu\text{g/ml}$ 임을 보고 하였다. Miller²²⁾ 등은 *Taxus wallicuiana* Zucc으로 부터 antileukemic alkaloids, cephalomannine을 분류하고 Mirzoev²³⁾ 등은 alkaloid taxine의 약리작용 및 독성시험을 하였고 0.5~1 mg의 용량에서 혈압강하가 투여 후 20~30분에 나타남을 관찰하였다. Vohora²⁴⁾ 등은 *Taxus baccata*의 biflavonoids가 중추신경계에 미치는 영향을 관찰하여 진통, 진정효과가 있고 항경련, 소염효과는 없으며 평활근에 대한 비특이적 진정효과를 보고하고 있다. Liu¹¹⁾ 등은 Taiwan yew의 심재를 민간에서 당뇨병 치료로 사용하고 있다. 또 주목을 공기 공해에 관여하는 중금속의 physiological parameter로 bio-indicator로도 이용되며 항산화작용도 있다. 한편 가축들이 이 식물의 잎이나 줄기를 먹으면 설사, 구토, 동공산대, 호흡곤란, 급속한 혼수, 경련이 일어나며 많이 먹으면 사망하는 수도 있다고 한다.²⁵⁾

이 연구는 미국에 분포되어 있는 Pacific yew²⁶⁾ Western yew,²⁷⁾ californian yew, *Taxus breviflora* Nutt.와 Florida yew,²⁸⁻³⁰⁾ *Taxus floridana* Nutt et. Champ를 실험재료로 사용하여 MeOH로 Ext.를 만들고 이를 CHCl₃로 추출하여 이를 column chromatography에 의해 taxol³¹⁾ 함유 분획을 벌여 mosquito larval test, cress seedling assay 및 mouse leukemia L1210 cell을 사용하여 세포독성 시험을 실시한바를 보고 한다.

실 험

실험재료

1989년 6월 미국에 자생하는 Pacific yew: *Taxus breviflora* Nutt와 Florida yew: *Taxus floridana* Nutt. ex. Chapm의 수가, 가는가지와 잎을 채취하여 실험에 사용하였다. Mosquito larvae test에 사용한 모기 알은 Florida대학교 농과대학에서 분양 받아 사용하였다. Cress seedling assay는 Cress pepper grass를 Chas C, Hart Seed Co.에서 구입하여 사용하였다. Cytotoxicity test는 mouse leukemia L1210 cell을 Florida대학교 의과대학에서 분양받아 사용하였다.

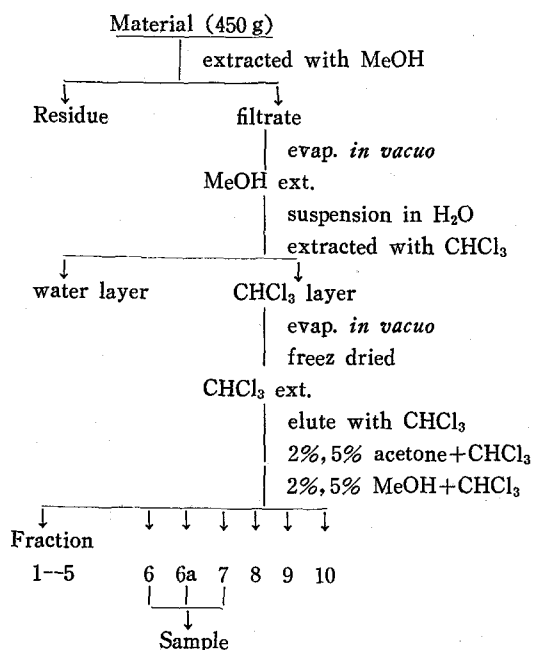
시약 및 기기

한천은 Bacteriological technical #0812-05를 사용하였고 petri dish는 Integrid petri dish로 뚜껑이 100×15 mm이며 정방형 13 mm 칸의 소독된 polystyrene-용기를 사용하였다. Mosquito test의 영양액은 肝 Ext. yeast를 사용하였다. Cytotoxicity assay에는 media를 RPMI-1640. HEPE-MOPS powder, fetal bovine serum (FBS) Hanks balance salts solution(HBSS)등 Sigma 제품을 사용하였다. CO₂ incubator에 배양하고 Laminar flow hood cabinet에서 실시하고 culture plate로는 24 well 6 well plate 등의 multiwell tissue culture plate를 사용하였다. 표준액으로는 taxol(NC), streptonigrin, mitocromin을 쓰고 염색액으로 trypan blue, 세포측정에 hemocytometer를 사용하고 그의 시약은 일급을 사용하였다.

실험방법

1) 시료의 추출 및 분획—Pacific yew와 Florida yew 각각의 시료 450 g를 1 l의 MeOH로 2일간 실온에서 3회 추출하고 추출액을 감압농축하여 냉동건조하여 건조 ext.를 얻었다. 또 각각의 MeOH ext.를 CHCl₃로 3회 추출하여 CHCl₃ ext.를 얻었다. Taxol 분획분을 얻기 위하여 CHCl₃ ext. 1 g를 silica column chromatography로 CHCl₃ 용리하고, 다음에 2% acetone+CHCl₃, 5% acetone+CHCl₃로 용리하고, 2% MeOH+CHCl₃, 5% MeOH+CHCl₃로 용리하여 fraction

1~10을 얻었다. Fraction을 TLC에서 1N H₂SO₄를 분무하고 가열하여 청색 및 갈색을 나타내는 fraction 6, 6a, 7에 대하여 생물활성시험을 하였다. Scheme 1.



Scheme 1. Fractionation of methanol ext. of *Taxus* spp.

2) 표준물질의 조제—i) Taxol 용액의 조제 : Taxol을 1000, 40, 20ppm 되게 DMSO에 용해시켜 표준용액을 만들어 대조군으로 사용하였다. Taxol을 TLC에서 CHCl₃ : acetone(10 : 2)로 전개하고 1N H₂SO₄를 분무하고 가열하면 청갈색의 반점 (Rf=0.6)를 확인하여 검체중 taxol의 분획과 비교 검토하였다. ii) Streptonigrin과 mitochromin 용액 조제 : 표준액을 각각 DMSO로 1mg/ml 되게 stock solution을 만들어서 세포독성시험에 positive control로 0.03, 0.01, 0.003 ppm을 HBSS로 희석한 용액 0.05 ml씩을 배양기에 가하여 2.0 ml 되게 하였다.

3) Mosquito larvae test—모기 알 80 mg(500~800개)를 물 10 ml가 담긴 시험관에 한시간 방치하여 부화시킨다. 부화된 유충을 1 l flask에 물 500 ml를 넣고 肝 ext. 225 g와 yeast 115 g을 가하여 녹힌액에 넣어서 배양기(20°)에서 일주일

기른후 실험에 사용하였다. 표준물질 용액 taxol, pacific yew ext. 및 Florida yew ext. 각각의 시료용액 400, 200, 80, 40, 20 ppm을 20 ml 시험관에 가하고 DMSO 1 ml에 녹히고 물 10 ml씩을 가하였다. 여기에 위에서 발육된 모기유충 10마리씩을 넣고 솜으로 가볍게 막아 배양하여 3, 24, 48시간 마다 관찰하여 모기유충의 생존마리수를 관찰하였다.

4) Cress seedling assay—Cress seed는 한시간 동안 물에 담근 후 agar 7g를 물 7 l에 가하여 가열한 후 Integrid petri dish에 20 ml 분주한 agar plate 위에 옮겨 20°에서 24시간 배양하여 싹트게 하였다. 50 ml 시험관에 대조군 DMSO, taxol 및 검액 Pacific yew ext. Florida yew ext.에 각각 0.1 ml의 DMSO를 가하고 전체가 20 ml 되게 한천배지를 넣고 응고시킨후 실험 plate를 만들었다. 여기에 발근된 cress seed를 6개씩 심어서 24시간 20°에서 배양기에서 자라게 한후 root meristem의 억제 상태를 -mm로 측정하여 억제율을 구하였다.

5) Cytotoxicity assay³²⁻³⁴⁾—i) 배지조제 : RP M1-1640을 증류수 900 ml에 녹히고 NaHCO₃ 2g를 가하고 1N HCl로 pH 7.2로 조절하고 무균적으로 0.22 microfilter에서 여과하고 500 ml 병에 나누어 넣어 멸균 배지를 조제하였다. Laminar flow hood cabinet 안에서 두 개의 500 ml로 부터 10 ml씩 취한 20 ml의 media를 0.22 microfilter에서 여과하고 HERPES-Mops buffer solution 20 ml를 가하고 5 ml의 l-glutamine 200 mM를 가하였다. 500 ml 각각의 media 병에서 반씩 나누어 가하고 무균적으로 50 ml의 fetal bovine serum (FBS)를 각각의 500 ml 배지 병에 넣어서 완전배지를 만들었다. Hank's balance salts solution(HBSS)는 1 l flask에 증류수 900 ml를 가하고 물을 저어가며 HBSS powder를 가하고 0.35 g NaHCO₃를 녹이고 1N HCl를 이용하여 pH 7.2로 맞추어 전체를 1 l 되게 하고 무균적으로 여과하여 사용하였다.

ii) Trypan blue stain³⁴⁾ : Trypan blue 400 mg를 물 90 ml에 넣고 NaCl 810 mg, K₂HPO₄ 50 mg, 그리고 methyl p-hydroxy benzoate 50 mg를 가한 후 혼합액을 가열 용해시키고 냉각후

pH 7.2~7.3로 조절하여 100 ml 되게 하여 사용하였다.

iii) Cytotoxicity test³⁵⁾: Mouse Leukemia L1210 cell line³⁶⁾을 이용하여 항종양작용을 측정하였다. L1210 cell을 corning disposable sterile tissue culture flask(25 m²)에 RPM1 1460 media (10% FBS) 10 ml를 가하여 CO₂ 배양기에서 배양시켰다. 4개의 6 well plate에 각각 2 ml씩의 배지를 가하고 1.6×10⁶ cell/ml broth~4×10⁴ cell로 부터 50 μl를 접종하고 cell의 exponential growth로 증식시키기 위해 24시간 CO₂ 배양기에서 배양하여 test cell/ml 0.7×10⁵로 하였다. 대조군으로는 0.1M phosphate buffer (pH 7): HBSS(1:9)와 DMSO/phosphate buffer:HBSS(4:1:9)를 사용하였다. 실험재료 pacifico yew는 silica column chromatography에서 얻은 fraction 6 0.8 mg/ml를 buffer로 희석액 1.0, 0.1, 0.3, 0.01, 0.03 ppm를 조제하여 3일간 배양하였다. Florida yew MeOH ext. 0.8 mg/ml도 buffer를 가하여 10, 1.0, 0.1, 0.001 ppm를 만들어 배양하였다. 다음에 각 well속의 양액에서 0.9 ml씩을 시험관에 취하고 trypan blue starch 0.1 ml를 가하고 5분후 hemocytometer에 가하여 현미경에서 cell수를 세어서 성장억제(I)를 구하였다.

$$I = \frac{(C_3 - T_3)}{(C_3 - C_0)} \times 100$$

T₃: 3일간 배양후 시료의 희석용액을 가한 배양관에서의 세포의 농도

C₃: 대조군의 세포의 농도

C₀: 배양전의 배양관의 세포의 농도

실험 결과 및 고찰

미국 서북쪽 California, Alaska 동남쪽에 분포하는 pacifico yew와 미국 남부 Florida 서북쪽에 자생하는 Florida yew의 수피, 작은가지와 잎을 재료로 써서 각각 MeOH ext, CHCl₃ ext.를 만들고, pacifico yew, CHCl₃ ext.를 column chromatography를 실시하여 taxol분획을 얻어 생리활성시험한 결과는 다음과 같다.

1. 대조군의 생물활성: Taxol은 mosquito larvae test에서는 20 ppm에서 50%의 생존율을 나타냈고, cress seed meristem의 억제에는 100 ppm

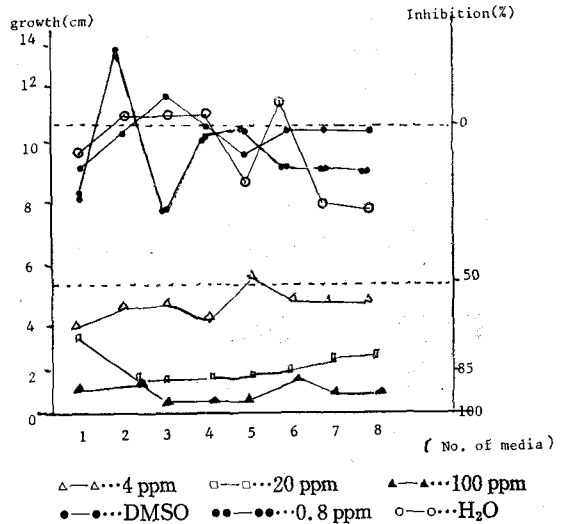


Fig. 1. The effect on cress seeding assay of taxol

에서 96%, 20 ppm에서 85%, 4 ppm에서 62%의 억제율을 나타냈다. Fig. 1.

Antitumor activity의 대조군으로는 streptonigrin 0.03 ppm에 2.7×10⁵ cell/ml에서 93%이고, mitocromin 0.03 ppm에 1.5×10⁵ cell/ml에서 100% 억제율을 갖는 것과 Pacific yew ext. Florida yew ext.와 비교 검토하였다.

2. Florida yew의 생물활성: Mosquito larvae test에서 생존율이 100%였으며, cress seedling assay 결과는 MeOH ext. (λ max. 278) 100 ml의 0.1 ml에 대하여 61%의 억제율이였고, CHCl₃ ext. 400 ppm에서 91%, 200 ppm에서 29%의 억제율을 나타냈다. Taxol 분획을 확인할 수 없었다. L1210 cell에 대하여는 10 ppm에서 2.3×10⁵ cell/ml로서 97%의 억제효과를 관찰할 수 있었다.

3. Pacific yew의 생물활성: Mosquito larvae test에서 MeOH ext. CHCl₃ ext에서 생존율은 100%였다. Cress seedling assay의 결과는 MeOH ext. 400 ppm에서 58%의 억제율을 나타내었고 CHCl₃ ext.에서 taxol계가 함유됨을 확인하여 column chromatography하여 얻은 분획 6는 200 ppm에서 91%, 100 ppm에서 88%였고, 분획 6A는 100 ppm에서 94%, 25 ppm에서 84%였다. 분획 7은 100 ppm에서 70%, 25 ppm에서 34%의

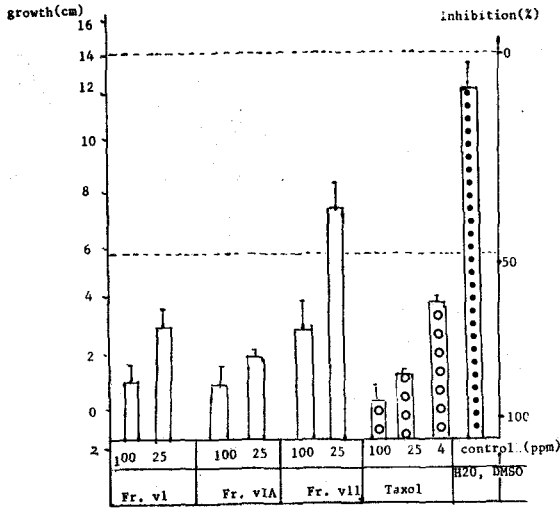


Fig. 2. Cress seedling assay enhancement of the fractions by Pacific yew

Table I. Cytotoxicity test

Material	ppm	L1210 cell/ml	Inhibition (%)
Test cell/ml Day	0	0.7×10^5	
Control	0.05	29.4×10^5	
Streptonigrin	0.03	2.7×10^5	93
	0.01	10.6×10^5	64
	0.003	18.2×10^5	39
Mitocromin	0.03	0.15×10^5	100
	0.01	0.99×10^5	99
	0.003	4.8×10^5	86
Pacific yew	1.0	0.84×10^5	98
	0.3	1.86×10^5	95
	0.1	20.6×10^5	38
	0.03	26.6×10^5	19
	0.01	33.0×10^5	0
Florida yew	10	2.3×10^5	97
	1.0	3.0×10^5	9
	0.1	3.9×10^5	0
	0.001	3.7×10^5	0

Control; DMSO/phosphate buffer/HBSS (4 : 1 : 9) Buffer/HBSS (1 : 9)

억제율을 나타냈다. Fig. 2. mouse leukemia L1210 cell에 대한 억제율은 1.0 ppm에서 98% 0.84×10^5 cell/ml로서 0.1 ppm에서 38% 20.6×10^5 cell/ml의 억제율을 나타냈다. Table I.

결론

Pacific yew. [*Taxus brevifolia* Nutt (Taxaceae)]와 Florida yew (*Taxus floridana* Nutt ex. Cham.)의 MeOH 및 CHCl₃ ext. 및 taxol 함유 분획의 생물활성 효과로 antimosquito test, cress seedling assay, cytotoxicity test를 실시한 결과 mosquito larvae에는 모두 효과가 없었고 cress seed의 root meristem를 억제하는 것은 Florida yew의 CHCl₃ ext.의 400 ppm에서 91%의 억제율을 나타냈고 pacific yew의 taxol 분획의 200 ppm에서 91%, 100 ppm에서 94%이었다. 항암 작용을 mouse leukemia L1210 cell로 실시한 결과 streptonigrin은 0.03 ppm에서 93% 2.7×10^5 cell/ml의 억제율이고 mitocromin은 0.03 ppm에서 100% 1.5×10^5 cell/ml의 억제율을 나타내는데 비하여 pacific yew 1.0 ppm는 0.84×10^5 cell/ml 98%의 억제율을 나타내고, Florida yew 10 ppm은 2.3×10^5 cell/ml로서 97%의 억제율을 나타내었다.

감사의 말씀—이 연구는 문교부 국비해외과제 연구 조성비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다. 또한 연구를 도와주신 University of Florida, Department of Medicinal Chemistry의 교수 Koppaka V. Rao 박사와 Richard Davies 및 교실원들에게 감사드립니다.

<1990년 5월 31일 접수 : 6월 15일 수리>

문헌

1. 육창수 : 한국약품식물자원도감, 진명출판사, 서울, pp.13-15 (1981).
2. Lyman Benson: Plant classification, 2nd. p.630 (1987).
3. D.J. Mabberley: The plant book, Cambridge University Press, Cambridge, p.571 (1981).
4. 이창복 : 식물분류학, 향문사, 서울, p.111 (1973).
5. 송주택, 정현배, 진희성 : 한국자원식물, 미도문화사, 서울, p.24-26 (1983).
6. 정태현 : 한국식물도감, 신지사, 서울, pp. 2-3 (1956).

7. 奥山春季：日本植物圖鑑，平凡社，寺崎 p.94 (1980).
8. Yoshizaki, F., Fukuda, M., Hisamichi, B., Ishida, T. and In. Y.: *Chem. Pharm. Bull.* 36, 2098 (1988).
9. Tyler, V.E., Jr.: *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* 49, 683(1960).
10. Ueda, K., Yamamoto, Y. and Yoshifumi, S.: *Yakugaku Zasshi* 83, 359(1968).
11. Liu, C.L., Lin, Y.C., Lin, Y.M. and Chen, F.C.: *Tai-wan K'oh Suen* 38, 119(1984).
12. Liang, J.G., Min, Z., Tanaka, T., Mizuno, M., and Linuma, M.: *Huaxue Xuebao* 46, 21(1988).
13. Khan, M.S. Y., Kumar, I., Prasad, J.S. and Krishnamurty, M.G.: *Planta Med.* 30, 82(1976).
14. Takemoto, T., Hikino, Y. and Jin, H.: *Yakugaku Zasshi* 83, 059(1968).
15. Nakano, K., Nohara, T. and Kahikawa, M.: *Phytochem.* 21, 2749(1981).
16. Miller, R.W., McLanghlin, J.L., and Smith, C.R., Jr.: *J. Nat. Prod.* 45, 78(1982).
17. 奥田拓男，天然藥物事典，廣川書店，東京，p.2160 (1986).
18. 刈米達夫，木村雄四郎；和漢藥用植物 p.427(1980).
19. Mansukhlal, W., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon Philip, McPhail and Andrew, J.: *J. Amer. Chem. Soc.* 93, 2325(1971).
20. Huang, C.H., Kingstone, D.G.F. and Boethner, F.E.: *J. Nat. Prod.* 49, 665(1986).
21. Liang, J., Min, Z., Linuma, M., Tanaka, T. and Mizuno, M.: *Chem. Pharm. Bull.* 35, 2613(1987).
22. Miller, R.W., Powell, R.G., Smith, C.R., Sr., Arnold E. and Clardy, J.: *J. Org. Chem.* 46, 1469(1981).
23. Mirzoez, K.M.: *Pokl. Akad. Nat. Azerb.* 28, 62 (1972).
24. Vohora, S.B. Kumar, I., Shah, S.A., Kham, M.S.Y.: *Indian J. Med. Res.* 7, 815(1980).
25. John, M.K.: *Poisonous Plant of the United States and Canada.* Prentice-Hall, Inc., New Jersey, p.122 (1986).
26. Schopmeyer, C.S.: *Seeds of woody plant in the United State*, Forest Servie, U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C., p.799 (1974).
27. Walter, H.L.: *Medical Botany*, Wiley-Interscience Pualication, New York, p.121(1981).
28. Hebb, W. Y.: *Pharmaceutical Botany* p.42 (1951).
29. Wilbur, H.D. and Marion, B.D.: *Trees of the Southeastern United States*, p.27(1980).
30. Andre, F.C.: *Guide to the vascular plants of the Florida pan handle*, Florida State University Press, Tallahassee, p.56 (1985).
31. Wai, M.C., Taylor, N.L., and Mcphanil, A.J.: *J. Am. Chem. Soc.* 93, 2325(1971).
32. Freshney, R.I.: *Culture of animal cells*, Alan R. Liss, Inc., New York., Chapter 8, 11, 16, 19 (1989).
33. Paul F. K.: *Tissue Cultre: Methods & Application*, p.408 (1973).
34. William, B.J. and Ira, H.P.: *Methods in Enzymology, cell culture*, Vol. 58, p.152 (1979).
35. Kishi, K., Yazawa, K., Taka, K., Mikam, Y. and Arai, T.: *J. Antibiotics* 37, 847(1984).
36. Philip, H., Philips, T., and Marthing, H.: *Cancer Chemotheraphy Report* 51(7), 451 (1667).