

## 천연물로부터 항암물질의 분리

이인란 · 송지영 · 이운실\*

이화여자대학교 약학대학, \* 원자력병원 암병리 연구실

### Cytotoxicity of Folkloric Medicine in Murine and Human Cancer Cells

Ihn Rhan Lee, Ji Young Song and Yun Si Lee\*

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750 and

\*Laboratory of Cancer Pathology, Korea Cancer Center Hospital, Seoul 139-240, Korea

**Abstract**—The whole plants of *Selaginella tamariscina*, *Orostachycis japonicus*, the cortex of *Ulmus mandshurica*, and the wood of *Alnus japonica* have been used as folk medicine for treating cancer. The cytotoxic activity of these plants were tested using a colorimetric tetrazolium assay (MTT assay). *S. tamariscina* and *A. japonica* showed mild IC<sub>50</sub> value, comparing with *O. japonicus* and *U. mandshurica*. So, MeOH extracts of *S. tamariscina* and *A. japonica* were partitioned into CHCl<sub>3</sub>, EtOAc and n-BuOH, successively. The CHCl<sub>3</sub>, EtOAc and BuOH fractions of *S. tamariscina* and *A. japonica* showed low percent of survival against P388 and MKN45 cells respectively. To isolate active components, they were subjected to silica gel column chromatography. Compound I was obtained from EtOAc extracts of *S. tamariscina* and identified as amentoflavone by chemical and spectral analysis. Amentoflavone inhibited the survival of P388 cells dose dependently, while not clearly inhibited that of MKN45 cells.

**Keywords**—*Selaginella tamariscina* · MTT assay · P388 · MKN45 · amentoflavone

腫瘍은 새로운 성장(new+growth)이라는 뜻으로 세포학적으로 비정상적인 세포의 과다 증식으로 인하여 실질 장기, 유공 장기, 골격 및 피부 조직에 비정상 조직을 형성하는 질환으로 인류가 극복해야 할 난치병종의 하나이다. 암에 대한 치료법으로는 외과 처치, 방사선 요법, 화학 요법 및 면역요법 등이 활용되고 있으며 그 중에서도 화학 요법이 자주 응용되고 있지만 이들 약제는 암종에 대한 감수성의 차이, 치료후의 부작용, 재발 및 합병증등이 문제점으로 대두되고 있다. 따라서 새로운 형태의 암세포를 직접 살해할 수 있는 항암제 및 암세포에 저항할 수 있는 생체내의 여러가지 방어 기전 즉, 면역 기구를 강화 내지 조절시킴으로써 암을 치료 할 수 있는

생물학적 치료법의 개발이 요구되고 있다. 그러나 시험에 사용되고 있는 암세포는 murine leukemia cell이 주인데 반해 현재 암정복에 문제점이 되고 있는 것은 human solid tumor이고 murine leukemia cell에는 독성을 유발하나 human solid tumor에는 효과가 없는 물질이 대부분이므로 본 연구는 먼저 문헌적으로 암에 사용되었으리라 사료되는 식물 몇가지(권백, 와송, 유근피 및 적양목)를 대상으로하여 시험관내에서 MTT assay를 이용하여 murine tumor cell인 P388과 human solid tumor cell인 MKN45 암세포에 독성을 유발시킬 수 있는 식물을 검토하고 그 식물에서 암세포독성을 유발하는 성분을 분리하고자 시도하였다.

## 實驗方法

실험 재료 및 기기—권백 전초, 와송 전초, 느릅나무의 뿌리껍질, 오리나무의 수피를 상품으로 구입하였다. 용점은 microscope melting point (Fischer-Johns, U.S.A.)를 사용하여 측정하였으며 IR spectrum은 Bruker IFS 113V FT-IR spectrometer를 사용하여 KBr disc법으로 측정하였고, UV spectrum은 Shimadzu UV-visible recording spectrophotometer를, NMR은 Bruker AMX 500 spectrometer를 사용하였고 MS는 VG 70VSE를 사용하였다.

추출 및 분획—각 재료를 MeOH로 24시간씩 실온에서 3회 반복 추출하여 농축한 MeOH extract와 3차 증류수로 실온에서 24시간씩 3회 추출한 water extract, MeOH 추출물에 H<sub>2</sub>O를 가해 현탁시킨 후 CHCl<sub>3</sub>으로 추출하여 CHCl<sub>3</sub> extract를 얻었다. 각각의 추출물을 MeOH, H<sub>2</sub>O 혹은 dimethylsulfoxide(DMSO)로 원하는 농도로 맞추어 녹인 후, 3000 x G에서 30분간 원심 분리하여 gauze로 여과한 다음 laminar flow hood내에서 다시 0.22  $\mu$ m membrane filter로 여과한 것을 시료로 사용하여 암세포 살해능을 측정하였다. 이후 EtOAc, n-BuOH로 분획하여 각 분획물을 얻었다.

세포주 및 세포 배양—세포주는 화학 요법제나 천연물의 암세포 살해능을 측정하는 데 많이 쓰이는 murine leukemia cell line인 P388과 human gastric adenocarcinoma cell line인 MKN 45를 사용하였다. P388은 RPMI-1640 배지에 55°C로 30분간 열처리된 FBS(fetal bovine serum), 2mM L-glutamine, 100U/ml penicillin - 100  $\mu$ g/ml streptomycin, sodium pyruvate, MEM-non-essential amino acid, 2-mercaptoethanol 및 20mM-HEPES buffer를 첨가한 배양액으로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. MKN45는 RPMI-1640 배지에 55°C로 30분간 열처리된 10% FBS와 100U/ml penicillin-100  $\mu$ g/ml streptomycin을 첨가한 배양액으로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 각 세포는 성장 속도에 따라 1주에 2~3회씩 계대 배양하

였다.

MTT assay에 의한 암세포 살해능 측정—지수 성장기에 있는 P388 cell과 MKN45 cell을 단세포 부유액으로 만든 후 hemocytometer와 현미경을 이용하여 세포 농도를 측정하였으며, 이때 0.2% trypan blue 염색으로 세포 생존도가 95% 이상임을 확인하였다. 준비된 single cell suspension을 P388 cell의 경우  $1.5 \times 10^4$  cells/ml, MKN45 cell의 경우  $3.5 \times 10^4$  cells/ml이 되도록 농도를 맞추어 96-well flat-bottom microplate에 135  $\mu$ l씩 넣었다. 무균 여과된 각각의 시료를 RPMI-FCS로 5 mg/ml, 1 mg/ml, 200  $\mu$ g/ml이 되도록 희석한 후, well plate에 15  $\mu$ l씩 첨가한 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 4일간 배양하였다. 대조군으로는 RPMI-FCS 배양액 15  $\mu$ l를 사용하였다. 4일 후 꺼내어 준비해 두었던 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, USA] 용액을 한 well당 15  $\mu$ l씩 넣은 후 다시 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 4시간동안 배양하였다. MTT로 처리한 조직 배양판을 꺼낸 후 0.04N HCl-isopropanol을 150  $\mu$ l씩 각 well에 넣고 강한 pipetting으로 formazan 결정들을 용해시킨 후 Microplate reader (Titertek, Multiscan)를 사용하여 540 nm의 파장에서의 광학 농도(optical density)를 측정하였다. 한 농도에서의 실험은 3 well에서 측정하여 그 평균치를 구하였다. 본 실험에서 사용한 세포 농도 및 실험 조건은 각 cell line의 표준 곡선과 성장곡선을 근거로 하여 결정하였다. 암세포 살해능은 대조군의 광학 농도에 대한 실험군의 광학 농도의 비율을 구하여 생존율(percent survival)로 표시하였다.

Percent survival (%)

$$= \frac{\text{Optical density of sample}}{\text{Optical density of control}} \times 100$$

물질의 분리—권백의 EtOAc 분획을 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (gradient elution) 용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 CHCl<sub>3</sub>:MeOH=10:1에서 compound I을 분리해냈다. CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O=4:1:0.1의 전기 용매로 thin layer chromatography한 결과 Rf=0.5의 반점이 육안으로 노란색을 띠었으며, UV lamp의 long wave(365

nm)에서 보라색으로 보이며, short wave(254 nm)에서도 관찰됐다. Vanillin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>나 anisaldehyde-sulphuric acid를 분무한 후 가열하였을 때 노란색이 조금 더 진하게 발색됐다. Pb(OAc)<sub>2</sub>액에 황색 침전, 1% FeCl<sub>3</sub>시액에 적갈색 침전, Shinoda 반응에서 황적색을 나타냈다. Compound I (mp>300°C)은 orange yellow crystal로 문헌상의 각종 spectral data와 비교 분석한 결과 amentoflavone과 일치하였고 authentic sample과 같은 Rf치를 나타내었다.

UV, λ<sub>max</sub>(MeOH) : 269, 333nm; λ<sub>max</sub>(MeOH+NaOAc) : 269, 283↑, 334↑; IR, ν<sub>max</sub><sup>KBr</sup> : 3416 (broad, OH), 2978, 2924, 2853, 1651 (conjugated C=O), 1575, 1461, 1358, 1170, 1121cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ : 6.24 (2H, dd, J=1.8, 14.6Hz, A-6 & A-8), 6.42 (1H, s, D-6'), 6.71 (1H, s, C-3), 6.76 (1H, s, F-3'), 6.78 (2H, d, J=8.9Hz, E-3''' & 5'''), 7.26 (1H, d, J=8.9Hz, B-5''), 7.84 (2H, d, J=8.7Hz, E-2''' & 6'''), 8.05 (1H, dd, J=2.2, 8.6Hz, B-6''), 8.45 (1H, d, J=2.2Hz, B-2'').

### 結果 및 考察

본 연구는 전해 내려오는 민간 치료제중 암 등에 사용되었을 것으로 추정되는 권백, 와송, 느릅나무, 오리나무를 대상으로 MTT test를 이용하여 암세포 살해능을 검색하기 위하여 수행하였다. MTT 검사는 최근 Mosmann<sup>1)</sup>에 의해

개발된 colorimetric tetrazolium assay인데 짧은 배양기간 때문에 암세포 성장억제 효과보다는 암세포 살해능이 주로 측정되며 환자의 종양표본을 가지고 직접 검사하기 힘들다는 단점이 있으나 조작이 비교적 간편하고 짧은 기간내에 실시할 수 있으며 반자동적으로 객관적인 결과를 얻을 수 있다는 장점이 있어 요즘 암의 기초 연구에 많이 쓰이고 있다.<sup>2,3)</sup>

권백은 脾咽癌, 肝癌, 肺癌, 骨關節痛, 악성포도체 같은 종양에 탁효를 나타내며<sup>4)</sup>, 와송은 일명 向天草라 하여 口腔 순설암, 식도암, 분문암, 치조암, 폐암, 위암, 폐결핵의 치료에 좋다고 한다.<sup>4,5)</sup> 또한 유근피는 간암 및 각종 종창과 脾胃 結核에 매우 좋은 약으로 浮腫, 水腫 등 악성 종양과 등창, 후발종, 견창, 둔종, 陰囊腫 등 각종 瘤腫의 靈藥이라고 되어 있으며<sup>6,7)</sup> 적양목은 胃癌 치료에 주로 사용한다고 한다.<sup>6,7)</sup>

권백, 와송, 유근피, 적양목에 대한 MTT assay 실험 결과는 Table I과 같다. Table I에서 보면 P388 cell line일 경우, 와송과 유근피는 200 μg/ml에서 MeOH 분획일 때 각각 88.13%, 63.46%를, H<sub>2</sub>O 분획일 때 97.96%, 82.30%의 생존율을 나타냈으므로 거의 암세포 살해능이 관찰되지 않았다. Human cancer cell인 MKN45의 경우는 암세포 생존율이 더 높은 경향을 나타내므로 이후의 실험에서는 제외시켰다. 권백과 적양목의 경우 200 μg/ml에서 MeOH 분획은 4.45%, 5.91% (P388 cells) 및 26.67%, 51.78% (MKN45 cells)로 H<sub>2</sub>O분획의 107.7%

Table I. Cytotoxicity of *S. tamariscina*, *O. japonicus*, *U. mandshirica* and *A. japonica* on P388 and MKN45 cells

Cell line	Sample Dose	Percent survival (%)							
		<i>S. tamariscina</i>		<i>O. japonicus</i>		<i>U. mandshirica</i>		<i>A. japonica</i>	
		MeOH Ext	H <sub>2</sub> O Ext	MeOH Ext	H <sub>2</sub> O Ext	MeOH Ext	H <sub>2</sub> O Ext	MeOH Ext	H <sub>2</sub> O Ext
P388	200 μg/ml	4.45	107.70	88.13	97.96	63.46	82.30	5.91	28.22
	1 mg/ml	5.02	111.50	14.48	14.48	10.24	98.41	10.52	6.53
	5 mg/ml	15.25	76.79	28.79	28.76	7.22	110.03	34.30	6.24
MKN45	200 μg/ml	26.67	114.11	86.74	65.89	74.73	100.16	51.78	53.41
	1 mg/ml	10.23	102.87	23.88	47.05	33.26	92.71	19.15	45.43
	5 mg/ml	33.80	80.08	50.31	36.36	39.85	84.34	56.36	26.28

Table II. Cytotoxicity of each fraction from *S. tamariscina* and *A. japonica* on P388 and MKN45 cells

<i>S. tamariscina</i> ( $\mu\text{g/ml}$ )	Percent survival(%)		<i>A. japonica</i> ( $\mu\text{g/ml}$ )	Percent survival(%)			
	P 388	MKN45		P 388	MKN45		
MeOH Ext.	1	97.00	93.76	MeOH Ext.	1	90.17	81.79
	10	96.93	78.93		10	90.32	62.00
	100	85.71	71.13		100	52.58	58.30
CHCl <sub>3</sub> Ext.	1	89.78	78.53	CHCl <sub>3</sub> Ext.	1	85.71	90.71
	10	88.94	55.21		10	94.36	104.19
	100	17.74	35.74		100	15.71	36.91
EtOAc Ext.	1	84.53	65.86	EtOAc Ext.	1	85.87	94.43
	10	94.42	61.16		10	81.15	83.08
	100	86.33	17.73		100	19.92	35.50
BuOH Ext.	1	94.16	89.40	BuOH Ext.	1	95.19	98.83
	10	84.75	44.09		10	94.93	91.13
	100	26.57	29.25		100	17.67	46.86
H <sub>2</sub> O Ext.	1	88.06	49.46	H <sub>2</sub> O Ext.	1	99.08	98.83
	10	86.90	57.42		10	103.49	112.91
	100	84.33	65.26		100	125.85	93.79

및 28.22% (P388 cells) 및 114.1%, 53.41% (MKN45 cells)에 비해 상대적 암세포 살해능이 크다는 것을 알 수 있었다. 농도가 높아짐에 따라 percent survival이 증가하는 경우가 있는데 이는 높은 농도에서 배양액에 불용성물질 또는 추출액 자체의 색깔에 의한 것으로 사료된다. 이에 MeOH 분획을 계통적으로 분획하여 세포 살해능을 검색하고자 1차적으로 MeOH층을 CHCl<sub>3</sub>으로 추출한 층을 좀 더 낮은 농도로 serial dilution 하여 MTT assay를 실시하였다. 권백과 적양목의 암세포 살해능은 human cancer cell인 MKN45 보다는 mouse cancer cell인 P388에 대해 보다 우수함을 보였다. CHCl<sub>3</sub>층을 취하고 남은 부분을 EtOAc, n-BuOH로 순차적으로 추출한 후 각 분획별로 MTT assay를 실시하였다(Table II). 권백의 각 분획의 100  $\mu\text{g/ml}$ 을 기준으로 하여 볼 때 P388 cell의 경우 CHCl<sub>3</sub>층은 17.74%, EtOAc층은 36.33%, BuOH층은 26.57%를 나타냈으며 MKN45 cell의 생존율도 EtOAc층은 17.73%를 보였다. 적양목은 P388 cell의 경우, CHCl<sub>3</sub>층은 15.71%/100  $\mu\text{g/ml}$ , EtOAc층은 19.

92%/100  $\mu\text{g/ml}$ , BuOH 층은 17.67%/100  $\mu\text{g/ml}$ 이었다. MKN45 cell에 대한 암세포 살해능은 CHCl<sub>3</sub>층, EtOAc층, BuOH층이 거의 유사했다. 50%의 inhibition을 나타내는 농도(IC<sub>50</sub>)를 살펴 보면, 권백은 P388 cell에 대해 CHCl<sub>3</sub>층 35  $\mu\text{g/ml}$ , EtOAc층 58  $\mu\text{g/ml}$ , BuOH층 38  $\mu\text{g/ml}$ 이며 MKN45 cell에 대해 CHCl<sub>3</sub>층 18  $\mu\text{g/ml}$ , EtOAc층 20  $\mu\text{g/ml}$ 이며, BuOH층 7.7  $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다. 적양목은 P388 cell에 대해 CHCl<sub>3</sub>층 37  $\mu\text{g/ml}$ , EtOAc층 33  $\mu\text{g/ml}$ , BuOH층 39  $\mu\text{g/ml}$ 이며, MKN45 cell 경우 각각 64  $\mu\text{g/ml}$ , 59  $\mu\text{g/ml}$ , 83  $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 그러나, 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서의 암세포 생존율이 P388 cell일 때 권백은 CHCl<sub>3</sub>층, 적양목은 EtOAc층이, MKN45 cell일 경우는 둘 다 EtOAc분획이 가장 낮았다.

먼저 EtOAc층에서 암세포에 독성을 나타내는 물질을 분리하고자 컬럼 크로마토그래피등을 실시하였으며 mp 300°C 이상의 등황색결정인 compound I을 분리하였다. 이 물질은 알콜에 잘 용해되었으며 vanillin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>나 anisaldehyde-sulphuric acid를 분무한 후 가열하였을 때 노란

**Table III.** Cytotoxicity of amentoflavone on P388 and MKN45 cells

Dose( $\mu\text{g/ml}$ )	Cell line	
	P388	MKN45
	Percent survival (%)	Percent survival (%)
0.5	111.02	83.50
5	96.94	102.20
50	37.78	115.70
500	5.91	15.79

색이 조금 더 진하게 발색되었고  $\text{Pb}(\text{OAc})_2$ 액에 황색 침전, 1%  $\text{FeCl}_3$ 시액에 적갈색 침전, Shinoda 반응에서 황적색을 나타냈다. 또한 UV, IR, NMR 및 mass spectrum의 결과를 분석한 결과 compound I이 amentoflavone으로 추정할 수 있었으며 이는 amentoflavone 표준과 같이 TLC 하였을 때 같은 Rf치를 나타내어 compound I을 amentoflavone으로 동정하였다. Amentoflavone의 MTT assay 결과에 나타난 바와 같이 P388 cell line일 경우  $\text{IC}_{50}$  20  $\mu\text{g/ml}$ 로 세포 생존율을 억제하였으나 MKN45 cell line에는 유의적인 결과를 얻지 못하였다. 따라서 권백의 P388과 MKN45 세포에 독성을 나타내는 물질이 amentoflavone이 아닐 수 있는 가능성이 있다고 사료되며 amentoflavone외에 EtOAc층의 다른 물질들을 계속 분리하고 아울러 암세포독성을 비교적 강하게 나타낸  $\text{CHCl}_3$ 분획의 물질을 연구하여 권백의 암세포 독성을 나타내는 물질을 정확히 밝힐 필요가 있겠으며 이와 함께 *in vivo* 항종양 실험도 병행해야 하리라 사료된다.

### 結 論

민간에서 항암의 목적으로 사용되었던 권백, 와송, 유근피, 적양목을 대상으로 그 암세포 살해능을 MTT assay로 검색한 결과 와송, 유근피의 경우 유의적인 결과를 얻지 못했다. 권백, 적양목의 경우는 수침 분획보다 MeOH 분획이 높은 암세포 살해능을 보였으며 이에  $\text{CHCl}_3$ , EtOAc, n-BuOH순으로 분획화하여 재검색하였을 때, 세 분획층이 거의 유사한 살해능을 보였다. 또한 전반적으로 human cell인 MKN45 보다는 mouse cell인 P388의 생존율이

더 강하게 억제되었음을 알 수 있었다. 권백의 EtOAc분획에서 단리한 compound I은 orange yellow의 결정으로 flavonoid에 특이적인 반응에 양성을 나타냈으며, 각종 spectral data, authentic sample과의 TLC결과로부터 amentoflavone임을 확인하였다. Amentoflavone의 세포살해능 실험결과 ( $\text{IC}_{50}=20 \mu\text{g/ml}$ ) mouse cancer cell에서만 유의적인 결과를 얻을 수 있었다. 본 실험에서는 확립된 세포주를 대상으로 하였는데 이는 화학요법에 비교적 저항성이 높으며 한 가지 세포주(MKN45)에 대한 실험의 결과로서 임상적인 의미를 부여하기는 어렵다는 단점을 가지고 있으며 천연물엑스의 경우 정확히 어느 정도의  $\text{IC}_{50}$ 가 암세포 살상력이 있는가에 대해서도 명확하게 논하기는 어렵다. 또한 MTT방법에 의한 시험관내 실험의 결과를 실제 임상에 적용시켰을 때 어느 정도의 상관관계를 보일 것인가에 대해서도 MTT방법의 결과를 기초로 항암화학요법을 실시한 임상보고가 아직 없어 예측하기 어렵다. 이에 우선 좀더 많은 세포주를 가지고 시험관내 실험을 하거나 마우스를 사용한 생체내 실험 과정을 거쳐야 할 것이며 그 기전을 정확히 규명하는 것도 앞으로 해결해야 할 중요한 과제의 하나로 생각된다.

**감사의 말씀 :** 이 연구는 1991년도 학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조정비의 지원에 의하여 연구되었음을 감사드립니다.

(1992년 6월 25일 접수 : 7월 29일 수리)

### 文 獻

1. Mosmann, T.: *J. Immunol. Method* 65, 55 (1983).
2. Camichael, J., Degraff, W.G., Gazdar A.F., Minna, J.D. and Mitchell, J.B.: *Cancer Research* 47, 936 (1987).
3. 박재갑, 권오중, 김선희, 김진복, 함수, 한문희 : 대한 암학회지 19, 68 (1987).
4. 상민의 編著, 김철수 역주 : 抗癌本草, 바람과물결, p. 252 (1992).
5. 金一勲 : 神藥, 나무, p. 65 (1986).
6. 文化放送 編著 : 韓國民間療法大會, p. 28 (1987).
7. 鄭普燮, 金一赫, 金在佶 : 原色天然藥物大事典, 南山堂, p. 34 (1984).