

단삼의 L1210 세포에 대한 세포 독성의 연구

CYTOTOXIC EFFECT OF SALVIA MILTIORRHIZA ROOT AGAINST L1210 CELL

선 중 기, 신 민 교*

I. 緒 論

천연 약물은 예로부터 동서양을 막론하고 항암제로 사용해 왔다. 한방과 민간에서 쓰이는 항암 성분을 가진 생약에서 항암 약품을 개발하려는 시도의 일환으로 L1210세포의 세포 독성 물질을 발견하여 항암약품을 개발하기 위한 기초 물질이 될 수 있다고 보며, 한편 과학적 측면에서는 항암 작용 물질이 밝혀지지 않고 있는 생약에 대한 보다 더 구체적인 연구를 행한다는 것은 뜻있는 일이 될 것이다.

Hartwell 등¹⁾은 민간에서 사용되는 항암 식물 226종을 대상으로 스크리닝을 행하였던 바, 그중 19.9%에 해당하는 생약이 유효하다고 보고하였다.

국내에서 얻을 수 있는 한약재 또는 민간 약에 대한 항암성 실험을 행한 보고도 있다. 장등²⁾은 34종의 생약을 선택하여 AC glioma에 대한 항암성 및 세포 독성을 관찰하였던 바, 사용한 식물중 독활, 구기자, 음양곽, 길경, 황금, 대황 및 적하수오가 유의할 만한 항암 작용을 나타낸다고 하였으나 뚜렷한 세포 독성을 나타내는 것은 없

다고 하였다. 한편 유등³⁾은 42종의 생약중 L1210세포의 세포 독성을 관찰한 바 인삼, 황금, 황련, 황백, 지각, 계피등은 양호한 세포 독성을 보인다고 보고 하였고, 이등⁴⁾은 국내에서 얻을 수 있는 생약 30여종을 사용하여 L1210세포에 대한 세포 독성을 스크리닝한 바 있다. 이등⁴⁾의 보고에 의하면 자근, 선학초, 울금, 천문동, 팔투인, 팔투근, 금은화, 견우자, 단삼, 철피, 한련초, 고목, 지실, 인삼잎, 홍삼, 목백합, 회침 등에서 유의한 효과가 있는 것으로 보고 되었다. 이등⁴⁾이 세포 독성을 시험한 생약 중 황금,^{5,6)} 인삼^{7,8,9,10)} 자근,¹¹⁾ 울금,¹²⁾ 팔투근,⁴⁾ 회침,¹³⁾ 등으로부터 세포 독성 물질이 분리된 바 있다.

본 실험은 이등⁴⁾의 스크리닝에서 효과가 양호하다고 생각되는 단삼(*Salvia Miltiorrhiza* Bunge)을 연구 대상으로 하였다. 단삼은 한방에서 활혈거어, 안신영심, 배농, 지통의 효능이 있고, 심교통, 월경부조, 통경, 경폐, 혈붕대하, 징하적취, 혈어복통, 골절동통, 양계불면, 악창종독, 등의 치료에 사용되며¹⁴⁾ 또 동물 실험결과¹⁵⁾에서 이 생약은 말초 혈관 확장작용과 혈압 강하 작용을 보였고 포도상구균 및 결핵균에 대하

* 전주 우석대학 교수

** 원광대학교 교수

여도 강한 항균 작용을 나타낸다고 보고되었다.¹⁵⁾ 단삼으로부터 분리된 색소 성분으로는 tansionone I, II, Cryptotanshinone, mitron 등이¹⁴⁾ 있다. 이와같이 문헌적 고찰로부터 미루어 볼 때 Salvia 속 식물 전반에 대하여 항암성 스크리닝을 행할 필요가 있다고 생각된다.

저자들은 단삼에서 세포 독성을 나타내는 물질을 보다 더 구체적인 연구를 하고자 하여 용미분획과 TLC 분획을 하여 L1210세포에 대한 세포독성을 측정하여 얻은 몇 가지 사실을 여기에 보고한다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) L1210세포 및 배양액

L1210세포는 Fischer 씨 배양액에서 1주일 2회, 동시에 BDFI 마우스 복강내에서 1주일에 1회 계대배양하여 유지하였다. 배양액은 3차증류수에 한봉지의 Fischer 씨 배지, 100ml의 말 혈청, 1.25g의 중조, 10만 단위의 페니실린, 100ml의 스트렙토마이신을 가한 후 0.1N의 염산으로 PH7.2가 되게 조정하고 전량이 1리터 되게 한 것이다. 이를 세균여과하여 냉장고에 보관하면서 사용하였다.

2) 약재

단삼(*Salvia miltiorrhiza*의 근경)은 대전시내 소재 중도건설상 으로부터 구입하였고 육안 및 현미경으로 확인하였다.

3) 시약 및 기기

실험에 사용한 용매류는 국내외의 일급시

약을 사용하였고, 공업용 용매를 사용할 경우에는 3차증류하여 정확한 비점을 보이는 분획만 취하여 사용하였다. Silica gel 60(70~230mesh), precoated silica gel plate, silica gel GF254는 모두 Merk 사 제품이었다. 시약류는 일급(GR, EP)을 사용하였다. UV-spectrophotometer는 Pye Unicam사의 PU-8800이었다. (Table. 1)

2. 실험방법

1) L1210세포의 배양 조제

재료항(1의 1)에서 조제한 배지를 Screw capped tube 및 250ml Screw capped Erlenmeyer 후라스크에 넣고 여기에 L1210 세포를 가한 다음 37도씨의 탄산 가스 Incubator에 넣어 배양한다.

2) 세포독성 실험

2의 1)에서 24시간 배양한 후, Screw capped 후라스크 내에 세균 농도를 $2\sim 3 \times 10^5$ Cells/ml가 되게 조정한다. 이 때 회석에 사용한 배지는 미리 37도씨로 가온한 것을 사용한다. 이를 다시 24시간 배양시켜서 logarythmic phase에 있는 L1210세포를 얻는다. 이 때의 세포 농도는 $0.8\sim 1.0 \times 10^5$ Cells/ml에 달하게 된다. 실험 직전에 이를 배지로 회석하여 세포 농도 5×10^4 Cells/ml가 되게 한다.

이 배양액 0.9ml와 시료용액 0.1ml를 섞은 다음 이 액 일정량씩을 덜어내어 각각 두 개씩의 screw capped tube에 가한다. 이들 각 시험관 내에 위에서 만든 세포현탁액 5ml씩을 가한다. 대조군은 시료를 제외

하는 일 외에는 모두 같은 조작으로 만든다. 이들을 37도씨의 탄산 가스 배양기에서 48시간 배양한 다음 hemacytometer 로 세포수를 계산한다. 시료의 양은 예비 실험으로 정한다. 계산된 양의 시료를 에탄올 또는 DMSO 에 녹여 용액으로 만든다. 이들 용매의 L1210세포에 대한 영향을 말하면 에탄올은 0.2%까지의 농도에서 독성을 나타내지 않았다. 본 실험의 배양액에 포함된 에탄올 농도는 0.02%이하 이므로 L1210세포에 대한 에탄올의 영향은 전무하다고 할 수 있다.

Dimethylsulfoxide -2 Ex/
mg 을 溶媒

3) 시료용액의 조제

석유 에테르액기스 10ml 를 에탄올 1ml 에 용해시킨 것으로서 시료용액으로 한다.

3. 단삼으로부터 세포 독성 물질의 분획

단삼 500g 을 3리터 크기의 추출기에 넣은 다음 시약급 메탄올 1.5리터를 가하고 2시간 동안 환류한 다음 여과하고 잔사를 2~3회 세척하였다. 잔사를 위와 같은 방법으로 2~3회 반복 추출하여 합한 여액을 rotary evaporator 에서 감압 농축하여 적갈색의 잔유물을 얻었다. 이 잔유물에 증류수 500ml 를 가하여 현탁시킨 후 분액 여두에서 석유 에테르를 0.5ml 씩으로 24시간마다 3회 추출한다. 추출 후 석유 에테르와 물층을 나누고 석유 에테르층은 농축하여 저장한다. 물층은 rotary evaporator 에 넣고 잔유하는 석유 에테르를 제거한 다음 다시 percolator 에 가한다. 같은 방법으로

에테르, 초산에칠 순으로 추출한다.

III. 결과 및 고찰

단삼을 에탄올로 추출하여 에탄올 액기스를 얻고 이 액기스를 물에 현탁시킨 다음 석유 에테르, 에테르, 초산 에칠로 차례차례 추출한 후 남은 물층과 더불어 건조한다. 그리고 이들 각 분획의 L1210세포에 대한 세포독성을 측정하였다. 그 결과를 Table 1에 종합하였다. Table 1을 보면 석유 에테르 분획으로 조제한 시료의 농도 20ml/ml(100ml 시료에 해당)에서는 L1210 세포가 모두 사멸하였다. 이 농도를 2배로 희석하여도 세포 독성은 매우 강함을 사멸하였다. 이 농도를 2배로 희석하여도 세포 독성은 매우 강함을 알 수 있다. (생존 평균 세포수=0.2개) 이것은 석유 에테르 분획에 함유되어 있는 세포 독성 물질의 활성이 매우 강함을 의미한다.

석유 에테르로 추출하고 남은 물층을 극성이 비교적 높은 에테르로 추출하여 에테르 분획을 얻었다. 에테르 분획도 강한 세포 독성을 보이고 있다. (100ul 에서 0.2개의 세포)

초산 에칠 분획 및 물 분획은 사실상 독성 효과를 보이지 않고 있다. 물층과 초산 에칠층이 활성을 보이지 않는다는 것은 세포 독성 물질의 극성이 매우 낮음을 뜻한다. 한편 석유 에테르 층과 에테르 층이 동시에 강한 활성을 나타내는 것을 보면 세포 독성 물질은 한개 이상일 가능성이 있다. 말하자면 석유 에테르 층에 용출되는 비극

성인 것과 에테르층에 용출되는 보다 극성이 큰 세포 독성 물질이 존재할 수 있다.

석유 에테르 층의 활성 물질을 분획한 목적으로 preparative silica gel acetone(9, 5:0.5)에 용해시키고 이것을 두께 약 1 mm의 TLC 판의 하부에 loading 하고 같은 용매가 들어 있는 TLC chamber에서 loading 선으로부터 10cm가 될 때까지 전개시켰다.

전개된 TLC를 육안과 UV 하에서 관찰하면 여러 가지 색상을 지닌 물질 대가 나타난다. 이 때 분획은 이 물질대에 따라서 행하였다(fig 1참조).

이들 물질대를 끊어내어 에탄올로 추출한 다음 에탄올은 증발시키고 남은 부분을 석유 에테르 엑기스 때와 마찬가지로 세포 독성을 측정하였다. 이렇게 하여 얻은 TLC 분획의 세포 독성을 Table II에 기록하였다.

Table II를 보면 우선 분획 I, II, III 및 IV는 모두 세포 독성을 보이고 있음을 알 수 있다. 처음 TLC에 Loading 한 양이 1 ml 용매중 15mg의 물질이 들어 있도록 조정하여 농도를 대폭 증가시켰음에도 불구하고 이들 각 분획의 활성은 모두 분획 이전의 석유 에테르 엑기스(20mg/ml 농도)의 그것에 비해서 훨씬 약함을 읽을 수 있다.

이와 같은 사실로 미루어 볼 때 석유 에테르 엑기스 중에는 이들 활성 물질의 작용을 강화시키는 작용 강화 물질이 함유되어 있다고 결론지을 수 있다. 이 작용 강화 물질이 위의 활성 분획 중의 하나일 수도 있고, 세포 독성을 보이지 않으면서 활성 물

질의 작용만 상승시키는 물질일 수도 있을 것이다.

가장 강한 세포 독성을 보이는 분획 IV에 함유되어 있는 주 물질이 어떠한 천연 물질군에 속하는가를 알아보기 위하여 그의 자외선 스펙트럼을 만들었다. 이 물질의 UV-maxima는 207nm, 230nm(sh) 및 272nm이고, 272nm의 강도가 다른 것보다 낮은 것으로 보아 Flavanone계 물질일 것으로 추측된다.

Table I.

용매분획		
Solvent	100ml	50ml
Petr. ether	0	0.2
Ethyl ether	0.2	3.7
Ethyl acetate	35.1	37.2
Water	41.9	42.0
control	43.0	

* Cytotoxic activities of the solvent fractions of salvia miltiorrhiza root.

Table II.

TLC 분획		
fraction	100ml	50ml
control	48.3	
petroleum ether	0.5	29.7
I	1.3	37.1

II	7.1	26.1
III	16.8	30.1
IV	1.2	20.1
V	30.9	45.7

VI	23.2	27.2
----	------	------

* Cytotoxic activities of the petroleum ether fraction of salvia miltiorrhiza root.

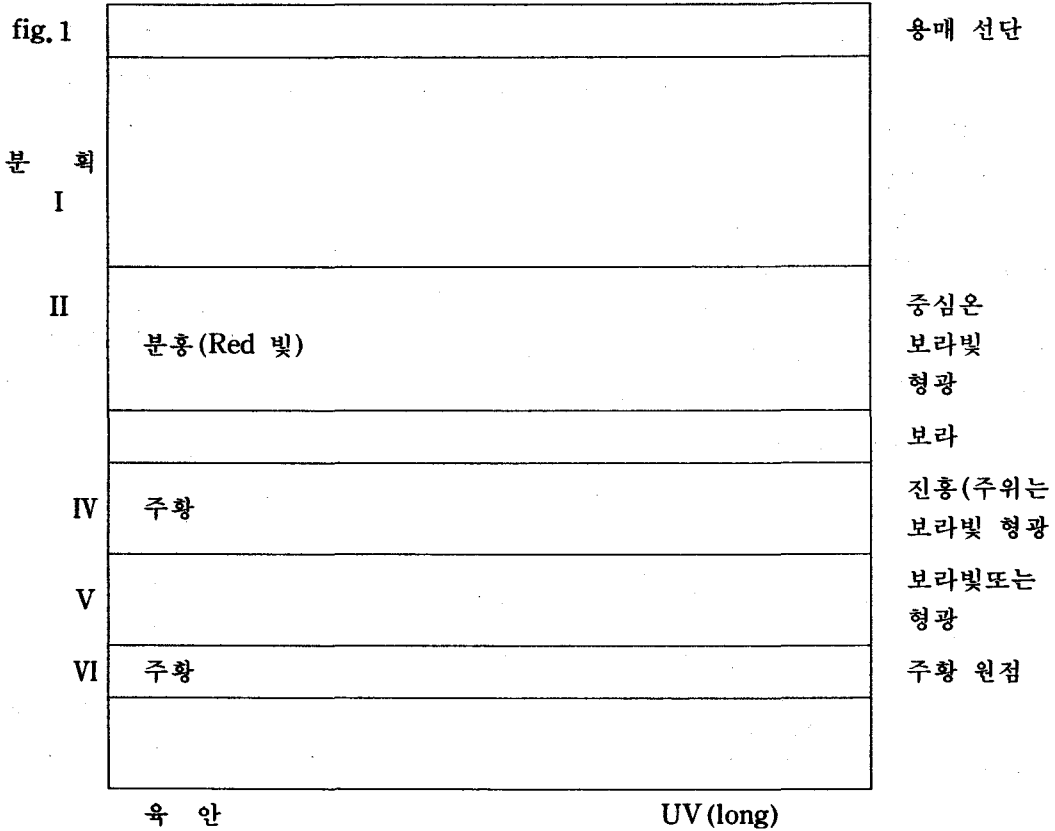


fig.1 Fractoination of petroleum ether Ex, on Silicagel TLC Solvent : n-hexane/acetone(9.5 : 0.5)

참 고 문 헌

1. J. L. : Plants used against cancer
Lloydia 30, 379(1967) and 34,
386(1971).

2. 장일무, 지형준 : 한국산 성약의 약리작용 및 독성 연구(3) —세포 독성 및 Glioma(9ASK)에 대한 항암 작용, 생약 학회지, 13, 55—61(1982).

3. Ryu, S.H., Moon, K.H. and

- pack, M. Y. : Kor. J. Appl. Microbiol. Bioen., 10, 53(1982).
4. Lee, Y.H., Kang, S.K. and B.Z. Ahn. : Antitumor Activity of trichosanthes Kirillowii and Lizio and s-180 tumors, Yakhak Haeji 30 163-168(1986).
 5. Ryu, S.H., B.Z.Ahn and pack, M. Y. : Planta medica 355(1985).
 6. Ryu, S.H., B.Z.Ahn and pack, M. Y. : The cytotoxic principle of scutellariae Radix against L1210 cell, planta Medica 355(1985).
 7. Hwang, W.L. and cha, S.M. : in "proc. of 2nd International Ginseng symposium 1978" Publ. by Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon 300-31, Korea, pp. 43-49.
 8. Woo, L.K., Nakamura, Y, and Donat, L. : Arch. Ital. Patol. Coin, Tumori. 8, 53-63(1965).
 9. Oura, H., Hiai, S., Odaka, Y. and Naetan, A : The 9th Herb Medicine symposium pp.34.
 10. Gong, T.H. and Lee, W.Y. : Archives of Dong Kuk university 18, 221(1979).
 11. Sankawa, U., Ebizuka, T., Miyajaki, T., osomura, Y., Otsuka, H., Shibata, s., Inomata, M., Fukuoka, F. : Antitumor Activity of shokonin and its derivatives, chem. Pharm. Bull. 25, 2392(1977).
 12. 이정형 : L1210 및 S-180압에 작용하는 울금의 항암 성분 및 작용 강화물질에 관한 연구 충남대학교 대학원 석사논문(1987).
 13. 김선희 : 회침의 L1210세포에 대한 항암 성분에 관한 연구, 충남대학교 대학원 석사논문(1988).
 14. Jiangssushineishuyiec, "Encyclopedia of Chinese Raw Druge" Hong Kong, Ssangwuingugwan, pp. 478-482(1977).
 15. 육창수의 5인 : 한약의 약리, 성분, 임상응용, 서울, 계축문화사 615-616(1982).

ABSTRACT

SHIN, MIN KYO, O.M.D., ph.D.
Dept. of Oriental Medicine, School of
Oriental Medicine, Won Kwang Univer-

sity, Iri, Korea
SUN, JUNG KEY.
Dept. of Oriental Medicine, Won

Kwang Universtiy,
 Iri, Korea

Solvent and TLC-fractionations of the root of *Salvia miltiorrhiza* have yielded the results as follows ;

Solvent fractions	100uL	50ul
Petr. ether	0	0.7
Ether	0.2	3.7
Ethyl acetate	35.1	37.2
Water	41.9	42.0
Control	43.0	

TLC-fractionation and the Cytotoxic activity		
Fractions	100uL	50uL
I	13.0	37.1
II	7.1	26.1
III	16.8	30.0
IV	1.2	20.1
V	30.9	45.7
VI	23.2	27.2
Petr. ether	0.5	29.7
Control	48.3	

Among the solvent fractions the petroleum ether fraction corresponding to the concentration of 20ug/ml has showed the strongest Cytotoxic activity. (no cell survived) A double dilution of the fraction(10ug/ml) still showed strong activity. (0.2 cells survived) The ether fraction contained strong activity. Of the fractions which have been obtained by a preparative silicagel TLC I, II, III & IV were cytotoxic, but V and VI were inactive However, it is worthwhile to note that no one of these has no strong Cytotoxicity as the petroleum ether fraction itself. This observation says that the active fractions could be additive or synergic to each other. The most active fraction, IV, was scratched out from the TLC and its UV-spectrum taken. The absorption maxima were 207 and 272 nm, indicating the presence of a flavanone structure.