

## 솔잎, *Pinus densiflora* Sieb.et Zucc.,의 抗癌效果에 대한 研究

文貞助·韓榮福·金鎮錫\*

實驗腫瘍研究所

建國大學校 畜產大學 獸醫學科\*

(1993년 9월 25일 접수)

### Studies on antitumor effects of pine needles, *Pinus densiflora* Sieb.et Zucc.

Jeong-jo Moon, Young-bok Han, Jin-suk Kim\*

Institute of Experimental Tumor

Department of Veterinary Medicine, College of Animal Husbandry, Konkuk University\*

(Received September 25, 1993 )

**Abstract** : The pine needles, *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc., which is a feed for goats showing a low incidence rate of cancer were evaluated to confirm the potent anticancer effects, with or without several conventional anticancer drugs. The pine needles collected from Mt. Buk-Han located near Seoul were extracted with 95% methanol and methanol and concentrated. From the methanol extract, SOM-A was extracted with dichloromethane and SOM-B was extracted with ethyl acetate. SOM-C was extracted with distilled water. These extracts were tested for their antitumor activities *in vitro* and *in vivo*. Among them, SOM-A and SOM-C exhibited potent antitumor activities described as follows.

1. The cytotoxic effects of SOM-A and SOM-C were examined against *in vitro* cultured murine and human tumor cells.

SOM-A showed strong cytotoxicity against human tumor cell lines and SOM-C showed strong cytotoxicity against murine tumor cell lines tested.

2. The antitumor effects of SOM-A and SOM-C were examined against P388 and L1210 of mouse ascitic tumors.

The highest mean survival time(MST) ration was 151%(P388) for SOM-C(90mg/kg).

3. To compare the antitumor effects of SOM-A, SOM-B, and SOM-C against solid tumors, S-180 and Ehrlich carcinoma were implanted subcutaneously to mice on Day 0. The drugs were given intraperitoneally to mice once a day on Days 1-20, and the tumor weights were measured on Day 21.

SOM-A showed inhibition of tumor growth more than 50% in the experiment on S-180 and Ehrlich, and SOM-C also markedly inhibited tumor growth. However, SOM-B had no effect.

4. SOM-C combined with  $\alpha$ -interferon and SOM-C combined with Mitomycin-C enhanced the antitumor activities against murine ascitic tumors P388 leukemia.

**Key words** : cytotoxicity, ascitic tumor, solid tumor.

## 서 론

지난 1950년대부터 미국 국립암연구소(National Cancer Institute)와 유럽 암연구 및 치료협의체(Euorpen Organization for Research and Treatment of Cancer)등과 같은 대표적인 암연구 기관들이 중심이 되어 항암제 개발을 위해 끊임없이 노력해 오고 있지만 아직도 암은 인류 최대의 난치병으로 남아 있는 실정이다.<sup>1,2</sup> 암연구의 큰 흐름은 암이 왜 발생하며 또 어떤 경로를 거쳐 전이되고 커 가는지에 대한 초기연구단계를 거쳐 최근에는 암을 일으키는 돌연변이발암유전자의 규명과 함께 이를 억제하는 여러가지 치료제 개발로 옮겨가고 있다.<sup>2,3</sup> 아울러 인체에 영향을 미치는 환경적 요인 즉, 식생활과 운동, 공해물질, 생활습관 그리고 지역적 특성 등과 발암과의 관계를 과학적으로 분석해 암을 일으키는 환경요인에 대한 최대공약수를 찾아내어 암의 예방과 치료에 이용하고자 노력하고 있다.

그와 같은 노력은 암발생과 성장에 관여하는 특정유전자에 결합해 이 유전자의 작용을 억제시키는 핵산의 개발<sup>1,2</sup>을 비롯하여 이미 개발된 펜토산(pentosan), 수라민(suramin) 등의 항체와 같이 성장인자에 특이적으로 결합해 성장인자의 작용을 억제함으로써 암세포의 성장을 억제시키는 새로운 항체의 개발<sup>1</sup>이나 세포의 성장에 관여하는 신호전달체계를 차단시키는 물질의 개발<sup>1</sup> 그리고 유방암 치료에 쓰이는 타목시펜(tamoxifen)과 같은 성장인자 억제유도물질 등이 개발<sup>1,2</sup>되어 실용화하게했다.

그러나 실질적으로 임상에서 평가되고 있는 좋은 항암제 즉, 정상세포에는 피해가 없으면서 암세포에만 선택적으로 피해를 준다든가 아니면 암유발 내지 촉진인자에 노출되었다 하더라도 발암이 되지않은 생체 스스로의 내성이 생기게 하는 등의 처방은 아직까지 개발되지 못하고 있다. 그래서 그와 같은 기대에 접근해가는 방법으로 생물활성 천연물, 그중에서도 식물에서의 유효성분을 찾아 항암제 개발에 나서는 것이 보다 현실적이라는 인식이 일본, 독일, 미국과 한국에서 본격적으로 나타나고 있다.<sup>4</sup> 그뿐만 아니라 식품성분과 암의 발생에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.<sup>1,4</sup>

특히 미국 국립암연구소(NCI)에서는 1993년부터 5개년 계획으로 암을 예방하는 식품개발에 적극적으로 추진하고 있다.<sup>4</sup>

물론 암과 식품과의 관계가 밝혀지고 효능이 큰 제조식품이 등장하게 되면 지금까지와는 전혀다른 새로운 의약식품산업이 창출될 것으로 보인다. 예를 들어 알콜의 대량섭취는 상부소화기관과 간에 암발생률을 높이

고, 고지방식이는 유암, 췌장암, 대장암, 직장암 등의 유발을 촉진시켜주지만 음식물내에는 비타민 A, C, E 등과 그 외의 많은 물질이 있어 암이 예방될 수도 있다는 논문이 여러나라에서 발표되고 있다.<sup>1,4</sup> 보통 식품중에는 14종류의 성분으로 구분되고 있는데 그중 대표적인 것은 황화물(sulfide), 플라보노이드(flavonoids), 인돌(indole), 카로티노이드(carotinoide), 트리테르펜(terpene), 리그닌(lignin) 등이다.<sup>1,4</sup> 이 물질들은 종양으로 발전하는 대사경로를 저해하거나 차단시키는 작용을 하므로 이러한 성분을 첨가함으로써 암예방이 어느 정도 가능하리라는 이론이다.<sup>4</sup>

이러한 연구와 이론을 기초로 해 볼때, 어떤식품이나 성분이 단일 또는 복합적으로 암에 대한 예방내지 치료작용이 있겠다는 믿음을 가지게 되었다.

그의 일환으로 실시된 자연발암률이 비교적 낮은 면양 및 산양의 먹이별 제암검색시험에서 술잎<sup>5,6</sup>에 의한 항암작용이 관찰되었다. 따라서 술잎을 서로다른 극성의 용매별로 추출하여 체계적인 항암효과시험을 실시해 그에 따른 결과를 보고하는 바이다. 물론 본 연구결과는 항암제로의 상품화와 새로이 도약하고 있는 의약식품산업의 창출에 기초자료가 될 수 있을 것으로 기대한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 :

1) 실험동물 : 고행암에 대한 검색시험에는 Clea Japan으로 부터 분양받아 실험종양연구소에서 25대이상 근교(近交)시킨 ICR계 마우스(♂, 5주령, 20±1g)를 사용하였다. 백혈병에 대한 효과는 BALB/C와 DBA/2의 교잡으로 얻은 1대 잡종으로서 유전적 분산이 작음 CD-F1(♀, 5주령, 20±1g)을 사용하여 조사하였다. 사육 및 실험조건은 온도 22±1℃, 습도 60±5%, 조명 150~300Lux, 소음 60 Phone이하, 취기 20ppm이하, 환기횟수 10~13회/시간 등 이었으며, 기자체와 깔집은 autoclave로 스팀멸균(121℃, 20~30)하여 사용하였다. 사료는 다우스용 실험동물 고행사료(제일사료)를 구입하여 방사선멸균(음영물산)하고 자유급수 시켰으며, 음수는 상수도물을 여과시키고 auto-clave로 스팀멸균(121℃, 20~30분)하여 자유급수 시켰다.

2) 실험암 세포주 : 본 연구에 사용된 시험관내 실험용으로는 미국의 American type culture collection(ATCC)로부터 분양받은 백혈병세포주 P388(ATCC NO. C-CL46)과 L1210(ATCC NO. CCL219) 그리고 서울대학교 의과대학 암연구소 SUN세포주 은행에서 분양받은 human유래 간암세포주 SK-HEP-1와 폐암세포주 3L.

L이 사용되었다.

3) 시료 및 약제 : 본 연구에서 시료로 사용한 솔잎은 서울시 종로구 평창동 북한산에서 1992년 6월 15일에 채취하여 당일추출 원재료로 사용했다. 기존의 항암제 Mitomycin-c(Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd),  $\alpha$ -interferon(한국녹십자 제약), Picibanil(일본중외제약)는 적용 범위가 넓고 개발과정에서 P388과 L1210암세포에 대한 시험평가를 거치게 되었고 또한 암환자들에게 널리 사용되고 있는 기존의 항암제들이다.

본 연구의 시약으로 사용된 Methanol은 Duksan Pharma Co. Ltd에서 Ethyl Acetate는 Chicago, Illinois ISC Co. Ltd에서 그리고 Dichloromethane은 일본 Junsei Chemical Co. Ltd에서 구입하여 사용했다. 기기로는 자동 혈구분석기인 Cell-dyn 800(Sequoiaturner Co., USA)과 광학현미경(Olympus)을 사용했다.

**실험방법 :**

1) 추출방법 : 채취한 솔잎 600g을 12시간 이내에 2cm 정도의 길이로 자른다음 첫단계의 용매인 6ℓ의 methanol 속에 넣어 상온에서 2주동안 추출한다. Buchner 깔때기와 aspirator를 이용해 흡인여과하고 감압농축장치에서 용매를 모두 제거한다. 상온이 되도록 식힌 다음, 증류수 200ml를 첨가해 충분히 용해시키고 분액깔때기로 옮겨 추가된 dichloromethane 200ml와 더불어 200회 이상 흔든 다음 24시간 정치시켜둔다. 분리된 2액층을 각각 수거하여 dichloromethane 추출액은 감압농축으로 용매를 모두 제거한 후 SOM-A시료로 하고, 나머지 증류수층액엔 ethyl acetate 200ml을 가해 200회 이상 흔들어 물질의 특성별 물질을 유도시킨 후 동일한 방법으로 정치시킨다. 그 다음날 분리된 2층의 물질을 수거한 후 각각의 감압농축장치에서 용매를 모두 제거하고 ethyl acetate extract는 SOM-B 그리고 증류수 extract는 SOM-C시료로 한다.

이상과 같은 방법으로 3종류의 시료를 얻게 되었는데 SOM-A=6.5g, SOM-B=2.1g 그리고 SOM-C=37g으로 반고형 물질들이다. 이 물질들을 각각 3차 증류수에 용해시킨 다음, PH7로 조절하고 무균처리된 membrane filter(0.22  $\mu$ m, Syrifil-MF, Nuclepore)를 통과시켜 최종 주사제로 사용했다.

**2) 시험관내 실험(in vitro tests) :**

(1) P388(마우스유래 백혈병세포주) : 배양액<sup>17,18</sup> : Dulbecco's modified Eagle's Medium with 4.5g/L glucose, 90%+horse serum, 10%(Gibco New York)에 Penicillin(50 units/ml)-SM(50  $\mu$ g/ml, Flow Laboratories, North Ryde, Australia)을 첨가한 배양액을 사용했다.

세포배양<sup>17~19</sup> : 위의 배양액 ml당 P388 세포주를 3×

10<sup>5</sup>개씩 각 well마다 접종하여 5% CO<sub>2</sub> 존재하의 37°C incubator에서 24시간동안 배양한다. 그후 시료를 2배수로 희석된 농도별로 넣어 2일동안 더 배양하고 4일째엔 각 Well(세포+약제+배지, 배지, 약제+배지)마다 MTT액<sup>7</sup>을 0.5mg/ml씩 넣어주어 MTT Assay<sup>7,10</sup>에 들어간다.

ID<sub>50</sub><sup>9</sup> : 세포주의 LD<sub>50</sub>치는 semi-logarithm지에서 y축을 생존률, x축을 추출약제의 농도로 하여 상관관계를 도식화 하였을 때 50%의 생존률을 나타내는 약제의 농도로 결정했다.

세포독성효과 판정<sup>11</sup> :

$$\text{Cytotoxicity}(\%) = \left(1 - \frac{\text{mean A}(\text{drug-treated})}{\text{mean A}(\text{nontreated})}\right) \times 100$$

\* A = 흡광도

(2) L1210(마우스유래 백혈병세포주) : Fischer medium, 90%+horse serum, 10%(Gibco, New York)에 penicillin(50 unit/ml) streptomycin(50  $\mu$ g/ml)이 첨가된 배양액을 사용했으며, 그의 배양과 제암효과분석 및 판정법은 P388 세포주와 동일하다.

(3) SK-HEP-1(Human 간암세포주)과 3LL(Human 폐암세포주) : RPMI 1640 medium, 90%+FBS, 10%(Gibco, New York)에 penicillin(50 unit/ml) streptomycin(50  $\mu$ g/ml)이 첨가된 배양액을 사용했으며, 그의 배양과 제암효과분석 및 판정법은 P388 세포주와 동일하다.

**3) 동물실험(in vivo tests) :**

(1) Ascitic tumors를 이용한 평가 : 본 실험에서 사용된 동물은 CDF1 마우스(♂, 21±1g, 5주령)로서 그룹별 6마리씩 사용했다. 시험방법으로는 CDF1 마우스의 복강내에 계대 접종된지(1×10<sup>8</sup>)10일만에 일회용 주사기(23Gx gauge/ml)를 이용하여 정상적인 세포주를 얻는다. 그와 같은 방법으로 얻은 P388 세포주는 마리당 1×10<sup>6</sup>, 그리고 L1210 세포주는 마리당 15×10<sup>5</sup>되게 복강내에 접종시키고 그후 24시간부터 대조군은 0.9% 생리식염수를 그리고 치료군은 시험물질을 1일 1회씩 7일간 복강내 주사한다.

제암효과 판정은 P388 및 L1210 세포주의 치사율이 대단히 높기 때문에 연명정도로서 제암효과를 판정하는데 다음과 같이 대조군에 대한 치료군의 백분율로 한다.<sup>11</sup>

$$\text{MST ratio}(\%) = \frac{\text{MST of T}}{\text{MST of C}} \times 100$$

\* MST=mean survival time

(2) Solid tumors를 이용한 평가 : 본 실험에서 사용된

동물은 ICR계 마우스(♂, 21±1g, 5주령)로서 그룹별 6마리씩 사용했다. 시험방법으로는 ICR계 마우스에 계대접종(1×10<sup>8</sup>)된지 7일만에 일회용 주사기(23Gx gauge/ml)를 이용하여 복강내에서 정상적인 각각의 세포주를 얻는다. 그와 같은 방법으로 얻은 S-180과 Ehrlich 세포주는 마리당 1×10<sup>7</sup>씩 좌측 복부의 피하에 각각 이식시킨다. 그후 24시간부터 대조군은 0.9%의 생리식염수를 그리고 치료군은 시험물질을 1일 1회씩 20일간 주사한다. 그리고 5일 간격으로 체중을 측정하여 물질에 대한 독성정도를 가늠하고 제암효과 판정시에도 참고로 한다.

제암효과의 판정은 먼저 외부에서 caliper를 이용해 고형화된 암종의 길이와 폭을 측정하여 길이에 폭의 제곱을 곱해서 2로 나눈다 [Tumor weight(mg)=1/2×a×b<sup>2</sup>(a=길이/mm, b=폭/mm)]. 이와같은 방법으로 구해진 값이 성장된 고형암의 무게인데 성장억제율은 다음과 같은 공식으로 구한다.<sup>11</sup>

$$\text{Growth inhibition (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Mean tumor weight T}}{\text{mean tumor weight C}}\right) \times 100$$

(3) SOM-C와 기존항암제의 상승효과 평가 : 본 실험에서는 앞에서 실시한 제암효력시험을 통해 알 수 있게 된 유효물질만을 택하게 되는데 SOM-C가 선정되었다. 이 물질은 백혈병, 위암, 간암 그리고 폐암을 적용중으로 비교적 널리 사용되고 있는 mitomycin-C, α-interferon, picibanil의 기존 항암제들과 아래와 같이 병용투여하여 약리적인 상호작용을 평가한다.<sup>12</sup>

- Mitomycin+SOM-C
- α-interferon+SOM-C
- Picibanil+SOM-C

본 실험에서 사용된 동물은 CDF1 마우스(♂, 21±1g, 5주령)로서 그룹별 6마리씩 사용했다. 시험방법으로는 CDF1 마우스에 계대접종(1×10<sup>8</sup>)된지 10일만에 일회용 주사기(23Gx gauge/ml)를 이용하여 정상적인 세포주를 각각 얻는다. 그와 같은 방법으로 얻은 P388 세포주는 마리당 1×10<sup>6</sup> 그리고 L1210 세포주는 마리당 1×10<sup>5</sup>되게 복강내에 접종시키고 그후 24시간부터 대조군은 0.9%의 생리식염수를 그리고 치료군은 시험물질을 1일 1회씩 7일간 복강내에 주사한다. 시험물질중 기존항암제의 투여농도 설정은 공급회사의 성인(60kg)기준 공시용량을 기초로해 사용동물의 무게에 따른 몫으로 한다.

제암효과판정은 P388 및 L1210 세포주의 치사율이 대단히 높기 때문에 연명정도로서 제암효과를 판정하는

데 다음과 같이 대조군에 대한 치료군의 백분율로 한다.<sup>11</sup>

$$\text{MST ratio (\%)} = \frac{\text{MST of T}}{\text{MST of C}} \times 100$$

(4) SOM-C에 대한 독성 스펙트럼 : 본 실험에서 사용된 동물은 DDY계 마우스(♀, 5주령, 20±1g)로서 급성독성시험에 25마리, 다단계 농도별 감수성시험에 22마리 그리고 체중변화 검사를 위한 대조군용으로 2마리를 사용했다. 시험방법으로는 급성독성시험법의 일부인 LD<sub>50</sub>측정법<sup>12</sup>에 따라 먼저 100%와 50% 치사율에 해당하는 농도를 구한다. 여기에서 얻는 독성정도를 기초로해 11단계별 농도를 설정하고 각각 복강내에 1회씩 투여한다. 투여후 7일동안 관찰하여 그 기간내에 죽게 되면 해당되는 농도를 중독사망으로 간주하고, 7일째에 측정된 체중변화가 대조군의 평균체중보다 다소라도 감소했을 때엔 Care zone, 같거나 증가되었을 때엔 Safety zone으로 하고 도표화 한다.

(5) SOM-C에 의한 혈액학적변화 검사 : 본 실험에 사용된 동물은 ICR계 마우스(♀, 5주령, 20±1g)로서 그룹별 3마리씩 사용했다. 사용방법으로는 SOM-C 물질의 항암작용 유효농도인 90mg/kg을 1일 1회씩 6일간 복강내에 투여하고 7일째에 경구탈구법에 의해 치사시킨 후 혈액채취용 모세관을 심장에 직접 삽입하여 채혈하였다. 검사는 채혈후 1시간 이내에 자동혈구분석기인 C11-dyn 800(Sequoiatuner Co., USA)에 의해 이루어졌다.

## 결 과

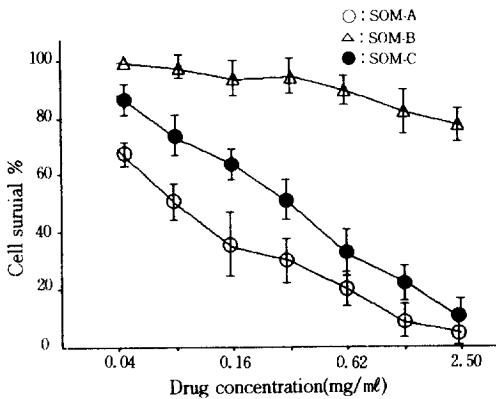
시험관내 실험(*in vitro tests*) : 일정한 조건(배양조건) 하에서의 7단계로 희석된 농도별 cell survival은 솔잎에서 추출한 3가지 물질 모두 상이하나 농도에 따른 세포독성(cytotoxicity)의 정도는 비슷한 패턴을 나타내고 있다. SOM-B는 각 세포주에서마다 세포독성의 영향이 아주 낮게 나타나 50% inhibitory concentration을 찾기에 양적으로도 문제가 있었다(Table 1). SOM-A는 S-K-HEP-1과 3LL 세포주(Figs 1, 2)에서 그리고 SOM-C는 P388과 L1210 세포주(Figs 3, 4)에서 보다 유의한 세포독성의 효과가 나타났다. 그러나 L1210 세포주에서의 경우 ID<sub>50</sub>치가 3LL/SOM-A보다 27.1배, SK-HEP-1/SOM-A보다 23.7배, P388/SOM-A보다 3.06배, P388/SOM-C보다 2.2배 그리고 3LL/SOM-C보다 1.78배 등 대부분 다른 세포주들에 비해 높게 나타났기 때문에 3가지 물질 모두 바람직한 효과로는 볼 수가 없다(Table 1). Figs 1, 2, 3, 에서 보여준 SOM-A와 SO-

M-C에 대한 세포독성은 보다 구체적인 관심을 가지기에 충분한 성적이었는데 특히 SOM-A에 강한 감수성을 보인 SK-HEP-1과 3LL 세포주의 경우 2.5mg/ml의 농도에서 95% 이상의 강한 세포독성효과를 보였고, SOM-C에 강한 감수성을 보인 P388의 경우는 2.5mg/ml의 농도에서 90% 정도의 세포독성효과를 보였다.

이상과 같은 시험관내 성적으로 보아 SOM-A와 SOM-C 물질은 세포주에 따른 선택적 세포독성효과가 있음을 보여 주었다.

**Table 1.** Cytotoxicity of drugs on various cell lines *in vitro* : 50% inhibitory concentration(mg/ml)

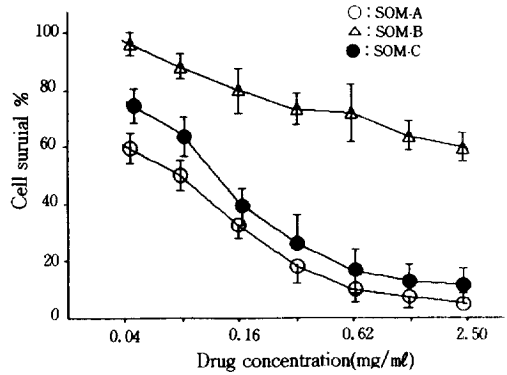
Sample	P388	L1210	SK-HEP-1	3LL
SOM-A	0.62	1.90	0.08	0.07
SOM-B	3.00	3.00<	3.00<	3.00<
SOM-C	0.11	0.25	0.31	0.14



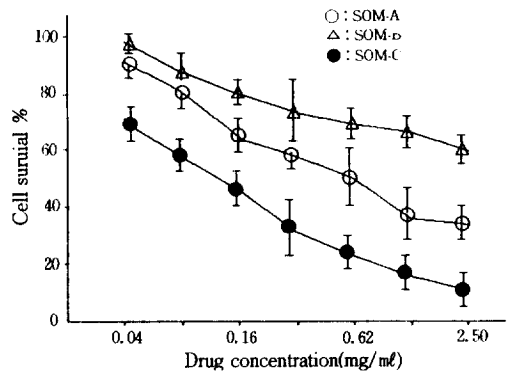
**Fig 1.** Effects of SOM-A, SOM-B, and SOM-C on survival of SK-HEP-1 cells.

**동물실험 (in vivo tests) :**

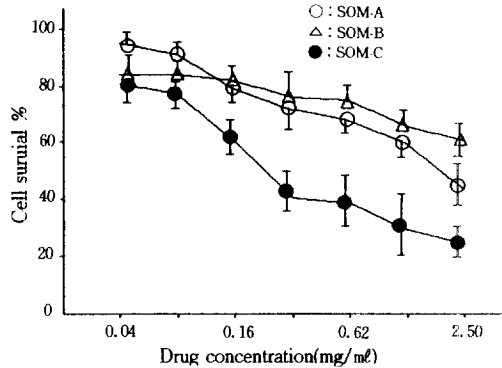
1) **Ascitic tumors를 이용한 제암효과 평가 :** 예비실험을 통해 알게된 각 물질에 대한 독성정도를 참고로해 각각 6단계의 농도로 희석해 실시한 P388과 L1210 세포주의 제암효과 결과는 다음 Table 2와 같다. SOM-B 물질의 경우 모든 농도에서 유의성 있는 평가에 미치지 못하고 있으나 SOM-A와 SOM-C는 암세포주 모두에서 가능성을 시사하고 있다. 유의성 있는 두 물질을 비교해 볼 때 SOM-A의 경우는 최대 T/C율이 P388 세포주의 75mg/kg 농도에서 135% 그리고 L1210 세포주의 100mg/kg 농도에서 125%인데 비해, SOM-C는 P388과 L1210 세포주의 90mg/kg 농도에서 151%, 126%로 보다 유의하게 각각 나타났다. 또한 SOM-C는 유효범위가 30~150mg/kg으로 넓어 중요한 장점을 지니고



**Fig 2.** Effects of SOM-A, SOM-B, and SOM-C on survival of 3LL cells.



**Fig 3.** Effects of SOM-A, SOM-B, and SOM-C on survival of P388 cells.



**Fig 4.** Effects of SOM-A, SOM-B, and SOM-C on survival of L1210 cells.

있다. 따라서 복수형 암세포주를 이용한 제암효과시험에서는 SOM-C 물질이 보다 우수한 것으로 평가 되어진다.

2) **Solid tumors를 이용한 제암효과 평가 :** 같은 조건

(실험방법)하에서의 물질별 그리고 4단계 희석농도별 제암효과시험 결과는 다음 Table 3과 같다. 앞에서 실시한 복수형 암세포주를 이용한 제암효과 평가시험에서와 마찬가지로 SOM-B 물질은 모든 농도에서 유의성 있는 평가에 미치지 못하고 있고, SOM-A와 SOM-C에서는 괄목할 만한 유의성을 보이고 있다. 2종류의 물질을 비교할 때 SOM-A의 경우는 S-180 세포주의 75mg/kg 농도에서 최대억제률(1-T/C%)이 65% 그리고 Ehrlich 세포주의 100mg/kg 농도에서 65%인데 비해 SOM-C 물질에서는 S-180과 Ehrlich 세포주의 90mg/kg 농도에서 72%, 76%로 보다 유의하게 각각 나타났다. 또한 유효범위도 S-180과 Ehrlich 세포주 모두에서 60~120mg/kg으로 넓었다. 따라서 고평형 세포주를 이용한 제암효과시험에서도 SOM-C 물질이 보다 유의성 있는 물질로 평가 되어진다.

3) SOM-C와 기존항암제의 상승효과 평가 : 기존의 항암제들은 이미 임상시험에서 어느 정도의 제암제로 평가를 받고 있는데 실험방법과 조건에 따라 원래의 공시된 성적과 차이가 있을 수도 있으므로 그와 같은 오판을 덜기 위해 연구자가 제시한 동일조건(Ascitic tumors 시험법)하에서의 여러 물질별 비교실험을 동시에 실시

해 보았다. 결과는 Table 4와 같은데 SOM-C가 Table 2에서 보이는 151%(P388)보다 낮은 146%로 T/C율이 나타났음을 참고로 하여 그의 물질들의 성적을 이해할 필요가 있다.

$\alpha$ -interferon의 경우 단일물질로서는 아주 미미한 112(P388), 110(L1210)%의 성적인데 비해, SOM-C가 혼합된 「 $\alpha$ -interferon + SOM-C」의 그룹에서는 158(P388), 136(L1210)%로 상당한 상승효과를 보이고 있다. 또한 Mitomycin-c도  $\alpha$ -interferon보다는 낮지만 SOM-C와 혼합투여시 139(P388), 142(L1210)%에서 156, 154%로 효과가 상승되었다. 그러나 Picibanil에서는 상승효과가 없는 것으로 나타났다.

4) SOM-C에 대한 독성스펙트럼 : 지금까지 실시한 술잎에 대한 제암효과 검색시험에서 SOM-C 물질이 긍정적인 평가를 받게 되었다. 따라서 앞으로 실시하게 될 각종의 안전성시험과 임상시험에서 중요 지표가 될 수 있는 SOM-C에 대한 독성스펙트럼을 필요로 하게 되어 7일동안 실시하게 되었는데 결과는 Fig 5와 같다.

50%의 치사량(LD<sub>50</sub>)은 270mg/kg 그리고 실험중 최초로 죽는 마우스가 발견된 최소치사량(MLD)은 201mg/kg이었다. 또한 실험기간내에 체중이 정상 대조

Table 2. Antitumor effects of SOM-A, -B and -C on murine ascitic tumors

Drug	Dose (mg/kg)	P388(i.p.i.p), QD 1-7		L1210(i.p.i.p), QD 1-7	
		T/C(%)	Activity	T/C(%)	Activity
SOM-A	25	104	-	105	-
	50	113	-	109	-
	75	135	+	116	-
	100	125	+	125	+
	150	119	-	114	-
	200	105	-	100	-
SOM-B	25	107	-	103	-
	50	112	-	106	-
	100	118	-	110	-
	150	106	-	104	-
	220	100	-	102	-
	300	96	-	94	-
SOM-C	10	106	-	103	-
	30	120	+	110	-
	60	140	+	119	-
	90	151	++	126	+
	120	135	+	121	+
	150	125	+	103	-

\* Tumor cells were inoculated intraperitoneally to mice on Day 0. The drugs were given intraperitoneally to mice once a day for 7 days(Days 1-7) in the P388 and L1210 tests.

\* MST was measured. Mice were used in groups of six in the P388 and L1210 test.

\* Criteria : + ≥120, ++ ≥150, +++ ≥175 - <120

\* QD : every day Tox : T/C value of <90% indicates toxicity

**Table 3.** Antitumor effects of SOM-A, -B and -C on murine solid tumors

Drug	Dose (mg/kg)	S-180(i.p.i.p), QD 1-20		Ehrlich(s.c.i.p), QD 1-20	
		1-T/C(%)	Activity	1-T/C(%)	Activity
SOM-A	25	28	-	35	-
	50	48	-	51	+
	75	65	+	62	+
	100	61	+	65	+
SOM-B	50	18	-	22	-
	100	42	-	38	-
	150	34	-	45	-
	220	30	-	41	-
SOM-C	30	45	-	46	-
	60	62	+	65	+
	90	72	++	76	++
	120	68	+	70	++

\* Tumor cells were inoculated s.c. to mice on Day 0.  
 The drugs were given i.p. to mice once a day for 20 days(Days 1-20).  
 \* Tumor weights were measured on Days 21. Mean tumor weights were calculated.  
 \* Mice were used in groups of six in the S-180 and Ehrlich tests.  
 \* Criteria : +≥50, ++≥70 -<50  
 \* QD : every day Tox : a survival rate of <80%

**Table 4.** Synergistic effects of SOM-C to the conventional anticancer drugs

Drug	Dose (/kg)	P388(i.p.i.p), QD 1-7		L1210(i.p.i.p), QD 1-7	
		T/C(%)	Activity	T/C(%)	Activity
SOM-C	90mg	146	+	121	+
α-INT.	20만 IU	112	-	110	-
α-INT. +SOM-C	10만 IU 45mg	158	++	136	+
Mitomycin -C	0.16mg	139	+	142	+
Mitomycin +SOM-C	0.08mg 45mg	156.3	++	154	++
Picibanil	0.2KE	151	++	157	++
Picibanil +SOM-C	0.1KE 45mg	153	++	154	++

\* Tumor cells were inoculated intraperitoneally to mice on Day 0.  
 The drugs were given intraperitoneally to mice once a day for 7 days(Days 1-7).  
 \* MST(mean survival time) was measured.  
 Mice were used groups of six in the P388 and L1210 teste.  
 \* Criteria : +≥120, ++≥150 -<120  
 QD : every day

군에 비해 다소라도 감소되어 주의를 요하는 지대인 Care zone은 149~200mg/kg이었고 그 외의 안전지대인 Safety zone은 150mg/kg이하로 나타났다.

이상의 결과를 참고로 해 볼때, 앞에서 실시한 제암 효과시험에서의 SOM-C의 최적 유효농도가 복수형암과 고형암실험 모두에서 90mg/kg이었으므로 독성이 매우 낮은 물질로 평가된다.

5) SOM-C에 의한 혈액학적변화 검사 : 지금까지의 술임에 대한 제암효과 검색시험으로 유의성이 높은 SO-

M-C 물질을 발견하게 되었다. 따라서 안전성에 대한 기본적인 정보를 얻기위해 1차적으로 SOM-C 물질 투여에 의해 일어나는 혈액학적변화를 검사해 보았는데 결과는 Table 5와 같다.

본 실험에서 사용된 정상대조군의 마우스는 시설 및 관리(KGLP기준)등의 모든 조건에서 시험그룹들과 동일하고, 일본 Clea에서 생산되는 JcL : ICR마우스<sup>13</sup>와 국내 화학연구소에서 생산되는 Ktc : ICR 마우스<sup>14</sup>와의 기초자료에서 5주령의 혈액상을 비교해 보았을 때 별다

Table 5. Hematological values of mice administrated with SOM-C

(Mean ± SD)

Items	Control	SOM-C	
		60mg/kg	90mg/kg
WBC×10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	1.74±0.61	1.85±0.39	1.77±0.41
RBC×10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	7.78±0.69	7.79±0.21	7.81±0.68
HGB g/dl	12.81±1.12	13.01±0.78	13.08±0.22
HCT %	42.62±2.31	42.11±2.36	41.26±1.37
MCV fl	52.61±1.04	51.30±1.58	50.01±1.26
MCH pg	17.29±0.61	16.27±0.33	16.47±0.71
MCHC g/dl	30.31±0.78	29.99±0.61	31.01±0.31
PLT×10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	1129±184.6	1248±126.5	1301±211.9

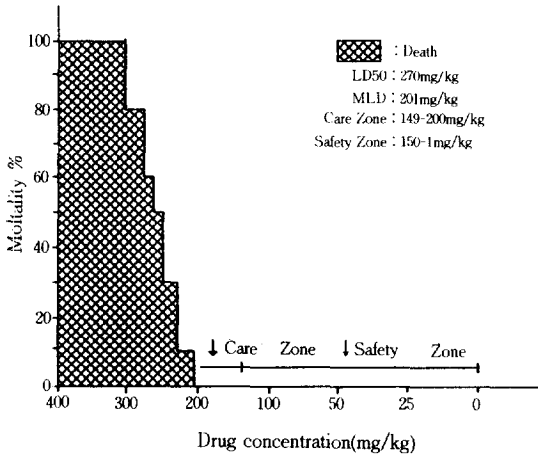


Fig 5. Toxicity spectrum of SOM-C.

큰 차이가 없었으므로 믿을 만한 평가기준이 될 수 있다. 그와 같은 대조군에 비교된 혈액학적 변화로는 WBC, RBC, HGB 및 PLT의 경우 SOM-C 물질 투여군 모두에서 약간 증가하는 경향을 보였고 그리고 MCV와 MCH의 경우 투여군 모두에서 다소 감소되는 경향을 보였다. PLT의 경우 SOM-C 물질을 투여함으로써 10% 이상의 상승치를 보였는데 백혈병환자 또는 선천적으로 어떤요인의 결함에서 오는 혈소판감소증(thrombocytopenia)내지 혈소판무력증(thrombostenia)등의 근치가 거의 불가능한 출혈성소질의 환자들이 상당수 현존하고 있다는 점을 고려할 때 혈소판(PLT)의 수치를 증가시킨다는 결과 하나만으로도 대단한 의미가 있다 하겠다.

결론적으로 SOM-C 물질을 투여(60~90mg/kg)함으로써 오는 부정적인 혈액상의 변화는 없는 것으로 판단된다.

## 고찰

“솔”은 인류의 역사와 더불어 옛날부터 식용과 약용

그리고 공업용으로는 이용되어 왔다. 흔히 소나무 또는 적송이라고 부르고 있으며, 학명은 *Pinus densiflora* Seib. et Zucc.으로서 표고 1000m이하의 국내 어느 지형에서나 자라고 있는 사철푸른 나무이다. “잎”부분의 이용도로는 신선한 잎을 따서 그대로 쓰여 왔는데 비타민 C의 원료로, 피혈병과 어린이 영양실조증에 잎의 클로로필(chlorophyll)은 고약을 만들어 피부질병에, 잎에서 얻은 정유는 공기정화제를 제조하는데 이용되었으며 그리고 솔잎차를 만들어 신경통, 관절염, 팔다리마비, 동맥경화증 등의 치료에 사용되었던 기록이 전해져 오고 있다.<sup>5,6</sup>

솔잎은 맛이쓰고 따뜻하며 체내조직에서 이루어지는 산화환원과정의 촉진작용과 소염작용 그리고 피벗이작용에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>5,6</sup> 신선한 솔잎의 성분은 아스코르빈산(ascorbic acid), 카로틴(carotin), 비타민 K, 쓴맛물질, 플라보노이드(flavonoids), 안토시안(anthocyan), 수지, 탄닌질(5%), 키나산(quinic acid), 시킴산(shikimic acid), 정유 등이 들어 있다. 그리고 흔히 독성이 염려되고 있는 알칼로이드(alkaloid)가 들어 있지 않는게 특징이다.<sup>5,6</sup>

이처럼 여러 병증에 예방내지 치료제로 오랫동안 사용되어 왔고 인류생활사와도 밀접한 관계를 유지하여 왔으면서도 암과 관계된 기록은 찾아보기어렵다. 이와 같은 사실이 본 연구자에게 오히려 관심을 가지게 했고, 더욱이 솔잎자원이 풍부해 상품화로의 경제성이 매우 높고 독성이 낮아 개발물질의 일차적인 선택에는 조건이 충족되었다고 보아진다.

따라서 솔잎을 유래물질로 하여 용매의 극성에 따라 추출된 SOM-A, SOM-B, SOM-C의 3가지 시험물질을 얻을 수 있었는데 *in vitro* 상에서 SOM-B는 전혀 제암효과가 없었고, SOM-A와 SOM-C는 사용된 암세포주에 따라 선택적으로 항암작용의 유의성이 관찰되었다. 동물실험의 경우, 임파선 백혈병세포주 L1210에 대해서는 모두 미약한 작용이었으나 다른 백혈병세포주 P388



에 대한 SOM-C의 제암작용은 T/C을 151%로 돋 보였다(Table 2). 그리고 고행암세포주인 S-180(Sarcoma), Ehrlich(Carcinoma)에서는 서로 다른 성격의 세포주이지만 SOM-C에서 비슷한 성적 72%와 76%의 제암효과를 나타내었다.

이상의 내용을 제암효과면에서 단순 비교시켜본다면 다음과 같을 수 있다.

**\* in vitro**

- P388 : SOM-C > SOM-A > SOM-B
- L1210 : SOM-C > SOM-A > SOM-B
- SK-HEP-1 : SOM-A > SOM-C > SOM-B
- 3LL : SOM-A > SOM-C > SOM-B

**\* in vivo**

- P388 : SOM-C > SOM-A > SOM-B
- L1210 : SOM-C > SOM-A > SOM-B
- S-180 : SOM-C > SOM-A > SOM-B
- Ehrlich : SOM-C > SOM-A > SOM-B

이상과 같은 결과로 보아 알 수 있듯이 술잎중에서도 dichloromethane과 ethyl acetate로 추출한 나머지의 물추출액 즉, SOM-C에서 제암작용을 나타내는 어떠한 인자가 들어 있음을 알 수 있게 되었다.

그리고 기존항암제와의 병용투여로 나타나는 상승효과란  $\alpha$ -interferon과 mitomycin-C에서 긍정적으로 나타났고, picibanil에서는 의미가 없었다. 비록 선택적이기는 하지만 그와 같은 기존 항암제와의 상승작용은 비타민의 전구물질로 세포막에서의 산화과정을 억제시키는 베타카로틴( $\beta$ -carotene)과 탄닌질에 제암효과의 유의성이 있다<sup>4</sup>는 점을 참고로 할 때 술잎성분중에 들어 있는 베타카로틴과 탄닌질이 제암작용에 관여하고 플라보노이드(flavonoids)에 의해서 탁해진 혈액의 점도를 낮추어 주는 등 몇가지 성분의 기능이 기존항암제와 상호보완적이고 거기에다 아직 알 수 없는 어떤 알파인자가 상승적으로 작용하여 그와 같은 효과를 발휘하는게 아닌가 하는 추론을 해본다. 그러나 아직은 난해하게도 특정항암제에만 선택적으로 상승작용을 나타내는 점은 다음의 연구과제로 남겨두고 있는 세포주기의 어느단계에서 SOM-C 물질이 가능하는지를 밝혀낸 다음에야 거론할 수 있을것 같다. 어떠한 여기에서 중요한 것은 SOM-C가 선택적으로 작용하기 때문에 어느 특정항암제와는 대단히 높은 상승효과도 있을 수 있으리라는 기대이다. 그러나 아무리 제암효과가 높다하더라도 정상세포들에 입히는 피해가 크다면 그 물질들은 개발의 가치가 없어진다. 따라서 어느 가능성이 있는 물질을 찾게 되면 1차적으로 확인해 보는게 혈액학적변화의 검사

인데 SOM-C의 경우 6일동안 90mg/kg을 매일 복강내에 투여했는데도 유의할만한 변화는 나타나지 않았다(Table 5). 오히려 혈소판의 수치가 10%이상 증가되어 백혈병 또는 선천적으로 어떤 요인의 결함에서 오는 혈소판감소증(thrombocytopenia)내지 혈소판무력증(thromb-asthenia)의 치료제로의 가능성을 시사하는 정보도 얻게 되었다.

그러나 이상의 결과로 볼 때 위에서 제시한 제암작용가능성의 SOM-C는 몇가지의 종류를 같이하는 화합물질로 생각된다. 따라서 HPLC, NMR 등의 분석기기를 이용해 조성성분을 알아내고 그 성분별로 세분화된 제암효과시험을 계속하여 보다 구체적인 제암인자를 찾아내는 일이 앞으로의 과제로 남겨두고 있다. 그리고 제암작용의 기전을 알아내기 위해 1차적으로 Flow cytometer와 같은 유식세포분석분리기를 이용해 SOM-C가 면역세포들에 어떠한 영향을 주고 있는지를 조사해 면역기능에 대한 작용을 확인해 볼 필요가 있다. 물론 암세포의 주기에 따른 즉, SOM-C가 증식기와 비증식기의 암세포에 작용(Cell cycle non-specific)하는지 아니면 비특이적으로 증식기(cell cycle phase non-specific)에 작용하는지 또는 증식기 암세포의 특정기【Cell cycle phase-specific = G1(효소, 홀몬), S(대사길항제), G2(항생물질), M(분열저지제)】에 작용하는지를 앞으로 시간을 두고 조사해 보아야 하고 또한 SOM-C의 세포내에서의 제암작용 부위와 작용양식도 알아내야 하는 과제를 남겨두고 있다.

**결 론**

술잎을 일단 메틸알콜로 추출하여 그 물질을 유래로 하였는데 극성이 다른 용매 Dichloromethane→Ethyl Acetate→H<sub>2</sub>O로 점차 진행시켜가는 추출방법으로 얻은 SOM-A, SOM-B, SOM-C 물질의 제암효과에 대한 연구 결과는 다음과 같이 요약할 수 있다.

1. 시험관내 실험(in vitro)에서는 SOM-A 물질이 S-K-HEP-1(Human 간암)과 3LL(Human 폐암)에 대한 세포독성효과가 보다 컸다.
2. 동물시험(in vivo)에서는 SOM-C 물질이 고행암세포주 S-180(마우스 육종)과 Ehrlich(마우스 암종)에 대한 억제효과가 보다 높았다.
3. SOM-C 물질이 기존항암제 Mitomycin-C와  $\alpha$ -interferon과의 각각 병용투여에서 높은 상승효과를 보였다.
4. 적정투여량(90mg/kg)에서 SOM-C 물질이 정상세포에 미치는 피해는 발견되지 않았다.
5. 이상의 결론은 SOM-C 물질이 신항암제 또는 기

존항암제의 보조제 내지 의약품산업의 중요한 원료로 이용될 수 있음을 확인하여 주고 있다.

### 참 고 문 험

1. 김삼용. 최근 암의 예방과 치료경향. 한국신약보-메시마 엑스 1992 ; 27~35.
2. Mark R. 유방암에서의 성장인자와 발암유전자와의 관계. 국제암심포지움 논문(연대암연구소) 1992 ; 3~9.
3. 대한병리학회편. 病理學. 신생물. 서울시 ; 고문사. 1990 ; 225~269.
4. 김창목. 암을 예방하는 식품. 약업신 논문 1992 ; 8 : 4~6.
5. 최옥자. 약초의 성분과 이용. 서울시 : 일월서각 1991 ; 114~116.
6. 과학백과사전 종합출판사. 東醫學事典. 서울시 : 도서출판 까치 1990 ; 561.
7. 조영호. BCA 정색반응을 이용한 새로운 세포독성 분석법 개발과 항암제 탐색을 위한 그 이용. 건국대 대학원 석사학위논문 1993 : 4~33.
8. Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, et al. FK506, A novel immunosuppressant isolated from a streptomycetes, II immunosuppressive effect of Fk-506 *in vitro*. *J Antibiotics* 1989 ; 40 : 1256~1265.
9. 김춘원, 조영호, 문정조, 등. 파두와 황련의 혼합 추출물(CP-2)이 수종의 암세포에 미치는 세포독성 효과. 중양의학 1992 ; 58 : 185~194.
10. Anne M, Dominic S, Philip SK, et al. Easibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the N Cancer Institute* 1991 ; 83~11.
11. Kyoichi S, Toshitaka M, Sueo MU, et al. Antitumor activity and hematotoxicity of a new, substituted dihydrobenzo., FK 973, in mice. *Cancer Research* 1988 ; 48 : 1168~1172.
12. 문정조, 김춘원, 한영복 등. 신규물질 CP-2의 동물 체내에서의 수종 암세포 증식에 미치는 영향. 중양의학 1993 ; 58 : 305~314.
13. 日本 Clea實驗動物. JCL-MCH(ICR) フウスデータ集 1985 : 3~16.
14. 송창우, 하창수, 한상섭. ICR마우스의 주령에 따른 기초연구. 한국실험동물학회지 1989 ; 5 : 59~68.