

L1210과 HL60 암세포에 대한 야생식물의 세포독성 검색

배기환,* 이준성, 민병선

충남대학교 약학대학

Screening on the Cytotoxicity of Medicinal Plants against L1210 and HL60 Cancer Cells

KiHwan Bae,* JunSung Lee and ByungSun Min

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea

Abstract - For the search of anticancer compounds from natural products, 43 plants were extracted with benzene and methanol, separately, and the extracts were screened for the cytotoxicity against L1210 and HL60 cancer cell lines. From the results, 22 samples in benzene extracts showed cytotoxicity against L1210 cells and 23 samples against HL60 cells, respectively. However, any methanol extracts did not exhibit cytotoxicity against two cancer cell lines, it suggested that cytotoxic compounds seemed to have low polarity. ED₅₀ values less than 5 µg/ml were observed in 14 and 9 samples in benzene extracts against L1210 and HL60 cancer cells, respectively.

Key words - Natural products; Cytotoxicity; L1210; HL60.

난치병으로 분류된 암을 정복하기 위한 노력은 천연물을 중심으로 수세기동안 계속되고 있으며, 천연물과 그 유사체의 항암활성 물질 연구는 Hartwell 등의 podophyllotoxin과 유도체의 연구로부터 시작되었으며,¹⁾ 현재에도 많은 연구가 진행 중이다.

항암제 개발을 위한 천연물의 스크리닝은 미국을 중심으로 연구가 이루어져, 미국암센터(NCI)에서 1950년대 부터 천연물에 대한 스크리닝이 시작되었고, 1968년까지 39,000 종, 1980년까지 114,045 종의 전세계 천연물을 수집하여 항암물질 검색에 관한 연구가 행해졌다.²⁾ 일본에서의 연구로는 Itokawa 등³⁻⁴⁾이 중국의 암치료 처방에 주로 사용되고 있는 생약 중 1차와 2차에 총 176 종을 선별하여 Sarcoma 180을 이용하여 항암활성을 검색하였고, 또 Kosuge 등⁵⁾은 한방에서 항암제로 쓰이는 생약 100 종에 대하여 Ehrlich carcinoma 및 HeLa cell을

이용하여 항암활성을 검색하였다. 그리고, 국내에서의 생약에 대한 항암력 실험은 배 등,⁶⁾ 이 등⁷⁾ 및 유 등⁸⁾이 *in vitro*에서 L1210 세포에 대한 연구가 있으며, 장 등⁹⁾은 P388 암세포에 53 종의 생약을 검색하였다. 그러나, 국내에서 이루어진 항암제의 스크리닝 검색은 주로 생약을 중심으로 이루어져 있으며, 야생식물에 대한 검색은 거의 미진한 상태이다.

본 연구는 항암활성 물질을 연구하기 위한 기초자료를 얻을 목적으로 무작위로 43 종의 식물을 채집하여 부위별로 나눈 67가지의 시료들의 벤젠 및 메탄올 엑스를 대상으로 L1210과 HL60 암세포에 대한 시험관내 항암활성을 검색하였고 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

식물재료 - 계룡산, 울릉도, 속리산 및 전라북도 무주(운일암반일암) 등지에서 1994년 8월 부터 10월까지 채집 후 음건, 세절하여 사용하였다. 종은

*교신저자 : Fax 042-821-5903

동정은 이¹⁰⁾의 대한식물도감을 참고로 하였다.

시약 및 기구-dimethylsulfoxide(DMSO, Sigma), absolute ethanol(Merck), NaHCO₃ (세포독성 실험용, Sigma), 페니실린 및 스트렙토마이신(Sigma), 기타 사용한 시약은 특급 및 일급을 사용하였고, 공업용인 경우 증류하여 사용하였다. 사용한 기구는 autoclave 및 incubator는 동양과학, screw cap tube, pipet 및 bottle은 Corning사의 제품을 사용하였다.

L1210 세포와 배양액-마우스 백혈병 세포인 L1210 세포는 American type culture collection (ACTT)에서 구입하여 사용하였고, 주 2-3회 계대배양하였다. 배양액은 증류수에 10.5 g의 Fisher's medium, NaHCO₃ 1.125 g, penicillin G(100,000 Units) 그리고 streptomycin(100 mg)을 넣어 용해시키고 pH를 7.2로 조절하여 전체 양을 11로 하였다. 그리고 세균 여과기로 여과한 후, 최종 농도가 10% 되도록 horse serum을 첨가하여 사용하였다.

HL60 세포와 배양액-인체의 전골수성 백혈병 (promyelocytic leukemia) 세포인 HL60 세포주¹¹⁾는 ACTT에서 구입하여 사용하였고, 주 2회 계대배양 하였다. 배양액은 L-glutamine이 포함된 RPMI 1640 10.4 g, NaHCO₃ 2 g 및 penicillin G(100,000 units), 그리고 streptomycin(100 mg)을 넣어 용해시키고 pH를 7.2로 조절하여 전체 양을 11로 하였다. 그리고 세균 여과기로 여과한 후, 최종 농도가 10% 되도록 horse serum을 첨가하여 사용하였다.

시료의 조제-시료 20~40 g을 세절로 하여 벤젠 300 ml로 48 시간 동안 냉침한 후 여과하고 잔류물은 건조하여 다시 메탄올 300 ml로 48 시간 동안 냉침한 후 여과하였다. 각각의 여액은 감압하에 농축, 건조하여 건조엑스를 얻었다. 각 엑스를 평량하여 10 mg/ml용액이 되도록 에탄올에 용해시키고, 에탄올에 난용인 것은 DMSO에 녹여 사용하였다.

L1210 세포에 대한 세포독성 실험-세포독성 실험에 사용되는 대수 성장기에 도달한 L1210 세포를 얻기 위하여 36~37 °C의 Fisher's 배지를 넣은 250 ml screw-capped erlenmeyer flask에 L1210 세포를 가해 2~3×10⁵ cells/ml 농도가 되게 조정된 후 하룻밤 배양시켰다 (spinner culture). 이 spinner culture한 세포를 세포독성 실험 직전

에 36~37 °C의 신선한 배지로 5×10⁴ cells/ml의 농도가 되도록 희석하였다 (run bottle). 시료는 실험 직전에 일정 농도의 에탄올 또는 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해 시켰으며 이 시료 용액 0.1 ml에 다시 신선한 배지 0.9 ml를 가해 10배 희석하였다. screw-capped tube에 희석액을 각각 60, 30, 15 μl를 가하고 세포 현탁액을 (run bottle)을 3 ml씩 넣고 대조군 tube (2√: n=시료 수)에는 3 ml의 현탁액 만을 넣었다. 37 °C, 5% CO₂ 대기하에서 48시간 배양 후 hemocytometer를 사용하여 세포수를 계산하였다.¹²⁾ 실험은 3회 이상 반복하여 각각을 평균하여 ED₅₀ 값을 계산하였다. positive control로는 5-fluorouracil (5-FU)을 사용하였으며 5-FU의 ED₅₀ 값은 0.009-0.03 μg/ml 범위에 있었다.

HL60 세포에 대한 세포독성 실험-상기의 L1210 세포에 대한 세포독성 실험과 마찬가지로 시료 희석액을 만들고, 이 희석액을 각각 40, 20, 10 μl 씩씩 micropipette으로 취하여 각각 2개씩의 well(24 well plate)에 가한다. 이 well 및 대조군 well(2√ n=시료 수)에 1×10⁵ cells/ml로 희석한 세포 현탁액 2 ml를 가하고 잘 섞은 후, 이들을 37 °C, 5% CO₂ 대기하에서 72시간 배양한 후 hemocytometer를 사용하여 세포 수를 계산하였다. 실험은 3회 이상 반복하여 각각을 평균하여 ED₅₀ 값을 계산하였다. positive control은 5-FU를 사용하였으며 5-FU의 ED₅₀ 값은 0.15-0.25 μg/ml 범위에 있었다.

ED₅₀ 값의 결정과 세포독성의 판단-ED₅₀ 값은 대조군의 50% 수준으로 L1210 세포의 성장을 억제하는 시료의 농도(μg/ml)로 주어지며, Thayer 등¹³⁾의 방법에 의해 결정하였다.

결과 및 고찰

현재까지 항암활성 연구는 주로 한방에서 항암제로 사용되는 생약을 중심으로 이루어졌는데, 새로운 계열의 항암제 개발을 위한 기초 자료를 얻기위하여 식물 43 종 67가지를 선정 하여 벤젠과 메탄올로 추출한 후 건조 엑스를 만들고 L1210과 HL60 세포에 세포독성을 측정하였다(Table I). 각 천연물의 추출은 배 등⁹⁾의 방법 같이 극성이 낮은 벤젠과 극성이 높은 메탄올로 추출하였는데, 극성이 높은 용매로만

Table I. ED₅₀(μg/ml) values of plants against L1210 and HL60 cancer cells

Species	Family	Part	L1210		HL60	
			Benzene	MeOH	Benzene	MeOH
<i>Achyranthes japonica</i> (쇠무릎)	Amaranthaceae	Aerial parts	-	-	-	-
		Root	-	-	-	-
<i>Aconitum pseudolaeva</i> var. <i>erectum</i> (진범)	Ranunculaceae	Aerial parts	-	-	-	-
		Root	-	-	-	-
<i>Adenocaulon himalaicum</i> (멀가치)	Compositae	Aerial parts	-	-	-	-
		Root	+++	-	++	-
<i>Agrimonia pilosa</i> (짚신나물)	Rosaceae	Aerial parts	+++	-	++	-
		Root	+++	-	+++	-
<i>Amorphophauls konjac</i> (곤약)	Araceae	Aerial parts	-	-	-	-
		Tuber	-	-	-	-
<i>Aster scaber</i> (참취)	Compositae	Herba	+++	-	++	-
<i>Carpesium abrotanoides</i> (담배풀)	Compositae	Aerial parts	+++	-	+++	-
		Root	+++	-	+++	-
<i>Carpesium divaricatum</i> (긴담배풀)	Compositae	Aerial parts	+++	-	+++	-
		Root	+++	-	+++	-
<i>Carpesium macrocephalum</i> (여우오줌)	Compositae	Aerial parts	+++	-	+++	-
		Root	+++	-	+++	-
<i>Caryopteris divaricata</i> (누린내풀)	Verbenaceae	Aerial parts	-	-	-	-
		Root	+	-	+	-
<i>Clematis apiifolia</i> (사위질빵)	Ranunculaceae	Aerial parts	-	-	-	-
<i>Clematis florida</i> (위령선)	Ranunculaceae	Root	-	-	-	-
<i>Clerodendron trichotomum</i> (누리장나무)	Verbenaceae	Leaf	-	-	-	-
<i>Cocculus trilobus</i> (탱탱이덩굴)	Menispermaceae	Fruit	-	-	-	-
		Leaf	-	-	-	-
<i>Commelina communis</i> (닭의장풀)	Commelinaceae	Herba	-	-	-	-
<i>Cornus kousa</i> (산딸나무)	Cornaceae	Fruit	-	-	-	-
<i>Corydalis ochotensis</i> (눈괴불주머니)	Fumariaceae	Herba	-	-	-	-
<i>Cuscuta Japonica</i> (새삼)	Convolvulaceae	Aerial parts	-	-	-	-
<i>Daphniphyllum macropodum</i> (굴거리)	Euphorbiaceae	Leaf	-	-	-	-
<i>Desmodium oxyphyllum</i> (도둑놈의 갈고리)	Leguminosae	Aerial parts	-	-	-	-
		Root	-	-	-	-
<i>Dictamnus dasycarpus</i> (백선)	Rutaceae	Aerial parts	++	-	+	-
		Root	+++	-	-	-
<i>Euonymus alatus</i> (화살나무)	Celastraceae	Leaf	-	-	-	-
		Stem	-	-	-	-
<i>Glehnia littoralis</i> (갯방풍)	Umbelliferae	cortex	+	-	+	-
<i>Humulus japonicus</i> (환삼덩굴)	Cannabiaceae	Herba	-	-	-	-
<i>Impatiens textori</i> (물봉선)	Balsaminaceae	Aerial parts	-	-	-	-
<i>Isodon japonicus</i> (방아풀)	Labiatae	Herba	+++	-	+++	-
		Aerial parts	-	-	-	-
<i>Ligustrum foliosum</i> (섬취뚱나무)	Oleaceae	Root	-	-	-	-
<i>Lindera obtusiloba</i> (생강나무)	Lauraceae	Fruit	-	-	-	-
<i>Lysimachia clethroides</i> (큰까치수염)	Primulaceae	Leaf	-	-	+++	-
		Leaf	++	-	-	-
<i>Magnolia obovata</i> (일본목련)	Magnoliaceae	Aerial parts	+++	-	+	-
		Root	-	-	-	-
		Fruit	-	-	-	-
<i>Majanthemum dilatatum</i> (큰두루미꽃)	Liliaceae	Leaf	+	-	+	-
		Twig	-	-	-	-

Table I. Continued

Plants	Family	Part	L1210		HL60	
			Benzene	MeOH	Benzene	MeOH
<i>Metaplexis japonica</i> (박주가리)	Asclepiadaceae	Herba	-	-	-	-
<i>Ostericum sieboldii</i> (땃미나리)	Umbelliferae	Aerial parts	-	-	-	-
		Root	++	-	+	-
<i>Phryma leptostachya</i> var. <i>asiatica</i> (파리풀)	Phrymaceae	Aerial parts	-	-	-	-
		Root	-	-	+	-
<i>Phtheirospermum japonicum</i> (나도송이풀)	Scrophulariaceae	Aerial parts	-	-	++	-
		Root	++	-	-	-
<i>Polygonatum inflatum</i> (통동굴레)	Liliaceae	Aerial parts	-	-	-	-
		Root	-	-	-	-
<i>Rabdosia inflexa</i> (산박하)	Labiataeae	Herba	++	-	++	-
<i>Rhododendron brachycarpum</i> (만병초)	Ericaceae	Leaf	-	-	-	-
<i>Rubia akane</i> (꼭두서니)	Rubiaceae	Aerial parts	-	-	-	-
<i>Rumex japonicus</i> (참소리쟁이)	Polygonaceae	Root	-	-	-	-
<i>Sanguisorba officinalis</i> (오이풀)	Rosaceae	Aerial parts	-	-	-	-
		Root	-	-	-	-
<i>Tiarellapolyphylla</i> (혈떡이풀)	Saxifragaceae	Herba	-	-	-	-
<i>Triadenum japonicum</i> (물고추나물)	Hypericaceae	Herba	+++	-	+	-
5-FU			0.009-0.03		0.15-0.25	

+++ : $ED_{50}(\mu\text{g/ml}) \leq 5 \mu\text{g/ml}$, ++ : $5 \mu\text{g/ml} < ED_{50}(\mu\text{g/ml}) \leq 10 \mu\text{g/ml}$, + : $10 \mu\text{g/ml} < ED_{50}(\mu\text{g/ml}) \leq 20 \mu\text{g/ml}$, - : $ED_{50}(\mu\text{g/ml}) > 20 \mu\text{g/ml}$. 5-FU: Positive control.

추출시 다양한 성질을 갖는 물질이 추출되며, 높은 수율로 엑스를 얻어 유효성분들이 회석될 가능성이 있고, 소량으로 존재하는 유효성분은 감지 못할 경우가 있어 극성이 서로 다른 두가지의 용매로 별도로 추출하였다. 본 실험에 사용된 암세포는 항암 물질 검색에 가장 많이 사용되는 암세포 중에서 기원이 다른 두 종류의 세포로 마우스 leukemia 세포인 L1210 및 인체 leukemia 세포인 HL60 세포를 선정 하였다.

세포독성 평가는 식물추출물일 경우 ED_{50} 값이 $20 \mu\text{g/ml}$ 이하일 때 세포독성이 있다고 규정하는데,¹⁴⁾ 실험검체에서 L1210 세포에 활성을 나타내는 것은 벤젠 엑스에서 22 종 (67 종 중, 약 33%)이 관찰 되었고, 그 중 ED_{50} 값이 $5 \mu\text{g/ml}$ 이하의 강한 세포독성을 갖는 것은 참취 등 14 종으로 나타났다. 그러나, 메탄올 엑스에는 활성이 있는 식물을 전혀 관찰되지 않았다. 인체 암종류인 HL60 세포에 대해서는 벤젠 엑스에서 67 종 중 23 종으로 약 34%로 세포독성이 관찰되었고, ED_{50} 값이 $5 \mu\text{g/ml}$ 이하의 세포독성을 나타내는 것은 짚신나물의 뿌리 등 9종이었으며, 또한 L1210 세포와 같이 메탄올 엑스에는 활성이 전혀 없었다.

L1210과 HL60 세포에 실험한 검체는 벤젠 엑스에서 각각 약 33%와 34%로 거의 같은 비율로 활성이 관찰되었으나, 세포독성은 L1210 세포에서 ED_{50} 값이 $5 \mu\text{g/ml}$ 이하의 농도를 갖는 추출물이 14 종으로 더욱 많았다. 같은 벤젠 엑스에서 L1210 세포가 HL60 세포보다 세포독성이 강하게 나타난 것은 멸가치 지하부, 짚신나물 지상부, 참취, 백선, 큰까치수영 지하부, 파리풀 지하부 및 물고추나물로 7종이 있었다. L1210과 HL60 세포에 동시에 활성을 갖는 검체 중, HL60 세포에 더욱 강한 활성을 갖는 것은 관찰되지 않아 실험에 사용 한 검체는 전체적으로 L1210 세포에 더 sensitive 하였다. 그리고, 같은 벤젠 엑스의 세포간 차이로 L1210 세포에만 세포독성을 갖는 것은 백선 지하부, 큰까치수영 지상부 및 나도송이풀 지하부 3 종이 있고, 생강나무 잎, 파리풀 지하부, 나도송이풀 지상부 및 혈떡이풀은 HL60 세포에서만 세포독성이 관찰되어 한가지의 세포 만으로 검색시 이들 중 일부는 활성을 감지할 수도 있었다. 특히, 생강나무 잎의 벤젠 엑스는 HL60 세포에서만 백선 지하부는 L1210에서 ED_{50} 값이 $5 \mu\text{g/ml}$ 이하의 강한 세포독성이 있었다. 메탄올 엑스는 L1210과 HL60 세포에 모두 세포

독성을 관찰되지 않아 실험에 사용된 검체의 극성 부분은 세포독성이 없음을 추정할 수 있었다.

이상의 실험에서와 같이 한방에서 생약으로 사용하지 않는 야생식물도 암세포에 강한 세포독성을 나타내는 식물이 관찰되어, 활성성분의 규명, 약효의 검증 등 연구가치가 있으며, 새로운 항암제 개발의 기초자료가 될수 있는 가능성을 시사한다.

결론

식물 43 종, 67가지 시료들의 벤젠 및 메탄을 엑스를 대상으로 L1210 및 HL60 cells에 대한 항암활성 스크리닝 시험을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 43 종 67가지 시료 중 L1210 세포에서는 백선지하부 등 22가지 시료가 HL60 세포에서는 생강나무 잎 등 23가지 시료가 각각 벤젠엑스에서 세포독성이 관찰되었다.
2. L1210 세포에 ED₅₀ 값이 5 µg/ml 이하의 강한 활성을 갖는 시료는 멸가치 지하부, 짚신나물 지상부 및 지하부, 참취 전초, 담배풀 지상부 및 지하부, 긴담배풀의 지상부 및 지하부, 여우오줌 지상부 및 지하부, 백선 지하부, 방아풀 지상부, 큰까치수영 지하부, 물고추나물 전초 등 14 종이였다.
3. HL60 세포에 ED₅₀ 값이 5 µg/ml 이하 활성을 갖는 시료는 짚신나물 지하부, 참취 전초, 담배풀 지상부 및 지하부, 긴담배풀의 지상부 및 지하부, 여우오줌 지상부 및 지하부, 방아풀 지상부, 생강나무 잎 등 9 종이였다.

인용문헌

1. Hartwell, J.L. and Schrecker, A.W. (1951) Components of podophyllin V. The constitution of podophyllotoxin. *J. Am. Chem. Soc.* 73: 2909-2916.
2. Suffness, M. and Douros, J. (1982) Current status of the NCI plant and animal product program. *J. Nat. Prod.* 45: 1-14.
3. Itokawa, H., Watanabe, K. and Mihashi, S. (1979) Screening test for antitumor activity of crude drugs. *Shoyakugaku Zasshi* 33: 95-102.
4. Itokawa, H. (1988) Research on antineoplastic drugs from natural sources. *Yakugaku Zasshi* 108: 825-841.
5. Kosuge, T., Yokota, M., Sugiyama, M., Okamoto, K., Saito, M. and Yamamoto, T. (1986) Studies on Chinese medicines used for cancer. III. Cytotoxic constituent against HeLa cells in the fruit of *Trapa bispinosa* Roxb. *Yakugaku Zasshi* 106: 183-185.
6. Bae, K. H., Min, B. S., Do, D. S., Kim, N. S., Yang, G. J. and Ahn, B.J. (1992) Screening on cytotoxicity of medicinal plants against L1210 cell. *Yakhak Hoeji* 36: 491-495.
7. Lee, J. H., Kang, K. S. and Ahn, B.J. (1986) Cytotoxic screening of oriental drugs and folklores against L1210 cells. *K. J. Pharmacogn.* 17: 286-291.
8. Ryu, S. H., Moon, K. H. and Park, M. Y. (1982) Primary screening for growth inhibitors of L1210 cells from oriental herbs. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 10: 53-58.
9. Jang, I. M. and Chi, H. J. (1982) Toxicological evaluation of medicinal plants used for herbal drugs (III). Cytotoxicity and antitumor activities against Glioma (9 ASK). *Kor. J. Pharmacogn.* 13: 55-61.
10. 李昌福. (1989) 大韓植物圖鑑. 鄉文社, 서울.
11. Collins, S.J., Gallo, R.C. and Gallagher, R.E. (1977) Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* 270: 347-349.
12. National Cancer Institute USA. (1972) Cell Culture Screen, KB, Protocol 1600. *Cancer Chemother. Rep. (part 3)* 3: 17.
13. Thayer, P. S., Himmelfarb, P. and Watts, G. L. (1971) Cytotoxicity assay with L1210 Cells *in vitro*. Comparison with L1210 cells *in vitro* and KB cells *in vitro*. *Cancer Chemother. Rep. (part 2)*, 1-25.
14. Spjut, R. W. and Perdue, R. E. (1976) Plant folklore: A tool for predicting sources of antitumor activity. *Cancer Treat. Rep.* 60: 979-985.

(1996년 6월 19일 접수)