

약용 식물의 암세포 다제내성 조절 활성 검색

김세은, 황방연, 김영호* 김영중,¹ 이경순,² 이정준*

생명공학연구소, ¹서울대학교 약학대학, ²충북대학교 약학대학

Multidrug-resistance Reversing Activity of Medicinal Plants

Se Eun Kim, Bang Yeon Hwang, Young Ho Kim,* Young Choong Kim,¹
Kyong Soon Lee² and Jung Joon Lee*

Natural Product & Biosynthesis R.U, Korea Research Institute of Bioscience and
Biotechnology, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600;

¹College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742; and

²College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763

Abstract - Methanol extracts from 450 plants were screened for multidrug-resistance reversing activity using drug sensitive KB-3-1 and multidrug-resistant KB-V1 cells. Among them, the extracts of *Cynanchum wilfordii*, *Torilis japonica*, *Celastrus orbiculatus*, *Melia toosendan* and *Terminalia chebula* strongly potentiated vinblastine cytotoxicity in KB-V1 cells. But their cytotoxicities to both sensitive KB-3-1 and resistant KB-V1 cells were in the same order of magnitude. These results indicate that the above samples would contain the active principles which do not exert their activity solely by cytotoxicity.

Key words - multidrug-resistance(MDR); vinblastine; *Cynanchum wilfordii*; *Torilis japonica*; *Celastrus orbiculatus*; *Melia toosendan*; *Terminalia chebula*.

항암 화학요법은 외과적 수술, 방사선 요법 및 면역요법과 함께 암치료의 주요 방법으로 자리잡고 있다. 그러나 화학요법 시행 초기에는 종양의 크기가 줄어들어는 민감한 반응을 나타내나 점차 암세포가 항암제에 대하여 내성을 획득하여 결국 화학요법이 실패하게 되는 경우가 많다. 특히, 다제내성(multidrug-resistance, MDR)은 doxorubicin, vinblastine, taxol, campotecin 등 구조와 작용기전이 상이한 여러 항암제에 대하여 교차내성을 나타냄으로써 화학요법의 가장 큰 장애가 되고 있다. 또한 대장암, 폐암 등 특정 조직 유래의 암은 항암제에 대한 노출이 없어도 발병 초기부터 다제내성을 발현

하기도 한다.¹⁾ 전형적인 다제내성의 기전은 내성세포의 세포막에 170 kD의 p-glycoprotein(P-gp)이 과잉발현되어서 항암제를 세포밖으로 능동적으로 배출함으로써 세포내 항암제의 농도가 감소되기 때문인 것으로 알려져 있다.²⁾ 최근에는 P-gp의 과잉발현 외에도 glutathione-S-transferase의 과잉발현,³⁾ topoisomerase II의 이상,⁴⁾ MRP(multidrug-resistance related protein) 단백질의 과잉발현⁵⁾ 등이 다제내성을 유도함이 밝혀졌다. 지금까지 verapamil 등 calcium channel blockers, calmodulin inhibitors 및 cyclosporins 등 기존의 약물들이 다제내성 조절 활성이 있음이 연구되어 왔다. 이들 약물은 인체에 대한 부작용 때문에 임상적으로 사용되고 있는 약물은 없으나 최근에 면역억제제인 cyclosporin 유도체인 PSC833

*교신저자 : Fax 042-860-4595

*현근무지 : 충남대학교 약학대학

이 임상 시험 중에 있다.⁶⁾

따라서 본 연구에서는 부작용이 적고 효과가 강력한 다제내성 조절제를 개발하기 위한 노력의 일환으로 천연물로부터 항암제의 다제내성 극복 물질을 탐색하였다. 총 450종 식물의 MeOH 추출물을 대상으로 다제내성 조절활성을 검색한 결과 14 종의 생약에서 높은 다제내성 조절 활성이 있음을 발견하였다.

재료 및 방법

재료 - 실험에 사용한 450 종 식물중 172종은 전국 각지의 산야에서 직접 채집하여 음건 세절하여 사용하였다. 278종 한약재는 대전시 소재 한약건재상에서 구입하였다. 22종 식물에 대하여는 충북대학교 이경순 교수님이 동정하였으며 확증표본은 생명공학연구소에 보관하였다(Table I).

기기 및 시약 - 세포배양에 필요한 배지와 소태아 혈청은 Gibco사(Grand Island, NY, U.S.A)에서 구입하였으며 vinblastine sulfate, verapamil hydrochloride 및 기타 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하였다.

시료의 조제 - 식물재료는 실온에서 MeOH로 2회 추출한 후 감압농축하여 20 mg/ml의 농도로 DMSO에 녹여 사용하였다.

세포주 및 세포배양 - 인체구강암 세포주 KB-3-1 세포와 동세포를 vinblastine의 농도를 점차 증가시키면서 배양하여 내성을 유도한 다제내성 세포주인 KB-V1 세포는 미국 국립암연구소 M. Gottesman 박사로부터 분양받아 사용하였다. KB-3-1 세포는 2 mM L-glutamine과 10% 소태아혈청이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)에서 배양하였으며, KB-V1세포는 내성을 유지하기 위하여 1 µg/ml의 vinblastine이 함유된 위의 배양액에서 배양하였다.

다제내성 조절 활성 검색 - 세포독성은 sulforhodamine B (SRB)법에 의하여 측정하였다.⁷⁾ 대수 증식기에 있는 세포를 trypsin-EDTA로 처리하여 단일세포 부유액을 만든 후 25,000-50,000/ml 농도가 되도록 희석하여 96 well plate에 100 µl의 양으로 분주한 후 24시간 배양한 후, 단계적으로 희석한 시료 또는 항암제를 함유한 배양액 100 µl를 가하였다. 세포의 생존율을 측정하기 위하여 48시간 배양 후 세

Table I. Selected plant materials used in this study

Plant	Family	Part	Specimen No.
<i>Anemarrhena asphodeloides</i> (지모)	Liliaceae	Rhizoma	92014
<i>Anthriscus sylvestris</i> (전호)	Umbelliferae	Herba	92381
<i>Artemisia argii</i> (쑥)	Compositae	Herba	147
<i>Attractylodes japonica</i> (삼주)	Compositae	Rhizoma	150
<i>Caesalpinia sappan</i> (소목)	Leguminosae	Lignum	182
<i>Celastrus orbiculatus</i> (노박덩굴)	Celastraceae	Radix	93428
<i>Citrus aurantium</i> (탱자나무)	Rutaceae	Fructus	145
<i>C. unshiu</i> (귤나무)	Rutaceae	Fructus	204
<i>Curcuma zedoaria</i> (봉출)	Zingiberaceae	Rhizoma	347
<i>Cynanchum wilfordii</i> (큰조롱)	Asclepiadaceae	Radix	92203
<i>Echinops setifer</i> (절굿대)	Compositae	Radix	92235
<i>Evodia officinalis</i> (오수유)	Rutaceae	Fructus	92003
<i>Forsythia koreana</i> (개나리)	Oleaceae	Fructus	138
<i>Indigofera kirilowii</i> (땅비싸리)	Reguminosae	Radix	92193
<i>Inula helenium</i> (목향)	Compositae	Radix	218
<i>Magnolia liliiflora</i> (자목련)	Magnoliaceae	Flora	92046
<i>Melia toosendan</i> (멀구슬나무)	Meliaceae	Fructus	92004
<i>Pharbitis nil</i> (나팔꽃)	Convolvulaceae	Semen	320
<i>Polygonum multiflorum</i> (적하수오)	Polygonaceae	Radix	327
<i>Taxus caespitosa</i> (눈주목)	Taxaceae	Herba	92204
<i>Terminalia chebula</i> (가자)	Combretaceae	Fructus	351
<i>Torilis japonica</i> (사상자)	Umbelliferae	Fructus	92010

포를 고정시키기 위하여 냉 50% trichloroacetic acid 용액을 well 당 50 μ l를 가하고 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 방치하여 세포를 고정하였다. 고정된 세포는 물로 5회 세척한 후 0.4% sulforhodamine B(in 1% acetic acid)용액을 가하여 30분간 염색시킨 후 1% acetic acid 용액으로 4회 세척하여 건조한 후 10 nM Tris 용액(pH 10.5)으로 용해시켜 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 다제내성 조절 활성의 정도는 KB-V1 세포에 대한 시료 단독 처리시의 IC_{50} 와 100 nM vinblastine과 시료를 동시에 처리하였을 때의 IC_{50} 의 비를 활성 증강도(enhancement factor, E.F.)로써 나타내었다.

$$E.F. = \frac{IC_{50} \text{ of sample}}{IC_{50} \text{ of (sample + vinblastine)}}$$

결과 및 고찰

총 450종 식물시료의 MeOH 추출물에 대하여 일

차적으로 KB-V1세포를 이용하여 다제내성 조절 활성을 측정하였다. KB-V1 세포에 단계적으로 희석한 시료를 가하여 100 nM의 vinblastine을 동시에 처리한 경우와 처리하지 않은 경우에 대하여 각각 시료의 IC_{50} 를 측정하였다. 처리한 vinblastine 농도는 감수성 세포주 KB-3-1 세포에 대하여는 강한 세포독성을 나타내나 다제내성 세포주인 KB-V1 세포의 세포성장에는 거의 영향을 미치지 않는 농도인 100 nM로 선택하였다. 따라서 vinblastine 존재하에서 시료의 IC_{50} 의 현저한 감소는 시료가 내성 세포의 vinblastine에 대한 독성을 현저하게 증가시킴을 의미한다. 즉 시료는 내성 세포에서 항암제의 독성을 증가시킴으로써 다제내성 극복 활성을 나타내게 된다.

이 검색법으로부터 각 식물 시료는 세가지 그룹으로 분류할 수 있었다. 첫째 그룹은 내성 세포에 세포독성을 나타내지도 않고 다제내성 조절활성을 보이지도 않았다. 둘째 그룹은 내성 세포에 세포독성을 나타내었다. 셋째 그룹은 시료의 비세포독성 농도에

Table 2. Effects of plant extracts on the cell growth of drug sensitive KB-3-1 and resistant KB-V1 cells

Plant	IC_{50} (μ g/ml) ^a			E.F
	KB-3-1	KB-V1	KB-V1 (100 nM VLB)	
<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	-	48.62	43.68	1.11
<i>Anthriscus sylvestris</i>	0.18	0.25	0.18	1.38
<i>Artemisia argii</i>	-	55.62	32.53	1.71
<i>Atractylodes japonica</i>	88.34	79.19	16.65	4.75
<i>Caesalpinia sappan</i>	-	22.35	20.66	1.08
<i>Celastrus orbiculatus</i>	6.13	5.82	0.50	11.64
<i>Citrus aurantium</i>	150.23	155.80	58.28	2.67
<i>C. unshiu</i>	328.65	356.32	48.94	7.20
<i>Curcuma zedoaria</i>	53.34	49.18	7.18	6.84
<i>Cynanchum wilfordii</i>	188.56	147.31	0.51	288.82
<i>Echinops setifer</i>	108.64	126.37	1.90	3.04
<i>Evodia officinalis</i>	7.45	8.24	10.65	4.33
<i>Forsythia koreana</i>	5.38	7.25	38.63	0.68
<i>Indigofera kirilowii</i>	130.56	112.30	11.60	2.90
<i>Inula helenium</i>	10.33	10.72	12.84	0.92
<i>Magnolia liliiflora</i>	48.65	53.39	13.60	4.15
<i>Melia toosendan</i>	123.67	166.45	8.36	12.19
<i>Pharbitis nil</i>	3.03	4.56	72.68	0.54
<i>Polygonum multiflorum</i>	- ^b	88.32	1.34	1.21
<i>Taxus caespitosa</i>	4.88	8.79	6.81	6.55
<i>Terminalia chebula</i>	150.08	137.46	0.79	20.18
<i>Torilis japonica</i>	38.35	30.98		38.98

^a IC_{50} was the concentration of sample that reduced the cell density to 50% of vehicle-treated control as determined by SRB method. ^bnot tested.

서 vinblastine의 세포독성을 증가시키는 내성조절 활성을 나타내었다. Table I에 각 그룹 중 활성이 우수한 식물 22종에 대하여 검색 결과를 나타내었다. 둘째 및 셋째 그룹에 속하는 시료에 대하여는 감수성 세포 KB-3-1에 대하여도 세포독성을 측정하여 감수성 세포에 비하여 내성세포에 대하여 선택적 세포독성을 나타내는지 알아보았다. 그 결과 전호, 목향, 개나리, 나팔꽃은 세포독성을 나타내는 시료로 감수성 세포와 내성세포 간에 IC_{50} 의 큰 차이가 없거나 내성세포에 대하여 다소 높은 IC_{50} 를 나타내었으므로 내성 세포에 대하여 선택적 세포독성을 나타내지는 않는 것으로 판단되었다.

다제내성 조절 활성을 나타내는 14종의 시료도 모두 그 자체의 세포독성은 감수성 세포주 KB-3-1과 내성 세포주 KB-V1에 대하여 큰 차이를 나타내지 않았다. 그러나 KB-V1 세포에 100 nM의 vinblastine을 처리하였을 때의 활성증강도(E.F)는 큰조롱, 사상자, 멸구슬나무, 노박덩굴, 가자에서 E.F. 10 이상의 높은 활성을 나타내었으며, 백출, 봉출, 오수유, 눈주목, 신이, 청피, 누로는 E.F. 3-10의 중등도의 조절 활성을 나타내었다. 특히, 오수유, 눈주목, 노박덩굴은 그 항종양 활성 성분이 이미 보고되어 있는 식물에서 강한 다제내성 조절 활성을 보이고 있는 점에서 이들 식물내에 항종양 활성 성분과 다제내성 조절 성분이 함께 함유되어 있을 가능성을 시사해주고 있다. 실제로 *Vinca* alkaloid의 비독성 유도체인 vindoline이 내성 세포주에서 vinblastine 및 daunorubicin의 세포독성을 증가시키고 세포내 항암제 농도를 증가시키는 것이 알려졌으며,⁸⁾ 저자 등은 이미 오수유로부터 세포독성 성분 evo-diamine과 다제내성 조절 성분 rutaecarpine을 함께 분리하여 그 활성을 보고한 바 있다.⁹⁾

지금까지 식물 유래의 reserpine, yohimbine, thaliblastine 등 indole alkaloids와 quinine, cinchonine 등 quinoline alkaloids가 다제내성 세포에 대한 항암제 독성을 증가시키는 것이 밝혀진 이래 많은 alkaloid가 식물로부터 분리되었으며 그 유도체가 합성되었다.^{6,10,11)} 최근에는 식물, 미생물 및 해양생물로부터 lignans, cyclic peptides 등 전형적인 다제내성 조절제와는 다른 다양한 구조의 다제내성 조절 물질이 분리 보고되고 있으며 이들의 활성과 작용기전에 관한 연구가 활발히 진행되고 있

다.¹²⁻¹⁶⁾

따라서 이 결과로부터 선별된 활성이 높은 각 식물로부터 다제내성 조절 성분을 분리하여 그 활성도를 측정하고 작용기전을 연구함으로써 새로운 타입의 다제내성 조절제 개발 및 선도 화합물을 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

인용문헌

1. Kartner, N., Riordan, J.R., and Ling, V. (1983) Cell surface P-glycoprotein is associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science* (Washington DC), 221: 1285-1288.
2. Gottesman, M. M. and Pastan I. (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 385-425.
3. Saburi, Y., Nakagawa, M., Ono, M., Sakai, M., Muramatsu, M., Kohno, K. and Kuwani, M. (1989) Increased expression of glutathione S-transferase gene in *cis*-diamminedichloroplatinum(II)-resistant variants of a Chinese hamster ovary cell line. *Cancer Res.* 49: 7020-7025.
4. Charcosset, J. Y., Saucier, J. M. and Jacquemin, S. A. (1988) A reduced DNA topoisomerase II activity and drug-stimulated DNA cleavage in (-)-hydroxyellepticine resistant cells. *Biochem. Pharmacol.*, 37: 2145-2149.
5. Zaman, G. J. R., Flens, M. J., Leusden, M. R., Hass, M. De., Mulder, H. S., Lankelma, J., Pinedo, H. M., Schper, R. J., Bass, F., Broxterman, H. J. and Borst, P. (1994) The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 8822-8826.
6. Hausdorff, J., Fisher, G. A. and Hasley, J. (1995) Phase I trial of etoposide with the oral cyclosporin SDZ PSC 833, a modulator of multidrug resistance. *Prod. Amer. Soc. Clin. Oncol.* 14: Abst 407.
7. Skehan, P., Streng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, J. D., Warren, T., Bokesch, H., Kenny, H. and Boyd, M. R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1107-1102.
8. Inaba, M. and Nagashima, K. (1986) Non-anti-tumor *Vinca* alkaloids reverse multidrug resis-

- tance in P388 leukemia cells *in vitro*. *Jpn. J. Cancer Res.* 77: 197-204.
9. 이성우, 황방연, 김세은, 김환목, 김영호, 이경순, 이정준, 노재섭. (1995) 약용식물 오수유로부터 다제약제 내성 조절 성분의 분리, *생약학회지* 26: 344-348.
 10. Chen, G., Ramachandran, C. and Krishan, A. (1993) Thaliblastine, a plant alkaloid, circumvents multidrug resistance by direct binding to P-glycoprotein. *Cancer Res.*, 53: 2544-2549.
 11. Shiraishi, N., Akiyama, S., Nakagawa, M., Kobayashi, M. and Kuwano, M. (1987) Effect of bisbenzyl isoquinoline (biscoclaurine) alkaloids on multidrug resistance in KB human cancer cells. *Cancer Res.* 47: 2413-2416.
 12. Scambia, G., Ranelletti, F. O., Panici, P. B., Vincenzo, R. D., Bonanno, G., Ferrandina, G., Piantelli, M., Bussa, S., Rumi, C., Cianfriglia, M. and Mancuso, S. (1994) Quercetin potentiates the effect of adriamycin in a multidrug-resistant MCF7 human breast-cancer cell line: P-glycoprotein as a possible target. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 34, 459-464.
 13. Somanabandhu, A., Nitayangkura, S., Mahidol, C., Ruchirawat, S., Likhitwitayawuid, K., Shieh, H. L., Chai, H., Pezzuto, J. M. and Cordell, G. A. (1993) ¹H- and ¹³C-NMR assignments of phyllanthin and hypophyllanthin: Lignans that enhance cytotoxic responses with cultured multidrug-resistant cells. *J. Nat. Prod.* 56: 233-239.
 14. You, M., Wickramaratne, D. B. M., Silva, G. L., Choi, H., Chagwedera, T. E., Farnsworth, N. R., Cordell, G. A., Kinghorn, A. D. and Pezzuto, J. M. (1995) (-)-Romerine, an aporphine alkaloid from *Annona senegalensis* that reverse the multidrug-resistance phenotype with cultured cells. *J. Nat. Prod.* 58: 598-563.
 15. Kawada, M., Imoto, M. and Umezawa, K. (1991) Suppression of multidrug resistance by inostamycin in cultured human carcinoma KB cells. *J. Cell Pharmacol.* 2: 138-142.
 16. Smith, C. D., Prinsep, M. R., Caplan, F. R., Moore, R. E. and Patterson, G. M. (1994) Reversal of multiple drug resistance by tolyporphin, a novel cyanobacterial natural product. *Oncol. Res.* 6: 211-218.

(1997년 8월 8일 접수)