

## 두충(杜冲) 추출물의 암세포증식 저해효과

최연희 · 서지희 · 김정숙 · 허정희 · 김성기 · 최상운 · 김영섭 · 김영균<sup>1</sup> · 유시용\*

한국화학연구원, <sup>1</sup>국민대학교 삼림과학대학

### Inhibitory Effects of the Stem Bark Extract of *Eucommia ulmoides* on the Proliferation of Human Tumor Cell Lines

Yeon Hee Choi, Jee Hee Seo, Jung Sook Kim, Junghee Heor, Seong-Kie Kim, Sang Un Choi, Young Sup Kim, Young-Kyoon Kim<sup>1</sup>, and Shi Yong Ryu\*

Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejeon 305-606, Korea

<sup>1</sup>College of Forest Science, Kookmin University, Seoul 136-702, Korea

**Abstract** – A bioassay-guided fractionation of the stem bark extract of *Eucommia ulmoides* Oliver (Eucommiaceae) led to the isolation of three iridoid constituents, genipin (1), geniposide (3), geniposidic acid (4) as well as (±)-guaiacylglycerol (2) and fatty acid mixtures as active ingredients of the extract responsible for the antitumoral property. The EtOAc soluble part and BuOH soluble part of the extract demonstrated a potent inhibition on the proliferation of cultured human tumor cells such as A549 (non small cell lung), SK-OV-3 (ovary), SK-MEL-2 (melanoma), XF498 (central nerve system) and HCT-15 (colon) in vitro, whereas the remaining water soluble part exhibited a poor inhibition. The intensive investigation of the EtOAc soluble part and BuOH soluble part of the extract yielded genipin, guaiacylglycerol, geniposide, geniposidic acid and large amounts of fatty acid mixtures as active components

**Key words** – Genipin, geniposide, geniposidic acid, *Eucommia ulmoides*

두충(杜冲) *Eucommia ulmoides* Oliver은 두충나무과 (Eucommiaceae)에 속하는 1과 1속 1종의 낙엽교목으로서 높이가 15 m, 지름 40 cm까지 자란다. 원산지는 중국의 호북, 사천성 등지로 알려져 있으며 우리나라에는 1926년에 처음 중국으로부터 도입되었다. 우리나라 중부이남 지역 어디에서나 잘 서식하며 특히 계곡이나 산록지대 또는 토질이 좋고 수분이 적절한데서 잘 자라며 약용가치가 높아 전국적으로 많이 재배되고 있다.

대한약전에는 이 나무의 여러해 묵은 수피를 두충(杜冲, *Eucommiae Cortex*)이라고 기재되어 있으며 강장, 진정, 진통작용 등이 알려져 있고 혈압강하효과가 있어 요배신경통, 유산 및 고혈압 등의 질병을 예방하는 데 사용한다고 명시되어 있다. 또, 우리나라에서는 이 식물의 잎을 차로 많이 음용하고 있는데 두충의 잎에는 비타민 C가 차 잎보다도 많은 63 mg % 정도 들어 있고 더운물에 우려나오는 가용성

분도 차잎에 비하여 많이 들어있어 오래 복용하면 간과 담낭의 기능을 활발하게 해주고 다리와 팔의 무력감을 없애 주고 몸이 가벼워지며 정력도 좋아진다고 알려져 있으나 유효성분에 관한 연구사례는 미진한 상황이다.

두충 및 두충차의 약리활성에 관한 연구로는 활성산소종의 소거작용<sup>1)</sup> 및 항산화효과<sup>2)</sup>가 보고되고 있으며 collagen synthesis를 촉진시키는 효과,<sup>3)</sup> α-glucosidase를 억제하는 기전에 의거한 항당뇨효과,<sup>4)</sup> 암발생저해효과(항돌연변이효과),<sup>5,6)</sup> 항보체효과(anticomplementary activity)<sup>7)</sup> 등이 보고되고 있다.

한편, 본 연구실에서는 다년간에 걸쳐 A549 (인체유래 비소세포암주) 등 5종의 인체유래 암세포주를 대상으로 하여 시험관 내 (*in vitro*) 세포증식저해효과<sup>8)</sup>를 지표로 하여 300여종의 생약재 추출물들의 항암효능을 검색하여 본 결과 생약재 두충의 MeOH 추출물이 농도 의존적으로 비교적 양호한 항암효과를 보여주었다. 또, 문헌조사 결과 아직껏 두충의 항암효과 및 그 유효성분에 대한 체계적인 연구가 진행된 바 없어 본 연구를 착수하게 되었다.

\*교신저자(E-mail) : syryu@krcit.re.kr  
(FAX) : 042-860-7160

## 재료 및 방법

### 시약 및 기기

본 연구에 사용된 시약은 모두 특급(GR) 및 1급(EP급) 시약을 사용하였으며 지방산표준품은 Aldrich사로부터 구입하였다. 용접은 Haakebuchler 미량용접 측정기를 이용하여 측정하였으며 측정치는 따로 보정하지 아니하였다. 선광도  $[\alpha]_D$ 는 JASCO DIP-4 digital polarimeter를, low resolution MS(70 eV)는 JEOL사의 JMS-DX 303 mass spectrometer, 각종 proton 및 carbon NMR spectra는 Bruker의 AM-300 및 AMX-500을 이용하여 측정하였다. 특별히 기재하지 않은 한, 사용한 용매의 peak를 기준 peak로 사용하여 chemical shift치를 정하였으며  $\delta$ (ppm)으로 표시하였다. Column chromatography는 silica gel (70–230 mesh, Merck), Lichroprep RP-18 (40-63  $\mu$ m, Merck)를 사용하였으며 preparative TLC는 Kiesel gel 60 F plate(0.5 mm, Merck)를 사용하였다.

### 실험재료

실험에 사용된 생약재 두충은 경동시장에서 구입하여 국민대학교 김 영균 교수의 감정을 거친 후 실험에 사용하였으며 voucher specimen은 한국화학연구원 및 국민대학교 삼림과학대학에 보관되어 있다.

### 추출 및 분리

건조된 두충 1 kg을 MeOH에 5일간 냉침시킨 후 감압 농축하여 methanol (MeOH) extract 105 g을 얻었다. 이 MeOH extract를 ethylacetate (EtOAc)와 증류수로 partition 한 후 EtOAc층을 감압농축한 결과 EtOAc soluble part 27 g을 얻었다. 잔류 물층은 butanol (BuOH)로 추출하여 BuOH soluble part 10 g을 얻었다. EtOAc soluble part 27 g을 hexane/EtOAc 혼합용매를 용출용매로 사용하여 stepwise gradient elution 방식으로 silica gel (70–230 mesh, 750 g) column ( $\varnothing=5.0 \times 100$  cm) chromatography를 실시하여 EC-1 (660 mg), EC-2 (1.62 g), EC-3 (1.36 g), EC-4 (3.24 g), EC-5 (5.4 g), EC-6 (4.66 g), EC-7(5.2 g) 등 총 7개의 fraction으로 나누었다. 이 중 EC-5를 EtOAc에 녹인 후 alumina column ( $\varnothing=1.0 \times 20$  cm)을 통과시키고 용출액을 농축하여 다시 silica gel column ( $\varnothing=2.0 \times 40$  cm) chromatography (MC:MeOH=200:1 $\rightarrow$ 20:1)를 실시하여 EC-51 (600 mg), EC-52 (760 mg), EC-53 (2300 mg), EC-54 (490 mg)을 얻었다. EC-54 (490 mg)는 70% MeOH를 용출액으로 사용하여 RP-18 column chromatography를 실시한 결과 compound 1 (120 mg)을 분리하였다.

EC-53 (2.3 g)을 RP-18 column chromatography 및 silica

gel column chromatography를 수차례 반복하고 최종적으로 preparative silica gel TLC (MC:MeOH=20:1)를 실시하여 compound 2 (59 mg)을 분리하였다.

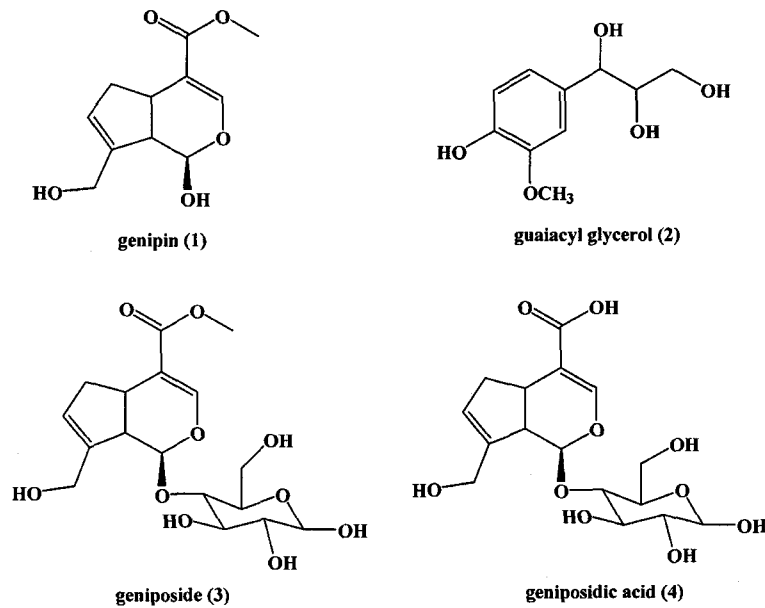
BuOH층 10 g을 MC/MeOH 혼합용매를 용출용매로 사용하여 stepwise gradient elution 방식으로 silica gel (70–230 mesh, 750 g) column ( $\varnothing=5.0 \times 100$  cm) chromatography를 실시하여 BC-1 (2.21 g), BC-2 (750 mg), BC-3 (2.55 g), BC-4 (1.5 g), BC-5 (2.74 g)을 얻었다. BC-3 (2.55 g)을 MeOH/H<sub>2</sub>O (step gradient)로 RP-18 C.C.를 실시하여 4개의 분획을 얻었으며 그 중 2번째 분획인 BC-32를 silica C.C. (MC:MeOH=20:1, 10:1, 1:1)를 거듭실시하여 compound 3 (232 mg)을 얻었으며 BC-4 (1.5 g)를 RP-18 C.C. (30%, 100% MeOH)하여 compound 4 (250 mg)를 분리하였다.

Compound 1 무색침상결정 (MeOH), mp. 120°C, C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>, <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.41 (1H, s, H-3), 5.79 (1H, brs, H-7), 4.72 (1H, d,  $J=8.7$  Hz, H-1), 4.23 (2H, m, H-10), 3.66 (3H, s, -OMe), 3.12 (1H, m, H-5), 2.81 (1H, m, H-6), 2.46 (1H, dd,  $J=8.1, 8.7$  Hz, H-9), 2.02 (1H, m, H-6), <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  36.6 (C-5), 38.9 (C-6), 47.8 (C-9), 51.3 (-OMe), 61.1 (C-10), 96.3 (C-1), 110.5 (C-4), 130.6 (C-7), 142.1 (C-3), 152.6 (C-8), 168.0 (C-11).

Compound 2 무색액상, C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>,  $[\alpha]_D=0$  (CHCl<sub>3</sub> 0.1 %), <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  3.13 (1H, m, H-9), 3.88 (1H, m, H-9), 3.90 (3H, s -OMe), 4.26 (1H, m, H-8), 4.76 (1H, d,  $J=4.0$  Hz, H-7), 6.83 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-3) 6.90 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-2), 6.91 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-6), <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  : 53.9 (-OMe), 55.8 (C-9), 71.5 (C-7), 85.7 (C-8), 108.6 (C-6), 114.2 (C-3), 118.8 (C-2), 132.6 (C-1), 145.1 (C-4), 146.6 (C-5).

Compound 3 흰색분말, mp. 160°C, C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>10</sub>, <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) :  $\delta$  2.65 (2H, m), 3.0-3.2 (6H, m), 3.64 (4H,s), 4.03 (1H, m), 4.11 (1H, m), 4.51 (2H, m), 4.73 (1H, m), 4.97 (2H, m), 5.08 (1H, m), 5.79 (1H, s, H-7), 7.52 (1H, s, H-3). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) :  $\delta$  : 34.5 (C-5), 38.0 (C-6), 45.9 (C-9), 51.1 (-OMe), 59.4 (C-10), 61.0 (C-6'), 70.0 (C-4'), 73.3 (C-2'), 76.6 (C-5'), 77.3 (C-3'), 95.7 (C-1), 98.6 (C-1'), 110.9 (C-4), 125.5 (C-7), 144.1 (C-3), 151.6 (C-8), 166.9 (C-11).

Compound 4 흰색분말, C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>, <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) :  $\delta$  2.60 (2H, m), 3.00–3.17 (6H, m), 4.12 (2H, m), 4.53 (2H, m), 4.72 (1H, t), 4.96–5.12 (4H, m), 5.68 (1H, s, H-7), 7.41 (1H,s, H-3). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) :  $\delta$  34.7 (C-5), 38.1 (C-6), 45.9 (C-9), 59.5 (C-



10), 61.0 (C-6'), 70.0 (C-4'), 73.4 (C-2'), 76.7 (C-5'), 77.3 (C-3'), 95.7 (C-1), 98.6 (C-1'), 111.6 (C-4), 125.6 (C-7), 144.2 (C-3), 151.1 (C-8), 168.1 (C-11).

**암세포 증식저해활성(*in vitro* cytotoxicity)의 측정**

실험에 사용한 암세포들은 A-549(non small cell lung-carcinoma), SK-OV-3 (adenocarcinoma, ovary malignant ascites), SK-MEL-2 (malignant melanoma, metastasis to skin of thigh), XF-498 (central nerve system tumor), HCT-15 (colon adenocarcinoma)이며 이 암세포들은 모두 human origin tumor cell line들로서, 미국의 국립암연구소(NCI)로부터 분양받아 한국화학연구원에서 계대배양 중인 것을 사용하였다. 배양액은 5% fetal bovine serum 으로 보강된 RPMI 1640 medium을 사용하였으며, 37°C 항온 항습 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 세포의 계대는 3-4일에 1회씩 하였으며, 계대시 세포를 용기 부착면으로부터 탈리시키기 위하여 phosphate buffered saline (PBS) 용액에 0.25% trypsin과 3 mM trans-1,2-di-aminocyclohexane-n,n,n,n-tetraacetic acid (CDTA)를 녹인 용액을 사용하였다.

암세포 증식저해활성은 1989년에 미국의 국립암연구소(NCI)에서 약물의 *in vitro* 항암활성을 1차적으로 측정하기 위하여 개발된 sulforhodamine B (SRB) assay 방법<sup>8)</sup>을 활용하였다. 즉 계대중인 세포들을 실험에 사용하기 위하여 우선 trypsin-CDTA 용액으로 용기부착면으로부터 탈리시키고, 96 well flat bottom microplate (Falcon)에 각 well 당 세포수가 5×10<sup>3</sup> (A-549, HCT-15), 1×10<sup>4</sup> (SK-MEL-2, XF 498), 2×10<sup>4</sup> (SK-OV-3)이 되도록 분주하였다. 분주된 세포

들은 CO<sub>2</sub> incubator 내에서 24시간 배양하여 바닥에 부착시킨 후 aspirator로 media를 제거하고 6 농도의 log dose로 medium으로 희석한 test material 용액들을 세포가 들어 있는 well에 각각 100 μl씩 3배수(triplicate)로 넣어주고, 48시간동안 더 배양하였다. 검체용액은 소량의 DMSO(dimethyl-sulfoxide)에 녹인 후 배지용액으로 희석하였으며 총 반응액 중 DMSO의 농도는 0.5% 이하가 되도록 하였다. 검체용액은 세포에 가하기 전에 milipore filter로 여과하여 실험의 무균상태를 유지하였다. 세포를 약물과 48시간 배양한 후 각 well의 medium을 제거하고 10% trichloroacetic acid (TCA)를 100 μl씩 가하여 4°C에서 1시간동안 방치하여 세포들을 plate의 바닥면에 고정시켰다. 세포의 고정이 끝난 후 plate 를 증류수로 5-6회 세척하여 남아있는 TCA 용액을 완전히 제거하고 실온에서 남은 물기가 없도록 건조시켰다. 완전히 건조된 plate 는 well당 100 μl의 1% acetic acid 용액에 0.4% SRB를 녹인 염색용액을 가하여 30분간 세포를 염색하고 다시 1% acetic acid 용액으로 5-6회 세척하여 세포에 결합하지 않은 과잉의 SRB를 제거하였다. 이렇게 염색된 cell plate 들을 다시 실온에서 건조시킨 후 well 당 100 μl의 10 mM trisma base (unbuffered)용액을 가하여 titer plate shaker로 10분간 shaking하여 염색액을 용출시킨 후 microplate reader를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 암세포들에 대한 약물의 효과를 계산하기 위하여 약물을 가하는 시점에서의 세포수(Tz, zero time)와 약물 대신 동량의 medium만을 가하여 48시간 배양했을 때의 세포수(C, control) 및 각농도의 약물과 함께 48시간 배양했을 때의 세포 수(T, test)을 각각 측정하여 다음의 수식

에 따라 항암활성을 계산하였다. 즉  $T_z > T_{in}$  경우에는  $[(T - T_z)/(C - T_z)] \times 100$ 으로 계산하였고,  $T_z < T_{in}$  경우에는  $[(T - T_z)/T_z] \times 100$ 의 수식으로 계산하였다. 이렇게 계산된 값들로부터 LOTUS program의 data regression tool을 이용하여 약물이 암세포의 증식을 50% 저해하는 농도인 50% effective dose( $IC_{50}$ )를 계산하였다

## 결과 및 고찰

A549(비소세포암주), SK-OV-3(난소암주), SK-MEL-2(흑색종주), XF498(중추신경계암주) 및 HCT-15(직장암주) 등 5종의 인체유래 암세포주에 대한 시험관 내 (*in vitro*) 세포 증식저해효과를 지표로 하여 생약재 추출물의 항암활성을 측정하여 본 결과 생약재 두층의 MeOH 추출물은 20  $\mu\text{g/ml}$  - 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도영역에서 농도 의존적으로 각 암세포주의 증식을 저해하고 있음이 관찰되었다. (A549 cell의 세포증식을 50% 저해하는 농도 [ $IC_{50}$ ]는 약 70  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}$ 로 나타났다.

또, 두층의 MeOH 추출물을 EtOAc, BuOH, 물의 순서로 단계 분획하고 각 분획물의 세포증식저해효과를 같은 방법으로 측정하여 본 결과 EtOAc soluble part가 우수한 활성 (A549의 세포증식을 50% 저해하는 농도 [ $IC_{50}$ ]는 약 30  $\mu\text{g/ml}$ )을 보여준 반면 BuOH 가용분 및 최종 수용성분획은 항암활성이 미미하였다(A549의 세포증식을 50% 저해하는 농도 [ $IC_{50}$ ]는 100  $\mu\text{g/ml}$  이상). 따라서 가장 우수한 암세포증식저해효과를 보여준 EtOAc soluble part를 전술한 방법에 따라 silica gel column chromatography와 RP-18 column

chromatography 등을 반복하여 항암활성을 나타내는 compound 1과 compound 2 그리고 지방산 혼합물을 분리하였다. 이중 compound 1과 compound 2는 각종 물리화학적 성상 및 분광학적 자료를 분석한 결과 compound 1은 monoterpene iridoid계 화합물인 genipin으로 compound 2는 phenylpropanoid 계열의 ( $\pm$ )-guaiacylglycerol로 동정하였으며<sup>9)</sup> 이들은 모두 10  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도영역에서 양호한 암세포증식 저해효과를 보여주었다(Table I).

한편 EtOAc soluble part를 활성유도분획법에 따라 column chromatography로 정제하는 도중 탁월한 암세포증식저해효과 (A549의 세포증식을 50% 저해하는 농도 [ $IC_{50}$ ]는 약 20  $\mu\text{g/ml}$ )를 나타내고 있는 미지의 성분이 다량 분리되었다. 또, 이 성분이 중성 alumina gel에 쉽게 흡착 제거되는 화학적 특성을 이용하여 EtOAc soluble part를 일부분 중성 alumina gel로 정제하여 본 결과 이 성분은 전체 EtOAc soluble part 총 중량의 30% 이상을 차지하고 있음을 알 수 있었다. 한편, 이 성분의  $^1\text{H-NMR}$ 과  $^{13}\text{C-NMR}$  data를 분석하여 본 결과 이들은 불포화지방산과 포화지방산이 서로 비슷한 비율로 섞여 있는 유리지방산의 혼합물임을 알 수 있었으며 이들은 통상적인 silica gel column chromatography와 RP-18 column chromatography 등의 방법으로는 더 이상의 정제가 불가능하여 시판되고 있는 지방산 표준품들을 구입하여 암세포증식 저해효과를 비교 검토하여 보았다.

그 결과 유리지방산들은 대체로 10  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도영역에서 현저한 세포증식저해활성을 나타내고 있었으며 lauric acid (C12:0), palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0) 등

**Table I.** Inhibition of tumor cell proliferation by components isolated from *E. ulmoides*

Compound	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>				
	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT15
Genipin	18.8±0.06	9.8±0.08	9.5±0.10	14.3±0.09	15.1±0.08
Guaiacylglycerol	31.2±0.22	24.8±0.25	32.2±0.12	29.6±0.21	35.3±0.17
Geniposide	>100	>100	>100	>100	>100
Geniposidic acid	>100	>100	>100	>100	>100
Fatty acid					
Undecylenic (11:1)	12.7±0.06	22.3±0.09	18.8±0.08	22.8±0.10	14.1±0.09
Lauric (12:0)	13.3±0.06	19.4±0.08	17.8±0.06	21.7±0.12	15.9±0.08
Palmitic (16:0)	13.0±0.07	7.8±0.06	13.8±0.06	9.2±0.06	16.3±0.06
Stearic (18:0)	17.3±0.08	10.1±0.06	18.9±0.08	16.2±0.06	20.2±0.06
Oleic (18:1)	38.6±0.12	30.4±0.09	35.8±0.10	29.4±0.09	39.5±0.09
Linoleic (18:2)	>100	>100	>100	>100	>100
Doxorubicin	0.1±0.02	0.2±0.02	0.1±0.01	0.2±0.02	1.8±0.05

<sup>a</sup> $IC_{50}$  value of compound against each cancer cell line, which was defined as a concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) that caused 50% inhibition of cell proliferation *in vitro*.

<sup>b</sup>Data are mean±S.E.M. of three distinct experiments.

포화지방산들이 oleic acid 및 linoleic acid 등 불포화지방산에 비하여 상대적으로 우수한 세포증식저해효과를 보여주었다(Table I). 한편 지방산(free fatty acid)의 암세포증식저해효과에 대하여서는 최근 palmitic acid가 human leukemic cell line MOLT-4에 대하여 세포증식저해효과 및 apoptosis를 유도하는 효과가 있다는 보고가 있어 본 연구결과와 잘 일치하고 있다.<sup>10,11)</sup>

한편 미약하게나마 암세포증식저해효과를 나타내고 있는 BuOH soluble part를 실험방법에 명기한 바와 같이 통상적인 silica gel column chromatography와 RP-18 column chromatography 등의 방법으로 정제한 결과 compound 1의 배당체에 해당하는 compound 3 (geniposide)과 compound 4 (geniposidic acid)<sup>12,13)</sup>가 각각 분리되었다. 한편 이들 화합물들을 경구투여 한 경우 암세포를 이식한 mouse의 종양의 크기를 유의성있게 감소시켰으며,<sup>14)</sup> C6 glioma cell을 대상으로 한 *in vitro* 실험에는 효과적으로 apoptosis를 유도하였고<sup>15)</sup> 또, mouse를 이용한 동물실험에서도 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate로 유발시킨 종양발생을 효과적으로 차단하였다<sup>16)</sup>는 등 이들 화합물들의 항암효과를 직간접적으로 제시하는 많은 연구보고가 발표되고 있다. 그러나 *in vitro*에서 배양한 인체유래 암세포의 성장저해효과를 바탕으로 항암효과를 평가하여본 본 연구의 결과에 따르면 이들 화합물들은 모두 100 µg/ml 이하의 농도영역에서는 실험에 사용한 어떠한 암세포주에 대하여도 유의적인 증식저해활성을 보여주지 못하였다.

## 결 론

생약재 두층의 MeOH 추출물이 A549(비소세포암주), SK-OV-3(난소암주), SK-MEL-2(흑색종주), XF498(중추신경계암주) 및 HCT-15(직장암주) 등 5종의 인체유래 암세포주에 대하여 우수한 시험관 내 (*in vitro*) 세포증식저해효과를 보여주었다. 한편 활성유도분획법에 따라 두층의 MeOH 추출물로부터 세포증식저해물질들을 추적하여 본 결과 활성성분들은 주로 ethylacetate soluble part에 많이 분포하고 있으며 이 ethylacetate soluble part를 각종 column chromatography 방법으로 정제한 결과 genipin(1), (±)-guaiacylglycerol 및 다량의 지방산혼합물을 암세포증식저해효과를 나타내는 활성성분으로 규명하였다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청의 바이오그린21 연구사업의 연구비지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

1. Hsieh C. L. and Yen G. C. (2000) Antioxidant actions of du-zhong (*Eucommia ulmoides* oliv.) toward oxidative damage in biomolecules. *Life Sci.* **66**: 1387-1400.
2. Yen G. C. and Hsieh C. L. (2000) Reactive oxygen species scavenging activity of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* oliv.) and its active compounds. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 3431-3436.
3. Li Y, Sato T, Metori K, Koike K, Che Q. M., and Takahashi S. (1998) The promoting effects of geniposidic acid and aucubin in *Eucommia ulmoides* oliver leaves on collagen synthesis. *Biol. Pharm. Bull.* **21**: 1306-1310.
4. Watanabe J., Kawabata J., Kurihara H., and Niki R. (1997) Isolation and identification of alpha-glucosidase inhibitors from tochu-cha (*Eucommia ulmoides*). *Biosci Biotechnol Biochem.* **61**: 177-178.
5. Nakamura T., Nakazawa Y., Onizuka S., Satoh S., Chiba A., Sekihashi K., Miura A., Yasugahira N., and Sasaki YF. (1997) Antimutagenicity of Tochu tea (an aqueous extract of *Eucommia ulmoides* leaves): 1. The clastogen-suppressing effects of Tochu tea in CHO cells and mice. *Mutat. Res.* **388**: 7-20.
6. Sasaki Y.F., Chiba A., Murakami M., Sekihashi K., Tanaka M., Takahoko M., Moribayashi S., Kudou C., Hara Y., Nakazawa Y., Nakamura T., and Onizuka S. (1996) Antimutagenicity of Tochu tea (an aqueous extract of *Eucommia ulmoides* leaves): 2. Suppressing effect of Tochu tea on the urine mutagenicity after ingestion of raw fish and cooked beef. *Mutat. Res.* **371**: 203-214.
7. Oshima Y., Takata S., Hikino H., Deyama T., and Kinoshita G. (1988) Anticomplementary activity of the constituents of *Eucommia ulmoides* bark. *J. Ethnopharmacol.* **23**: 159-164.
8. Skehan P., Streng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., et al. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**: 1107-1112.
9. Deyama T., Ikawa T., Kitagawa S., and Nishibe S. (1987) The constituents of *Eucommia ulmoides* oliv. *Chem. Pharm. Bull.* **35**: 1785-1789
10. Harada H., Yamashita U., Kurihara H., Fukushi E., Kawabata J., and Kamei Y. (2002) Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substance in a marine red alga. *Anticancer Res.* **22**: 2587-2590.
11. Nano J. L., Nobili C, Girard-Pipau F., and Rampal P. (2003) Effects of fatty acids on the growth of Caco-2 cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* **69**: 207-215.
12. Morota T., Sasaki H., Nishimura H., Sugama K., Chin M., and Mitsunashi H. (1989) Two iridoid glycosides from *Rhemannia glutinosa*. *Phytochemistry* **28**: 2149-2153.
13. Jensen S. R., Olsen C. E., Rahn K., and Rasmussen H.

- (1996) Iridoid glucosides in *Plantago alpina* and *P. altissima*. *Phytochemistry* **42**: 1633-1636.
14. Hsu H. Y., Yang J. J., Lin S. Y., and Lin C. C. (1997) Comparisons of geniposidic acid and geniposide on antitumor and radioprotection after sublethal irradiation. *Cancer Lett.* **113**: 31-37.
15. Chang Y. C., Tseng T. H., Lee M. J., Hsu J. D., and Wang C. J. (2002) Induction of apoptosis by penta-acetyl geniposide in rat C6 glioma cells. *Chem. Biol. Interact.* **141**: 243-257.
16. Lee M. J., Hsu J. D., and Wang C. J. (1995) Inhibition of 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate caused tumor promotion in benzo[a]pyrene-initiated CD-1 mouse skin by geniposide. *Anticancer Res.* **15**: 411-416.

(2003년 9월 20일 접수)