약학회지 제30권 제 4호 193~197 (1986)
Yakhak Hoeji Vol. 30, No. 4

항암성 천연물 및 그 유사체(X)

L1210 및 S-180에 대한 하늘타리의 항암성

이유희 · 강석균* · 안병준
충남대학교 약학대학 · *대전 한방병원

(Received August 13, 1986)

Antineoplastic Natural Products and the Analogues(X)

--Antitumor Activity of Trichosanthes kirillowii on L1210 and S-180 Tumors--

You Hui Lee, Suck-Kyun Kang and Byung Zoon Ahn
College of Pharmacy, Choong Nam National University, Taejon 300-31 and
**Taejon Hospital of Oriental Medicine, Taejon 300-31, Korea*

Abstract—A strongly cytotoxic fraction (Fc-2, ED50=0.0003μg/ml) against L1210 cell was obtained from the root, seed and fruit of Trichosanthes kirilowii. Administration of Fc-2 prolonged the life span of the BDF1 mice bearing L1210 and the ICR mice bearing S-180 by 135% and 130%, respectively. The Fc-2 affected L1210 cells were enlarged in their diameters two or three times in comparison with the untreated ones. When 20mg/kg of Fc-2 was administered, intraperitoneally, all the mice were killed.

하늘타리는 박과에 속하며 우리나라 전역에서 자생하는 다년생 초본이다. 그 종자를 괄루인이라 하고 껍질을 제거한 괴근을 건조 분쇄한 것을 천화분이라 하여 한방에서는 거담 해열의 목적으로, 또 유선염 창종 등의 치료제로 사용하고 있다.[1]

천화분은 다량의 전분을 함유하고 있으며[2] 이것으로 부터 분리한 peptide물질인 trichosanthin은 낙태작용[3]과 항암작용[4]을 나타내고 있다. 괄루인은 여러 종류의 sterin계 물질과 지방[5]을 함유하고 있다. 중약대사전[1]에 언급되어 있는 것을 보면 하늘타리의 과피와 종자의 추출물은 복수암세포에 대한 in vitro 실험에서 세포독성을 나타낸다고 되어 있다.

60% 알콜 추출물이 더욱 유효한 것으로 되어 있는데 이는 peptide 이외의 알콜성 수용액에 용출되는 항암성물질도 하늘타리에 함유되어 있음을 시사해준다.

저자 등은 하늘타리 뿌리로부터 세포독성물질을 분리하는 과정에서 얻어진, 비 peptide 분획이 L1210세포 및 그암에 걸린 BDF1생쥐와 S-180암에 걸린 ICR생쥐에 대하여 항암효과를 보여주고 있음을 관찰하였다. 또한 괄루인, 괄루의 과육도 L1210세포에 대하여 강한 독성을 보여주었다.

하늘타리는 한방에서 실제로 항암의 목적으로 사용되고 있는 약재이므로 이와 같은 항암성분획을 얻어서 그 작용을 다양하게 연구함으로서 이 분획을 실용케할 기초자료를 제공하는 것이 본 연구의 목표이다.

재료 및 방법

암세포—마우스 백혈세포인 L1210세포는 과학기술원으로 부터 분양받았다. 이는 말 혈청으로 보완된 Fischer씨 배지중에서 37도로 배양하였고 주 2회의 계대배양으로 유지하였다. 또는 BDF1 마우스의 복강중에서 주 1회의 계대배양으로 유지하였다. S-180세포는 ICR 마우스의 복강에서 주 1회의 계대배양으로 유지시켰다.

배지—Fischer씨 배지와 말혈청은 GIFCO의 것을 사용하였다. Fischer씨 배지(10.5g powder), 말혈청 100ml, 중탄산소다 1.125g, penicilline 100unit/ml, streptomycine 100μg/ml를 950ml의 증류수에 녹이고 0.1N-HCl로 pH 7.2로 조절한 후 1,000ml가 되게 하고 세균여과 장치에서 여과하여 4도의 냉장고에서 보관하면서 사용하였다.

실험동물—실험에서 사용한 마우스종은 BDF1, DBA/2, C57BL/6 및 ICR 마우스였으며 BDF1은 본 실험실에서 번식시켜 사용하였고 다른 동물은 과학기술원에서 분양받았다. 이들 마우스의 실험시 체중은 20~22g(male)이었고, 온도조절이 잘되는 곳에서 항생제를 첨가하지 않은 사료와 물을 제한없이 공급하면서 사육하였다.

약재 및 시약—하늘타리 뿌리는 시중 건재상에서 구입 세말로하여 사용하였다. 생약의 초벌추출에는 공업용 메탄올을 증류하여 사용하였으며 chromatography용 용매는 EP급을 사용하였다. 기타 시약도 EP 또는 GR급을 사용하였다. 크로마토그라피용 silica gel은 모두 Merck제를 사용하였다.

하늘타리에서의 항암성 물질의 분획—세말로 분획한 하늘타리 뿌리 10kg을 메탄올 20l로 환류하에 2시간씩 2회 추출하였다. 여과후 여액은 감압하에서 건조한 후 증류수 5l를 가하여 현탁시킨다. 이 현탁액 1l를 2.5l 크기의 percolator에 가하고 석유에테르, 초산에칠로서 차례로 48시간씩 추출한다. 추출후 남은 수용액을 건고한 것을 물분획으로 하였다. 이들 분획중 초산에칠 분획(45g)이 L1210세포에 대하여 가장 강한 세포독성을 나타내는 반면, 석유에테르 및 물 분획은 유의할만 한세포독성을 갖고 있지 않았다.

팔루인 및 과육도 같은 방법으로 분획하였다.

L1210세포를 사용한 세포독성 실험[6]—우선 logarithmic phase에 도달한 L1210세포를 실험 24시간 전에 세포농도 $2\sim3\times10^5$ cells/ml가 되게 조절하였다. 이것을 24시간 배양하면 보통 $0.8\sim1.0\times10^6$ cells/ml의 농도가 된다. 이 세포 현탁액을 희석하여 세포농도 5.0×10^4 cells/ml가 되게하고 이것을 공시험관 및 시료시험관에 5ml씩 가하였다. 시험하고저 하는 물질은 10mg/ml ethanol 용액이 되게 하고 이 액 0.1ml와 배지 0.9ml를 시험관에 넣고 혼화한 후 이 혼화액 일정량 씩을 시료시험관에 넣었다. 공시험관 및 시료시험관은 두개 씩 사용하였다. 공시험관은 배지만 넣은 것이다.

37°C에서 48시간 배양한 다음 hemacytometer를 사용 세포수를 계산하였다. ED50값은 대조군의 50% 수준으로 L1210세포의 성장을 억제하는 시료의 농도(μg/ml)를 말한다.

ICR 또는 BDF1을 사용한 동물실험—1) sarcoma 180 세포를 이용한 실험

ICR 마우스의 복강에서 7일간 배양된 S-180 세포를 복수와 함께 취하여 냉 생리 식염수에 가하고 400×g으로 2분간 원심분리 하여 세포를 침강시켰다. 이 조작을 한번 더 행한 후 침강된 세포를 다시 생리색염수에 현탁시켜 세포농도 1×10^7 cells/ml가 되게 하였다. 이 세포현탁액 0.1ml씩을 ICR 마우스의 복강에 주사하였다. 주사후 24시간 후부터 각 군을 8마리로 하여 비교군에는 50% PEG400을, 시료투여군에는 50% PEG400에 현탁시킨 시료를 마우스당 0.1ml씩 1일 1회 7일 연속으로 복강 투여하였다.

비교군의 평균 수명에 대한 시료투여군의 평균생존비(T/C%), 즉 시료에 의한 수명연장의 정도로서 그 효과를 판정하였다.

2) L1210 세포를 이용한 동물 실험

BDF1 마우스의 복강안에서 배양된 L1210 세포를 S180과 같은 방법으로 세포를 얻어 생리 식염수에 현탁시켜 세포농도 1×10^6 cells/ml가 되게 하였다. 이 세포현탁액 0.1ml씩을 BDF1 마우스의 복강에 주사하였다. 주사후 24시간부터 각군당 6마리씩으로 하여 비교군에는 50% PEG 400을, 시료 투여군에는 50% PEG 400에 현탁시킨 시료를 마우스당 0.1ml씩 1일 1회 9일간 연속으로 복강투여 하였다. 그후 평균 생존비(T/C%)를 구하여 그 효과를 판정하였다.

$$\frac{\text{시험군의 평균생존일}}{\text{비교군의 평균생존일}}\times100=\text{T/C(\%)}$$

실험결과 및 고찰

괄루근으로 부터 항암성 분획을 행하면서 각 분획의 L1210세포에 대한 세포독성을 관찰하였던 바, 그 결과를 Fig. 1과 Table I에 표시하였다. 하늘타리 뿌리의 메탄올 추출물이 나타내는 ED 50값=10.0μg/ml은 엑기스로 매우 강한 것으로 더 자세한 연구가 필요한 것을 뜻한다. 실험에서 언급했듯이 용매분획중에서는 초산에칠 분획이 가장 강한 세포독성을 보이고 있다. 메탄올엑기스에 대한 초산에칠 엑기스의 양적 비와 ED50값의 비가 각각 대개 5인 것으로 보아 작용성분들의 추출은 잘 진행되었다고 할 수 있다.

초산에칠엑기스는 silica gel column에서 chloroform/methanol(0~10% gradient) 혼액으로 분획하였으며, 각 분획은 TLC상의 Rf치의 범위로 구분하였다(Fig. 2). 이중 Fa-3이 가장 강한 세포독성을 나타내었으므로 이를 같은 크로마토그라피 조건에서 다시 분획하였다. 이때 얻어진 Fb-3를 다시 silica gel column에서 chloroform/methanol(97 : 3)으로 분획하여 Fc-2를 얻었다.

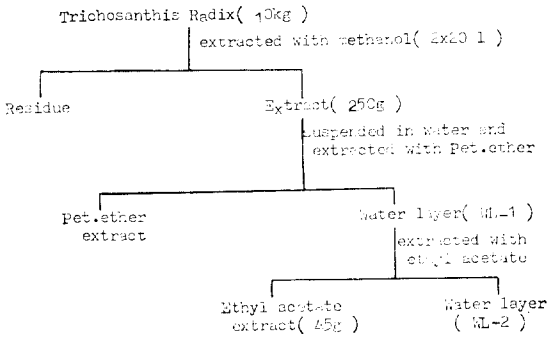

Fig. 1—Solvent fractionation of Trichosanthis Radix.

Table I—ED_{50} values of solvent fractions on L1210.

Fractions	ED_{50}(μg/ml)
Methanol Extract	10.0
Pet. ether Extract	20.0
WL-1	20.0
Ethyl acetate Extract	2.0
WL-2	20.0

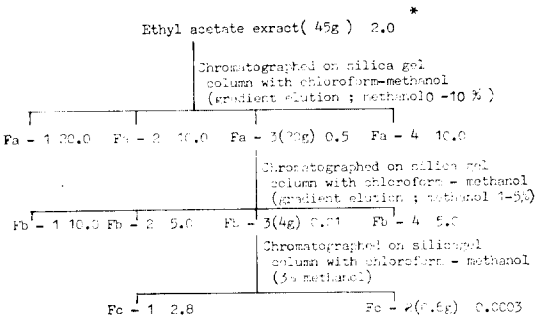

Fig. 2—Chromatographic fractionation of ethyl acetate extract from Trichosanthis Radix.
*Numerals indicate the ED_{50} (μg/ml) value.

Fc-2는 대단히 강한 세포독성을 나타내고 있다. 이 분획과정에서 유의해야할 점은 세포독성이 여러 분획에 분산되어 있다는 것이다. 이 사실은 분획이 정확하게 되었다면, 즉 분획시 Rf치의 구분이 정확하였다면 작용물질이 여러가지임을 시사한다. 그러나 Fc-2는 silica gel TLC를 행함에 있어서 여러가지 용매중에서 단일한 Rf치를 갖고 있었음에도 불구하고 실온에서 24시간 이상 방치하면 여러가지 Rf치를 갖는 물질이 나타났다. Fc-2가 이와 같이 불안정한 성질을 갖고 있는 것으로 보아 세포독성이 분산되어 있는 것은 2차적으로 생성된 인위적인 물질 때문이라고 해야될 것이다. 이와 같은 물질의 불안정성이 하늘타리 뿌리로부터 작용물질의 분리를 어렵게 만드는 요인이 된다. Fc-2의 ED50값은 0.0003μg/ml로서 실제사용하고 있는 대부분의 합성 항암제보다 더 강한 세포독성을 나타낸다. 또한 Fc-2는 그의 용매분획과정과 크로마토그라피상의 성질로 보아 peptide나 기타 고분자성 물질이 아님이 분명하다.

Fc-2와 접촉한 L1210세포는 대조군에 비하여 그 반경이 2내지 3배나 커져있음을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 세포팽대효과는 이 물질의 작용기전의 연구에서 해결되어야 할 문제이다.

Fc-2는 그 불안정성 때문에 더 이상 정제하기가 힘드나 L1210세포에 대한 강한 세포독성을 나타낸다는 사실만으로도 이 분획자체의 항암작용을 더욱 구체적으로 관찰할 필요가 있다.

S-180암에 걸린 ICR 마우스에 대한 항암작

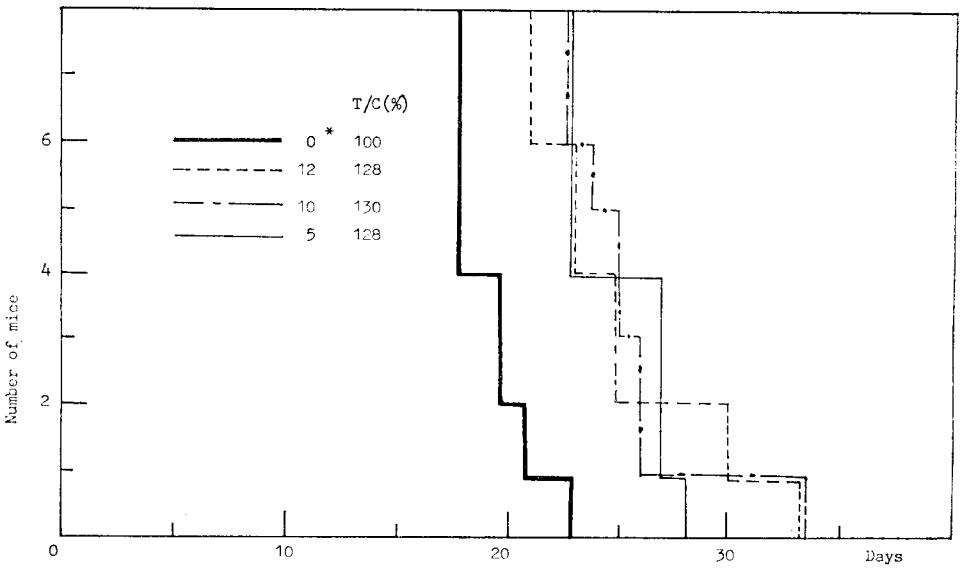

Fig. 3—Effect of the intraperitoneal administration of the most active fraction (Fc-2) on the life span of ICR mice bearing sarcoma 180 cells.
*Numerals indicate the dose of Fc-2 (mg/kg)

용—S-180세포를 ICR 마우스의 복강에 이식한 후 PEG 400에 현탁시킨 Fc-2를 제 1 군에는 5 mg/kg, 제 2 군에는 10mg/kg, 제 3 군에는 12mg/kg씩 1일 1회 7일간 연속 주사하였다.

Fig. 3에서 볼 수 있듯이 시험군의 T/C(%) 값은 128%, 130% 및 128%였다.

건강한 ICR 마우스에 Fc-2를 20mg/kg으로 복강주사하는 경우 주사직후 복부에 심한 경련을 일으키며 24시간이 지나기전에 모두 사망하였다. 15mg/kg을 투여하면 치사율이 60%가 되고 10 mg/kg일 경우에는 사망하는 쥐를 볼 수 없었다. 그러나 투여한 시료의 양적 차이가 큼에도 불구하고 T/C(%)의 차이가 크지 않은데 이는 아마 Fc-2의 독성 때문일 것이다. 즉, 고농도에서는 그 독성 때문에 동물의 치사율을 더 높이는 결과가 초래된다.

L1210암에 걸린 BDFI 마우스에 대한 항암실험 (Fig. 4)—L1210세포를 BDF1 마우스의 복강에 이식한 후 Fc-2분획을 각 시험군에 각각 15mg/kg, 10mg/kg, 7.5mg/kg씩 1일 1회 9일간 연속 주사하였고 대조군에는 50% PEG를 주사하였다. 대조군의 생존일 범위는 15~17일로서

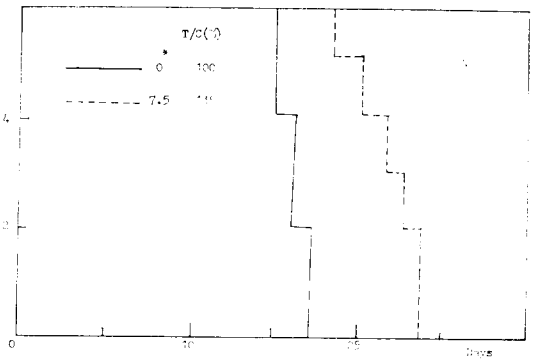

Fig. 4—Effect of the intraperitoneal administration of the most active fraction (Fc-2) on the life span of BDF_1 mice bearing L1210 cells.
*Numerals indicate the dose Fc-2 (mg/kg).

평균 생존일은 16일 이었으며, 7.5mg/kg 투여한군의 생존일 범위는 18~24일이고 평균 생존일은 21.6일이다. 이 값으로 부터 계산한 T/C (%)값은 135%이다. 그러나 15mg/kg 투여군은 투여 3일만에 모두 사망하였으며 10mg/kg 투여군은 5일 만에 80% 이상 사망하였으므로 생명연장효과를 볼수가 없었다.

이와 같이 소분자성 물질로 구성되어 있는

Fc-2는 ICR, BDF1 마우스에 대하여 강한 항암작용을 보이고 있을 뿐만 아니라 동시에 강한 독성도 갖고 있다.

분획 Fc-2는 괄루인과 괄루의 과육에도 함유되어 있었다. 괄루근, 괄루인 및 과육으로 부터 분리한 Fc-2는 모두 같은 Rf치를 갖고 있었으며 L1210세포를 2~3배 팽대시키는 효과도 보였다.

결 론

하늘타리의 뿌리, 종자 및 과육으로 부터 항암성 분획을 얻어서 항암실험을 행한 결과 다음과 같은 사실들을 알 수 있었다.

1. 하늘타리에는 종전에 주로 연구되어온 항암성 peptide인 trichosanthin이외 소분자성 항암물질도 함유되어 있다.

2. 초산에칠 분획을 크로마토그라피하여 얻은 Fc-2 분획은 L1210세포에 대하여 ED50=0.0003 μg/ml을 보였다.

3. Fc-2 7.5mg/kg을 투여하는 경우 L1210세포로 이식한 BDF1마우스의 수명을 135% 연장하였다.

4. Fc-2 10mg/kg을 투여했을 때 S-180으로 이식한 ICR마우스의 생명을 130% 연장시켰다.

5. Fc-2 15mg/kg을 L1210암에 걸린 BDF1에 복강주사하면 3일 이내에 모두 사망하였고, 그 20mg/kg을 S-180암에 걸린 ICR마우스에 복강주사하면 24시간 내에 모두 사망함을 관찰하였다.

문 헌

1) Jingssushineishueyien, Encyclopedia of Chinese Raw Drugs, Hong Kong, Ssangwuingugwan, p. 1781-1783 (1977).

2) 고정삼, 김형옥; 하늘타리의 생리화학적 성질에 관한 연구, 한국 농학회지 **20**, 292-295 (1977).

3) Wang, Y., Ling, J. and Zhu, L.: Preliminary studies on purification and characterization of an aborficient plant protein; trichosanthin, ***Tum Wu Hsueh Pa* 22**, 137-143 (1976).

4) Pan, O.C., Xian, L.J. and Yeung, H.W.: International Symposium On Chinese Medicinal Materials Research, Hong Kong, p. 25 (1984).

5) Homberg, E.E. and Seher, A.: Sterine in Trichosanthes kirillowii, ***Phytochemistry* 16**, 288 (1977).

6) Thayer, D.S., Himmelfarb, D. and Watts, G.L.: ***Cancer Chemother. Rep.*, 2**, 1 (1971).