

백혈병 세포주에 대한 (\pm)-ar-Turmerone, 자근 및 황금추출물에 의한 항암제의 세포독성 증강효과

이윤영 · 유관희 · 김삼용* · 안병준**

충남대학교 자연과학대학 생물학과, *의과대학 내과학 교실, **약학대학 약학과

(Received June 4, 1991)

Augmentation of the Cytotoxic Effects of Anticancer Drugs by (\pm)-ar-Turmerone and Extracts of the Lithosperma and Scutellaria Roots against Human Leukemia Cell Lines

Yun-Young Lee, Kwan-Hee You, Sam-Yong Kim* and Byung-Zun Ahn**

Department of Biology, College of Natural Sciences, Chungnam National University,

*Department of Internal Medicine, College of Medicine, Chungnam National University,

**Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Chungnam National University,

Taejeon, 305-764, Korea

Abstract—Using the colorimetric [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) assay, we evaluated the chemosensitivity of 8 anticancer drugs {vincristine(VCR), vinblastine (VBL), adriamycin(ADR), cisplatin(CPDD), etoposide(VP-16), cytosine arabinoside(ara-C), bleomycin (Bleo) and cyclophosphamide(CYC)} and the cytotoxicity-enhancing effects of (\pm)-ar-turmerone and the extracts of the crude drugs {*Lithospermum erythrorhizon*(LE) and *Scutellaria baicalensis* (SB)} on the above mentioned anticancer drugs against HL-60 and KG-1 cells among 8 anticancer drugs, VCR, VBL, ADR, and CPDD inhibited the growth of both cell lines by more than 50%, while VP-16, ara-C, Bleo, and CYC were less effective. (\pm)-ar-Turmerone had significant inhibitory effects against both cell lines, showing the ID_{50} values of 11.730 $\mu\text{g/ml}$ and 0.292 $\mu\text{g/ml}$ for HL-60 and KG-1 cells, respectively. But the extracts of LE and SB roots showed no significant cytotoxic effects. According to ID_{50} values, the cytotoxicities of VCR, VBL and ADR against HL-60 were enhanced two, eight and three times by mixing (\pm)-ar-turmerone, five, seven and three times by adding the extract of LE root, and twenty, six and three times by mixing the extract of SB root, respectively. The cytotoxicities of the above mentioned drugs against KG-1 cell were enhanced two, seven and three times by mixing (\pm)-ar-turmerone, two, three and three times by combining with the extract of LB root, and two, five and two times by adding the extract of SB root, respectively. The cytotoxicity-potentiating effects of (\pm)-ar-turmerone and the extracts of LE and SB roots against HL-60 cell were greater than KG-1 cell.

Keywords □ Chemosensitivity, anticancer drugs, cytotoxicity-enhancing effects, (\pm)-ar-turmerone, Lithosperma, Scutellaria roots

악성종양을 치료하기 위한 약제는 DNA와 직접 작용하여 세포독성 효과를 나타내게 하는 것을 비롯하여 DNA 합성, purine 생합성, pyrimidine 생합성, 미세소관 단백질, 단백질 합성 등의 활성을 억제시키는 생물학적 기작에 기초를 두어 개발되어 왔다.¹⁾

그러나 종양 종류에 따라 증식속도 및 항암제에 대한 반응정도 등이 다르므로 유효한 약제의 선택은 쉽지 않으며,²⁻⁴⁾ 현재 개발된 대부분의 항암제는 암세포와 정상세포 모두에 대하여 독성을 나타내어 여러 가지 부작용이 유발될 뿐만 아니라 약제에 내성을 보이는

세포가 잔존하기도 함으로써 기대하는 암치료에 실효를 거두지 못하는 실정이다.

이러한 문제점을 극복하고자 천연물로부터 항암성 물질을 찾는 연구가 진행되어 인삼(*Panax ginseng*),^{5,6)} 울금(*Curcuma domestica*),^{7,8)} 황금(*Scutellaria baicalensis*),^{9,10)} 지실(*Poncirus trifoliata*),¹¹⁾ 까마중(*Solanum sodomaeum*),¹²⁾ 꼭두서니(*Rubia akane*), 땀대이 덩굴(*Cocculus trilobus*), 노박덩굴(*Casearia sylvestris*) 등¹⁵⁾의 생약제로부터 추출한 물질이 P388, L1210, Sarcoma 180 등의 암세포주에 대한 세포독성 및 항암작용이 있음이 보고되어 있다.

항암화학요법의 감수성검사에는 dye exclusion assay,¹⁶⁾ colony formation assay,¹⁷⁾ isotope uptake assay^{18,19)} 그리고 Mosmann(1983)²⁰⁾이 개발한 악성종양세포내의 산소 소비, 해당작용, 효소활성도 등 세포대사의 변화를 이용한 방법들이 있고 최근에는 colorimetric MTT assay의 방법이 개발되어 사용되고 있다. 이 중에서 MTT assay는 정량적 결과를 비교적 객관적으로 단시일내에 얻을 수 있으므로 항암제 선별과 암 기초연구에 널리 이용되고 있다.^{20~24)}

본 연구에서는 인체의 말초혈액에서 분리한 전골수성 백혈병(promyelocytic leukemia)세포주인 HL-60²⁵⁾과 인체의 골수에서 분리한 급성골수성 백혈병(acute myelogenous leukemia)세포주인 KG-1²⁶⁾에 대하여 Mosmann이 개발한 MTT assay를 변형시킨 방법을 사용하여 첫째, 8종의 항암제 감수성검사와 둘째, 황금의 항암성분을 순수한 racemic ar-turmerone, 紫根(*Lithospermum erythrorhizon*의 근경)과 황금 추출물 등 생약의 항암효과 셋째, 이들 생약추출물을 항암제에 병용투여함으로써 높은 치료효과를 나타내면서도 항암제의 부작용을 감소시키고 약제의 내성을 극복 혹은 예방할 수 있는 항암작용의 증강효과를 밝히고자 하였으며, 또한 생약제로부터 항암성물질 및 항암작용을 강화시키는 물질을 동정하고자 하였다.

실험방법

세포주 및 세포배양—세포주는 인체의 전골수성 백혈성 세포주인 HL-60²⁵⁾과 인체의 급성골수성 백혈성 세포주인 KG-1²⁶⁾을 사용하였다. 이 두 세포주는 L-glutamine이 포함된 RPMI 1640(Flow Lab.) 배지

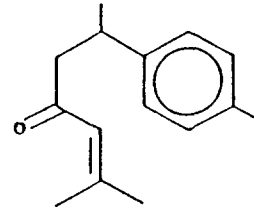


Fig. 1—Structure of (±)-ar-turmerone.

에 56°C 수조에서 30분간 가온하여 불활성화시킨 fetal bovine serum(FBS, Flow Lab.)을 10% 포함하고, 1% 항생제(penicillin 10,000 units/streptomycin 10 mg, Sigma Co.)를 첨가한 조직배양액으로 37°C, 5% CO₂, 완전 습윤상태가 유지된 세포배양기(Queue Systems, TM)에서 배양하였다.

항암제—Vincristine sulfate(VCR : 대웅리제약), vinblastine sulfate(VBL : Eli Lilly, France), adriamycin(ADR : 일동제약), cisplatin(CPDD : 녹십자), etoposide(VP-16 : 동아제약), cytosine arabinoside(ara-C : 중외제약), bleomycin sulfate(Bleo : 일본화약, Japan), cyclophosphamide(CYC : 중외제약)의 8 가지 주사용 제제를 사용하였다. 이들 항암제는 최고 실험농도의 100배 농축액을 만들어 -20°C에서 냉동 보관한 후 실험 직전에 녹여 pH 7.4 phosphate buffered saline(PBS : Flow Lab.)으로 각각의 실험농도로 희석하여 사용하였다.

생약추출물—자근(*Lithospermum erythrorhizon*의 근경), 황금(*Scutellaria baicalensis*의 근경)의 2가지 생약제를 추출하여 사용하였다. 울금의 항암성분은 합성한 (±)-ar-turmerone(racemic, Fig. 1)으로 대체하여 사용하였으며, 자근과 황금은 soxhlet 장치를 이용하여 에틸에테르로 환류하면서 7일간 추출한 후 추출액을 감압농축하여 사용하였다. (±)-ar-turmerone의 용매로써 dimethylsulfoxide(DMSO : Sigma Co.), 자근과 황금추출물의 용매로써 에탄올을 사용하였다. 이들 생약추출물을 독성을 주지않는 범위인 0.1% 이하의 DMSO와 에탄올 농도로 용해시킨 후 0.22 μm millipore filter를 통과시켜 멸균하여 4°C에서 냉장 보관하면서 실험직전에 PBS(pH 7.4)로 각각의 실험농도로 희석하여 사용하였다.

Linearity 및 세포성장실험—HL-60과 KG-1세포주의 세포수와 이에 의해 측정되는 흡광도와의 관계를 알아보기 위해 각 세포주의 대하여 well당 세포수를

1×10^5 , 5×10^4 , 2.5×10^4 , 1.25×10^4 , 6.25×10^3 , 3.13×10^3 , 1.56×10^3 , 7.81×10^2 으로 조정하여 각각을 96 multi-well plates(Flow Lab.)의 7개 well에 넣고 즉시 MTT assay를 시행하였다. 또한 각 세포주의 대하여 7개의 well마다 위의 세포수를 넣고 5일 동안 매일 MTT assay로 흡광도를 측정하여 세포성장실험을 하였다. 가장 증식률이 높은 세포수를 실험에 사용하기 위하여 흡광도로 doubling time을 계산하였다. 실험기간으로 정한 96시간 동안의 각 세포주에 있어 세포수에 따른 doubling time은 다음의 공식²⁷⁾을 이용하였다.

$$96\text{hrs}/[\log_2(\text{absorbance after 96hrs})-\log_2(\text{absorbance at time 0})]$$

항암제, 생약추출물 처리—HL-60과 KG-1세포주의 세포수를 세포성장실험에서 정한 2.5×10^4 cells/well로 조정하여 96 multi-well plates에 넣은 후 항암제, 생약추출물을 실험에 사용될 농도로 조정하여 처리하였다.

항암제의 농도는 Von Hoff 등²⁸⁾와 Mann 등²⁹⁾이 보고한 최고 혈중농도를 고려하여 조정하였다. 실험 최고농도를 VCR와 VBL는 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$, ADR과 ara-C는 $40 \mu\text{g}/\text{ml}$, CPDD는 $20 \mu\text{g}/\text{mg}$, VP-16, Bleo, CYC는 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 하여 실험농도를 실험 최고농도의 1, 1/10, 1/100, 1/1,000, 1/10,000배가 되도록 PBS(pH 7.4)로 희석하여 5가지 농도에 대하여 각 세포주에 처리하였다.

생약추출물의 농도는 (±)-ar-turmerone은 실험 최고농도를 $10^{-3} \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 하여 실험농도를 $10^{-3} \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $10^{-4} \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 10배씩 PBS(pH 7.4)로 희석하여 8가지 농도, 자근과 황금추출물은 100, 50, 10, 1, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에 대하여 각 세포주에 처리하였다. 이와같이 처리된 plates를 CO₂ 배양기에서 4일간 배양시킨 후 MTT assay를 시행하였다.

항암제와 생약추출물의 병용처리—HL-60과 KG-1 세포주의 세포수를 2.5×10^4 cells/well로 조정하여 96 multi-well plates에 넣은 후 각 항암제의 농도를 항암제 처리실험에서와 같은 농도로 처리한 후, (±)-ar-turmerone은 $0.0001 \mu\text{g}/\text{ml}$, 자근과 황금추출물은 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 각각 해당 plate에 첨가시켰다. 이와 같이 처리된 plates를 5% CO₂ 배양기에서 4일간 배양시킨 후 MTT assay를 시행하였다.

MTT assay-96 multi-well plates에 실험에 사용될

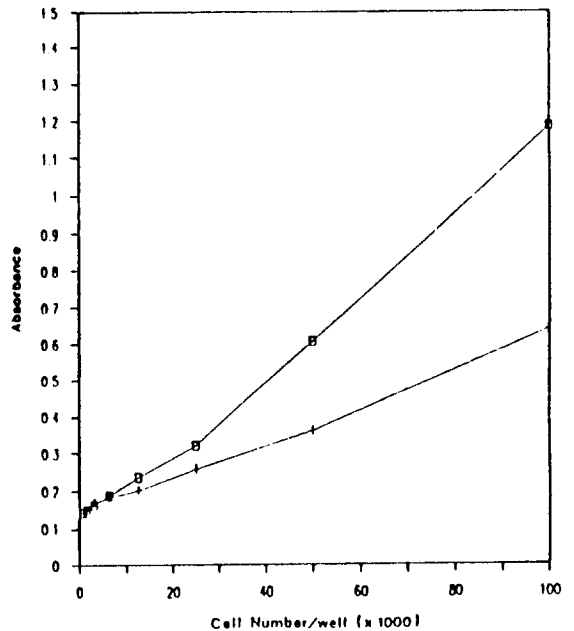


Fig. 2—Relationship between absorbance and number of cells per well in two leukemia cell lines: HL-60 cells(□), KG-1 cells(+).

세포수가 들어가도록 조정된 RPMI 1640-10% FBS 배양액 0.18 ml을 넣은 후 실험군에는 약제들을 0.02 ml씩을 첨가하였으며 대조군에는 약제 대신 동량의 PBS(pH 7.4)를 첨가하였다. 이렇게 만든 plates는 5% CO₂ 배양기에서 37°C로 유지시켜 4일동안 배양하였다. 배양 후 PBS(pH 7.4)로 5 mg/ml가 되도록 만든 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide](MTT : Sigma Co.)용액 0.02 ml을 가하고 다시 4시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 유지시켜 살아있는 세포의 미토콘드리아 탈수소효소들의 반응에 의하여 노란색의 MTT를 푸른색의 formazan products로 변화시키게 하였다. 그런 후 plates를 plate 원심분리기에서 1,500 rpm으로 15분 동안 원심분리하여 상층액을 제거시키고 DMSO 0.15 ml을 가하여 plate shaker에서 120 rpm으로 30분 동안 유지시켜 푸른색 formazan products를 완전 용해시킨 후 즉시 multi-well scanning spectrophotometer(Titertek Multiskan MCC, Flow Lab.)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 실험은 3회씩 실시하여 이들의 평균치를 계산하였으며, 다음의 공식을 이용하여 survival or fractional absorbance(%)를 계산하였다.

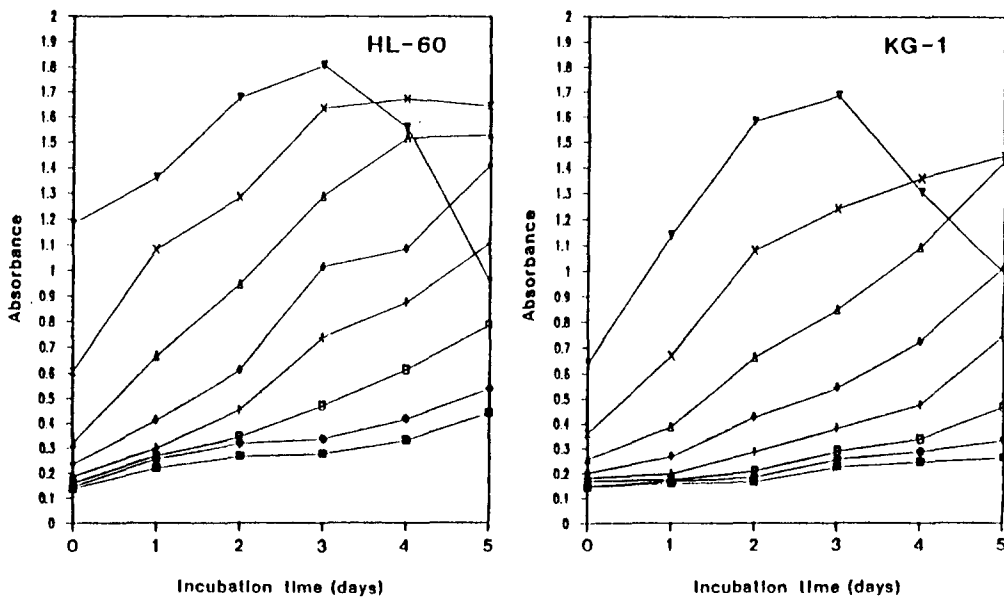


Fig. 3—Growth rate estimated by the MTT assay: inoculation densities (cells/0.18 ml); 100,000(▽), 50,000(×), 25,000(△), 12,500(◇), 6,250(+), 3,125(□), 1,563(●), 781(■).

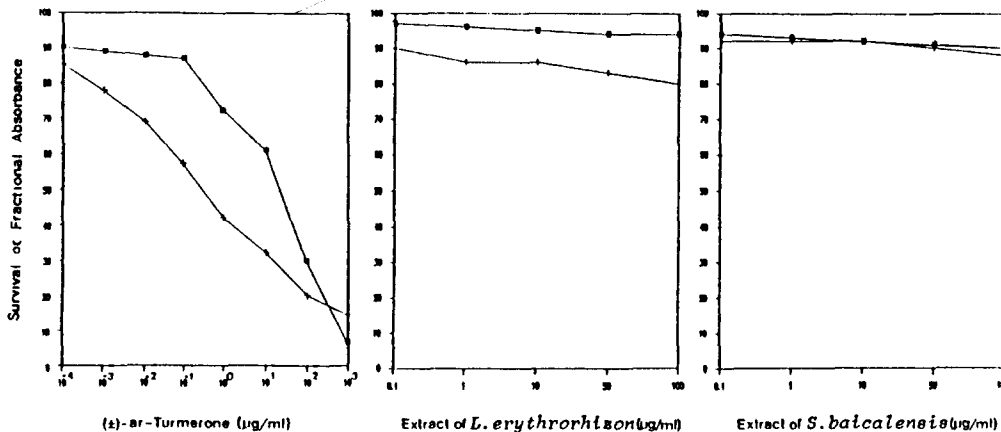


Fig. 4—Effects of crude drug extracts on leukemia cell lines: HL-60 cells(□), KG-1 cells(+).

Survival or Fractional Absorbance(%)

$$= \frac{\text{mean of absorbance in test wells}}{\text{mean of absorbance in control wells}} \times 100$$

실험결과

Linearity 및 세포성장—HL-60과 KG-1세포주에 대한 각각의 well당 세포수와 이에 따른 MTT assay에

의한 흡광도와와의 관계는 상관계수가 HL-60세포주는 0.9970이며 KG-1세포주는 0.9974를 보임으로 서로 비례관계임을 알 수 있었다(Fig. 2).

96 multi-well plates에서 5일 동안 배양하여 세포 성장실험을 한 결과 실험기간으로 정한 96시간 동안 증식률이 가장 높은 세포수는 2.5×10^4 cells/well의 세포수에서 HL-60, KG-1세포주 각각 42.86시간, 45.99 시간의 doubling time을 보였다(Fig. 3). 따라서 HL-

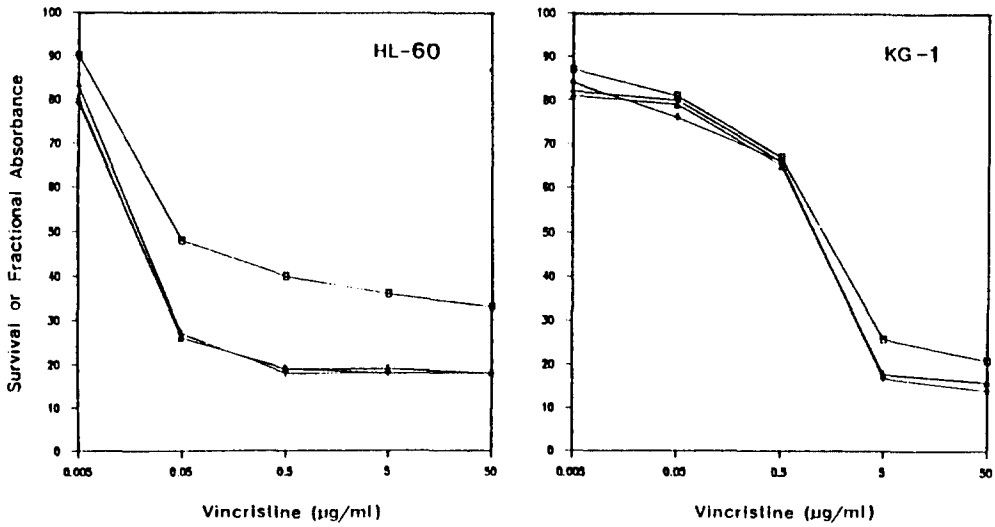


Fig. 5—Effect of combining crude drug extracts on cytotoxicity of vincristine: alone VCR(□), + (±)-ar-Turmerone (+), + *L. erythrorhizon*(◇), + *S. baicalensis*(△).

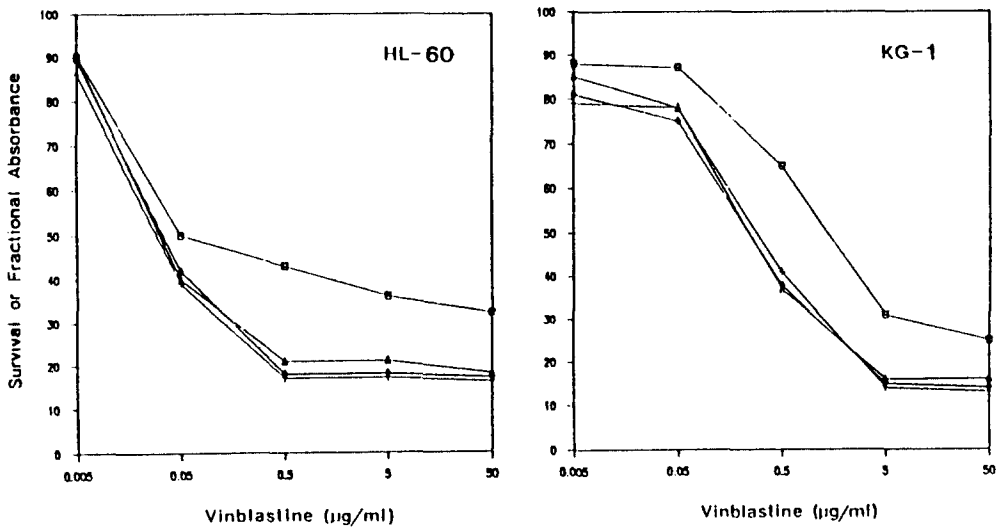


Fig. 6—Effect of combining crude drug extracts on cytotoxicity of vinblastine: alone VBL(□), + (±)-ar-Turmerone (+), + *L. erythrorhizon*(◇), + *S. baicalensis*(△).

60과 KG-1세포주에 대하여 가장 증식률이 높은 세포수인 2.5×10^4 cells/well의 농도로 조절하여 모든 실험을 수행하였다.

생약추출물 처리효과—(±)-ar-Turmerone은 HL-60세포주에 대하여 0.1~1,000 µg/ml의 농도에서 13~93%의 세포독성을, KG-1세포주에 대하여는 0.0001~1,000 µg/ml의 농도에서 15~86%의 강한 세포독성을

보였다. (±)-ar-turmerone의 세포독성을 ID₅₀ 값으로 나타내면 HL-60세포주의 대하여는 11.730 µg/ml로서 비교적 약한, KG-1세포주에 대하여는 0.292 µg/ml로서 강한 세포독성을 나타내었다. 그러나 자근추출물은 사용한 실험농도에서 HL-60과 KG-1세포주에 대하여 각각 3~6%, 10~20%의 세포독성이 나타났으며, 황금추출물은 사용한 실험농도에서 HL-60과 KG-1세포

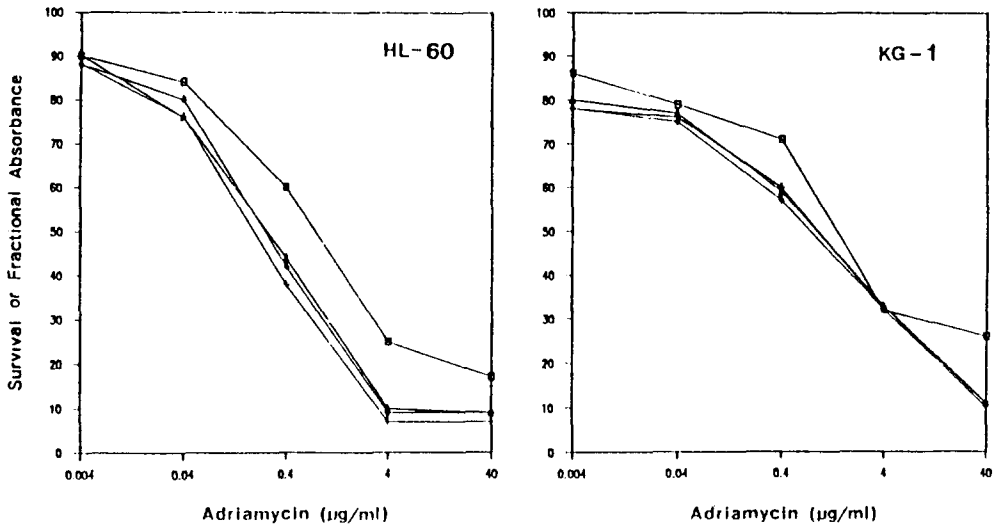


Fig. 7—Effect of combining crude drug extracts on cytotoxicity of adriamycin: alone ADR(□), + (±)-ar-Turmerone (+), + *L. erythrorhizon*(◇), + *S. baicalensis*(△).

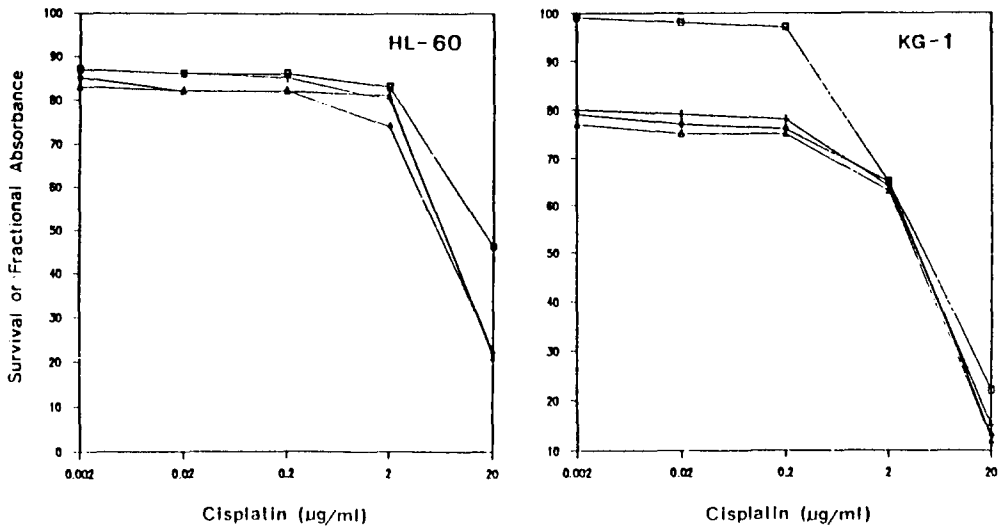


Fig. 8—Effect of combining crude drug extracts on cytotoxicity of cisplatin: alone CPDD(□), + (±)-ar-Turmerone (+), + *L. erythrorhizon*(◇), + *S. baicalensis*(△).

주에 대하여 각각 6~10%, 8~12%의 세포독성을 보임으로써 자근과 황금추출물은 두 세포주 모두에 대하여 유의한 세포독성을 보이지 않았다(Fig. 4).

항암제 처리효과—HL-60세포주에 대하여 VCR은 0.05~50 µg/ml 농도에서 52~67%, VBL은 0.05~50 µg/ml에서 50~68%, ADR은 0.4~40 µg/ml에서 40~83%, CPDD은 20 µg/ml에서 54%, VP-16은 10 µg/

ml에서 44%의 세포독성을 보인 반면, ara-C는 40 µg/ml에서 19%, Bleo은 10 µg/ml에서 15%, CYC는 10 µg/ml에서 13%로 약한 세포독성을 나타냈다(Fig. 5~12).

KG-1세포주에 대하여 VCR은 0.5~50 µg/ml 농도에서 33~79%, VBL은 0.5~50 µg/ml에서 35~75%, ADR은 0.4~40 µg/ml에서 29~74%, CPDD은 2~20

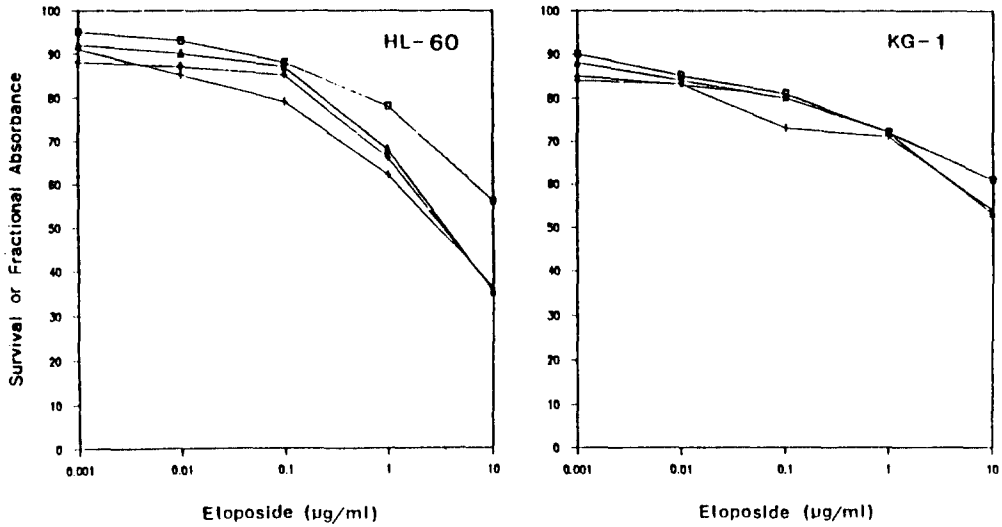


Fig. 9—Effect of combining crude drug extracts on cytotoxicity of etoposide: alone VP-16(□), + (±)-ar-Turmerone (+), + *L. erythrorhizon*(◇), + *S. baicalensis*(△).

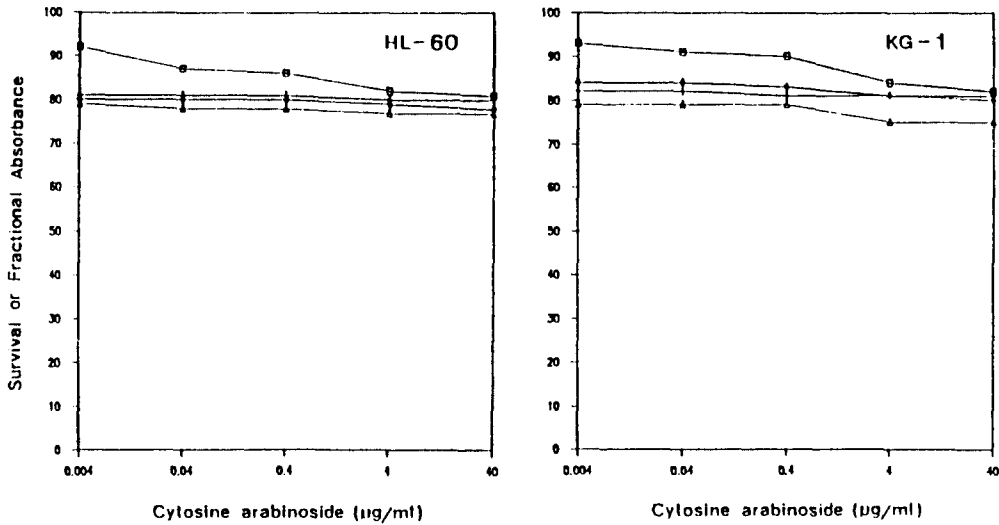


Fig. 10—Effect of combining crude drug extracts on cytotoxicity of cytosine arabinoside: alone ara-C(□), + (±)-ar-Turmerone(+), + *L. erythrorhizon*(◇), + *S. baicalensis*(△).

µg/ml에서 35~78%의 세포독성을 보인 반면, VP-16은 0.1~10 µg/ml에서 19~39%, ara-C는 40 µg/ml에서 18%, Bleo는 0.1~10 µg/ml에서 20~30%, CYC는 10 µg/ml에서 18%로 비교적 약한 세포독성을 보였다 (Fig. 5~12).

따라서 HL-60 및 KG-1세포주에 대하여 VCR, VBL, ADR, CPDD은 사용한 실험농도에서 50% 이상의 억

제효과가 있는 것으로 나타났으며 VP-16, ara-C, Bleo, CYC는 50% 이상의 억제효과가 나타나지 않았다.

항암제와 생약추출물의 병용효과—두 세포주에 대하여 세포증식을 50% 이상 억제시키는 항암제 3가지와 (±)-ar-turmerone 및 두 생약추출물을 병용처리시 나타나는 항암효과를 ID₅₀값으로 표시, 비교한 결과를 Table 1에 나타내었다. HL-60세포주에 대하여

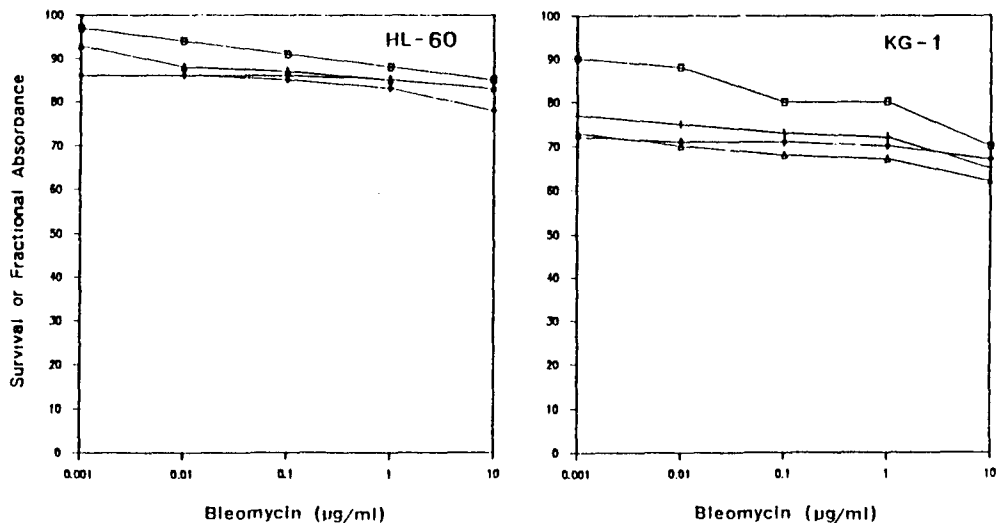


Fig. 11—Effect of combining crude drug extracts on cytotoxicity of bleomycin: alone Bleo(□), + (±)-ar-Turmerone (+), + *L. erythrorhizon*(◇), + *S. baicalensis*(△).

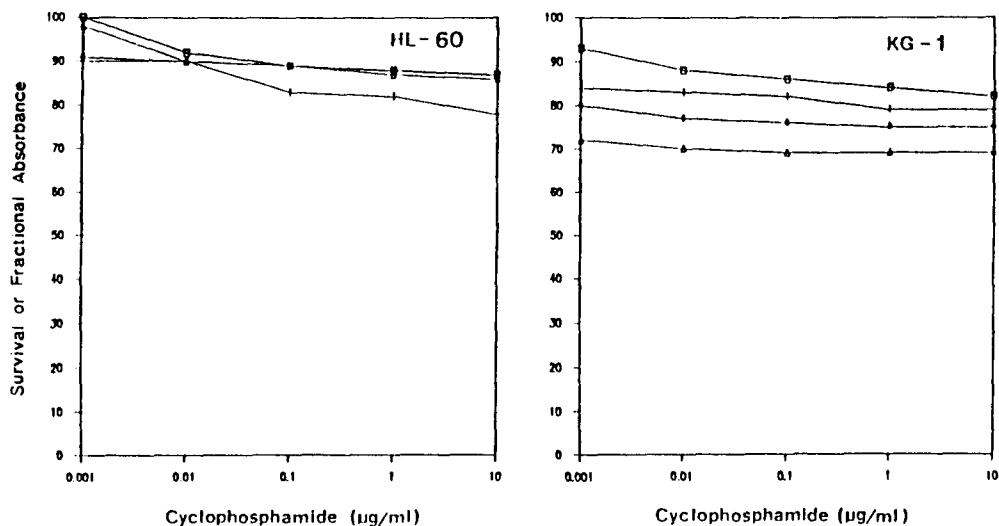


Fig. 12—Effect of combining crude drug extracts on cytotoxicity of cyclophosphamide: alone CYC(□), + (±)-ar-Turmerone(+), + *L. erythrorhizon*(◇), + *S. baicalensis*(△).

VCR, VBL, ADR을 단독처리시 ID₅₀값이 각각 0.450 µg/ml, 0.518 µg/ml, 0.717 µg/ml로 나타난 반면, (±)-ar-turmerone 병용처리시에는 각각 0.23 µg/ml, 0.06 µg/ml, 0.204 µg/ml으로 나타났다. 이는 (±)-ar-turmerone을 첨가함으로써 HL-60세포주에 대한 VCR, VBL, ADR의 ID₅₀값을 각각 2배, 8.6배, 3.5배 감소시키는 결과가 되며, 이는 ID₅₀ 단위로 표시된

세포독성을 이들 배수 만큼 증강시키고 있음을 뜻한다. 자근추출물의 병용시에는 각각 22배, 5.5배, 2.8배 순으로, 황금의 경우 20배, 8.6배, 2.7배 순으로 세포독성을 증강시켰다. KG-1세포주의 경우 (±)-ar-turmerone 첨가로 인한 VCR, VBL, ADR의 세포독성 증강은 각각 1.6배, 6배, 3배이었고, 자근추출물 병용시 각각 1.9배, 6배, 3배순으로, 황금추출물 병용시에는

Table I—ID₅₀ value of anticancer drug combined with crude drug extract using the MTT assay.

Crude drug extracts	HL-60				KG-1			
	None	(±)-ar-Turmerone (10 ⁻⁴ µg/ml)	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> (10 µg/ml)	<i>Scutellaria baicalensis</i> (10 µg/ml)	None	(±)-ar-Turmerone (10 ⁻⁴ µg/ml)	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> (10 µg/ml)	<i>Scutellaria baicalensis</i> (10 µg/ml)
Vincristine (%)	0.450 (100)	0.230 (51)	0.020 (23)	0.022 (5)	1.100 (100)	0.665 (60)	0.588 (53)	0.621 (56)
Vinblastine (%)	0.518 (100)	0.060 (12)	0.081 (16)	0.092 (18)	1.601 (100)	0.278 (17)	0.263 (16)	0.330 (21)
Adriamycin (%)	0.717 (100)	0.204 (28)	0.257 (36)	0.263 (37)	1.346 (100)	0.466 (35)	0.433 (32)	0.515 (38)

각각 1.7배, 4.8배, 2.6배씩 증강시키고 있다.

고 찰

항암제는 DNA와 직접 작용하여 핵산의 합성을 억제시키거나 DNA 합성에 관여하여 DNA polymerase와 ribonucleoside reductase 등을 억제시키며 purine 및 pyrimidine의 생합성으로 thymidilate synthetase 등을 억제, 미세소관 단백질에 작용하여 tubulin과 결합시키고 체세포분열의 방추사형성을 억제, 단백질합성을 유도하여 L-asparagine을 가수분해시키는 등 생물학적 활성기작에 기초를 두어 개발되어 왔다.¹⁾

한편 전통 한방, 민간 약용식물에서 새로운 항암 물질을 찾고자 하는 연구⁶⁾가 시도되어 인삼추출물이 자궁 경부암 환자에 대하여 방사선치료시골수 기능 장애를 억제시키며 X-선을 조사한 생쥐에 항방사선 작용을 나타내며 X-선 조사로 발생하는 배양세포의 변형감소, 골수와 적혈구 모세포의 유사분열 활성 그리고 DNA, RNA 및 단백질합성이 증가된다고 하였다.³⁰⁻³⁴⁾ 또한 지실에서 aurapten,¹¹⁾ 인삼에서 panaxydol⁵⁾ 및 그 유사체들⁶⁾을, 자근에서 shikonine,¹³⁾ 황금에서 skullcapflavone II¹⁴⁾를 분리하여 항암효과를 보고하였으며, 까마중에서 glycoalkaloids를 추출하여 Sarcoma 180을 이식시킨 생쥐에 대하여 항암작용을 관찰하였으며,¹²⁾ 꼭두서니에서 추출한 cyclic oligopeptides RA 계통의 화합물, 땀덩이 덩굴에서 추출한 sinococuline, 노박덩굴에서 추출한 diterpenes이 L₁₂₁₀, P388 등의 세포주에서 세포독성을 보인다고 보고하였다.¹⁵⁾

본 연구에서는 HL-60 및 KG-1세포주에 대하여 1983년 Mosmann²⁰⁾에 의해 개발된 MTT assay를 변형시킨 방법을 사용하여 8종의 항암제에 대한 감수성검사와 올금 항암성분의 합성품인 (±)-ar-turmerone과 자근 및 황금추출물의 항암효과 그리고 이들 생약추출물을 항암제에 병용투여함으로써 나타나는 항암작용의 증강효과를 관찰하였다.

HL-60 및 KG-1세포주에 대하여 well당 세포수와 흡광도와의 관계가 HL-60세포주는 0.9970이며 KG-1세포주는 0.9974의 상관계수를 보임으로써 서로 비례임을 알 수 있었으며(Fig. 2), 본 실험에서는 *in vitro*에서 확립된 백혈병 세포주를 사용하였으므로 assay 자체의 문제점은 없었으나 정상세포에 대해서도 MTT를 formazan으로 환원시킬 수 있으므로 신선한 종양조직으로는 검사가 어렵다는 단점도 있다. 그러나 1989년 Hida 등³⁵⁾은 낮은 plating efficiency와 검사 과정에 있어 시간이 많이 소요되는 단점을 갖고 있는 human tumor clonogenic assay(HTCA)와 MTT assay를 조합하여 MTT hybrid assay를 개발하여 두 가지 assay의 문제점을 보완시켰다.

세포성장실험에서 4일 동안의 배양기간 중 증식률이 가장 왕성하고 안정된 성장을 보이는 세포수는 두 세포주 모두에 대하여 2.5×10⁴ cells/well로 나타나 이 세포수에서 모든 실험을 수행하였으며, 4일 동안의 배양기간에서는 암세포에 대하여 세포독성 검사를 하는데 있어 약제가 세포내로 유도되어 세포괴사와 미토콘드리아 탈수소효소의 활동력 소실을 기대할 수 있다는 Carmicheal 등²²⁾의 보고와 같이 본 실험에서도 반응시간을 4일로 정함으로써 생체내 반응 환경을 충분히 반영시킬 수 있었다고 사료된다.

항암제 감수성검사에서 HL-60 및 KG-1세포주는 VCR, VBL, ADR, CPDD에는 감수성이 있는 것으로 판정되었고, VP-16, ara-C, Bleo, CYC에는 감수성이 없는 것으로 판정되었다. 또한 사용한 대부분의 항암제는 KG-1세포주에 비하여 HL-60세포주에 대하여 더 큰 효과를 보였다(Fig. 5~12). 따라서 HL-60과 KG-1세포주의 증식속도 및 항암제의 반응정도가 다름을 확인할 수 있었다.

생약추출물의 세포독성효과를 보면, (±)-ar-turmerone은 HL-60세포주에 대하여 ID₅₀값이 11.730 µg/ml로 나타나 유의한 효과를 보였으며, KG-1세포주에 대해서는 0.292 µg/ml로 나타나 강한 항암효과를 보인다. 그리고 자근과 황금추출물은 두 세포주 모두에 별 영향은 없는 것으로 나타났다(Fig. 4).

(+)-ar-Turmerone은 1986년 안 등⁸⁾이 L₁₂₁₀ 세포주에 대하여 기존의 항암제와 병용투여시 세포독성을 증가시키며 Sarcoma 180을 이식시킨 생쥐에 대하여 164%의 생명연장 효과를 보인다고 보고한 바 있다. 그리고 1989년 Sato⁹⁾는 수십종의 생약제를 사용하여 인체의 자궁 경부암 세포주인 JTC-26에 대한 세포독성검사를 한바 올금은 500 µg/ml 농도에서 31%, 황금은 60~500 µg/ml에서 15~90%의 세포독성을 보인다고 하였으며, 자근에 대해서는 세포독성효과를 보이지 않았다고 하였다. 이 결과는 안 등¹³⁾이 자근으로부터 분리한 acetyl shikonine이 L₁₂₁₀세포 및 S-180 암에 대하여 강한 항암성을 보였다는 결과와는 대조적이다. 실험세포주의 차이 때문인 것으로 생각된다. 결과적으로 (±)-ar-turmerone이 HL-60세포주에 대하여 0.1~1,000 µg/ml의 농도에서 13~93%의 세포독성(fractional absorbance)을 나타냈으며 KG-1세포주에 대하여도 0.0001~1,000 µg/ml에서 15~86%의 세포독성을 보여줌으로써 1986년 안 등⁸⁾과 1989년 Sato⁹⁾의 결과와 비교 분석할 때 새로운 항암물질의 개발 가능성을 제시하고 있다고 생각된다.

Fig. 5~12는 항암제 단독처리시 항암효과와 생약추출물을 항암제에 병용처리시 항암제의 세포독성을 증가시키는 효과를 본 것으로 항암제의 각 농도에 따라 병용효과가 각각 다르게 나타났다. 특히 HL-60 및 KG-1세포주에 대하여 항암제 단독처리시 50% 이상의 세포독성을 보이는 3종의 항암제 즉 VCR, VBL, ADR의 ID₅₀값으로 보면, HL-60세포주에 대하여 단독처리시에 비하여 (±)-ar-turmerone 병용처리시

에는 각각 2배, 8.6배, 35배로, 자근추출물 병용시에는 22배, 5.5배, 2.8배로, 황금추출물 병용시에는 20배, 8.6배, 2.7배로 모두 세포독성이 증강되었다. HL-60의 경우 특히 VBL에 대한 ar-turmerone의 증강효과, VBL에 대한 자근의 증강효과 그리고 VCR 및 VBL에 대한 황금추출물의 증강효과는 두드러졌다. 이들 물질들의 ADR의 세포독성 증강효과는 비교적으로 약하였다. 이는 vinca 알칼로이드인 VCR, VBL과 tetracyclinone계 물질인 ADR간의 구조적 차이에서 오는 작용격차인 것으로 보인다. 李⁸⁾ 등은 (±)-ar-turmerone의 세포독성 증강작용은 주로 지용성 구조를 갖는 세포독성물질, 예컨대 MeCCNU, b-sesquiphellandrene 등의 세포독성을 대폭 증강시키고 있음을 발견하였다. 그러나 여기에 사용한 세포독성물질은 모두 알칼로이드성 물질로서 비지용성을 나타냄으로 李 등의 결론을 여기에 적용할 수는 없다. KG-1세포주에 대하여는 VCR, VBL, ADR의 단독처리시에 비하여 (±)-ar-turmerone 병용처리시에는 각각 1.6배, 6배, 3배, 자근추출물 처리시에는 각각 1.9배, 6배, 3배, 황금추출물 병용시에는 각각 1.7배, 4.8배, 2.6배의 세포독성 증강을 나타내었다. KG-1의 경우 증강효과는 HL-60에 비하여 약하게 나타났지만 (±)-ar-turmerone/VBL의 경우 6배, 자근/VBL의 경우 6배, 황금/VBL의 경우 4.8배로 상당히 강한 증강작용이 나타나고 있음을 발견할 수 있다. 생약제의 약리작용은 주로 上昇作用에 그 基礎를 두고 있음을 감안할 때 앞으로 생약추출물의 新 또는 既存 세포독성에 대한 증강효과를 체계적으로 검토할 필요가 있다고 생각된다.

이와 같은 작용을 직접 임상에 응용할 수 있을 경우, 항암제의 투여량을 상대적으로 감소시킬 수 있을 것이고 따라서 인체독성을 감소시킬 수 있을 것이다. 또한 이와 같은 상승효과는 약제의 내성과도 관계가 있을 것으로 생각되며, 이에 대한 기초연구 또한 필요하다. 앞으로 자근과 황금으로부터 세포독성 증강작용을 갖는 물질의 단리와 구조규명에 관한 연구가 진행되어야 할 것이다.

결론

생약추출물을 기존의 항암제와 병용투여함으로써 높은 치료효과를 나타내면서 항암제의 부작용을 감

소시키고 약제의 내성을 극복 혹은 예방할 수 있는지 알아보고자 시행한 본 연구는 colorimetric [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide](MTT) assay를 사용하여 HL-60과 KG-1세포주에 대하여 8종의 항암제 감수성검사와 3종의 생약추출물의 항암효과 그리고 항암제에 생약추출물을 병용투여하여 나타나는 항암작용의 증강효과를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 항암제의 감수성검사서 vincristine, vinblastine, adriamycin, cisplatin은 HL-60에 대하여 각각 67%, 68%, 83%, 54%까지 세포독성효과를 보였으며 KG-1에 대하여는 각각 79%, 75%, 74%, 78%까지 세포독성효과를 보였다. 그러나 etoposide, cytosine, arabinoside, bleomycin, cyclophosphamide는 사용한 농도에서 50% 이상의 억제효과는 나타내지 않았다.

2. 생약추출물의 단독투여시 (±)-ar-turmerone은 HL-60 및 KG-1에 대하여 ID₅₀값이 각각 11.730 µg/ml과 0.292 µg/ml로 유의한 억제작용을 나타내었으나 자근과 황금추출물은 효과를 보이지 않았다.

3. 생약추출물을 항암제와 병용투여시 대부분의 항암제에서 항암제 단독투여시 보다 항암작용이 증강되었다. 특히 VCR, VBL, ADR의 경우 단독투여시에 비해 ID₅₀값이 생약추출물과 병용투여시에 HL-60 세포에 대하여 (±)-ar-turmerone은 VCR, VBL 및 ADR의 세포독성을 각각 2배, 8.6배, 3.5배 증강시켰으며, 자근은 각각 22배, 5.5배, 2.8배, 그리고 황금은 각각 20배, 8.6배, 2.7배 상승시켰다. KG-1세포의 경우 (±)-ar-turmerone은 VCR, VBL 및 ADR의 세포독성을 각각 1.6배, 6배, 3배, 자근추출물은 각각 1.6배, 6배, 3배, 자근추출물은 각각 1.9배, 6배, 3배 그리고 황금추출물은 각각 1.7배, 4.8배, 2.6배 증강시켰다.

결론적으로 (±)-ar-turmerone, 자근추출물 및 황금추출물은 vincristine, vinblastine 및 adriamycin의 HL-60세포와 KG-1세포에 대하여 좋은 세포독성 증강효과를 보이고 있음을 발견하였다. 이들 물질은 HL-60세포에 대하여 보다 민감하게 반응하였고, 그 중에서도 자근이 가장 강한 증강작용을 나타내었다.

문 헌

1) Powis, G.: *Cancer chemotherapy II: Laboratory to clinic.* In Farmer, P.B. and Walker, J.M(eds.), The

molecular basis of cancer. A Wiley-Interscience publication, New York, p.287(1985).

2) Van Putten, L.M., Leheveld, P. and Kram, I.L.: Cell cycle specificity and therapeutic effectiveness of cytostatic drugs. *Cancer Chemother. Rep.* **56**, 691 (1972).

3) Barranco, S.C. and Novak, J.K.: Survival response of dividing and nondividing mammalian cells after treatment with hydroxyurea, arabi nosylcytosine or adriamycin. *Cancer Res.* **34**, 1616(1974).

4) Drewinko, B., Patchen, M., Yang, L.Y. and Barlogie, B.: Differential killing efficacy of twenty antitumor drugs on proliferating and nonproliferating human tumor cells. *Cancer Res.* **41**, 2328(1981).

5) Ahn, B.Z. and Kim, S.I.: Antineoplastic natural products and the analogues VI: Panaxydol, the cytotoxic principle of the *Panax ginseng* root against L₁₂₁₀ cells. *Arch. Pharm. Res.* **8**, 283(1985).

6) Ahn, B.Z. and Kim, S.L.: Beziehung zwischen struktur und zytotoxizitaet von panaxydol-analogen gegen L₁₂₁₀-zellen. *Archiv. Pharm.*(Weimheim). **321**, 61(1988).

7) Lee, J.H., Kang, S.K. and Ahn, B.Z.: Antineoplastic natural products and the analogues(XI): Cytotoxic activity against L₁₂₁₀ cell of some raw drugs from the oriental medicine and folklore. *Kor. J. Pharmacogn.* **17**, 286(1986).

8) Ahn, B.Z. and Lee, J.H.: Cytotoxic and cytotoxicity-potentiating effects. of the *Curcuma* Root k1 jon L₁₂₁₀ cell. *Kor. J. Pharmacogn.* **20**, 223(1989).

9) Sato, A.: Studies on anti-tumor activity of crude drugs I: The effects of aqueous extracts of some crude drugs in shortterm screening test.(1). *Yakugaku Zasshi* **109**, 407(1898).

10) Ryu, S.H., Ahn, B.Z. and Pack, M.Y.: The cytotoxic principle of *Scutellaria radix* against L₁₂₁₀ cell. *Planta Medica* 355(1985).

11) Kang, K.S., Ryu, S.H. and Ahn, B.Z.: Antineoplastic natural products and the analogues IV: Auraptin, the cytotoxic coumarin from *Poncirus trifoliata* against L₁₂₁₀ cell. *Arch. Pharm. Res.* **8**, 187(1985).

12) Cham, B.E., Gilliver, M. and Wilson, L.: Antitumour effects of glycoalkaloids isolated from *Solanum sodomaeum*. *Planta Med.* **5**, 34(1986).

- 13) Kim, H. and Ahn, B.Z.: Antitumor effects of acetylshikonine and some synthesized naphthazarins on L₁₂₁₀ and S-180 systems. *Yakhak Hoeji* **34**, 262 (1990).
- 14) Ahn, B.Z.: Antitumor activities of some natural and synthetic flavones against L₁₂₁₀ and S-180 cells. in "the proceedings of the international symposium on new drugs development from natural products" ed. by I.R. Lee, H.S. Yun and I.M. Chang, Seoul. (1989).
- 15) Itokawa, H.: Research on antineoplastic drugs from natural sources: Especially from higher plants. *Yakugaku Zasshi* **108**, 824(1988).
- 16) Roper, P.R. and Drewinko, B.: Comparison of *in vitro* methods to determine drug-induced cell lethality. *Cancer Res.* **36**, 2182(1976).
- 17) Hamburger, A.W. and Salmon, S.E.: Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* **197**, 461 (1977).
- 18) Friedman, H.M. and Glaubiger, D.L.: Assessment of *in vitro* drug sensitivity of human tumor cells using [³H]-thymidine incorporation in a modified human tumor stem cell assay. *Cancer Res.* **42**, 4683 (1982).
- 19) Tanigawa, N., Kern, D.H., Hikasa, Y. and Morton, D.L.: Rapid assay for evaluating the chemosensitivity of human tumors in soft agar culture. *Cancer Res.* **42**, 2159(1982).
- 20) Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55(1983).
- 21) Tada, H., Shiho, O., Kurshima, K., Koyama, M. and Tsukamoto, K.: An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J. Immunol. Methods* **93**, 157 (1986).
- 22) Carmichael, J., DeGraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D. and Mitchell, J.B.: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936(1987).
- 23) Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H. and Boyd, M.R.: Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* **48**, 589(1988).
- 24) Catino, J.J. and Miceli, L.A.: Microtiter assay useful for screening of cell-differentiation agents. *J. Natl. Cancer Inst.* **80**, 962(1988).
- 25) Collins, S.J., Gallo, R.C. and Gallagher, R.E.: Continuous growth and differentiation of human myeloid leukemic cells in suspension culture. *Nature* **270**, 347(1977).
- 26) Koeffler, H.P. and Golde, D.W.: Acute myelogenous leukemia: A human cell line responsive to colony-stimulating activity. *Science* **200**, 1153(1978).
- 27) Patterson, M.K.: *Measurement of growth and viability of cells in culture*. In Jakoby, W.B., and Pastan, I.H.(eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. LVIII. Academic Press, New York, p.141(1979).
- 28) Von Hoff, D.D. Casper, J., Bradley, E., Sandbach, J., Jones, D., and Makuch, R.: Association between human tumor colony-forming assay results and response of an individual patient's tumor to chemotherapy. *Am. J. Med.* **70**, 1027(1981).
- 29) Mann, B.D., Kern, D.H., Giuliano, A.E., Burk, M. W., Campbell, M.A., Kaiser, L.R. and Morton, D.L.: Clinical correlations with drug sensitivities in the clonogenic assay. *Arch. Surg.* **117**, 33(1982).
- 30) Saito, H., Yoshida, Y. and Takagi, K.: Effect of *Panax ginseng* root on exhaustive exercise in mice. *Jap. J. Pharmacol.* **24**, 119(1974).
- 31) Yokozama, T., Semo, H. and Oura, H.: Effect of ginseng extract on lipid and sugar metabolism. *Chem. Pharm. Bull.* **23**, 3095(1975).
- 32) Yonezawa, M.: Restoration of radiation injury by intraperitoneal injection of ginseng extract in mice. *J. Radiat. Res.* **17**, 111(1976).
- 33) Chang, Y.S., Park, C.I. and Noh, H.I.: The effect of *Panax ginseng* on the postoperative radiation complication in cervical cancer patients. *Proc. 3rd Inter. Ginseng Symp.* 197(1980).
- 34) Yonezawa, M., Takeda, A. and Katoh, N.: Restoration of radiation injury by ginseng extract. *Proc. 3rd Inter. Ginseng Symp.* 17(1980).

35) Hida, T., Ueda, R., Takahashi, T., Watanabe, H., Kato, T., Suyama, M., Sugiura, T., Ariyoshi, Y. and Takahashi, T.: Chemosensitivity and radio-sensitivity of small cell lung cancer cell lines studied

by a newly developed 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) hybrid assay. *Cancer Res.* **49**, 4785(1989).