

## L1210 세포에 대한 약용 식물의 세포독성 검색

배기환<sup>#</sup> · 민병선 · 도동선 · 김남수 · 양기중\* · 안병준

충남대학교 약학대학, 경상대학교 농과대학\*

(Received September 14, 1992)

### Screening on Cytotoxicity of Medicinal Plants against L1210 Cell

Ki-Hwan Bae<sup>#</sup>, Byung-Sun Min, Dong-Sun Do, Nam-Soo Kim,  
Gi-Jong Yang\* and Byung-Zun Ahn

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

\*College of Agriculture, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

**Abstract**—For the research of cytotoxic natural products, 50 medicinal plants were extracted with benzene and methanol, separately, and screened against L1210 cells. From the results(Table I), 6 samples showed cytotoxicity both in benzene and methanol extracts of 17 samples in benzene extracts and 3 samples in methanol extracts, respectively. Generally, the cytotoxicity exhibited high frequency (34%) in benzene extract but low frequency in methanol extract (6%), it meant that active cytotoxic components had less polarity. ED<sub>50</sub> values less than 10 µg/ml were observed in 17 medicinal plants.

**Keywords** □ Medicinal plants, L1210 cell, cytotoxicity.

현재 개발된 대부분의 항암제는 암세포와 정상세포 모두에 대하여 독성을 나타내어 여러가지 부작용이 유발될 뿐만 아니라 약제에 내성을 보이는 세포가 잔존하므로 암치료에 실효를 거두지 못하고 있다. 이러한 문제점을 해결할 목적의 하나로 천연물로부터 새로운 항암제를 개발하기 위한 노력이 1956년 이후 계속되어 왔다. 국내에서 식물생약에 대한 세포독성 실험은 이 등,<sup>1)</sup> 및 유 등<sup>2)</sup>이 암 또는 그 유사질환에 관한 연구보고가 있고, 장 등<sup>3)</sup>은 P-388생쥐 암세포에 대하여 53종 생약의 항암작용과 세포독성작용을 연구하여 보고하였다. 저자 등은 세포독성 물질을 연구하기 위한 기초자료를 얻을 목적으로 한방에서 살충이나 소염제로 사용되고 있는 50종의 생약을 선정, 생쥐 백혈병세포의 하나인 L1210에 대한 screening test를 실시하였다. 그 결과 및 세포독성이 비교적

강하게 나타난 생약에 대하여는 구체적으로 약화학적 연구가 진행된 것이 있는 데 그 내용에 대해서 보고 한다.

일반적으로 천연물로부터 추출한 엑스의 약효를 검색할 때, 유효성분이 대단히 작은 농도로 존재하는 경우가 많아서, 실험방법에 감도와 선택성이 요구된다.<sup>4)</sup> 본 연구에서는 약효적인 측면을 고려하여 *in vivo* 실험보다 감도가 100배 내지 1000배 정도 높은 *in vitro* 실험을 선택하였고, cell line은 NCI panel중의 하나이며 천연물의 screening에 많이 사용하는 cell line중의 하나인<sup>5)</sup> L1210 leukemia cell을, 감수성 검사에는 Mossmann<sup>6)</sup>이 개발한 MTT assay를 변형시킨 방법을 이용하였다.

#### 실험재료 및 방법

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

실험재료—대전의 중도한약방(1991년 11월 10일)

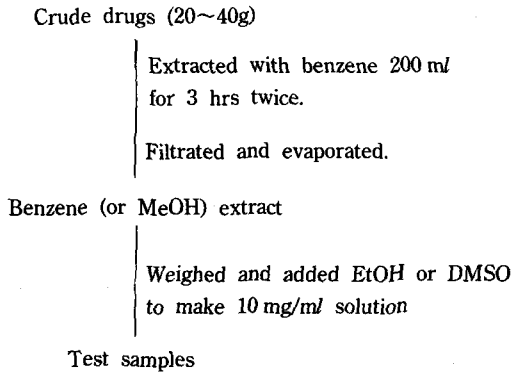


Fig. 1—Sample preparation for cytotoxicity against L1210 cell.

및 사천의 제생당약방(1991년 12월 15일)에서 구입 또는 증정 받은 강활외 47종, 개비자나무는 1992년 6월 15일 계룡산에서, 한신초는 1991년 5월 20~30일 진도와 해남에서 채집하여 사용하였다.

**시약 및 기구**—dimethylsulfoxide(DMSO, Sigma), absolute ethanol(Merck), NaHCO<sub>3</sub>(세포독성 실험용, Sigma), 페니실린 및 스트렙토마이신(Sigma), 기타 사용한 시약은 특급 및 일급이며, 공업용 용매인 경우는 증류하여 사용하였다. 사용한 기구는 autoclave 및 incubator는 동양과학, screw cap tube, pipet 및 bottle은 Corning의 것을 사용하였다.

**L1210세포의 배양**—생쥐 백혈병세포인 L1210세포<sup>5)</sup>는 실험실에서 보존하고 있는 것을, 이틀에 한번씩 계대 배양하여 사용하였다. 이 세포는 구형이고 이 분법으로 성장하며 약 12~17.5시간의 doubling time을 갖고 있다.

**시료의 조제(Fig. 1)**—생약 20~40g을 세말로 하여 Soxhlet 추출기에 넣고 벤젠과 메탄올로 각각 추출 여과후 감압하에 농축, 다시 vacuum dryer에서 건조, 엑스를 얻었다. 각 엑스를 평량하여 10 mg/ml 용액이 되도록 에탄올에 용해 시키고, 에탄올에 난용인 것은 DMSO에 녹여 사용하였다.

**세포독성 실험**—세포의 농도를 2~3×10<sup>5</sup> cells/ml 배지가 되게 조정후 하루배양하면 logarithmic phase에 도달 한 세포가 0.8~1.0×10<sup>6</sup> cells/ml 배지의 농도로 자라며(spinner culture), 실험하기 직전에 37°C로 가온한 배지로 희석하여 5×10<sup>4</sup> cells/ml배지로 한다(run bottle). 시료 용액 0.1 ml에 배지 0.9 ml를 가해 10배 희석한 후 screw-cap tube에 100, 50, 25

μl를 가하고 위에서 제조한 세포 현탁액(run bottle)을 5 ml씩 넣어 실험군으로 하였고, 대조군 tube(갯수 2√n: n=시료수)에서 5 ml의 세포 현탁액만을 넣어 배양기에 넣고 37°C, CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간 배양한다. 배양된 각 시험관내의 세포수는 hematocytometer를 사용하여 계산하였다.

**ED<sub>50</sub>값의 결정**—ED<sub>50</sub>값은 대조군의 50% 수준으로 암세포의 성장을 억제하는 시료의 농도(μ/ml)로 주어지며, Thayer 등의 방법<sup>7)</sup>에 의해 결정하였다.

## 결과 및 고찰

각 생약을 벤젠 및 메탄올로 추출한 후 건조엑스를 만들고 L1210세포에 대해 세포독성을 측정하였다(Table I). 생약 추출시 벤젠과 메탄올을 사용하였는데, 메탄올로 추출하면 높은 수율로 엑스를 얻을 수는 있지만, 활성 성분의 농도가 희석될 확률이 높아 활성이 나타나지 않을 수 있다. 그러므로 비극성물질군을 목표로 벤젠으로도 추출하여 실험하였다. L1210 세포 독성의 평가는 식물추출물인 경우 20 μ/ml 이하일 때 세포독성이 있다고 규정<sup>8)</sup>하고 있다. 이 규정에 따라, Table I에서 나타난 실험성적을 분석하면 다음과 같다. 50종의 생약중 백두구 등 6종이 벤젠 및 메탄올 엑스에서 세포독성이 나타났고, 강활 등 17종이 벤젠엑스에서, 빈랑자 등 3종의 생약이 메탄올 엑스에서만 세포독성이 관찰되었다. 스크리닝 시험한 생약중 벤젠과 메탄올엑스에서 각각 세포독성을 나타내는 생약은 다른 극성을 갖는 다양한 활성 물질이 함유되어 있을 것으로 추측되나, 이런 경우는 다양한 용매로서 좀더 엄격히 분석을 실시하여 세포 독성물질 탐색을 해야만 할 것이다. 벤젠엑스에서 세포독성이 많은 생약들이 있다는 것은 활성성분이 비교적 비극성의 물질들일 것이라고 추정되며, 다소 차이는 있으나 주로 당을 함유하지 않은 폐쇄성 물질, 알칼로이드 등의 분자량이 적고, 극성도 낮아 세포막 투과가 용이한 화합물이 함유되어 있을 것이다.

ED<sub>50</sub>값이 10 μg/ml 이하인 생약이 17종으로 나타나, 이러한 생약들에 대하여는 현재 세포독성 물질을 규명하고 있다. 대상 생약중 부분적이나마 세포독성물질을 탐색한것은 강활, 연교 및 한신초이며, 상세한 연구 결과에 대하여는 추후 발표예정이나, 약기하면 다음과 같다. 강활은 한방에서 발한, 진통, 해열 등에

Table I—ED<sub>50</sub> values of benzene and methanol extracts against L1210 cells

Scientific Name	Part	ED <sub>50</sub> (μg/ml)	
		Benzene ex.	Methanol ex.
<i>Alpinia officinarum</i> (양강)	Rhizome	>20.0	>20.0
<i>Amomum kravanh</i> (백두구)	Fruit	7.9	6.9
<i>Ampelopsis japonica</i> (백렴)	Root	>20.0	>20.0
<i>Angelica dahurica</i> (백지)	Root	>20.0	>20.0
<i>Angelica koreana</i> (강활)	Root	4.2	>20.0
<i>Areca catechu</i> (빈랑자)	Seed	>20.0	6.8
<i>Arisaema amurense var. serratum</i> (천남성)	Tuber	10.0	>20.0
<i>Arisma orientale</i> (택사)	Tuber	13.8	>20.0
<i>Aristolochia contorta</i> (마도령)	Fruit	7.1	>20.0
<i>Asiasarum sieboldi</i> (새신)	Root	>20.0	>20.0
<i>Asparagus cochinchinensis</i> (천문동)	Tuber	>20.0	>20.0
<i>Cephalotaxus koreana</i> (개비자)	Leaf	>20.0	>20.0
<i>Chrysanthemum zawadskii</i> (구절초)	Herb	>20.0	>20.0
<i>Cimicifuga heracleifolia</i> (승마)	Rhizome	>20.0	>20.0
<i>Clematis florida</i> (위령선)	Root	14.0	>20.0
<i>Crataegus pinnatifida</i> (산사자)	Fruit	>20.0	>20.0
<i>Curcuma zedoaria</i> (봉출)	Rhizome	>20.0	>20.0
<i>Cyperus rotundus</i> (삼릉)	Rhizome	>20.0	>20.0
<i>Dianthus sinensis</i> (구맥자)	Fruit	9.2	>20.0
<i>Elsholtzia ciliata</i> (향유)	Herb	2.2	>20.0
<i>Ephedra sinica</i> (마황)	Herb	10.2	16.3
<i>Equisetum hyemale</i> (목적)	Herb	19.6	>20.0
<i>Eugenia caryophyllata</i> (정향)	Flower	>20.0	>20.0
<i>Forsythia koreana</i> (연교)	Fruit	2.4	6.7
<i>Gardenia jasminoides</i> (치자)	Fruit	7.4	>20.0
<i>Ginkgo biloba</i> (백과)	Seed	20.0	>20.0
<i>Inula britannica var. chinensis</i> (선복화)	Flower	9.9	>20.0
<i>Juncus effusus</i> (등심)	Herb	>20.0	>20.0
<i>Kalopanax pictus</i> (해동피)	Root bark	>20.0	>20.0
<i>Lindera strychnifolia</i> (오약)	Root	11.0	>20.0
<i>Liriope platyphylla</i> (맥문동)	Tuber	>20.0	>20.0
<i>Lycium chinense</i> (구기자)	Fruit	7.1	>20.0
<i>Melandrium firmum</i> (왕불류행)	Herb	>20.0	>20.0
<i>Melia azedarach</i> (고련피)	Stem bark	1.0	3.0
<i>Mentha arvensis var. piperascens</i> (박하)	Herb	9.3	>20.0
<i>Morus alba</i> (상백피)	Root bark	>20.0	>20.0
<i>Polyporus umbellatus</i> (저령)	Hypha	>20.0	>20.0
<i>Pueraria thunbergiana</i> (갈근)	Root	>20.0	>20.0
<i>Reynoutria elliptica</i> (호장근)	Rhizome	7.8	10.0
<i>Sanguisorba officinalis</i> (지유)	Root	>20.0	>20.0
<i>Scirpus flubiatilis</i> (삼릉)	Rhizome	>20.0	18.5
<i>Scrophularia buergeriana</i> (현삼)	Root	1.6	3.3
<i>Scutellaria indica</i> (환신초)	Root	4.8	>20.0
<i>Sinomenium acutum</i> (방기)	Rhizome	>20.0	>20.0
<i>Sophora flavescens</i> (고삼)	Root	14.4	>20.0
<i>Strychnos ignatii</i> (보두)	Seed	>20.0	>20.0
<i>Teucrium veronicoides</i> (곽향)	Herb	>20.0	5.0
<i>Ulmus parvifolia</i> (낭유피)	Root bark	>20.0	>20.0
<i>Vitex rotundifolia</i> (만형자)	Fruit	>20.0	>20.0
<i>Zingiber officinale</i> (건강)	Rhizome	3.5	>20.0

사용하며, 암치료에 있어서는 보조 요법제<sup>9)</sup>로 사용되어 왔다. 성분의 연구로는 furanocoumarin계통의 imperatorin,<sup>10)</sup> ferulic acid, bisabolangelone, oxypeucedanin hydrate, osthol,<sup>11)</sup> isooxypeucedanin, oxypeucedanin mathanolate<sup>12)</sup> 등이 보고되어 있다. 세포독성물질을 구명할 목적으로, 용매분획을 하기위하여 강활을 메탄올로 추출, 물에 현탁시켜, petroleum ether, ether, ethyl acetate로 용매 분획하여 세포독성을 나타내는 ether층에서 세포독성 물질을 분리하여 확인한 결과, sesquiterpene계통의 화합물인 bisabolangelone이 강한 세포독성을 나타냄을 알 수 있었다. 연구는 해열, 소염, 배농 및 이뇨 등에 사용되어 왔으며, 성분연구로는 triterpenoid계 화합물, lignan계 화합물,<sup>13)</sup> phenylpropanoid 배당체,<sup>14)</sup> flavonol 배당체<sup>15)</sup> 등이 보고되어 있다. 메탄올로 추출한 후 물에 현탁, 생기는 침전물에서 세포독성 물질을 분리하여 확인한 결과 triterpenoid계 화합물인 acetyl betulinic acid와 betulinic acid가 세포 독성을 나타내었다. 한신초는 중국에서 암치료제로 사용하고 있으며, 성분 연구로는 flavonoid계통의 화합물<sup>15)</sup>이 알려져 있다. 세포독성 물질을 찾기위하여 한신초를 메탄올로 추출한 후, *n*-hexane, ether, ethyl acetate, *n*-buthanol로 분획하여 세포독성을 나타내는 에테르층을 분리하여 확인한 결과 flavonoid계통의 화합물인 flavanone과 flavone 화합물이 세포독성을 나타내었다.

## 결 론

생약으로부터 신규항암제를 개발하기 위한 기초연구로, 한방에서 살충제나 소염제로 사용하고 있는 생약 50종을 선정, 벤젠과 메탄올로 추출, 건조 엑스로 만들어 L1210세포에 대해 세포독성을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 50종의 생약 중 벤젠 및 메탄올엑스 모두에 활성을 보인 것은 백두구 등 6종이었고, 벤젠엑스에서만 세포독성이 나타난 것은 빈랑자 등 17종, 메탄올엑스에서만 나타난 것은 강활 등 3종이었다.

2. ED<sub>50</sub>값이 10 µg/ml 이하인 생약은 활성성분의 규명, 약효의 검증 등 구체적인 약화학적연구를 할 만한 것으로서 백두구, 강활, 빈랑자, 천남성, 마도령, 구맥자, 향유, 연교, 치자, 선복화, 구기자, 박하, 호장근, 현삼, 한신초, 광향, 건강 등 17종이었다. 그 외의

생약은 세포독성이 없거나 미약하였다.

## 문 헌

- 1) Lee, J. H., Kang, K. S. 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. *K. J. Pharmacogn.*, **17**, 286 (1986).
- 2) Ryu, S. H., Moon, K. H. and Park, M. Y.: *Kor. J. Appl. Microbial. Biochem.*, **10**, 53 (1982), cited from reference 1).
- 3) Chang, I. M., Kim, J. H., and Han, D. S.: Toxicological evaluation of medicinal plants used for herbal drugs (IV), Acute toxicity and antitumor activities. *K. J. Pharmacogn.*, **13**, 69 (1982).
- 4) Matthew, S. and John, D.: Current status of the NCI plant and animal products program. *J. Nat. Prod.*, **45**, 1 (1982).
- 5) John, M. C., Milliam, M. B. and Ching, J. C.: Natural products as a source of potential cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. *J. Nat. Prod.*, **53**, 23 (1990).
- 6) Mossman, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **93**, 157 (1986).
- 7) Thayer, P. S., Himmelfarb, P. and Watts, G. L.: *Cancer Chemother. Rep.*, (Part 2), **2**, 1 (1971), cited from reference 1).
- 8) Cell Culture Screen, KB, Protocol 1600, *Cancer Chemother. Rep.*, (Part 3), **3**, 17 (1972).
- 9) 홍원식 : 현대 중공의 암치료, 영문사, 서울, pp. 110-115 (1980).
- 10) Ryn, K. S. and Yook, C. S.: Studies on the constituents of the root of *Angelica koreana* Max. *J. Pharm. Soc. Korea*, **12**, 59 (1968).
- 11) Hata, K., Kozawa, M., Bata, K. and Chi, H. J.: Coumarin and a sesquiterpene from the crude drugs "Korean Qianghuo" the roots of *Angelica spp.* *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 1963 (1971).
- 12) Lee, C. K. and Woo, W. S.: Coumarin constituents from the roots of *Angelica koreana* Max. *Kor. J. Pharmacogn.*, **13**, 10 (1982).

- 13) Nishibe, S., Chiba, M. and Hisada, S.: Studies on the Chinese crude drug "Forsythiae Fructus" (I), On the constituents of Forsythiae Fructus on the market. *Yakugaku Zasshi*, **97**, 1134 (1977).
- 14) Nishibe, S., Okabe, K., Tsukamoto, H., Sakushima, A., Hisada, S., Baba, H. and Akisada, T.: Studies on the Chinese crude drug "Forsythiae Fructus." *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 4548 (1982).
- 15) Yukinori, M., Yoshitaka, I., Tsuyoshi, T. and Chun, C. L.: Studies on the constituents of *Scutellaria species* (IX), On the flavonoid constituents of the root of *Scutellaria L.* *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 1320 (1987).