

白花蛇舌草로부터分離된抗癌活性物質에 關한 研究

金聖勳*

ABSTRACT

Study on the Antitumor Substance Isolated from *Oldenlandiae diffusae Herba*

Sung-Hoon kim, O.M.D., Ph.D.,

Oriental medical college, Taejeon university, 96-3, Yongwoondong, Donggu,
Taejeon, South Korea, 300-716.

Hexane fraction of *Oldenlandiae diffusae Herba*(ODH) which was being used for the treatment of cancer in oriental medicine showed the best cytotoxicity against L1210 and A549 in the solvent fractions. Antitumor substance isolated from hexane fraction of ODH was identified as ursolic acid(UA) by photometric analysis. IC50 of UA against cancer cells as SNU-1, HCT15, XF498, SK-MEL2 and A549 was 13 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$, 12 $\mu\text{g/ml}$, 9 $\mu\text{g/ml}$ and 11 $\mu\text{g/ml}$ respectively. It significantly inhibited the metastasis to lungs and kidneys from pulmonary colonization assay and study on histological changes of organs and showed the enhancing effect on B cell dosage-dependently by FACS analysis.

T/C % of UA against S-180 cells was 171 % and its cytotoxicity against SNU-1 cell was confirmed from the morphological changes by electronic microscopes such as SEM and TEM that it induced undulated membrane 4 hr after UA treatment, and the breakdown of cell membrane and nucleus 24 hr after UA treatment.

I. 緒 論

백화사설초는 꼭두서니과(茜草科; Rubiaceae)에 속하는 1년생 초본인 쌍낚시돌풀(백운풀) *Oldenlandiae diffusae*(WILLD.) ROXB.(=*Hedyotis diffusa* WILLD.)의 전

초로서 습기가 많은 산기슭에 자라는데 중국에서는 복건, 광둥, 광서, 운남 및 양장강 남쪽지방에 주로 분포하며 우리나라에서는 전남의 백운산, 제주도에 자생하고 최근 진주에서 재배하고 있다¹⁾²⁾.

백화사설초의性は寒, 平, 無毒하며 맛은 달고 쓰며 작용하는 경락은 위경, 대장

* 大田大學校 韓醫科大學 病理學教室

경, 소장경 등이며, 본초학적 효능은 淸熱解毒, 利水通淋, 活血化瘀, 消癰 등으로 폐열기침, 편도선염, 인후염, 충수염, 이질, 황달, 자궁부속기염, 각종 염증 및 뱀에 물린곳에 달여 내복하거나 외용하고 있으며³⁾, 최근에는 소화기암, 임파암 및 인후암 등에 응용되고 있다.

백화사설초 전탕액의 약리작용으로는 in vitro에서 황색포도상구균과 적리균에 대해 미약한 작용이 있으며 세망내피계와 백혈구의 탐식능을 촉진하고, 급성임파구형, 과립구형, 단핵구형 및 만성과립구형 등의 세포에 대해 강한 억제작용이 있다고 알려졌고⁴⁾, in vitro에서 사람 백혈병과 간암세포에 대해, in vivo에서 Walker-256, cervical carcinoma 14, sarcoma-180 및 간암주에 대해 항종양효과가 있다고 보고되었으며⁵⁾, 송⁶⁾은 백화사설초가 시험관내에서 대식세포로 하여금 NO의 생성을 촉진하여 P 815 murine mastocytoma 암주의 성장을 억제했다고 보고하였다. 백화사설초는 일반적으로 4-70g의 용량으로 처방에 가미되어 사용되는 경우가 많은데 식도암에 응용되는 海花夏楮糖漿에 백화사설초 24g, 장암에 응용되는 蛇籠湯에 백화사설초 30g 등이 가미 되는 등 각종 암에 활용되고 있다.

성분으로 전초에서 hentriacontane, stigmasterol, ursolic acid⁵⁾, oleanolic acid, β -sitosterol, β -sitosterol-d-glucoside, p-coumaric acid 등이 밝혀졌고^{4,7)}, Huang은 새로운 iridoids로서 oldenlando-side를 분리하였으나⁸⁾, 백화사설초의 분획이나 성분을 이용하여 항암활성을 살펴본 연구는 거의 없다.

이에 저자는 백화사설초의 용매분획의 항암성을 탐색하고 항암활성물질을 찾아 구조를 동정하고 이 항암물질을 이용하여 in vitro에서 수종암주에 대한 세포독성, 생화학적 작용기전, FACS에 의한 작용

면역세포분석 및 전자현미경(SEM & TEM)에 의한 형태학적 변화, in vivo에서 생명연장율(T/C%), 체중변화, pulmonary colonization assay, 장기조직변화 등을 측정하여 얻은바가 있어 보고하는 바이다.

II. 재료 및 실험방법

1. 실험재료

1) 생약

본 실험에 사용한 백화사설초는 시내 한약방 두곳에서 구입하여 외부형태를 비교 조사하여 확인한 후 실험에 사용하였다.

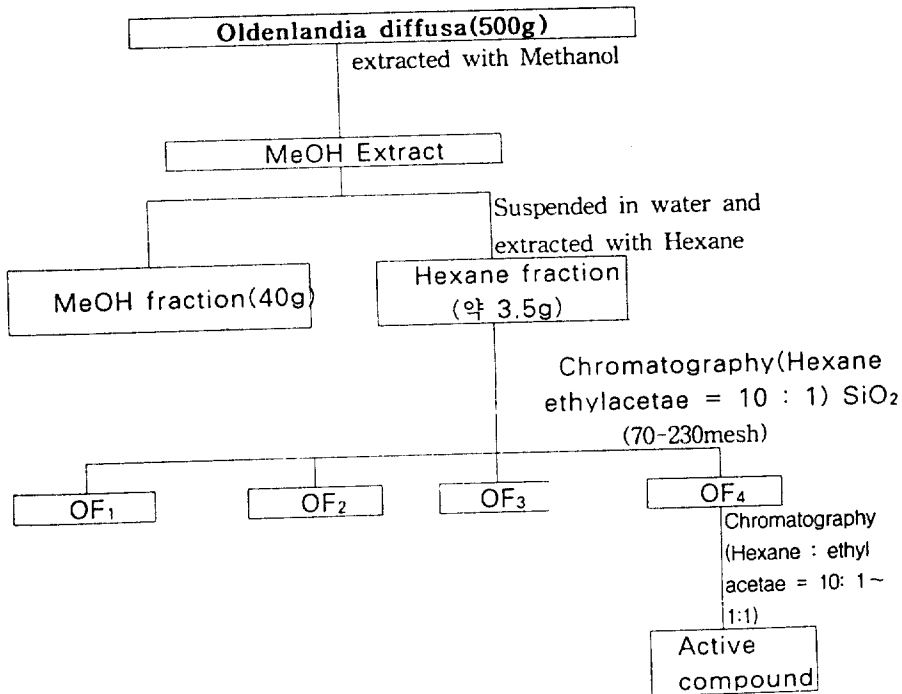
2) 동물

동물은 자웅 구분 없이 4주령의 ICR생쥐(International Cancer Research, U.S. A), C57BL/6생쥐 그리고 BALB/C 생쥐를 한국화학연구소에서 공급받아 실험당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료Co.)와 물을 충분히 공급하고 실온 22 ± 2 °C를 계속 유지하고 2주일간 실험실환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 시약 및 기기

실험에 사용된 시약은 추출용 용매로는 국내외의 EP급을 2차 증류하여 사용하였고 분리에 사용한 silicagel은 Sigma사의 230-400mesh를 사용하였으며 Thin layer chromatography는 Merck사의 silicagel GF-254 precoated plates를 사용하였다. RPMI1640(Sigma), fetal bovine serum (FBS, Sigma), dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS-A, Sigma), sodium dodecylsulfate(SDS, Sigma), 5-fluorouracil (Sigma), mitomycinC(MMC, Sigma), cisplatin(CPT, Daewoong Pharm. co.), trypsinEDTA(Sigma), 3-[4,5-dimethylthiazol

Scheme 1. 백화사설초 항암활성 물질의 분리



-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT, Sigma), ethanol(Merck, Germany), penicillin-streptomycin, (Sigma), sodium bicarbonate(GIBCO), trypan blue(Sigma), phenolred(sigma), sodiumazide (Sigma), isopropanol(Sigma), HCl(Merck, Germany), Acetic acid(Glicial), sodium hydroxide(Sigma) 그리고 staining buffer (1xPBS, 3%FBS, 0.1%sodium azide, 20mMHEPES)등이고 사용기기는 CO₂ incubator (vision scientific사 제품(Model VS-9108MS)을, clean bench (vision scientific사 (KMC-14001)), centrifuge (Beckman사, (GS-6R)), inverted microscope(Nikon co, Japan), bright microscop

e(UFX-DX, Nikon), ELISA-reader(Emax, U.S.A), FACScan(Bectondickinson, U.S.A), rotary vaccum evaporator (Büchi 461), autoclave (Hirayama, Japan), micro-pipet(Gilson, U.S.A), autostill W G25(Japan), titer plate shaker(labline inst., U.S.A), culture flask(Falcon 3024), multi-well plate(96-well, Falcon), conical tube, disposable pipet (5ml, 10ml, 25ml, Falcon) 및 syringe filter (0.25um, Falcon)등을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 백화사설초 항암활성 화합물의 분리

잘 말린 백화사설초 전초 500g을 MeOH 10 L에 3주간 상온에서 침잠시킨후 마포를 사용하여 여과하였다. 여액을 water bath (35°C)상에서 rotary evaporator로 농축하여 총 volume 1 L가 되게 하여 분액여두(separating funnel)에 넣었다. 여기에 n-Hexane 1 L를 가하고 흔든 후 방치하여 Hexane 가용분 및 MeOH 가용분획으로 나누었다. 각 분획을 따로 취하고 농축하여 Hexane 가용분 3.5g 및 MeOH 가용분 40g을 얻었다. 이 중 항암 활성이 나타난 핵산분획을 이용하여 유효 성분의 분리작업에 들어갔다. 즉 SiO₂을 담체로 chromatography 방법을 사용하였으며 이 때 elution solvent로는 핵산 : 에틸아세테이트 = 10 : 1 혼합용매를 이용하여 강한 활성을 나타낸 OF-4를 얻고 여기서 점차 에틸아세테이트의 비율을 높여 가며 elution하여 에틸 · 아세테이트 5 : 1 용매조건에서 백색 침상결정을 얻어 화합물 A로 명명하였다.

2) 백화사설초 항암활성분획 및 화합물 A의 TLC profile

<Figure will be shown by slide>

Developing solvent
Hexane:ethylacetate=10:1
Detection: heating after
H₂SO₄ spray

3) 백화사설초로부터 얻은 항암활성 화합물 A의 구조분석

백화사설초로부터 얻은 항암활성 물질 A를 핵산에세테이트 용매에서 수차례 재결정을 통해 정제하여 다음과 같은 물리 화학적 데이터를 얻었다.

M.P.: 292°C

[α]_D +72(c=0.5, MeOH)

IR : KBr(cm⁻¹) ; 3420(-COOH), 2950(-CH), 1680(-COOH), 1450, 1380, 1020,

980(Fig 2)

Low Resolution Mass(LRMS, 70 eV, compound A methyl ester) : m/z(relative intensity); 470 ([M⁺], 4.0), 410 ([M⁺-COOCH₃], 3.5), 262(100), 208(20.3), 207(30.8), 203(74.2), 189(14.3), 133(24.4)(Fig 6)

¹H NMR(DMSO-d₆, compound A) : 11.85 (1H, m, D₂O exchangeable, -COOH), 5.13(1H, m, 12-H), 4.24(1H, d, D₂O exchangeable, 3-OH), 3.12(1H, m, 3-H), 2.09(1H, d, J=10.6 Hz, 18-H), 0.98, 0.85, 0.82, 0.74 and 0.68(each 3H, s, 23, 24, 25, 26 and 27-CH₃) (Fig 3, Fig 4)

¹³C NMR(DMSO-d₆, compound A methyl ester) : 38.8(C-1), 27.2(C-2), 78.9(C-3), 38.8(C-4), 55.2(C-5), 18.2(C-6), 33.0(C-7), 39.6(C-8), 47.5(C-9), 37(C-10), 17.0(C-11), 125.5(C-12), 138.1(C-13), 42(C-14), 28.1(C-15), 24.2(C-16), 48.0(C-17), 52.8(C-18), 39.1(C-19), 38.8 (C-20), 30.7(C-21), 36.7(C-22), 28.1(C-23), 15.4(C-24), 15.6(C-25), 16.7(C-26), 23.3(C-27), 178.1(C-28), 23.6(C-29), 21.2(C-30), 51.4 (COOMe) (Fig 5)

4) 항암활성 화합물 A의 유도체 합성 및 구조분석

백화사설초로부터 얻은 화합물 A의 구조 분석을 위하여 다음과 같이 화합물 A의 유도체를 합성하였다.

(1) 화합물 A의 acetate

화합물 A 30mg을 정제된 pyridine 1 ml에 녹이고 1 ml의 acetic anhydride(무수초산)을 가한후 12시간 방치하였다. 과잉의 Pyridine 및 acetic anhydride를

evaporation하여 제거한후 SiO₂ column chromatography를 이용하여 정제하여 화합물 A acetate 20mg을 얻었다(Fig 7).

(2) 화합물 A의 methyl ester

화합물 A 30mg을 2ml의 MeOH에 녹이고 과잉의 신선한 diazomethane in ether 용액을 가하고 10분간 방치하였다. 과잉의 diazomethane in ether 및 MeOH를 evaporation하여 제거한후 SiO₂ column chromatography를 이용하여 정제하여 화합물 A methyl ester 20mg을 얻었다.

5) 백화사설초로부터 분리한 ursolic acid의 항암성 연구

A. 암세포에 대한 *in vitro* 실험

1) 세포 배양

L1210세포와 SNU-1의 배양

이 세포는 구형이며 이분법에 의하여 성장한다. L1210세포와 SNU-1의 배양액은 RPMI 1640배지에 fetal bovine serum (FBS, Flow Laboratories Inc., Mclean, VA)을 10% 포함하고 1% 항생제(페니실린-G 10만 units/스트렙토마이신 100mg)와 NaHCO₃ 2g을 첨가하여 제조 하였다.

SKMEL-2, XF498, HCT 15, B16 melanoma 세포 및 A549세포의 배양

배양액은 L-glutamine이 포함된 RPMI 1640배지에 56°C 수조에서 30분간 가온하여 불활성화 시킨 fetal bovine serum (FBS, Flow Laboratories Inc., Mclean, VA)을 10% 포함하고 1% 항생제(페니실린-G 10만 units/스트렙토마이신 100mg)와 NaHCO₃ 2g을 첨가하여 제조 하였다. 백화사설초의 화합물 A의 *in vitro* 항암활성을 측정하기 위하여 사용한 세포들은 SKMEL-2(흑색종), XF498(뇌암), HCT15(대장암), B16 melanoma(흑색종) 세포 및

A549(폐암) 등으로 모두 고행암이다. 세포의 계대는 3~4일에 1회씩 하였으며, monolayer 암주를 부착면으로부터 분리하기 위하여 phosphate buffered saline용액에 0.25% trypsin과 3mM *trans*-1, 2-diaminocyclo-hexane-n,n,n',n'-tetraacetic acid(EDTA)를 녹인 용액을 사용하였다.

2) L1210와 SNU-1 암세포에 대한 *in vitro* 세포독성실험

L1210세포와 SNU-1세포에 대한 세포 독성 실험

세포독성 실험에 사용되는 logarithmic phase에 도달한 L1210세포와 SNU-1세포를 얻기 위하여 실험 24시간 전에 36~37°C로 가온한 RPMI 10% FBS 배지를 넣은 75ml screw-capped erlenmeyer flask에 L1210세포와 SNU-1세포를 2~3×10⁵ cells/ml 농도가 되게 조정후 배양시켰다. 이렇게 배양한 배양액의 농도는 약 0.8~1.0×10⁶ cells/ml의 농도가 되도록 L1210세포와 SNU-1세포 현탁액을 만들었다. 시료는 실험하기 바로 전에 일정 농도의 에탄올 또는 dimethyl sulfoxide 용액으로 만들었고, 이 시료 용액 0.1ml에 fresh medium 0.9 ml를 가해 10배 희석하였다. Screw-capped tube에 시료 희석액을 각각 100, 50, 25, 12.5 1.25 µg/ml씩 가하고 위에서 조제한 세포 현탁액(5×10⁴ cells/ml)을 5ml씩 넣어 실험군으로 하였고, 대조군 tube(2√n : n = 시료수)에는 5ml의 현탁액만을 넣어 37°C, CO₂ incubator에서 48시간 배양후 hemacytometer를 사용하여 세포수를 계산하였다.

3) SKMEL-2, XF498, HCT 15, B16 melanoma세포 및 A549세포에 대한 *in vitro* 세포독성 실험

본 실험에 사용한 MTT법은 Mosma

nn¹⁰)이 개발하여 Kotnik등이 변형시킨 방법을 이용한다. 즉 96 well plate의 각 well에 2×10^4 cells/200 μ l를 넣고 37°C의 CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후, 검액 추출액을 농도별로 제조하고 각 well에 20 μ l씩을 넣고 37°C의 CO₂ incubator에서 48시간 배양한다. 배양종료 4시간 전에 5 μ g/ml 농도로 DPBS-A에 희석된 MTT용액 20 μ l를 각 well에 첨가하고, 배양종료시까지 은박지로 빛을 차단시켜 배양한다. 배양종료시 well plate를 1000rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액을 제거한 후 0.04N HCl-isopropanol 100 μ l를 각 well에 첨가하고 20분간 교반시킨 다음, titer plate shaker (Lab-Line, USA) 3.5 speed에서 5분간 shaking한다. 변색된 각 well의 흡광도를 ELISA-reader(Emax, U.S.A)를 이용하여 570nm에서 측정하고, 대조군의 흡광도와 비교하여 세포성장률을 %로 환산하였다.

4) 전자현미경에 의한 형태학적 변화 관찰

(1) 위상차현미경(Contrast Microscope)에 의한 관찰

SNU-1 cells에 ursolic acid를 6 μ g/ml을 처리하고 4시간과 24시간 후에 형태학적 변화를 x400 배율에서 관찰하였다.

(2) 투과전자현미경(TEM; Transmission Electron Microscope)관찰방법

SNU-1 cells을 모은 다음 이를 2% PFCHO(Paraformaldehyde)와 2.5% GCHO(Glutaldehyde)로 제조된 1차 고정액에 4°C에서 4시간 동안 고정한다. 이후 0.1M PBS(phosphate buffer sol.)로 1시간씩 3회 세척하고 0.1M PBS로 조성된 1% osmic acid(OsO₄)로 1시간 동안 상온에서 2차고정을 한 후, Epon 812를 이용하여

포매하였다. 100nm이하의 silver color의 절편을 만들어 포화초산우라늄(uranyl acetate)과 구연산납(lead citrate)으로 2중 전자염색하여 투과전자현미경으로 관찰한다.

(3) 주사전자현미경(SEM ; Scanning Electron Microscope)관찰방법

SNU-1 cells을 모은 다음 이를 2% PFCHO(Paraformaldehyde)와 2.5% GCHO(Glutaldehyde)로 제조된 1차 고정액에 4°C에서 4시간 동안 고정한다. 이후 0.1M PBS(phosphate buffer sol.)로 1시간씩 3회 세척하였다. 이후 50, 70, 85, 95% ethanol로 10분씩 탈수 한 후 100% ethanol에서 10분씩 탈수하였다. 탈수가 끝난 후 주사전자현미경 관찰을 위해서 33.3% isoamylacetate/ethanol, 50% isoamylacetate/ethanol 및 50% isoamylacetate/ethanol용액에서 10분간 방치한 후 다시 100% isoamylacetate용액에서 10분간 3회 방치하여 치환한다.

Isoamyl acetate로 치환하고 임계점 건조기(critical point dryer)로 건조하여 표면을 금으로 덮은(gold coating)다음 주사전자현미경으로 관찰하였다.

5) FACS에 의한 유세포 분석

(1) 비장 백혈구 현탁액 조제

BALB/C를 cervical dislocation으로 치사시킨 후 비장을 적출하고 Scheme 1과 같이 비장 백혈구 현탁액을 제조하였다. 세포 처리 및 형광염색용 완충액으로는 Ca²⁺과 Mg²⁺이 들어 있지 않은 Satining buffer를 사용하였다. 적출한 비장을 100 mesh(sigma, U.S.A)에 올려 놓고 주사기 피스톤 뒷부분으로 가볍게 문질러 조직을 분쇄하였다. 15ml conical tube(Becton dickinson, U.S.A)에 옮겨 약 5분간 방치

Table 1. Monoclonal antibody used for immunofluorescence staining

Immune cell types	Markers	monoclonal antibody
T cells	Thy1,2	J1j
helper T cells	CD4	G.K.1.5
B cells	CD23	J11d-10
Macrophages	CD11b	M1/70
Second antibody	F(ab') ₂ FITC - goat anti rat Ig (Tago)	

ICR mouse

Sacrifice of mouse by cervical dislocation
Excise the spleen out

Spleen

Transfer onto a prewetted 100 mesh stainless-steel screen
Cut into pieces
Squeeze through the screen
Transfer to a 15 ml conical tube
Keep stood for 5 min on ice
Take the upper layer
Wash 2 times with buffer(PBS w/o Ca²⁺ & Mg²⁺)
Hemolysis with 0.83 % NH₄Cl
Adjust the cell concentration to 5x10⁶ cells/ml in 2% FCS-RPMI 1640

Splenic Leukocyte suspension

Cell culture

Pool the cells into a 5 ml tube
Wash 3 times with the staining buffer
Resuspend in 0.5 ml of the staining buffer

Cell suspension (80 μl)

Add 100 μl of the primary Ab
Incubate for 40 min
Wash 3 times with the staining buffer

mAb-bound cells

Add 50 μl of F(ab)₂ fragment of FITC-conjugated goat anti-rat Ig
Incubate for 40min on ice
Wash 3 times with the staining buffer
Resuspend in 0.3ml with staining buffer

IF-stained cell

Scheme 2. Preparation of splenic leukocyte suspension.

하여 조직덩어리를 침전시킨 후 상층액을 취해 2회 세척하고 0.83 % NH_4Cl 용액을 넣고 5분간 incubation시켜 적혈구를 용혈시켰다. 다시 2회 세척하고 RPMI1640 2% FBS (sigma, U.S.A)로 5×10^6 cells/ml가 되도록 희석하였다.

(2) 세포 배양 및 약물 처리

비장 백혈구 현탁액을 24-well culture plate(Becton Dickinson, U.S.A)에 1ml씩 가하고 2시간 후 complete RPMI 배지에 용해시킨 ursolic acid를 100ul씩 가하여 (최종농도가 0, 1, 3, $6 \mu\text{g/ml}$)이 되게하여 5% CO_2 incubator에서 37°C 에서 48 시간 배양하였다.

(3) 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)

면역 형광염색은 전과정을 0-4 °C에서 실시하였고, 배양한 비장 세포를 회수하여 PBS로 3회 세척한 후 5ml FACS tube(Becton Dickinson, U.S.A)에 0.3ml의 staining buffer를 넣고 vortex한 후 원심분리(1300rpm, 5min)한다. 각각의 1차 항체 Culture sup.을 $100 \mu\text{l}$ 씩을 5ml FACS tube에 넣고 vortex한 후 40분간 ice에서 반응시켰다. 사용한 1차 항체는 3회 세척 후, fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rat Ig F(ab)₂ fragment 1:100(Tago, U.S.A) 희석액 $50 \mu\text{l}$ 를 가하고 40분간 반응시켜 후 3회 세척 후 0.3ml staining buffer를 넣고 vortex한 후 FACScan(Becton dickinson, U.S.A)으로 분석하였다.

(4) 유세포 분석

염색이 완료된 세포들을 0.3ml의 staining buffer에 부유시켜 FACScan(Becton dickinson, U.S.A)를 이용하여 분석하였다. 시료당 5,000개의 세포에 대하

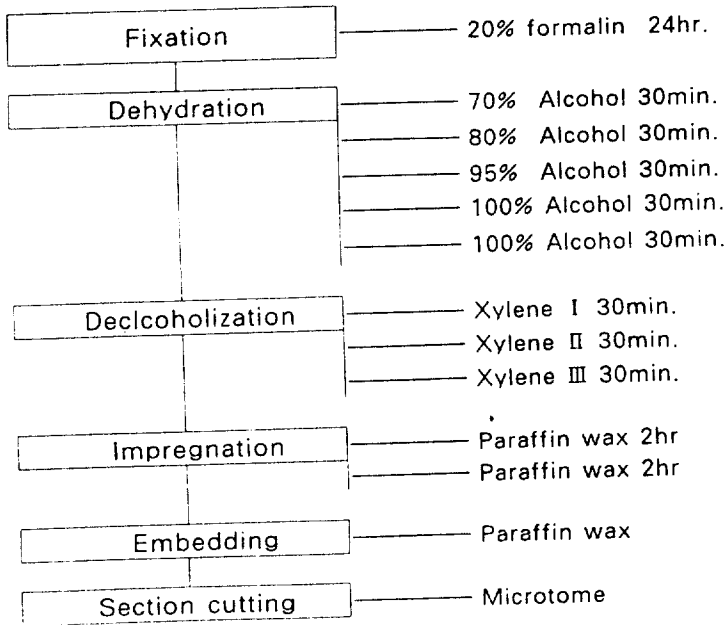
여 list mode로 자료를 취합하였으며 Consort 30 프로그램을 이용, 분석하였다. data의 분석은 forward scatter(FSC)와 side scatter(SSC)의 dual parameter를 이용한 dot plot 상에서 전체 비장세포와 small lymphocyte 영역 및 lymphoblast 영역을 구분하여 그 중의 B cell, CD4^+ , T cell 그리고 Mac-1⁺ cell의 비율(gated,%)을 산출하였다.

B. 암세포에 대한 *in vivo* 실험

(1) Sarcoma 180 암세포를 이용한 동물 실험

실험에 사용한 마우스종은 화학연구소에서 구입한 ICR 마우스로 수컷을 사용하고 체중 18~23g에 속하는 건강한 것을 선택하였다. 사육은 23~24°C로 온도조절이 된 곳에서 물과 먹이를 제한없이 공급하였고 사료는 항생제 무첨가 마우스용을 사용한다. ICR 마우스의 복강내에 7일간 배양된 sarcoma 180세포를 복수와 함께 취하여 멸균된 냉생리식염수를 가해 $400 \times \text{g}$ 로 2분간 원심분리하여 세포침전물을 분리했다. 분리된 세포침전물을 다시 냉멸균 생리식염수에 부유시켜 다시 원심분리하여 상층액을 제거한 후 혼재된 적혈구를 피해 Sarcoma 180세포만을 취한다. 동일한 방법으로 3회 세척한 후 hemacytometer로 세어 10^7 cells/ml의 농도가 되도록 세포부유액을 만들고 이 부유액을 0.1ml씩 복강내에 이식하였다. 이식 후 24시간 부터 각 군을 8~9마리로 한다. 시료는 계산된 양의 dimethylsulfoxide에 용해시켜 보존용액을 만든 후 4°C에 보존하며 주사직전에 보존용액 30ul을 취하여 생리식염수액을 1.5ml와 혼합, 실험동물의 복강내에 0.1ml씩 주사 하였으며 대조군에는 2% dimethylsulfoxide-생리식염수액을 주사하였다. 대조군이 모두 사망하는 날짜

Scheme 3. Tissue processing



(대개 18~20일)를 기준으로 생존비를 계산한다. 생존비(T/C,%)는 미국립암연구소 protocol에 언급된 식에 따라 계산한다.

(2) Pulmonary colonization assay⁹⁾

실험에 사용한 마우스종은 화학연구소에서 구입한 C57BL/6 마우스로 수컷을 사용하고 체중 18~23g에 속하는 건강한 것을 선택하였다. 사육은 23~24℃로 온도 조절이 된 곳에서 물과 먹이를 제한없이 공급하였고 사료는 항생제 무첨가 마우스용을 사용하였다. C57BL/6 마우스의 미정 맥에 5×10^5 cells/0.2ml을 주사하고 이식 후 24시간 부터 각 군을 8마리로 한다. 시료는 계산된 양의 dimethylsulfoxide에 용해시켜 보존용액을 만든 후 4℃에 보존하

며 주사직전에 보존용액 30μl을 취하여 생리식염수액을 1.5ml와 혼합, 실험동물의 복강내에 0.1ml씩 주사 하였으며 대조군에는 2% dimethylsulfoxide 생리식염수액을 암세포 이식 후부터 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9일로 투약하는 방식으로 0.1ml씩 7회 복강내 주사 하였다. 암주이식후 21일째에 채혈은 C57BL/6 생쥐를 pentothal sodium(30mg/kg, 중외제약)으로 마취하고 심장천자를 하여 미리 heparin이 들어있는 1회용 주사기(23G×1¼, Samwoo Co.)로 혈액을 채취하여 혈소판수, WBC, RBC 및 hemo globin 등의 측정에 사용하였으며 장기(간장, 비장, 폐장, 신장)를 제거하여 외관을 관찰하고 조직절편을 만들었으며 특히 폐장의 외부를 ×200 배율에서 흑색암주의

Scheme 4. Harris Hematoxylin & Eosin Staining

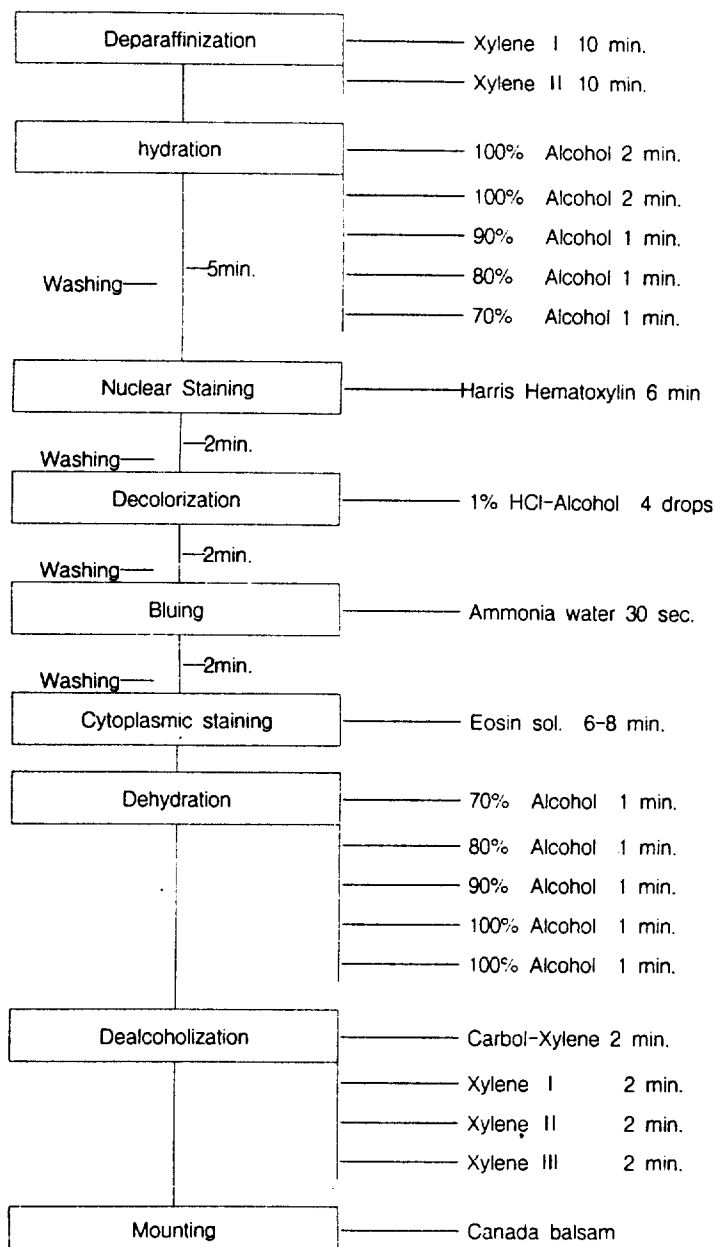


Table 2. Effect of Solvents Fractions of *Oldenlandia diffusa* Herba L1210 cell line(5×10^4 cells/ml)

Concentrations	Fraction layers of <i>Oldenlandia diffusa</i> Herba			P-value
	Hexane	E. Ether	E. Acetate	
Control	135 ± 3.32	135 ± 3.32	135 ± 3.32	
1.25ug/ml	122 ± 5.38 ^K	134 ± 3.45 ⁻	136 ± 4.14 ⁻	K
12.5ug/ml	118 ± 3.68 ^M	125 ± 6.55 ⁻	132 ± 3.97 ⁻	M
25ug/ml	114 ± 5.41 ^M	116 ± 5.29 ^M	130 ± 6.66 ⁻	M
50ug/ml	88 ± 4.55 ^W	101 ± 3.03 ^W	126 ± 6.25 ⁻	W
100ug/ml	2.8 ± 0.36 ^W	43 ± 2.55 ^W	100 ± 5.27 ^W	W

* : Statistically significant value compared with control data by T test
(K: < 0.05, M: < 0.01, W: < 0.001)

colony수를 관찰하였다.

(3)조직변화를 통한 암세포의 전이여부 판정

B16-Fo를 미정액 주사하고 검액을 투여한 C57BL/6 생쥐를 23일째 희생시킨 후, 비장, 신장 및 폐장 등을 10% 중성 formalin에 고정한 후 세절하여 흐르는 물에 8시간 수세한 다음 아래 scheme 2과 같은 과정을 거쳐 포매하였다. 이것을 microtome으로 절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin염색(scheme 3)을 하였다.

III. 결과 및 고찰

1) 백화사설초의 용매분획의 L1210암주에 대한 세포독성

Table 2에서 보는 바와 같이 hexan층은 저농도부터 고농도까지 대조군에 비해 유의성 있는 세포독성을 보였으며 EE층도 25ug/ml이상의 농도부터 대조군에 비해 유의성있는 세포독성을 보였고 EA층은 100ug/ml이상의 농도에서만 유의성있는 세포독성을 나타내어 hexan층이 가장 가능성을 보이는 분획으로 판정되었다.

2) 백화사설초의 용매분획의 A549암주에 대한 세포독성

Table 3에서 보는 바와 같이 hexan층은 12.5ug/ml이상의 농도부터 대조군에 비해 유의성 있는 세포독성을 보였으며 EE층도 12.5ug/ml이상의 농도부터 대조군에 비해 유의성있는 세포독성을 보였고 EA층은 50ug/ml이상의 농도에서만

Table 3. Effect of solvent fractions of *Oldenlandiae diffusae* Herba A549 cell line (2×10^4 cells/ml)

Groups	Fractions of <i>Oldenlandiae diffusae</i> Herba			P-value
	Hexane	E. Ether	E. Acetate	
Control	100 ± 4.06	100 ± 4.06	100 ± 4.06	
1.25ug/ml	95.3 ± 3.11 [*]	95.4 ± 2.76 [*]	97.3 ± 3.14 [*]	-
12.5ug/ml	88.5 ± 2.67 ^K	82.1 ± 3.25 ^M	93.1 ± 4.55 [*]	K,M
25ug/ml	71.1 ± 3.45 ^W	84.6 ± 2.99 ^M	94.1 ± 4.21 [*]	M,W
50ug/ml	58.3 ± 3.33 ^W	78.9 ± 1.25 ^W	88.1 ± 3.42 ^K	K,W
100ug/ml	55.4 ± 4.21 ^W	65.5 ± 3.21 ^W	85.9 ± 5.51 ^K	K,W

* : Statistically significant value compared with control data by T test

(K:< 0.05, M:< 0.01, W:< 0.001)

유의성있는 세포독성을 나타내어 hexan층과 에테르층이 모두 유효한 것으로 보이지만 hexan층이 가장 가능성을 보이는 분획으로 판정되었다.

3) 화합물 A의 구조분석

백화사설초 hexan분획으로부터 SiO₂ column chromatography를 통해 얻은 화합물 A는 ethylacetate용액중에서 백색침상 결정으로 얻어졌다. 화합물 A의 UV spectrum은 200nm에서 end absorption을 나타내어 isolated double bond이외의 chromophore가 존재하지 않음을 알수 있었고, IR spectrum (Fig 2)에서 3420 cm⁻¹, 1680 cm⁻¹에서 흡수극대를 나타내어 -COOH의 존재를 추정할 수 있었다.

한편 화합물 A의 ¹H-NMR spectrum에서는 δ11.85 ppm에서 1H분의 D₂O exchangeable proton이 나타나고, 또 하나의

D₂O exchangeable proton이 δ4.24 ppm에서 관찰되어 서로 다른 두개의 -COOH 혹은 -OH의 존재를 추정할 수 있었다. 또한 δ5.13 ppm에서 triplet like multiplet이 나타나 double bond를 추측할 수 있었다. 기타 angular methyl기들로 추정되는 3H분의 singlet가 1.0 ppm부근에서 다섯개가 관찰되었다. 한편 화합물 A의 ¹³C-NMR spectrum에서는 30개의 carbon peak를 관찰할 수 있어 결국 화합물 A는 탄소 30개로 구성되고 -COOH 및 -OH기를 가진 triterpene계열의 화합물로 추정할 수 있었다. 자연계에는 이와같이 -COOH 및 -OH기를 가진 여러가지 계열의 triterpene계열 화합물들이 존재하므로 화합물 A의 정확한 구조규명을 위하여 화합물 A을 화학적으로 변형시켜 보았다. 즉 상법에 따라 합성한 화합물 A의 acetate는 ¹H-NMR에서 하나의 acetyl기가 도입되었음을 보여주었

으며(Fig 7 참조), 역시 상법에 따라 합성한 화합물 A의 methyl ester는 하나의 methyl기가 도입되어 결국 화합물 A는 하나의 -COOH 및 -OH의 존재를 거듭 확인할 수 있었다 (Fig. 6 참조).

한편 화합물 A의 methyl ester의 ^{13}C -NMR spectrum으로부터 관찰된 각 탄소의 chemical shift치(δ)를 문헌에 나타난 여러가지 유사구조의 화합물들의 그것들과 비교하여 본 결과 ursolic acid methyl ester의 그것과 정확하게 일치함을 알 수 있었다(Fig. 5 참조). 또 이의 low resolution mass 역시 ursolic acid methyl ester의 그것과 비교하여 동일한 [M]⁺ peak 및 동일한 fragment ion peak들을 보여주었다(Fig. 6 참조). 이와 같은 사실들을 비추어보아 화합물 A는 α -amyrin계에 속하는 ursolic acid로 추정할 수 있어 기타 용점 (m.p.) 및 선광도 ($[\alpha]_D$) 등 physicochemical data를 표준품과 비교하여 본결과 일치함을 확인할 수 있었다.

4) 백화사설초 ursolic acid의 암주에 대한 in vitro 세포독성

Ursolic acid는 HCT15, XF498, SK-MEL-2, A549, SNU-1 등의 암주에 대한 ED50이 $13\mu\text{g/ml}$, $15\mu\text{g/ml}$, $12\mu\text{g/ml}$, $9\mu\text{g/ml}$, $11\mu\text{g/ml}$ 등으로 나타나 유효한 세포독성을 나타냈으며, ursolic acid의 유도체인 ursolic acid methyl ester는 ED50이 A549에서 $82\mu\text{g/ml}$ 인 경우를 제외하고 모두 100이상이어서 효과가 없다고 보며 ursolic acid는 ED50이 $2\mu\text{g/ml}$, $2\mu\text{g/ml}$, $10\mu\text{g/ml}$, $11\mu\text{g/ml}$, $3\mu\text{g/ml}$ 등으로 나타나 유의한 세포독성이 있음을 알 수 있었다.

2) 백화사설초의 용매분획의 A549암주에 대한 세포독성

Table 3에서 보는 바와 같이 핵산층은 $12.5\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도부터 대조군에 비해

유의성 있는 유의성 있는 세포독성을 보였으며 EE층도 $12.5\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도부터 대조군에 비해 유의성있는 세포독성을 보였고 EA층은 $50\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서만 유의성있는 세포독성을 나타내어 핵산층과 에테르층이 모두 유효한 것으로 보이지만 핵산층이 가장 가능성을 보이는 분획으로 판정되었다.

3) 화합물 A의 구조분석

백화사설초 핵산분획으로부터 SiO_2 column chromatography를 통해 얻은 화합물 A는 ethylacetate용액중에서 백색침상 결정으로 얻어졌다. 화합물 A의 UV spectrum은 200nm에서 end absorption을 나타내어 isolated double bond이외의 chromophore가 존재하지 않음을 알 수 있었고, IR spectrum (Fig 2)에서 3420 cm^{-1} , 1680 cm^{-1} 에서 흡수극대를 나타내어 -COOH의 존재를 추정할 수 있었다.

한편 화합물 A의 ^1H -NMR spectrum에서는 $\delta 11.85\text{ ppm}$ 에서 1H분의 D_2O exchangeable proton이 나타나고, 또 하나의 D_2O exchangeable proton이 $\delta 4.24\text{ ppm}$ 에서 관찰되어 서로 다른 두개의 -COOH 혹은 -OH의 존재를 추정할 수 있었다. 또한 $\delta 5.13\text{ ppm}$ 에서 triplet like multiplet이 나타나 double bond를 추측할 수 있었다. 기타 angular methyl기들로 추정되는 3H분의 singlet가 1.0 ppm부근에서 다섯개가 관찰되었다. 한편 화합물 A의 ^{13}C -NMR spectrum에서는 30개의 carbon peak를 관찰할 수 있어 결국 화합물 A는 탄소 30개로 구성되고 -COOH 및 -OH기를 가진 triterpene계열의 화합물로 추정할 수 있었다. 자연계에는 이와같이 -COOH 및 -OH기를 가진 여러가지 계열의 triterpene계열 화합물들이 존재하므로 화합물 A의 정확한 구조규명을 위하여 화합물 A을 화학적으로 변형시켜 보았다. 즉 상법에 따라 합

Table 4. Effect of Ursolic acid on the cytotoxicity against cancer cell lines(%control)

CONC. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	SNU-1	HCT15	XF498	SK-MEL-2	A549
3.125	100.0	91.0450	94.9402	93.1733	100.9895
6.25	89.3	89.0316	83.5897	72.4800	88.7945
12.5	53.8	81.0983	82.0171	67.0613	74.1392
25.0	6.1	63.6691	71.3504	18.7200	43.0634
50.0	-87.2	1.1344	-78.4703	-93.5432	-67.5596
100.0	-73.41	-57.0089	-92.0680	-97.6325	-89.3823
ED 50	13.125	15.2342	11.9509	9.2704	11.6432

Table 5. Effect of Ursolic acid methyl ester on the cytotoxicity against cancer cell lines(%control)

CONC. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	SNU-1	HCT15	XF498	SK-MEL-2	A549
0.3	100.1215	98.1118	100.0915	98.1328	100.8120
1.0	100.0913	97.8087	99.7712	98.5572	96.7996
3.0	84.1352	98.7160	96.0645	88.3726	91.7363
10.0	71.4618	98.3887	95.0120	87.3541	92.6975
30.0	68.4614	93.6556	88.1936	84.0441	85.1445
100.0	51.6013	51.2840	47.3287	48.3980	38.8584
ED 50	101.2435	144.6875	115.6059	125.0890	81.8407

성한 화합물 A의 acetate는 $^1\text{H-NMR}$ 에서 하나의 acetyl기가 도입되었음을 보여주었으며(Fig 7 참조), 역시 상법에 따라 합성한 화합물 A의 methyl ester는 하나의 methyl기가 도입되어 결국 화합물 A는 하나의 $-\text{COOH}$ 및 $-\text{OH}$ 의 존재를 거듭 확인할 수 있었다 (Fig. 6 참조).

한편 화합물 A의 methyl ester의 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum으로부터 관찰된 각 탄소의 chemical shift치(δ)를 문헌에 나타난 여러가지 유사구조의 화합물들의 그것들과 비교하여 본 결과 ursolic acid methyl ester의 그것과 정확하게 일치함을 알 수 있었다(Fig. 5 참조). 또 이의 low

Table 6. Effect of ursolic acid of Oldenlandiae diffusae Herba on spleen weight and lung colonies in C57BL/6 injected i.v. with B16-Fo.

Group	Spleen weight(g)	Lung colonies
Normal	0.104 ± 0.009 ^{ai}	0.00 ± 0.00
Control	0.174 ± 0.035	61.0 ± 3.42
Ursolic acid	0.185 ± 0.034 ^k	4.15 ± 1.07 ^w

Normal : Non-treated group

Control : Saline-treated group after i.v. injection of B16-Fo

Ursolic acid : Ursolic acid of Oldenlandiae Diffusae Herba-treated group after i.v. injection of B16-Fo
(K: < 0.05, M: < 0.01, W: < 0.001)

resolution mass 역시 ursolic acid methyl ester의 그것과 비교하여 동일한 [M]⁺ peak 및 동일한 fragment ion peak들을 보여주었다(Fig. 6 참조). 이와 같은 사실들을 비추어보아 화합물 A는 α-amyrin계에 속하는 ursolic acid로 추정할 수 있어 기타 융점 (m.p.) 및 선광도 ([α]_D) 등 physicochemical data를 표준품과 비교하여 본결과 일치함을 확인할 수 있었다.

4) 백화사설초 ursolic acid의 암주에 대한 in vitro 세포독성

Ursolic acid는 HCT15, XF498, SK-MEL-2, A549, SNU-1 등의 암주에 대한 ED₅₀이 13μg/ml, 15μg/ml, 12μg/ml, 9μg/ml, 11μg/ml 등으로 나타나 유효한 세포독성을 나타냈으며, ursolic acid의 유도체인 ursolic acid methyl ester는 ED₅₀이 A549에서 82μg/ml인 경우를 제외하고 모두 100이상이어서 효과가 없다고 보며 ursolic acid는 ED₅₀이 2μg/ml, 2μg/ml, 10μg/ml, 11μg/ml, 3μg/ml 등으로 나타나 유의한 세포독성이 있음을 알 수 있었다.

5) 위상차현미경과 전자현미경(SEM & TEM)에 의한 형태학적 변화관찰

SUN-I암주에 ursolic acid를 처리한 후 위상차현미경에 의한 관찰에서 대조군에 비해 4시간후에는 세포외막의 손상을 알 수 있으며 24시간에는 핵막의 부종과 세포질의 응축으로 세포사에 이르는 볼 수 있었고, 주사전자현미경에 의한 관찰에서도 UA처리후 4시간에는 세포외막의 모양이 불규칙적으로 나타나며 24시간후에는 세포질종창으로 이상적 용기가 출현하였고, 투과전자현미경에서 4시간후에는 핵염색체가 응결되어 진행되고 이상 용기가 나타나기 시작하며 24시간후에는 핵의 분열과 큰 공포가 형성되며 결국 세포사에 이르는 것으로 볼 수 있었다.

<Figures will be shown by slides>

6) 백화사설초 ursolic acid가 폐장전이 colony수에 미치는 영향

폐장으로 전이된 colony수는 대조군에서 61개이었으나 백화사설초 ursolic acid 처리군은 대조군보다 유의성있게 감소하였다(Table 6).

7) 백화사설초 ursolic acid의 조직학적 변화

Table 7. Degree of infiltration of B16-Fo into Kidney.

Group	Degree infiltration of B-16 melanoma cell line	Site for infiltration of B-16 melanoma cell line	
		Cortex	medulla
Normal	-	-	-
Control	-	+++	-
Ursolic acid	-	-	-

B16-Fo암주는 주로 폐장과 신장으로 암주가 다량 전이되는데 백화사설초 ursolic acid를 처리한 실험군에서는 대조군에 비해 전이가 거의 없었는데(Table 7, Table 8, Table 9), 최근 손등¹²⁾은 ursolic acid가 embryo chorioallantoic membrane assay에서 IC50이 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 나타나 강한 항암성이 있다고 보고하였으며, 차등¹³⁾은 ursolic acid가 Northern blot 분석에서 사람 전이암주인 HT 1080 fibrosarcoma에 대해 암주의 invasion을 감소시켰다고 보고와 일치하는 결과로 본다.

서 처럼 복수암으로 인한 체중증가가 대조군에서는 암주이식후 8일에 급격히 증가하여 16일에 모두 죽었지만 cisplatin 처치군은 일정한 체중을 유지하였으며 OF-4와 UA처치군은 복수로인해 사망한쥐가 죽는 16일 이후부터 정상체중을 유지하는 것으로 나타나있고 생명연장율에서는 대조군의 MST는 14일, OF-4 처치군은 17일, UA 처치군은 24일(암주이식후 30일 현재)로 나타나, OF-4처치군과 UA처치군의 T/C %는 각각 121.4 %, 171 %로 나타나 ursolic acid의 항암성이 인정된다.

<Figures will be shown by slides>

IV. 결론

8) 백화사설초 Ursolic acid가 BALB/C 비장의 면역세포에 미치는 영향

백화사설초를 농도별로 면역세포에 미치는 영향을 측정하였던바 Table에 나타난 바와 같이 ursolic acid의 농도 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 농도에 비례하여 B cell을 증가시켰지만 T cell에 대해서는 고농도에서는 독성이 인정되었다.

9) Ursolic acid의 S-180에 대한 항암성
Ursolic acid와 OF-4를 S-180이 이식된 생쥐에 10일간 경구투여한후 체중증가를 측정하였더니 복강 주사하였던 바 Fig에

한방에서 암치료에 자주 활용되는 백화사설초(*Oldenlandia diffusa* Herba)에서 L1210과 A549에 대해 가장 좋은 세포독성을 보였던 핵산층에서 분리한 항암물질이 ursolic acid임을 알 수 있었다. Ursolic acid의 수종 암주(SNU-1, HCT15, XF498, SK-MEL2, A549)에 대한 IC50은 각각 13 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 9 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등으로 세포독성을 나타냈으며, pulmonary colonization assay와 장기조직변화에서 대조군에 비해 유의한 전이억제효과를 나타냈고, S-180암주에 대한 T/C%는 171%로 대조군에 비하여 유의한 항암효과를

Table 8. Degree of infiltration of B16-Fo into Lungs.

Group	Degree infiltration of B-16 melanoma cell line	Site for infiltration of B-16 melanoma cell line			Inflammation	Hemorrhage
		perivascular	Peribronchiale	alveolar septa		
Normal	-	-	-	-	-	
Control	+++	-	+++	-	-	
ursolic acid	-	-	-	-	-	

Table 9. Degree of infiltration of B16-Fo into Liver.

Group	Degree infiltration of B-16 melanoma cell line	Site for infiltration of B-16 melanoma cell line(Portal triad)
Normal	-	-
Control	-	-
ursolic acid	-	-

- : Negative, + : mild, ++ : moderate, +++ : severe

Normal : Non-treated group

Control : Saline-treated group after i.v. injection of B16-Fo

ursolic acid : Ursolic acid of *Oldenlandia Diffusae* Herba- treated group after i.v. injection of B16-Fo

<Figures will be shown by slides>

Table 10. Effect of Ursolic acid isolated from Fraction *Oldenlandia diffusa* on the splenic leucocytes of BALB/C mouse with B/T and CD4/T

Group	Drug concen. (µg/ml)	% Positive cells to				B/T	CD4/T
		J1j-10	G.K.1.5.3	J1id	M1/70		
Control	0	50.1	36.0	48.1	14.3	0.96	0.72
	1.5	50.7	34.1	50.2	13.5	0.99	0.67
	3.0	52.6	31.5	52.9	13.5	1.01	0.59
	6.0	36.4	14.1	62.9	21.6	1.72	0.39

Table 11. Effect of OF-4 and ursolic acid on MST of ICR mice on the 26th day after implantation i.p. with Sarcoma 180.

Group	No.of animals	M S T (day)	T/C (%)
Control	10	14	
OF-4	10	17	121.4
UA	10	24	171

Control : Non treated group

OF-4 : OF-4 treated group

UA : Ursolic acid treated group

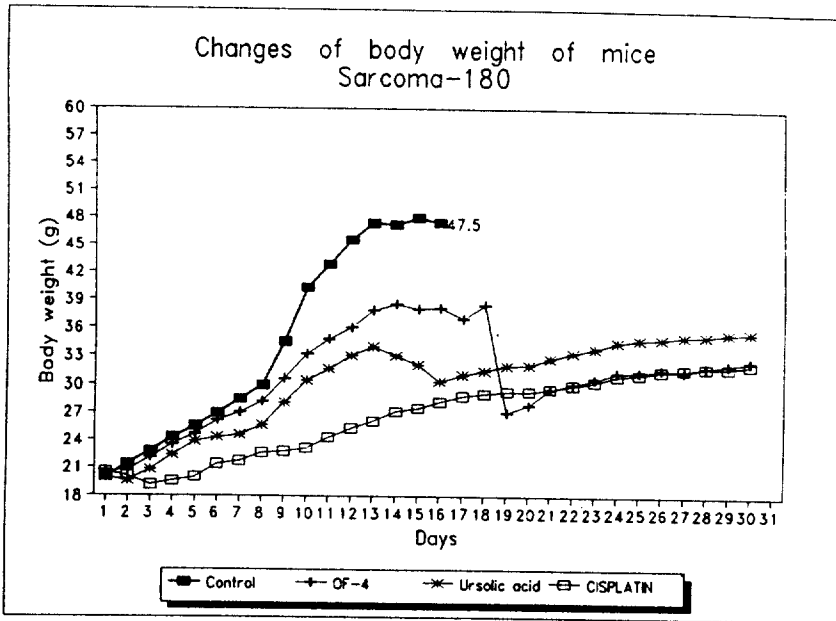


Fig 1. Changes of body weight of ICR bearing S-180 treated with OF-4 & ursolic acid

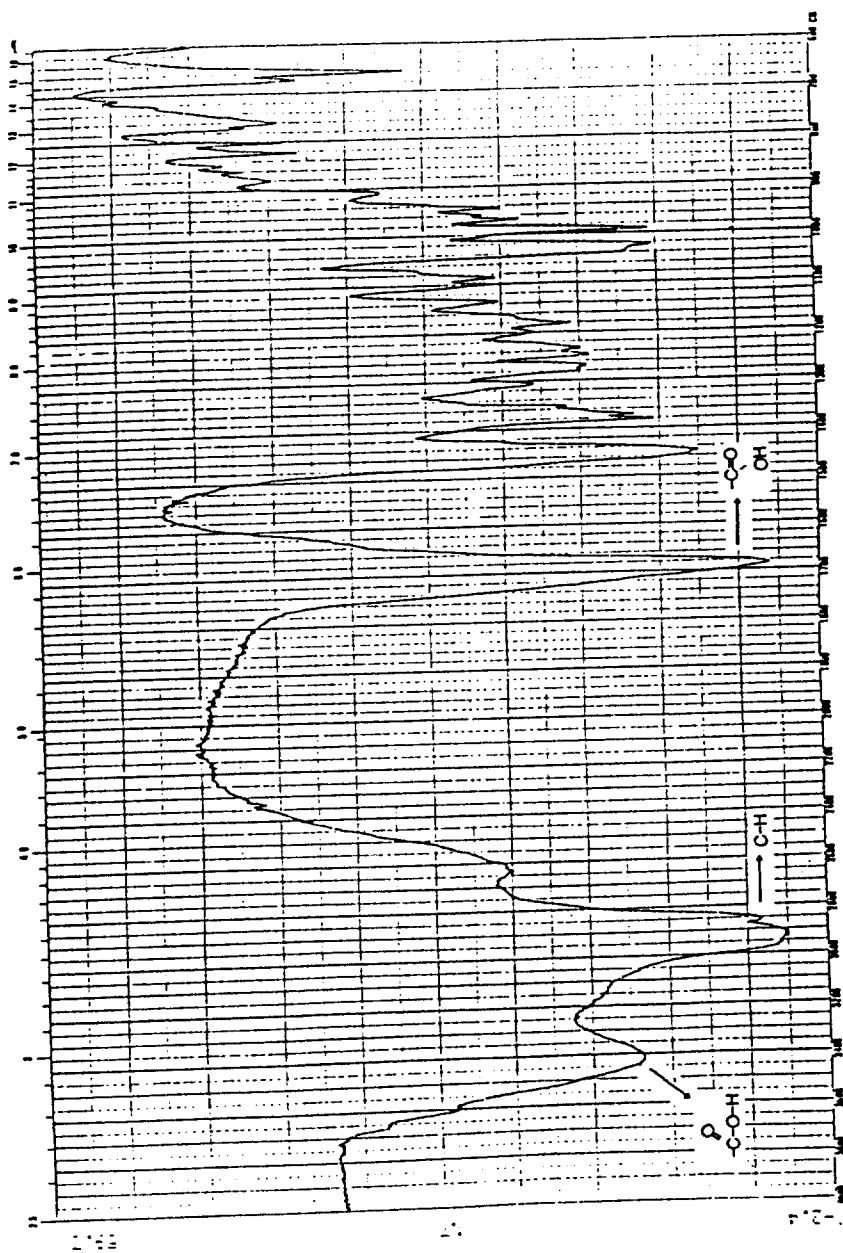


Fig. 2. IR-spectrum of compound A from *Oldenlandia diffusa* Herba

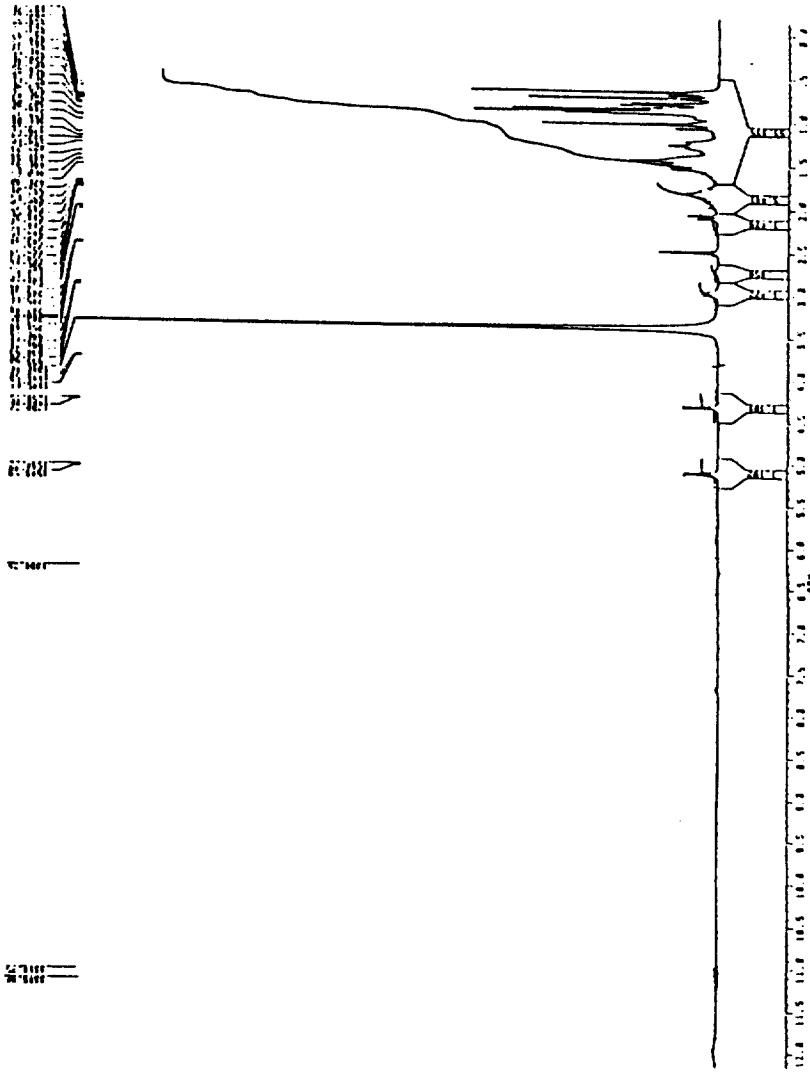


Fig. 3. ¹H-NMR spectrum of compound A from *Oldenlandiae diffusa* Herba

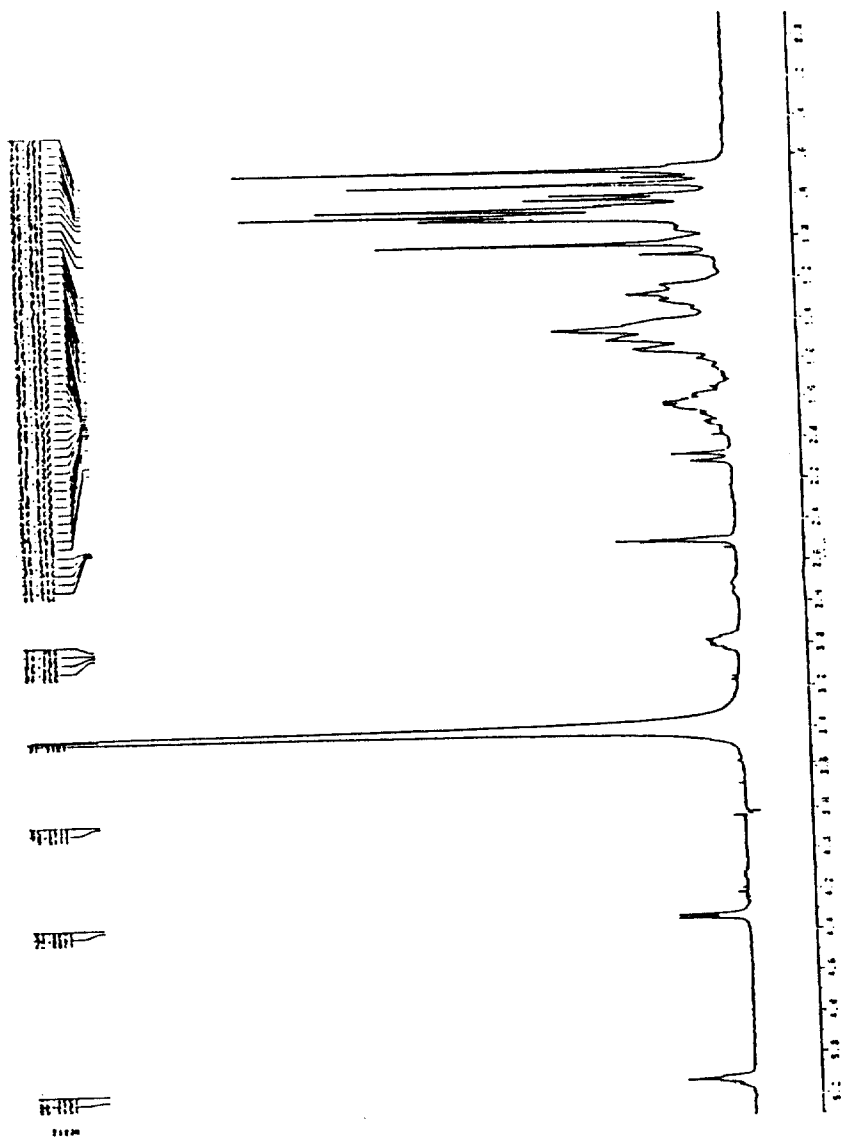


Fig. 4. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound A from *Oldenlandia diffusa* Herba

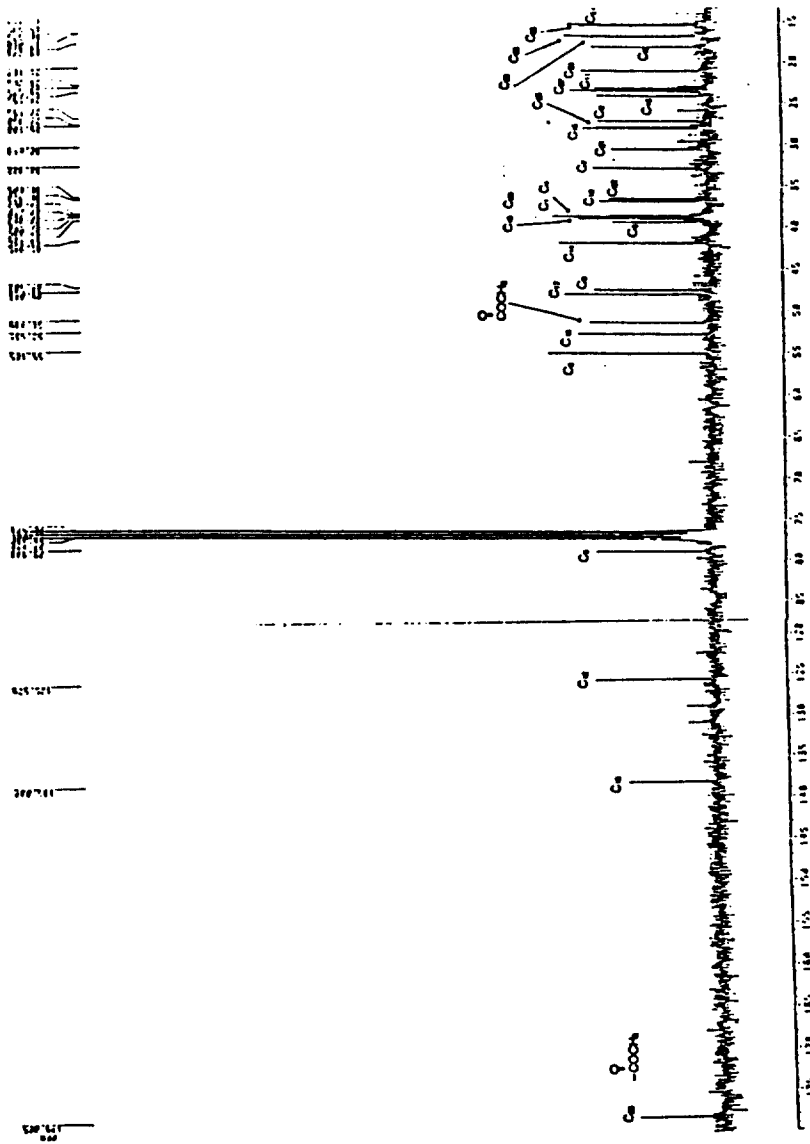
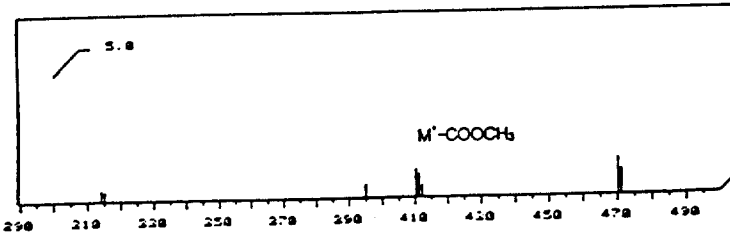
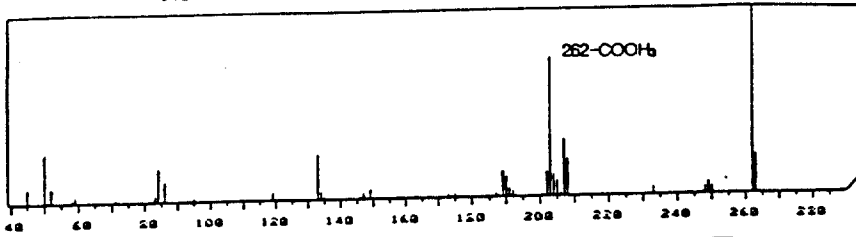


Fig. 5. ^{13}C -NMR spectrum of compound A methyl ester from *Oldenlandiae diffusae* Herba

 FILENAME:Y-2 .01
 COMMENT:DI:91/8-7

MODE: EI
 EV: 20 GAIN: 2.7
 IS TEMP: 250 SCAN SPEED: 9
 DI TEMP: 125

DATA	R.T.	PEAK MASS	RANGE	BASE PEAK	TOTAL	RAW- E.G.
66	2.9	148	42- 471	320700(262)	1946054	0- 0
		148	42- 471	320700(262)	1946054	0- 0



FILENAME:Y-2 .01
 COMMENT:DI:91/8/7

MODE: EI
 EV: 20 GAIN: 2.7
 IS TEMP: 250 SCAN SPEED: 9
 DI TEMP: 125

DATA	R.T.	PEAK MASS	RANGE	BASE PEAK	TOTAL	RAW- B.G.
66	2.8	148	42- 471	320700(262)	1946054	0- 0
		148	42- 471	320700(262)	1946054	0- 0

MASS	R.INT.	TOTAL	A.INT.	MASS	R.INT.	TOTAL	A.INT.
45.0	8.6	1.4	27470	202.0	13.3	2.2	42600
50.0	26.2	4.3	83900	203.0	74.2	12.2	237800
52.0	8.3	1.4	26610	204.0	12.1	2.0	38700
84.0	18.1	3.0	58100	205.0	9.4	1.5	30020
86.0	11.3	1.9	36250	207.0	30.7	5.1	98300
133.0	24.3	4.0	78000	208.0	20.3	3.4	65200
189.0	14.3	2.3	45700	262.0	100.0	16.5	320700
190.0	11.1	1.8	35440	263.0	21.2	3.5	68000

Fig 6. MS spectrum of compound A methyl ester from *Oldenlandia diffusa* Herba

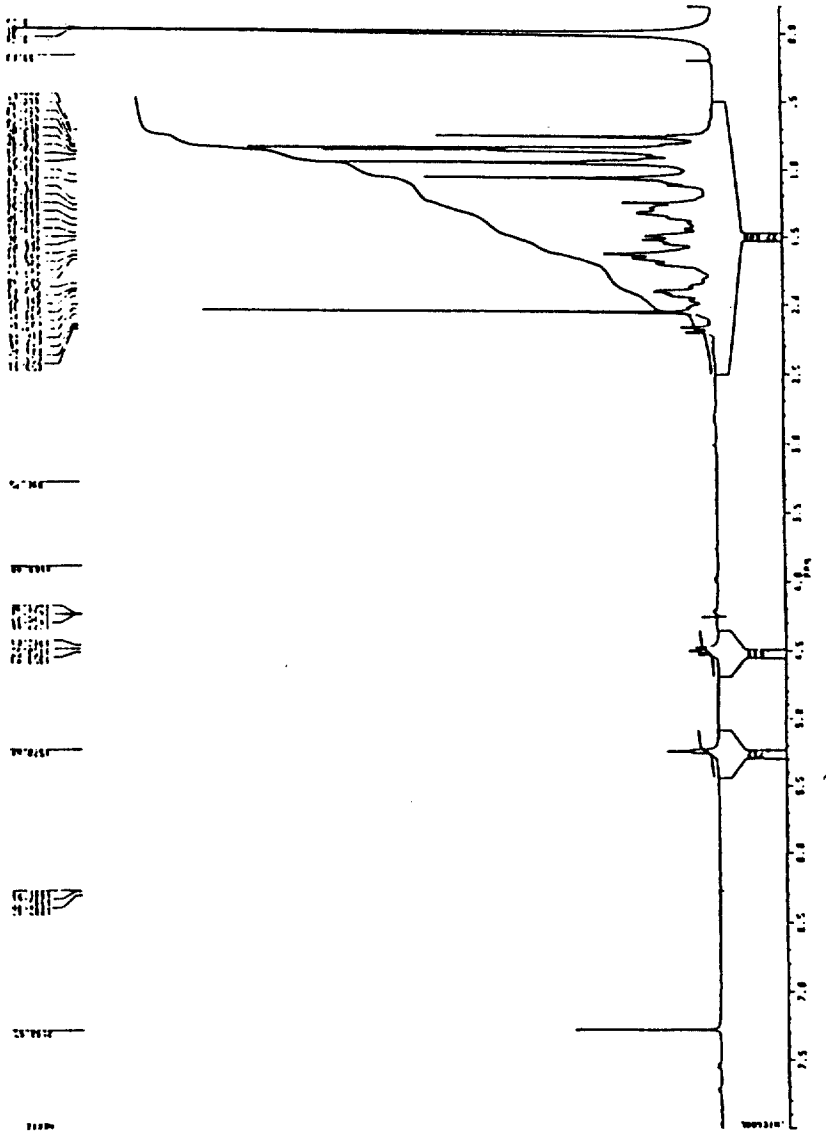


Fig 7. ¹H-NMR spectrum of compound A acetate

보였으며, FACS상 Balb/c 비장세포에 대한 분석에서 B cell을 농도에 비례하여 증가시켰으나 T cell에 대해 독성이 인정되었고, ursolic acid 10 μ g/ml을 SUN-1 암주에 처치한후 전자현미경(SEM & TEM)상에서 4시간후에 세포막 돌기가 생기고 24시간후에 세포막 및 세포내 핵의 파괴 등 형태학적 변화를 확인할 수 있었다.

參 考 文 獻

1. 신민교 : 원색임상본초학, 영림사, 서울, 688 (1986)
2. 이창복 : 대한식물도감, 향문사, 서울, 693, (1982)
3. 전국 한의과대학 본초학교수편 : 본초학, 223, 1991
4. 강소신의학편 : 중약대사전 상책, 상해과학기술출판사, 754 (1979)
5. 구명, 서홍화, 이연문, 낙화생 : 항종류분초도보, 상무인서관, 20 (1990)
6. 송호준, 김태현 : 백화사설초 진탕액 투여가 마우스의 항종양 면역반응에 미치는 영향, 본초분과학회지 9(1), 83-97 (1994).
7. Meng Yanfa et al : separation, purification and fundermental properties, Lanzhou Univ, Tongbao 26(4), 113-116 (1990)
8. Huang Jai Tung : New iridoids from Oldenlandia diffusa ROXB, Arch. PHAR MACH., 314(10), 831-6(1981)
9. H.Peter Vollmers et al : Monoclonal antibodies inhibit the adhesion of mouse B16 melanoma cells in vitro and block lung metastasis in vivo, Proc. Natl. ACAD. vol 80, PP.3729-3733, 1983
10. Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytoto

xicity assays. J. Immunol. Methods pp.65, 55, 1983

11. Es--Saady-D, Najid-A, Simon-A, Denizot-Y, Chulia-AJ, Delage-C., Effects of ursolic acid and its analogues on soybean 15-lipoxygenase activity and the proliferatuon rate of a human gastric tumor cell line, MEDIATORS-INFLAMM. 3(3), 181-184, 1994.

12. Kyung Soo Sohn, Ho Young Lee, Kyu Won Kim : Antiangiogenic activity of triterpene acids, Cancer Letters 94, 213-218, 1995

13. Hee Jae Cha, Soo Kyung Bae, Ho Young Lee, Kyu Won Kim: Anti invasive activity of ursolic acid correlates with the reduced expression of MMP-9 in 1080 human fibrosarcoma, Proceedings of KOSEF(Nov. 22),1995