

유포르비아속 식물로부터 단리한 가수분해형 탄닌의 인체고형암 세포에 대한 세포독성효과

이승호[#] · 박지수 · 김소영 · 정시련, 최상운*

영남대학교 약학대학, *한국화학연구소

(Received June 23, 1997)

Cytotoxic Effects of Hydrolysable Tannins from Some *Euphorbia* Plants on the Human Tumor Cell Lines

Seung-Ho Lee[#], Ji Soo Park, So Young Kim,
See Ryun Chung and Sang Un Choi*

College of Pharmacy, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

*Korean Research Institute of Chemical Technology (KRICT), P.O. Box 107, Dae-jeon 305-342, Korea

Abstract—Seventy three hydrolysable tannins and related compounds were isolated from seven *Euphorbia* plants. Among them, 28 compounds including nine gallotannins, eleven ellagitannins and eight related compounds were selected according to the structural similarity. Cytotoxicity of them on the human tumor cell lines including A-549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF-498 and HCT-15 were evaluated by the SRB method in vitro. 3,4,6-Tri-O-galloyl-D-glucose was shown to exhibit most potent cytotoxic effect (4.4 $\mu\text{g/ml}$ (ED₅₀) (10.3 $\mu\text{g/ml}$)

Keywords □ Hydrolysable tannins, *Euphorbia* spp. cytotoxicity, human tumor cell lines, 3,4,6-tri-O-galloyl-D-glucose.

탄닌은 가죽을 부드럽게 하는 성질을 가지고 있는 식물성 polyphenol의 총칭으로 식물계에 넓게 분포하고 있고 구조에 따라서 가수분해형 탄닌과 축합형탄닌의 두그룹으로 분류된다. 전자는 가수분해에 의하여 생산되는 phenol carboxyl group의 종류에 따라서 gal-
lotannin과 ellagitannin으로 구별되며 이들은 phenol carboxylic acid가 polyalcohol에 ester결합한 형태로 식물체중에 존재한다. 탄닌화합물의 생리활성에 관한 연구로는 항 virus작용¹⁾, 효소활성저해작용²⁾, 혈압강화작용³⁾, 혈중노질소(BUN) 저하작용⁴⁾, 이종나선 구조를 가진 DNA절단작용⁵⁾, 항종양작용⁶⁾, 항 allergy작용⁷⁾, 항 ACE(angiotensin converting enzyme)활성 저해작용⁸⁾, 항 HIV작용⁹⁾등 다양한 활성이

연구 보고되고 있고, 최근 새로운 분리 분석기술의 발전에 힘입어 새로운 형태의 탄닌화합물이 속속 밝혀짐에 따라 이들 화합물을 이용한 생리활성 연구가 활발하게 진행되고 있다.

대극과 식물은 열대, 아열대에 넓게 분포하고 있고 그 종류는 300속, 7500종에 이르며, 그중에는 약용식물로서 중요한 것이 많고 또 탄닌의 자원으로서도 중요한 식물군이다.¹⁰⁾ *Euphorbia*속 식물은 아열대를 중심으로 2000종이 분포하고 있고 줄기와 잎에 상처를 내면 흰색의 유액을 내는 것이 특징이다. 옛날부터 하제, 이뇨제, 통경약, 진통약, 해독약, 수렴약등으로 이용되고 있지만 독성이 있기때문에 사용에 주의를 요하는 것이 많다.¹¹⁾ *Euphorbia*속 식물의 성분으로는 *E. frankiana*로부터 phorbol, lipid, triterpene을, *E. cornigera*로부터 ellagic acid, 3,3'-di-O-methyl ellagic acid를 *E. fishcheriana*로부터 7-oxosterol, 7 α -hydroxy sterol, 7 β -

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 053-810-2818 (팩스) 053-81-3871

hydroxy sterol등이 단리되어 보고되었다.¹²⁾

저자들은 수년간 고등식물에 함유되어 있는 tannin 및 관련화합물에 대한 화학적 연구를 수행하여 *Euphorbia helioscopia*, *E. thymifolia*, *E. jolkini*, *E. fischeriana*, *E. adenochlora*, *E. maculata*, *E. supina* 등 7종의 *Euphorbia*속 식물로부터 15종의 new compounds를 포함한 73종의 화합물을 단리하여 보고하였다.¹³⁻¹⁶⁾ 본 논문에서는 앞에서 언급한 7종의 *Euphorbia*속 식물로부터 단리한 가수분해형 tannin이 5종의 human tumor cell lines에 대하여 나타내는 세포독성을 *in vitro*에서 측정하여 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

실험방법

시료물질의 분리 및 구조결정 - 실험에 사용된 *Euphorbia*속 식물은 직접 채집하거나 시장에서 구입하여 전문가의 감정을 받아 사용하였다. 시료식물은 잘게 썰어 80% acetone으로 실온에서 일주일간 2회 반복 추출하였다. 추출액은 한데 모아 감압하에서 acetone을 증발농축하였다. 농축액은 24시간 방치후 생성되는 침전을 여과하여 제거하였다. 여액을 재차 농축하여 Sephadex LH-20 column에 loading한 후 water-methanol-acetone을 gradient로 하여 순차적으로 용출시켰다. 용출액은 1% ethanolic FeCl₃ solution을 발색시약으로 하여 TLC로 monitoring 하면서 분획하였다. 각각의 분획은 MCI-gel CHP 20P(75~150 μ, Mitsubishi Chemical Co. Ltd, H₂O-MeOH), Fujigel ODS G3, 43~65 μ, Fujigel Hanbai Co. Ltd, H₂O-MeOH), Bondapak C₁₈/Porasil B(37~75 μ, Waters Associates, Inc, H₂O-MeOH), Prep Pak 500/C₁₈(37~75 μ, Tosoh Co., H₂O-MeOH), TSK gel Phenyl-Toyopearl 650 M(88 μ, Tosoh Co., H₂O-MeOH), Avicel cellulose(Funakoshi, 2% AcOH)등의 reverse phase column chromatography를 반복 실시하여 화합물을 단리하였다. 단리된 화합물은 ¹H- 및 ¹³C-NMR, MS등의 spectral data를 검토하여 기저물질인 경우에는 spectral data를 표품의 문헌치와 비교하거나 직접 co-TLC를 실시하여 동정하였고, new compound의 경우에는 각종 spectral data의 검토, 가수분해 및 유도체합성등을 통하여 구조를 구명하였다.

본 실험에서는 단리된 73종의 화합물중 화학구조에

있어서의 공통점을 고려하여 28종의 화합물을 선정하여 각종 인체고형암세포에 대한 세포독성을 측정하였다.

세포독성의 측정 - 1989년에 미국의 국립 암 연구소에서 약물의 *in vitro* 항암활성을 측정하기 위하여 개발된 suforhodamine B(SRB) assay 방법을 사용하였다.¹⁷⁾ 즉 계대중인 세포들을 실험에 사용하기 위하여 우선 trypsin-EDTA 용액으로 부착면으로부터 분리시키고, 96 well flat bottom microplate(Falcon)에 well 당 세포수가 5×10³(A 549, HCT 15), 1×10⁴(SK-MEL-2, XF 498), 2×10⁴(SK-OV-3)이 되도록 분주하였다. 분주된 세포들은 CO₂ incubator 내에서 24시간 배양하여 바닥에 부착시킨 후 aspirator로 media를 제거하고 6농도의 log dose로 medium으로 희석한 test material 용액들을 세포가 들어있는 well에 각각 100 μl 씩 3배수로 넣어주고, 48시간동안 더 배양하였다. 검체들을 녹이기 위하여 필요에 따라 DMSO를 사용하였으며 이 때 세포에 가해지는 DMSO의 농도는 0.5% 이하가 되도록 하였다. 또한 이렇게 희석한 검체 용액은 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 1시간 동안 방치하여 세포들을 plate의 바닥면에 고정시켰다. 세포의 고정이 끝난 후 plate를 물로 5~6회 세척하여 남아있는 TCA 용액을 완전히 제거하고 실온에서 남은 물기가 없도록 건조시켰다. 완전히 건조된 plate는 well당 100 μl의 1% acetic acid용액에 0.4% SRB를 녹인 염색용액을 가하여 30분간 세포를 염색하고 다시 1% acetic acid용액으로 5~6회 세척하여 세포에 결합하지 않은 SRB들을 제거하였다. 이렇게 염색된 cell plate 들은 다시 실온에서 건조시킨 후 well 당 100 μl의 10 mM trisma base(unbuffered) 용액을 가하여 titer plate shaker로 10분간 shaking 하여 염색약을 용출시킨 후 microplate reader를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 암세포들에 대한 약물의 효과를 계산하기 위하여 약물을 가할 때의 세포수(T_z)와 약물이 들어 있지 않은 medium을 가하여 48시간 배양했을 때의 세포수(C) 및 각 농도의 약물과 함께 48시간 배양했을 때의 세포수(T) 등을 측정하여 다음의 수식에 의해 항암활성을 계산하였다. 즉 T_z/T인 경우에는 [(T-T_z)/(C-T_z)]×100 으로 계산하였고, T_z < T인 경우에는 [(T-T_z)/T_z]]×100의 수식으로 계산하

었다. 이렇게 계산된 값들로부터 LOTUS priogram의 data regression을 이용하여 약물이 암세포의 성장을 50% 억제하는 농도인 50% effective dose(ED₅₀)를 계산하여 각 약물의 항암활성도를 비교하였다.

결과 및 고찰

각종 인체고형암에 대한 치료제로서 현재까지는 불소화 pyrimidine류, anthracycline류, 백금착화합물등이 대부분이었으나, 근래 합성의약품의 부작용과 독성이 심각한 문제로 제기됨에 따라 합성의약품보다는 천연물로부터의 항암제개발을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 예로 kupchan등은 미국 NCI의 대규모 screening data를 바탕으로 다수의 sesquiterpene lactone류, diterpene류, quassinoid류, macrolide류, alkaloid류 등 다수의 항종양 활성물질을 천연물로부터 단리, 구조를 구명하였다.¹⁸⁾ 이밖에도 다수의 천연 유기화합물이 항암제개발을 목표로 분리되어 구조가 구명되어 있으며 이들을 대상으로 *in vivo* 혹은 임상실험

을 통하여 항암제로 개발될 수 있는 천연물을 탐색하는데 많은 노력을 기울이고 있다. Polyphenol류의 항암 활성에 대한 연구로는 Kashiwada등¹⁹⁻²⁰⁾이 penta-O-galloyl- β -D-glucose와 chebulagic acid를 포함하는 몇몇의 가수분해형 탄닌이 melanoma PRMI-7951에 대하여 강한 세포독성을 나타냈으며 활성의 강도는 분자내의 polyalcohol의 종류에 따라 다르게 나타난다고 보고한 바 있다. Lee등²¹⁾은 *Terminalia chebula*로부터 5종의 human tumor cell lines에 대하여 cytotoxicity를 나타내는 4종의 탄닌 및 관련화합물을 단리하여 보고한 바 있다.

본 실험에서는 7종의 대극과 식물로부터 단리한 73종의 가수분해형 탄닌 및 관련화합물중 Table I에 나타낸 바와같이 구조의 유사성을 고려하여 임의로 선정한 9종의 gallotannin, 11종의 ellagitannin, 3종의 복합형 탄닌 및 5종의 관련화합물을 시료로 하여 5종의 human tumor cell lines에 대한 cytotoxicity를 측정하여 그 결과를 Table II에 나타내었다.

실험에 사용한 28종의 polyphenol중 18종의 화합물

Table I—Hydrolysable tannins and related compounds used in this experiment

No	Compound name	Source ^a
1	1-O-galloyl- β -D-glucose	EH, EJ, EA
2	1,6-di-O-galloyl- β -D-glucose	EH, EJ, EM
3	1,2,6-tri-O-galloyl- β -D-glucose	EH
4	3,4,6-tri-O-galloyl-D-glucose	EF
5	1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose	EH, ET, EJ, EA, EM
6	3,5-di-O-galloyl-shikimic acid	EM
7	3-O-galloyl-quinic acid	EH
8	2-O-galloyl-D-galactose	EH
9	1,2,3,6-tetra-O-galloyl- β -D-allose	EF
10	geraniin	EH, ET, EJ, EA, ES, EM
11	elaecarpusin	EH
12	bixanin	ET
13	putranjivain A	EJ
14	Hippomanin A	EH
15	Pedunculagin	ET
16	1-desgalloyl eugeniin	ET
17	Rugosin E	ES
18	Excoecarianin	EM
19	Euphorbin D	EM
20	Helioscopinin B	EH, EJ, EA
21	Furosin	EH, EJ, EA, EM
22	supinanin	ES
23	helioscopin B	EH
24	gallic acid	EH, ET, EJ, EA, ES, EM, EF
25	ellagic acid	EH, ET
26	brevifolin carboxylic acid	EA
27	gallic acid 3-O- β -D(6'-O-galloyl)-glucoside	EH
28	gallic acid 4-O- β -D(6'-O-galloyl)-glucoside	EH

^a EH: *Euphorbia helioscopia*, ET: *E. thymifolia*, EJ: *E. jolkini*, EA: *E. adenochlora*, ES: *E. supina*, EM: *E. maculata*, EF: *E. fischeriana*

Table II—Cytotoxic effects of the compounds from the some *Euphorbia* species against the human tumor cell lines *in vitro*

No	ED ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) ^a				
	A 549	SK-OV-3	SL-MEL-2	XF 498	HCT 15
1	50<	36.0<	44.0	29.0	43.4
2	50<	50<	50<	37.4	50.0
3	21.0	19.2	28.3	12.1	13.9
4	7.8	8.1	10.3	8.0	4.4
5	9.2	19.2	8.7	9.5	9.5
6	21.2	18.4	15.5	17.1	17.5
7	50<	50<	50<	50<	50<
8	50<	50<	50<	50<	50<
9	21.1	22.1	20.8	12.7	11.1
10	21.5	41.5	14.4	25.8	16.4
11	14.4	23.7	13.2	17.8	7.2
12	35.4	50<	25.8	50<	19.0
13	23.6	32.2	26.6	32.9	19.3
14	18.1	34.6	29.4	28.5	23.4
15	12.0	21.5	9.3	14.8	6.0
16	13.7	28.9	22.8	28.2	14.7
17	19.1	35.5	16.8	28.2	8.8
18	15.1	40.3	19.0	17.2	15.0
19	46.4	50<	42.7	50<	39.9
20	12.4	24.8	8.9	13.9	5.2
21	50<	50<	50<	50<	25.8
22	15.2	14.0	17.5	19.8	8.0
23	19.0	23.5	32.3	34.0	13.9
24	8.2	16.1	6.1	9.8	14.0
25	50<	50<	30.9	49.3	50<
26	50<	50<	50<	50<	39.1
27	50<	50<	50<	50<	42.4
28	50<	50<	50<	50<	50<
Adriamycin	0.1	0.2	0.1	0.2	2.4

^a ED₅₀ value of compound against each cancer cell line, which was defined as a concentration that caused 50% inhibition of cell growth *in vitro*.

이 전체 cell lines에 대하여 50 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 ED₅₀ value를 나타냈으며 3,4,6-tri-O-galloyl-D-glucose(4)가 가장 강한 활성(4.4 $\mu\text{g/ml}$ (ED₅₀<10.3 $\mu\text{g/ml}$)을 나타냈다. Gallotannin(1-9)이 다른 화합물군보다 대체로 강한 활성을 보였으며 phenol glucoside류(27-28)에서는 거의 활성을 나타내지 않았다. Gallotannin 중에서는 glucose를 polyalcohol로 하고 있는 3,4,6-O-trigalloyl-D-glucose⁴⁾, penta-O-galloyl- β -D-glucose(5)가 quinic acid(7) 및 galactose(8)를 polyalcohol로 하고 있는 경우보다 현저하게 강한 활성을 나타내고 있다. 분자내에 hexahydroxydiphenoyl(HHDP) group을 갖고있는 ellagitannin(10-20)은 전체적으로 비교적 완화된 활성을 나타내고 있으나 그중에서는 pedunculagin(15)이 가장 강한 활성을 나타냈다. Gallic acid(24) 단독의 경우에는 강한 활성을 나타냈으나 gallic acid가 다른

polyalcohol에 결합되어 있는 경우(1, 2, 27, 28)에는 현저하게 활성이 저하되었다.

이제까지 식물성 polyphenol은 구조적인 특징때문에 산, 알칼리, 열, 빛등에 의해 화학적인 변화를 일으키기 쉽고 높은 polarity때문에 순수하게 분리가 어려웠다. 또 분자내에 hydroxyl group을 다수 갖고 있기 때문에 단백질과의 collagen을 형성한다든지 각종 금속 ion과 chelate를 형성하는 특성때문에 cell line 혹은 enzyme과 non-specific binding을 한다고 생각되어 천연 활성물질의 개발에서 제외되어 온 경우가 많았다. 그러나 현재는 각종 분리기술이 개발되고 분석기기의 발달에 힘입어 매우 다양한 구조를 가진 polyphenol이 속속 단리, 보고되고 있고, 이들 탄닌을 이용한 생리활성연구도 활발히 전개되어 활성 data들이 속속 보고되고 있다. 따라서 앞으로 천연에 풍부하게 분포하고 있는 천연 polyphenol을 대상으로 한 연구가 활발히 전개되어 새로

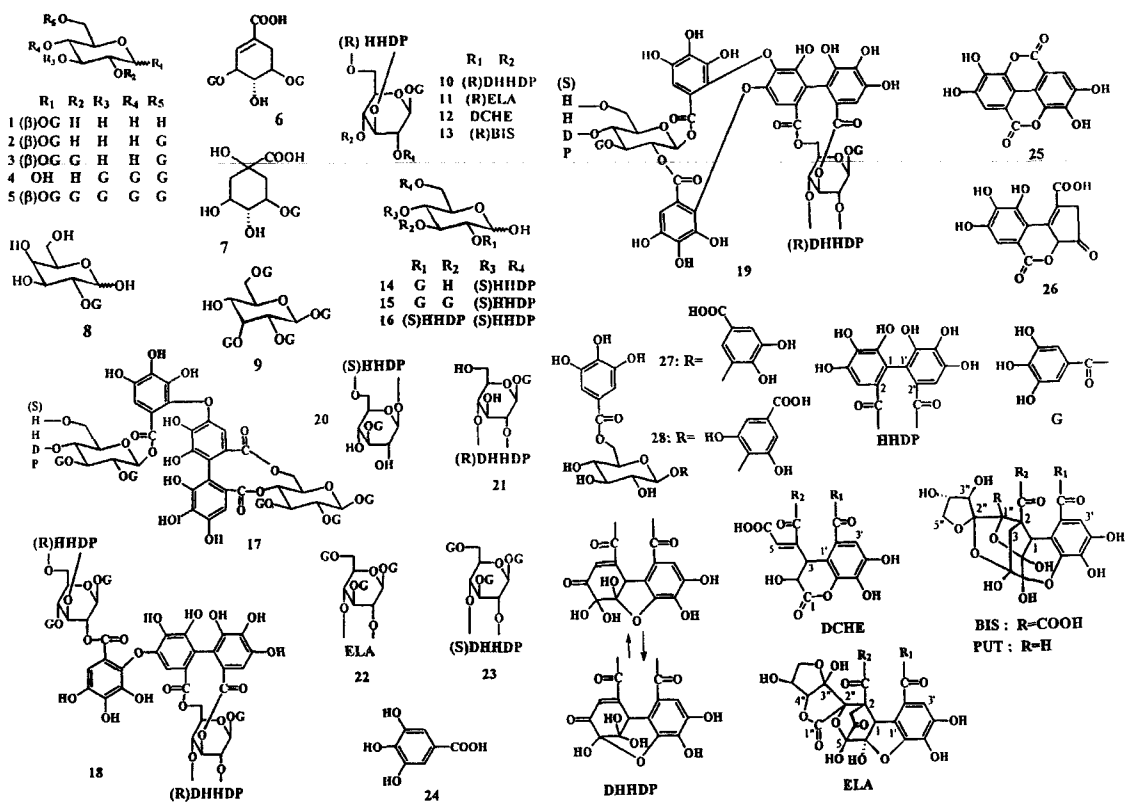


Fig. 1 — Structures of hydrolysable tannins used in this experiment.

은 활성을 갖는 천연물질로의 개발 또는 각종 생리활성 연구에 시료물질로서 이용될 수 있으리라 기대된다.

문헌

- Nishioka, I., Chemistry and Biological Activities of Tannins : *Yakugaku Zasshi* **103**, 125 (1983).
- Hatano, T., Yasuhara, T., Hukuda, T., Noro, T. and Okuda, Y., Phenolic Constituents of Licorice II. Licopyranocoumarin, Licoarylcoumarin and Glisoflavone and Inhibitory Effects of Licorice Phenolics on Xanthine Oxidase: *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 3005 (1989).
- Inoguchi, J., Okabe, H., Yamaguchi, T., Nagamatsu, A., Nonaka, G. and Nishioka, I., Antihypertensive substance in seeds of Areca Catechu L. : *Life Science* **38**, 1375 (1986).
- Shibutani, S., Nagasawa, T., Oura, H., Nonaka, G. and Nishioka, I., Effects of Extracts from Paeoniae Radix on Nitrogen Concentration in Rat Serum: *Chem. Pharm. Bull.* **29**, 874 (1981).
- Shirahata, S., Murakami, H., Nishiyama, K., Sugata, I., Shinoha, K., Nonaka, G., Nishioka, I. and Omura, H., DNA Breakage by Hydrolysable Tannins in the Presence of Cupric Ion: *Agric. Biol. Chem.* **49**, 1033 (1985).
- Kaiuchi, N., Hattori, M. and Namba, T., Inhibitory Effects of Tannins on Reverse Transcriptase from RNA Tumor Virus: *J. Nat. Prod.* **48**, 614 (1985).
- Kakegawa, H., Matsumoto, H., Endo, K., Satoh, T., Nonaka, G. and Nishioka, I., Inhibitory Effects of Tannins on Hyaluronidase Activation and on the degranulation from Rat Mesentery Mast Cells: *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 5079 (1985).
- Inoguchi, J. I., Okabe, H., Yamaguchi, T., Nagamatsu, A., Nonaka, G., and Nishioka, I., Inhibitors of Angiotensin-converting Enzyme in Crude Drugs II: *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 264 (1985).
- Okuda, T., Yoshida, Y. and Hatano, T., EL-

- lagitannis as Active Constituents of Medicinal Plants: *Planta Med.* **55** (1989).
- 10) Willis, J. C., "A dictionary of the flowering plants (7th ed.)", Cambridge Univ. Press. p. 651 (1966).
 - 11) 甘偉松, 臺灣藥用植物誌 上, 國立中醫藥研究所, 臺北 p. 417 (1985).
 - 12) 李承浩, 博士學位論文(7종의 Euphorbia屬 植物의 tannin 및 關聯化合物에 대한 化學的 研究), 九州大學, 福岡, p. 3 (1991).
 - 13) Lee, S. -H., T. Tanaka, G. -I. Nonaka and I. Nishioka, Hydrolysable tannins from *Euphorbia thymifolia*, *Phytochemistry* **29**(11), 3621 (1990).
 - 14) Lee, S. -H., Tanaka, T., Nonaka G.-I. and Nishioka, I., Tannins and related compounds XCV. Isolation and characterization of helioscopinins and helioscopins, Four new hydrolysable tannins from *Euphorbia helioscopia*, *Chem. Pharm. Bull.* **38**(6), 1518 (1990).
 - 15) Lee, S. -H., T. Tanaka, G. -I. Nonaka and I. Nishioka, Tannins and related compounds CV. Monomeric and dimeric hydrolysable tannins having a DHHPD group, supinanin, euphorhelin and jolkinin from *Euphorbia species*, *Chem. Pharm. Bull.* **39**(3), 630 (1991).
 - 16) Lee, S. -H., Tanaka, T., Nonaka, G. -I. Nishioka, I. and B. Zhang, Allose gallate from *Euphorbia fischeriana*, *Phytochemistry* **30**(4), 1251 (1991).
 - 17) Ryu, S. Y., Lee, C. K., Lee, C. O., Kim, S. H. and Zee, O. P., Antiviral triterpenes from *Prunella vulgaris*, *Arch. Pharm. Res.* **15**(3), 242 (1992).
 - 18) Eric, J. L. and Wen, Y. L., Structure-activity relationship analysis of chinese anticancer drugs and related plants, Oriental Healing Arts Institute, Taiwan, p. 10 (1985).
 - 19) Kashiwada, Y., Nonaka, G.-I., Nishioka, I., Chang J.-J. and Lee, K. H., Antitumor agents 129. Tannins and related compounds as selective cytotoxic agents, *J. Nat. Prod.* **55**(8), 1033 (1992).
 - 20) Kashiwada, Y., Nonaka, G.-I., Nishioka, I., Lee, K. J. H., Bori, I., Fukushima, Y., Bastow, K. F. and Lee, K. H., Tannins as potent inhibitors of DNA topoisomerase II in vitro., *J. Pharm. Sci.* **82**(5), 487 (1993).
 - 21) Lee, S. -H., Ryu, S. Y., Choi, S. U., Lee, C. O., No, Z., Kim, S. K. and Ahn, J. -W., Hydrolysable tannin and related compounds having cytotoxic activity from the fruits of *Terminalia chebula*, *Arch. Pharm. Res.* **18**(2), 118 (1995).