

생약으로부터 *In vitro* DNA 결합활성의 검색

김윤설 · 정세준 · 신화우 · 김윤철*

원광대학교 약학대학

(Received January 3, 1998)

Screening of *In vitro* DNA-binding Activity from the Crude Drugs

Youn-Seol Kim, Sei-Joon Jeong, Hwa-Woo Shin and Youn-Chul Kim*

College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Abstract—One hundred and seventeen crude drugs were screened for DNA-binding activity *in vitro*. The DNA-methyl green assay is a useful biochemical screen for the detection or development of biologically active compounds which bind to DNA. This assay is based upon the fact that free methyl green undergoes rapid spontaneous molecular rearrangement to its colorless carbinol base so that the liberation of the dye from DNA by displacement can be followed spectrophotometrically as a decrease in absorbance at 650 nm. Seven methanolic extracts of crude drugs including Cinnamomi Cortex spissus, Coicis Semen, Coptidis Rhizoma, Perillae Semen, Plantaginis Semen, Polygalae Radix and Zanthoxyli Fructus showed less than 2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ as their IC_{50} values. The active principles of Plantaginis Semen and Zanthoxyli Fructus were transferred into organic solvents, which showed the IC_{50} values with 588 and 574 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. These fractions have been selected for isolation of biologically active constituents.

Keywords □ DNA-binding activity, DNA-methyl green assay, Screening, Crude drugs.

DNA와 결합하는 화합물은 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 즉, 항말라리아 약물인 quina-crine, chloroquine, 항종양 활성 항생물질인 an-thramycin methyl ether, adriamycin, daunoru-bicin 등이 DNA와 결합한다는 사실이 밝혀졌다.¹⁻⁴⁾ 또한, 핵산과 상호작용하는 약물들은 암치료를 위한 가장 유용한 화학요법제 중의 하나이다. 이와 같은 사실에 입각하여 활성물질의 발견을 위한 방법 중의 하나로 핵산에 선택적으로 작용하는 화합물의 검색이 이루어지고 있다.

Triphenylmethane 염료인 methyl green(MG)은 DNA의 조직화학적 염색시약이며, MG이 DNA와 결합한 DNA-methyl green(DNA-MG)은 일반적으

로 deoxyribonuclease(DNase)에 대한 기질로서 이용되고 있다.⁵⁾ DNA-MG이 DNA와 결합능을 가지고 있는 물질과 반응하게 되면 이 물질과 DNA-MG의 MG과 치환된다. 유리된 MG은 pH 5.0이상에서 신속하게 H₂O 한 분자가 부가되어 무색의 carbinol을 형성하게 된다.⁶⁾ 이와 같은 원리를 이용한 DNA-MG assay⁴⁾는 단순한 spectrophotometer와 DNA-MG만을 필요로 하는 간단한 방법으로 단시간 내에 검체의 DNA 결합능을 측정할 수 있어서 천연물로부터 DNA 결합능을 가지는 생리활성물질의 탐색을 목적으로 이용되고 있다.^{7,8)}

저자 등은 천연물로부터 DNA결합능을 가지는 물질을 탐색할 목적으로 한방 및 민간에서 널리 사용되고 있는 생약 중 117종을 무작위로 선정하고 각각의 methanol 추출물에 대하여 DNA-MG assay를 이용하여 검색을 실시하여 보고하고자 한다.

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0653-850-6823 (팩스) 0653-52-8837

실험방법

시약 및 기기 - DNA methyl green, Doxorubicin HCl은 Sigma사의 제품을 사용하였으며, 기타 시약 및 용매는 분석용 특급 또는 1급 시약을 사용하였다. 흡광도 측정을 위하여 ELISA Reader(Molecular Devices)를 사용하였다.

재료 및 시료의 조제 - 본 실험에서 사용한 생약은 익산시 소재 한약재상에서 구입하여 감별한 후 세절하여 사용하였으며, 증거표본은 원광대학교 약학대학 생약표본실에 보관되어 있다(Table I). 건조된 생약 80g을 MeOH로 실온에서 3일간 2회 추출한 후 여과하고

여액을 40°C이하에서 감압농축하여 MeOH 추출물을 얻었다. MeOH 추출물은 EtOH에 용해시켜 시료용액으로 사용하였다. 각 MeOH 추출물의 2,000, 1,000, 500 µg/ml용액을 이용하여 1차 활성검색을 실시하였으며, IC₅₀치가 2,000 µg/ml이하를 나타낸 MeOH 추출물에 대해서는 80% 수성 MeOH에 용해시킨 후 *n*-hexane으로 추출하여 *n*-hexane 가용부를 얻었다. 80% 수성 MeOH 분획은 증류수를 가하여 60% 수성 MeOH로 하고 여기에 CHCl₃을 가하여 용매분획을 행하여 CHCl₃과 60% 수성 MeOH 분획을 얻었다. 얻어진 *n*-hexane, CHCl₃ 및 60% 수성 MeOH 용매분획은 1차 검색에서의와 동일한 농도의 시료용액을 조제하고

Table I—Activity of the methanolic extract of crude drugs in the DNA-methyl green assay

Samples	Voucher specimen	IC ₅₀ (µg/ml) Value*
Achyranthis Radix(우슬)	WP 313	> 2,000
Aconiti Tuber(부자)	WP 183	> 2,000
Acori graminei Rhizoma(석창포)	WP 233	> 2,000
Akebiae Caulis(목통)	WP 136	> 2,000
Alismatis Rhizoma(택사)	WP 434	> 2,000
Amomi tsao-ko Fructus(초과)	WP 419	> 2,000
Ampelopsis Radix(백렴)	WP 157	> 2,000
Alpiniae Fructus(익지인)	WP 341	> 2,000
Amomi Semen(사인)	WP 197	> 2,000
Anemarrhenae Rhizoma(지모)	WP 391	> 2,000
Angelicae dahuricae Radix(백지)	WP 168	> 2,000
Angelicae gigantis Radix(당귀)	WP 089	> 2,000
Angelicae koreanae Radix(강활)	WP 009	> 2,000
Arctii Semen(우방자)	WP 312	> 2,000
Araliae cordatae Radix(독활)	WP 102	> 2,000
Arecae Semen(빈랑자)	WP 188	> 2,000
Arisaematis Tuber(천남성)	WP 406	> 2,000
Armeniaca Semen(행인)	WP 473	> 2,000
Artemisiae asiatica Herba(애엽)	WP 270	> 2,000
Artemisiae capillaris Herba(인진호)	WP 344	> 2,000
Asiasari Radix(세신)	WP 240	> 2,000
Asparagi Tuber(천문동)	WP 409	> 2,000
Astragali Radix(황기)	WP 499	> 2,000
Atractylodis Rhizoma(창출)	WP 403	> 2,000
Atractylodis Rhizoma alba(백출)	WP 170	> 2,000
Aurantii Fructus(지각)	WP 388	> 2,000
Aurantii immatri Pericarpium(청피)	WP 417	> 2,000
Aurantii nobilis Pericarpium(진피)	WP 398	> 2,000
Bambusae Caulis in Taeniam(죽여)	WP 386	> 2,000
Bombycis Corpus(백강잠)	WP 150	> 2,000
Bupleuri Radix(시호)	WP 261	> 2,000
Caesalpiniae Lignum(소목)	WP 244	> 2,000
Carthami Flos(황화)	WP 495	> 2,000
Cassiae Semen(결명자)	WP 018	> 2,000
Chaenomelis Fructus(모과)	WP 129	> 2,000
Chrysanthemi Flos(감국)	WP 004	> 2,000
Cimicifugae Rhizoma(승마)	WP 258	> 2,000
Cinnamomi Cortex(계피)	WP 024	> 2,000
Cinnamomi Cortex spissus(육계)	WP 331	1,361
Cnidii Rhizoma(천궁)	WP 404	> 2,000

Table I—Continued

Samples	Voucher specimen	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$) Value*
Coicis Semen(의이인)	WP 339	1,901
Coptidis Rhizoma(황련)	WP 500	1,694
Corni Fructus(산수유)	WP 203	> 2,000
Crataegi Fructus(산사자)	WP 202	> 2,000
Cuscutae Semen(토사자)	WP 438	> 2,000
Cyperi Rhizoma(향부자)	WP 474	> 2,000
Dioscoreae Rhizoma(산약)	WP 204	> 2,000
Elsholtziae Herba(향유)	WP 475	> 2,000
Ephedrae Herba(마황)	WP 119	> 2,000
Eucommiae Cortex(두충)	WP 109	> 2,000
Evodiae Fructus(오수유)	WP 297	> 2,000
Farfarae Flos(관동화)	WP 040	> 2,000
Foeniculi Fructus(회향)	WP 506	> 2,000
Forsythiae Fructus(연교)	WP 278	> 2,000
Fraxini Cortex(진피)	WP 399	> 2,000
Fritillariae Bulbus(패모)	WP 443	> 2,000
Gardeniae Fructus(치자)	WP 427	> 2,000
Gastrodiae Rhizoma(천마)	WP 408	> 2,000
Gentianae macrophyllae Radix(진교)	WP 396	> 2,000
Gentianae Scabrae Radix(용담)	WP 307	> 2,000
Gleditsiae Spina(조각자)	WP 397	> 2,000
Glycine Semen Germinatum(대두황권)	WP 093	> 2,000
Glycyrrhizae Radix(감초)	WP 007	> 2,000
Hoelen(복령)	WP 178	> 2,000
Hordei Fructus Germinatus(맥아)	WP 124	> 2,000
Liriodis Tuber(맥문동)	WP 123	> 2,000
Lithospermi Radix(자근)	WP 346	> 2,000
Lonicerae Flos(금은화)	WP 062	> 2,000
Lycii Fructus(구기자)	WP 048	> 2,000
Lycii Radicis Cortex(지골피)	WP 389	> 2,000
Machili Cortex(후박)	WP 507	> 2,000
Magnoliae Flos(신이)	WP 264	> 2,000
Menthae Herba(박하)	WP 144	> 2,000
Mori Radicis Cortex(상백피)	WP 212	> 2,000
Moutan Cortex Radicis(목단피)	WP 131	> 2,000
Nelumbinis Semen(연자육)	WP 280	> 2,000
Nepetae Spica(헝개)	WP 481	> 2,000
Paeoniae Radix(작약)	WP 357	> 2,000
Patriniae Radix(패장)	WP 444	> 2,000
Perilliae Herba(소엽)	WP 246	> 2,000
Perilliae Semen(소자)	WP 245	1,514
Persicae Semen(도인)	WP 101	> 2,000
Phellodendri Cortex(황백)	WP 502	> 2,000
Pinelliae Tuber(반하)	WP 147	> 2,000
Piperis longi Fructus(필발)	WP 449	> 2,000
Plantaginis Semen(차진자)	WP 401	1,295
Platycodi Radix(길경)	WP 064	> 2,000
Polygalae Radix(원지)	WP 323	2,000
Polygoni avicularis Herba(편축)	WP 445	> 2,000
Polygoni multiflori Radix(하수오)	WP 452	> 2,000
Polyporus(저령)	WP 362	> 2,000
Ponciri Fructus(지실) ^a	WP 393	> 2,000
Prunellae Spica(하고초)	WP 451	> 2,000
Puerariae Radix(갈근)	WP 002	> 2,000
Rehmanniae Radix(건지황)	WP 395	> 2,000
Rubi Fructus(복분자)	WP 179	> 2,000
Salviae Radix(단삼)	WP 087	> 2,000
Sanguisorbae Radix(지유)	WP 394	> 2,000
Santalini Lignum rubrum(자단향)	WP 347	> 2,000
Saussureae Radix(복향)	WP 137	> 2,000

Table I—Continued

Samples	Voucher specimen	IC ₅₀ (µg/ml) Value*
Schizandrae Fructus(오미자)	WP 295	> 2,000
Scirpi Rhizoma(삼릉)	WP 208	> 2,000
Scrophulariae Radix(현삼)	WP 476	> 2,000
Scutellariae Radix(황금)	WP 498	> 2,000
Sinomeni Caulis et Rhizoma(방기)	WP 148	> 2,000
Sophorae Flos(괴화)	WP 046	> 2,000
Sophorae Radix(고삼)	WP 030	> 2,000
Torilidis Fructus(사상자)	WP 194	> 2,000
Trichosanthis Semen(팔투인)	WP 043	> 2,000
Trichosanthis Radix(팔투근)	WP 042	> 2,000
Typhae Pollen(포황)	WP 447	> 2,000
Vitidis Fructus(만행자)	WP 120	> 2,000
Xanthii Fructus(창이자)	WP 402	> 2,000
Zanthoxyli Fructus(산초)	WP 207	963
Zedoariae Rhizoma(봉출)	WP 181	> 2,000
Zyzyphi spinosi Semen(산조인)	WP 206	> 2,000

* Values represent the concentration required for a 50% decrease in the initial absorbance of the DNA-methyl green solution.

2차 활성검색에 적용하였다.

DNA 결합능 측정 - DNA 결합능 측정은 Burres 등⁷⁾의 방법을 이용하였다. 즉, DNA-MG 20 mg을 7.5 mM MgSO₄를 함유하는 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) 100 ml에 현탁시키고 차광하고 37°C에서 24시간 교반하여 DNA-MG용액을 조제한다. 검색시료는 EtOH에 용해하고 20 µl씩 96-well microplate에 넣는다. 감압하에서 EtOH를 증발 건조시키고 DNA-MG용액 200 µl씩 넣은 후 ELISA Reader를 사용하여 650 nm에서 흡광도를 측정하고 24시간 동안 실온에서 차광상태로 방치한다. 24시간 경과 후 다시 650 nm에서 흡광도를 측정하여 최종 흡광도치와 최초 흡광도치의 차로부터 감소된 흡광도치를 계산하였다. control은 DNA-MG용액 대신 Tris-HCl buffer를 사용하였고 각 실험은 3회 실행하여 평균치를 구하였다. 또한, DNA 결합능의 비교를 위해 단계별 희석용액의 흡광도 감소율로부터 linear regression법을 이용하여 IC₅₀(Inhibition concentration necessary to decrease 50% of the absorbance)를 구하였다.

$$\text{흡광도 감소율(\%)} = \frac{(1\text{S흡광도}-1\text{C흡광도})-(2\text{S흡광도}-2\text{C흡광도})}{(1\text{S흡광도}-1\text{C흡광도})} \times 100$$

1S흡광도 : DNA-MG을 넣고 처음 측정한 시료의 흡광도

1C흡광도 : Tris-buffer를 넣고 처음 측정한 control의 흡광도

2S흡광도 : 24시간 후 측정된 시료의 흡광도

2C흡광도 : 24시간 후 측정된 control의 흡광도

결과 및 고찰

117종 생약의 MeOH 추출물에 대하여 DNA-binding assay를 이용하여 DNA 결합능을 검색하였다 (Table I). 육계, 의이인, 황련, 소자, 차전자, 원지, 산초 등 7종 생약의 MeOH 추출물 시료에서 IC₅₀치가 2,000 µg/ml이하의 DNA 결합능을 나타내었다. 1차 검색에서 선별된 7종의 MeOH 추출물에 대해서는 용매분획을 실시하여 활성물질의 유기용매로의 이행을 검토하였다. 즉, 각각의 MeOH 추출물에 대한 용매분획을 행하여 n-hexane, CHCl₃ 및 60% 수성 MeOH 분획을 얻었으며, 이들 분획의 DNA 결합능 실험결과는 Table II와 같다. 7종의 모든 생약에 있어서 활성성분이 유기용매층으로 이행됨을 알 수 있었다. 특히, 차전자와 산초의 n-hexane 가용부가 가장 높은 활성을 보였으며, 각각 588 및 574 µg/ml의 IC₅₀치를 나타내었으며 이는 DNA 결합능을 가지는 양성 대조약물인 doxorubicin(IC₅₀=47.5 µg/ml)에 비하여 낮은 활성을 보였다. 그러나 이들 n-hexane 가용부에는 많은 화합물들의 존재가 TLC로 확인되었으며, 본 활성검색법을 이용하여 분리되는 단일의 활성물질은 높은 활성을 나타낼 것으로 생각된다. 한편, 육계, 의이인, 황련, 소자, 원지 등 5종의 생약에 있어서는 활성성분이 유기용매층으로 이행되었으나, 각각의 MeOH 추출물에서와

Table II— Activity of organic solvent-soluble fractions of the crude drugs in the DNA-methyl green assay

Samples	IC ₅₀ (μg/ml) Value*		
	<i>n</i> -hexane fr.	CHCl ₃ fr.	60% aq. MeOH fr.
Cinnamomi Cortex spissus	1,609	> 2,000	> 2,000
Cóicis Semen	1,942	> 2,000	> 2,000
Coptidis Rhizoma	> 2,000	1,230	> 2,000
Perillae Semen	1,055	> 2,000	> 2,000
Plantaginis Semen	588	> 2,000	> 2,000
Polygalae Radix	1,314	> 2,000	> 2,000
Zanthoxyli Fructus	574	> 2,000	> 2,000

* Values represent the concentration required for a 50% decrease in the initial absorbance of the DNA-methyl green solution.

동등하거나 약간의 활성 증가만을 나타내었다. 이는 이들 *n*-hexane 가용부가 DNA-MG 용액에 대하여 난용성인 것에 기인하는 것으로 생각된다.

DNA-MG assay에 있어서 DNA-MG 복합체로부터 MG의 치환능과 DNA-complexing 물질의 생화학적 또는 생리활성과의 상호 관련성이 있음이 알려져 있다.⁴⁾ 따라서 본 검색의 결과를 토대로 각종 생약으로부터 유기용매층으로 이행되는 활성물질을 탐색한다면 DNA를 bioreceptor로 하는 생리활성물질의 발견을 기대할 수 있을 것으로 생각되며, 현재 차전자와 산초의 *n*-hexane 가용부에 대한 활성물질의 분리가 진행 중에 있다.

결 론

총 117종 생약의 MeOH 추출물에 대하여 DNA 결합능을 측정하여 2,000 μg/ml이하의 IC₅₀치를 나타내는 육계, 의이인, 황련, 소자, 차전자, 원지, 산초의 7종의 생약을 1차적으로 선별하였다. 이들을 용매분배법을 이용하여 *n*-hexane, CHCl₃ 및 60% 수성 MeOH 가용부로 나누고, 각 분획의 활성을 조사한 결과 차전자와 산초의 2종의 *n*-hexane 가용부가 각각 588 및 574 μg/ml의 IC₅₀치를 나타내는 것으로 확인되어 이들을 활성성분의 분리를 위한 후보생약으로 선별하였다.

감사의 말씀

이 논문은 1997년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 연구되었음을 감사드립니다.

문 헌

- 1) Kurnick, N. B. and Radcliffe, I. E. : Reaction between DNA and quinacrine and other antimalarials. *J. Lab. & Clin. Med.* **60**, 669 (1962).
- 2) Bates, H. M., Kuenzig, W. and Watson, W. B. : Studies on the mechanism of action of anthramycin methyl ether, a new antitumor antibiotic. *Cancer Res.* **29**, 2195 (1969).
- 3) Isetta, A. M., Intini, C. and Soldati, M. : On the immunodepressive action of adriamycin. *Experientia* **27**, 202 (1971).
- 4) Krey, A. K. and Hahn, F. E. : Studies on the methyl green-DNA complex and its dissociation by drugs. *Biochemistry* **14**, 5061 (1975).
- 5) Kurnick, N. B. : The determination of deoxyribonuclease activity by methyl green, application to serum. *Arch. Biochem.* **29**, 41 (1950).
- 6) Kurnick, N. B. and Foster, M. W. : Methyl green III. Reaction with desoxyribonucleic acid, stoichiometry, behavior of the reaction product. *J. Gen. Physiol.* **34**, 147 (1950).
- 7) Burren, N. S., Frigo, A., Rasmussen, R. R. and McAlpine, J. B. : A colorimetric microassay for the detection of agents that interact with DNA. *J. Nat. Prod.* **55**, 1582 (1992).
- 8) Desmarchelier, C., Mongelli, E., Coussio, J. and Ciccio, G. : Studies on the cytotoxicity, antimicrobial and DNA-binding activities of plants used by the Ese'ejas. *J. Ethnopharmacol.* **50**, 91 (1996).