

인체암세포주에 대한 천연자원의 세포독성 검색 (II)

이유희*, 박종대

한국인삼연초연구원

Cytotoxic Activities of Herbal Drugs Against Human Cancer Cell Lines (II)

You Hui Lee* and Jong Dae Park

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

Abstract - In our continuing search for new antineoplastic agents from natural products, one hundred and thirty-five herbal drugs were extracted with petroleum ether/ether (1:1), ethyl acetate and methyl alcohol, successively and their cytotoxicities were evaluated against A549 (human lung carcinoma) and SK-OV-3 (human ovary adenocarcinoma) cell lines. Among them, fifteen kinds of ether extracts, eighteen kinds of ethyl acetate extracts and seven kinds of methanol extracts showed significant cytotoxic activities (above 70% inhibition) against A549 cell lines at a concentration of 40 µg/ml, while ten kinds of ether extracts, thirteen kinds of ethyl acetate extracts and six kinds of methanol extracts demonstrated significant cytotoxic activities against SK-OV-3 cell lines at the above same concentration.

Key words - herbal drugs; solvent extracts; cytotoxicity; human cancer cell lines.

천연자원으로 부터 직접 또는 선도물질(lead compound)로서 개발 될 수 있는 부작용이 적고 항암 효과가 뛰어난 새로운 활성물질의 탐색연구의 일환으로서 인체 암세포에 대한 천연자원의 세포독성을 검색하였다. 저자 등은 일차적으로 201종의 생약에 대한 시험관내 항암효과를 검색한 결과를 전보¹⁾에서 이미 보고한바 있다. 이의 계속으로서 본 논문에서는 국내에서 채집한 135종의 식물자원의 용매 추출물을 만들어 인체 암세포주에 대해 세포독성효과를 검색하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

천연자원 - 인체 암세포독성 검색에 사용한 135종

*교신저자 : Fax 042-861-1949

의 천연자원은 계룡산, 지리산, 대전근교의 야산 및 한국인삼연초연구원 약초원에서 채집하여 음건 후 사용하였다. 이들 증거표본은 한국인삼연초연구원에 보관되어 있다.

검체 조제 - 음건한 천연자원은 전보¹⁾와 동일한 방법으로 처리하여 세포독성 검색에 필요한 검체를 제조하였다. 즉, 구입한 천연자원 각 20 g을 세말로 하여 petroleum ether/ethyl ether(1:1), ethyl acetate, methanol의 순서로 각각 3회 씩 실온에서 진탕하면서 추출하였다. 1회 사용한 추출용매는 각 200 ml이었다. 각 용매별로 합한 추출액을 감압 농축하여 각각의 용매추출물을 얻었다. 이 추출물들을 DMSO/ethanol(1:1)을 사용하여 20 mg/ml 농도로 제조하여 인체암세포주에 대한 세포독성 검색에 사용하였다.

세포독성 검색 - 세포독성 검색에 사용한 인체암 세포주는 A549(lung carcinoma, Human) 및 SK-OV-3(ovary adenocarcinoma, Human)로 전보에서 보고한 SRB 방법²⁾에 따라 검체의 세포독성을 검색하였다.

결과 및 고찰

전보에 이어 계속해서 천연자원으로 부터 새로운 계열의 항암물질을 분리하고자 우선 유효한 약용자원을 선별하기 위하여 2차로 천연자원 135종을 수집하였다. 각각의 petroleum ether/ethyl ether (1:1), ethyl acetate 및 methanol 추출물을 제조하여 용매추출물을 최종농도가 40 µg/ml가 되도록 하여 인체 암세포주인 A549 및 SK-OV-3에 대한 세포독성을 검색하였다. 검체의 활성은 암세포주의 성장율(Y%)로 표시하였다. 즉, 검체처리시 암세포주의 성장율이 30%이하이면 +++ , 30 %<Y≤

60%이면 ++ , 60<Y≤90%이면 + , Y>90%이면-로 판정하였다(Table I). Table I에 보인 바와 같이 135종의 자원식물에서 얻어진 각각 3종의 용매추출물들 중에서 1종 이상의 용매추출물이 A549 또는 SK-OV-3의 성장을 70% 이상 억제하는 효과를 나타내는 자원식물은 29 속 이었다. 즉, petroleum ether/ethyl ether(1:1), ethyl acetate 및 methanol추출물을 40 µg/ml 로 A549 세포주에 투여시 각각 15종, 18종, 7종의 용매추출물에서 암세포주의 성장율이 30%이하로 나타났고 SK-OV-3세포주에 같은 농도의 용매추출물을 투여시 각각 10종, 13종, 6종의 용매추출물에서 암세포의 성장율이 30%이하로 나타났다. 이들 29속, 30종의 자원들 중에서 *Agrimonia* 속,³⁾ *Artemisia* 속,⁴⁾ *Atractylodes* 속,⁵⁾ *Biota* 속,⁶⁾ *Cephalotaxus* 속,⁷⁾ *Chrysanthem* 속,⁸⁾ *Forsythia* 속,⁹⁾ *Juniperus* 속,¹⁰⁾ *Mallotus* 속,¹¹⁾ *Platycarya* 속,¹²⁾ *Polygonum* 속,¹³⁾ *Poncirus* 속,¹⁴⁾ *Trichosanthes*

Table I. Growth inhibition rates of crude drugs against human cancer cell lines

Herbal drug	A549			SK-OV-3			Voucher specimen
	E ^a	A ^b	M ^c	E	A	M	
Actinidiae Folium et Caulis	+	++	+	+	+	+	KG012
Actinidiae polygamae Fructus	++	+	-	+	+	-	KG401
<i>Adenophora remotiflora</i> (Herba)	-	-	-	+	++	+	KG402
Agastachis Herba	+	++	-	+	++	-	KG029
Agrimoniae Herba	+++	+++	++	++	++	+	KG278
<i>Ailantus altissima</i> (Folium)	++	++	++	++	++	+	KG403
Akebiae Caulis	+	+	++	+	++	++	KG096
<i>Akebia quinata</i> (Folium)	++	++	+	+	-	-	KG236
<i>Angelicae gigantis Radix</i>	++	+	-	++	+	-	KG064
Arisaemae Rhizoma	++	++	++	++	++	+	KG287
<i>Arisaema japonicum</i> (AP ^d)	++	++	++	++	++	++	KG405
Armeniaca Semen	-	+	+	-	+	+	KG337
Artemisiae apiaceae Herba	+++	++	+	+	+++	-	KG298
Artemisiae argyi Herba	++	+++	+	++	+++	+	KG199
Artemisiae capillaris Herba	+++	++	+	+++	+++	-	KG243
Asiasari Radix	+++	+++	++	+++	+++	++	KG406
Asparagi Radix	++	-	-	-	+	-	KG290
<i>Aster scabar</i> (AP)	+	+	-	+	+	+	KG308
<i>Aster scaber</i> (Radix)	+	+	-	+	+	-	KG407
<i>Aster tataricus</i> (AP)	+	+	-	+	+	-	KG015
Asteris Radix	+	+	-	++	-	-	KG246
Atractylodis Rhizoma	++	++	+	+	+	+	KG284
Atractylodis ovatae Rhizoma	+	+++	++	+++	++	+	KG126
<i>Atractylodes japonica</i> (AP)	++	++	-	+	+	+	KG430

Table I. continued

Herbal drug	A549			SK-OV-3			Voucher specimen
	E ^a	A ^b	M ^c	E	A	M	
Bidentis Herba	+	+	-	+	+	+	KG045
Biotae Folium et Ramulus	+++	+	-	+++	++	-	KG309
<i>Boehmeria nivea</i> (Herba)	+	-	++	+	++	+	KG252
Brassicae camphestris Semen	+	+	+	+	++	+	KG225
Brevipedunculatae Caulus	-	-	-	-	-	-	KG431
<i>Buxus microphylla</i> (Fructus)	++	++	+	++	++	+	KG363
Buxi Ramulus et Folium	++	++	++	+	++	++	KG362
Calystegiae Herba	-	++	+++	-	++	+++	KG087
<i>Cephalotaxus koreana</i> (Cortex)	+	+++	+++	-	+++	+++	KG016
Chaenomelis Fructus	+	-	-	+	+	+	KG091
Chebulae Fructus	+	+	+	-	-	+	KG002
Chrysanthemi Flos	++	++	++	+	++	+	KG006
Chrysanthemi Herba	+++	++	+	++	+	+	KG039
Citrus Semen	++	+	-	-	-	-	KG046
Clematidis Radix	+++	-	-	+++	+	+	KG228
Cnidii Rhizoma	+	-	-	-	++	+	KG285
Coicis Semen	-	+	++	++	-	-	KG239
Commelinae Herba	+	++	+	+	+	-	KG062
Corni Fructus	-	+	+	-	+	++	KG154
Crataegi Fructus	++	++	-	+	+	-	KG153
Dianthi Herba	+	++	++	-	++	+	KG036
Duchesneae Herba	+	+	+	++	++	-	KG144
Euonymi Lignum Suberalatum	++	++	++	++	++	+	KG409
<i>Euonymus alatus</i> (Ramulus)	+	++	++	+	+	++	KG355
<i>Euonymus oxyphylla</i> (Cortex)	++	++	++	++	+	+	KG282
<i>Euonymus sieboldianus</i> (Cortex)	++	+++	+++	+	++	+++	KG125
<i>Firmiana simplex</i> (Cortex)	+	+	+	+	+	+	KG410
Forsythiae Fructus	+++	++	+	++	-	+	KG207
<i>Forsythia viridissima</i> (Ramulus)	-	+	+	-	-	-	KG411
Galla Rhois	++	+++	+++	+	+++	+++	KG214
Gardeniae Fructus	+	-	-	+	++	-	KG310
Ginkgonis Folium	+	++	+	+	++	+	KG237
Ginkgonis Semen	++	+	-	++	+	+	KG110
Gleditsiae Fructus	++	++	++	++	++	+	KG264
Gleditsiae Spina	++	+++	+	++	+++	+	KG262
Helianthi Caulis Medulla	-	+	-	+	++	+	KG341
<i>Helianthus annuus</i> (AP)	-	+	-	+	++	++	KG413
Impatientis Herba	+	++	+	+	++	+	KG414
Impatientis Semen	+	+	+	+	++	-	KG050
<i>Impatientis textori</i> (Herba)	+	++	+	+	++	+	KG100
<i>Ixeris sonchifolia</i> (Herba)	+	+	+	+	+	+	KG021
Juniperi Folium et Ramulus	+++	+++	++	+++	+++	++	KG338
Kalopanax Cortex	+	+	++	++	-	-	KG335
Kerriae Flos	+	-	+	+	+	+	KG360
Leonuri Herba	++	+++	+	+	+++	+	KG240
<i>Leonurus sibiricus</i> (Semen)	+	-	-	+	+	-	KG307
Lilii Bulbus	++	++	+	+	+	+	KG129
<i>Liriodendron tulipifera</i> (Folium)	++	++	+	++	++	+	KG093

Table I. continued

Herbal drug	A549			SK-OV-3			Voucher specimen
	E ^a	A ^b	M ^c	E	A	M	
Liriodopsis Tuber	-	++	-	+	++	+	KG085
Lonicerae Flos	+	++	+	-	-	+	KG049
Lonicerae Folium et Caulis	++	++	-	+	+	-	KG242
Loranthi Ramulus	++	-	+	+	+	++	KG163
Lycii Fructus	+	-	+	+	-	+	KG035
Lycii Radicis Cortex	+	+	-	++	-	-	KG268
Magnoliae Flos	++	+	+	++	++	+	KG193
Malloti Cortex	+++	+++	+	+++	++	+	KG200
<i>Matricaria chamomilla</i> (Herba)	+	+	+	+	++	+	KG089
Maydis Stigmata	++	++	++	-	+	++	KG217
Mori Cortex	+	-	+	+	++	+	KG164
Mori Folium	+	+	+	+	+	-	KG166
Nelumbonis Rhizoma	++	++	+	++	++	+	KG208
Nelumbonis Semen	++	++	+	++	++	+	KG209
Oenanthi Herba	+	+	+	+	++	+	KG014
Oenotherae Herba	+	++	+	+	++	-	KG063
Oenotherae Radix	++	+	++	-	++	++	KG416
Paeoniae Radix	+	+	+	++	-	-	KG120
Perillae Folium	+	++	+	-	++	+	KG178
Perillae Semen	+	++	-	+	+	++	KG179
Persicae Semen	-	+	-	+	-	-	KG073
Pharbitidis Semen	-	-	+++	-	+	+++	KG124
Phaseoli Semen	++	++	++	+	+	++	KG255
<i>Phragmites communis</i> (Herba)	-	-	-	-	+	+	KG004
Phragmitis Rhizoma	-	+	+	-	-	-	KG056
Pini Folium	+	+	+	+	+	+	KG184
<i>Pini koraiensis</i> (Semen)	+++	+	+	++	+	+	KG336
Plantaginis Fructus	+	+	+	+	++	+	KG279
Plantaginis Herba	+	++	+	++	++	-	KG277
<i>Platycarya strobilacea</i> (Cortex)	++	+++	+	++	++	+	KG041
Platycodi Radix	+	+	-	+	+	-	KG051
Polygonum avicularis Herba	+++	+++	-	+++	++	+	KG326
Ponciri Fructus	++	+	-	++	++	+	KG271
Poncirus trifoliata Rafinesque	+++	+	-	++	++	+	KG267
Portulacae grandiflorae Herba	+	++	+	+	++	+	KG104
Portulacae Herba	+	++	+	+	+	+	KG186
Pruni Cortex	++	+	+	++	-	+	KG418
<i>Prunus persica</i> (FR ^e)	-	-	-	++	++	-	KG152
<i>Pteridium aquilinum</i> (Herba)	-	+	+	-	++	++	KG419
Pulsatillae Herba	++	++	++	+	+	+	KG420
Pyrolae Herba	+	+	+	+	+	+	KG058
Rubi Fructus	-	+	++	+	++	+	KG133
<i>Rubi parvifolius</i> (Herba)	++	+	+	++	++	+	KG421
Rubra paeoniae Radix	+	+	+	++	++	-	KG422
Rumecis Radix	++	+	+	+	+	+	KG150
<i>Rumex japonicus</i> (Herba)	++	+	+	+	+	+	KG423
Salicis Rhizoma	+	++	-	++	+++	+	KG229
<i>Salix babylonica</i> (Cortex)	++	+	-	++	+	-	KG230

Table I. continued

Herbal drug	A549			SK-OV-3			Voucher specimen
	E ^a	A ^b	M ^c	E	A	M	
Siegesbeckiae Herba	++	+	+	++	++	++	KG369
Solani nigri Herba	++	++	++	+	+	+	KG053
Sophae Flos	+	+++	+++	-	+	+	KG034
Sorbus Cortex	+++	+++	+	+++	+	+	KG257
Spirodelae Herba	+	++	++	++	+	+	KG137
Taxi Folium et Ramulus	+	++	++	+	++	++	KG265
Theae Folium	+	++	+	+	++	+	KG060
Trichosanthis Radix	+	+++	+++	+	+++	+++	KG032
Trichosanthis Semen	+	++	++	+	++	++	KG033
Violae Herba	+	++	+	+	++	-	KG273
<i>Xanthium strumarium</i> (Herba)	+	++	+	+	+++	+	KG426
<i>Zanthoxylum piperatum</i> (Cortex)	+	+++	+	+	++	+	KG427
Zawadskii Herba	+	+++	++	+	+++	+	KG037
<i>Zea mays</i> (Seman)	-	+	-	+	+	+	KG428
Zingiberis Rhizoma	+++	++	++	+++	++	++	KG169

Voucher specimens are kept in Korea Ginseng Tobacco Research Institute. Growth ratio (Y%) at a concentration of 40 µg/ml, +++: Y≤30%, ++: 30%<Y≤60%, +: 60%<Y≤90%, -: Y>90%. A549: human lung carcinoma, SK-OV-3: human ovary adenocarcinoma. ^aE: petroleum ether/ethyl ether (1:1) extract, ^bA: ethyl acetate extract, ^cM: methanol extract. ^dAP: aerial part, ^eFR: Folium et Ramulus.

속,¹⁵⁾ *Xanthium* 속,¹⁶⁾ *Zanthoxylum* 속¹⁷⁾ 자원에 대해서는 항암관련 연구가 보고된 바 있다.

본 저자들은 이와 같이 40 µg/ml 농도에서 인체 암세포주인 A549 및 SK-OV-3의 성장을 70% 이상 억제하는 천연자원중 *Asiasari Radix*,¹⁸⁾ *Euonymus sieboldianus*(Cortex)¹⁹⁾ 등으로 부터 유효 성분 순수분리하여 그 화학구조를 규명하였으며, 그 밖에 유효한 결과를 보이는 천연자원중 아직 항암작용에 대해 연구되어진 바가 없는 자원을 선별하여 항암활성 성분을 순수분리하여 화학구조를 규명중에 있다. 또한, 항암물질의 개발을 위해서 본 연구에서 검색하지 않은 다양한 자원을 대상으로 추후 지속적인 검색을 할 예정이다.

결 론

천연자원으로 부터 새로운 항암활성 물질을 탐색하고자 국내에서 135종의 천연자원을 수집하여 이들의 petroleum ether/ethyl ether(1:1) 추출물, ethyl acetate 추출물 및 methanol 추출물을 조제하여 40 µg/ml 농도로 인체암세포주에 대해 대해 시험관내 항암검정을 수행한 결과 petroleum ether/ethyl ether(1:1) 추출물, ethyl acetate

추출물 및 methanol 추출물 각각이 A549에 대해서는 15, 18, 7종에서 암세포주의 성장을 70% 이상 억제하는 효과를 보여주었고, SK-OV-3에 대해서는 각각 10, 13, 6종의 용매추출물에서 70% 이상의 강한 암세포주 성장억제 효과를 보여 주어 추후 새로운 항암활성 물질의 개발 가능성을 보여주었다.

인용문헌

1. Lee, Y. H., Park, J. D. and Kim, S. I. (1998) Cytotoxic activities of herbal drugs against human cancer cell lines (I). *Kor. J. Pharmacogn.* 29: 323-330.
2. Skehan, P., Storeng, R., Schudiero, D. A., Monks, A., McMahn, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenny, S. and Boyd, M. R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J. of Natl. Cancer Inst.* 82: 1107-1112.
3. Koshiura, R., Miyamoto, K., Ikeya, Y. and Taguchi, H. (1985) Antitumor activity of methanol extract from roots of *Agrimonia pilosa Ledeb.* *Jpn. J. Pharmacol.* 38: 9-16.
4. Zheng, G. Q. (1994) Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *Artemisia annua*. *Planta Med.* 60: 54-57.

5. Lien, E. J. and Wen, Y. L. (1985) Structure-activity relationship analysis of Chinese anti-cancer drugs and related plants, 21. Oriental Healing Arts Institute, Taiwan, R.O.C.
6. Kosuge, T., Yokota, M., Sugiyama, K., Saito, M., Iwata, Y., Nakura, M. and Yamamoto, T. (1985) Studies on anticancer principles in Chinese medicines. II. Cytotoxic principles in *Biota orientalis* (L.) Endl. and *Kaempferia galanga*. *Chem. Pharm. Bull.* 33: 5565-5567.
7. Smith, C. R. Jr., Powell, R. G. and Mikolajczak, K. L. (1976) The genus *Cephalotaxus*: source of homoharringtonine and related anticancer alkaloids. *Cancer Treat. Rep.* 60: 1157-70.
8. Nam, S. H. and Yang, M. S. (1995) Isolation of cytotoxic substances from *Chrysanthemum boreale* M. *Kor. Soc. Agricultural Chemistry and Biotechnology* 30: 273-277.
9. 이준성, 민병선, 배기환 (1996) L1210 및 HL60에 대한 연교의 세포독성 성분. *약학회지* 40: 462-467.
10. Cairnes, D. A., Ekundayo, O. and Kingston, D. G. (1980) Plant anticancer agents. X. lignans from *Juniperus phoenicea*. *J. Nat. Prod.* 43: 495-497.
11. Arisawa, M., Fujita, A., Hayashi, T., Morita, N., Kikuchi, T. and Tezuka, Y. (1990) Studies on cytotoxic constituents in pericarps of *Mallotus japonicus*. IV. *Chem. Pharm. Bull.* 38: 698-700.
12. 김양일, 이승호, 조태순 (1996) 굴피나무잎으로부터 항암활성을 갖는 천연물질의 분리. *생약학회지* 27: 238-245.
13. Yeh, S. F., Chou, T. C. and Liu, T. S. (1988) Effects of anthraquinones of *Polygonum cuspidatum* on HL-60 cells. *Planta Med.* 54: 413-414.
14. Kang, K. S. and Ahn, B. Z. (1985) Antineoplastic natural products and analogues IV, auraptin, the cytotoxic coumarin from *Poncirus trifoliata* against L1210. *Arch. Pharm. Res.* 8: 187-190.
15. Ryu, S. Y., Lee, S. H., Choi, S. U., Lee, J. O., No, Z. and Ahn, J. W. (1995) Antitumor activity of *Trichosanthes kirilowii*. *Arch. Pharm. Res.* 17: 348-353.
16. Roussakis, C., Chinou, I., Vayas, C., Harvala, C. and Verbist, J. F. (1994) Cytotoxic activity of xanthatin and the crude extracts of *Xanthium strumarium*. *Planta Med.* 60: 473-474.
17. Chen, I. S., Wu, S. J. and Tsai, I. L. (1994) Chemical and bioactive constituents from *Zanthoxylum simulans*. *J. Nat. Prod.* 57: 1206-1211.
18. Park, J. D., Baek, N. I., Lee, Y. H. and Kim, S. I. (1996) Isolation of a cytotoxic agent from *Asiasari radix*. *Arch. Pharm. Res.* 19: 559-561.
19. Baek, N. I., Lee, Y. H., Park, J. D., Kim, S. I. and Ahn, B. Z. (1994) Euonymoside A, a new cytotoxic cardenolide glycoside from the bark of *Euonymos siboldianus*. *Planta Med.* 60: 26-29.

(1999년 2월 26일 접수)