雷公藤 디클로메탄(CH_2Cl_2)분획의 항암효능 연구

박완수*

국군벽제병원 한방과

Study on the Antitumor Activity of Dichloromethane Extract of *Tripterygium regelii* SPRAGUE

Wan Su Park*

Department of Korean medicine, The Armed Forces Byukje Hospital

Tripterygium regelii SPRAGUE is distributed in Korea and Northern China. This extract has been used as a herb medicine, especially antiparasitic, anti-inflammatory and detoxifying agent in East asia. During our research to develop new antitumor agents from natural products, Dichloromethane (CH_2Cl_2) extract of *Tripterygium regelii* SPRAGUE (DTR) showed the potent apoptotic effects in A-549 lung cancer, HeLa-3 cervical cancer, SKMEL-2 melanoma cells in a dose-dependent manner. In order to purify major compounds from DTR, column chromatography was carried out gradually. Silica gel and RP-18 column chromatography for active fractions led to the isolation of a compound. The compound determined by ^{1}H-NMR was turned out to be Celastrol known to have antitumor activity.

Key words : *Tripterygium regelii* SPRAGUE, apoptotic effect, A-549, HeLa-3, SKMEL-2, Celastrol

서 론

뇌공등(雷公藤, *Tripterygium regelii* SPRAGUE, 미역줄나무)은 우리나라의 산지에서 비교적 흔히 자라는 노박덩굴과(Celastraceae)의 여러해살이 落葉蔓莖 나무이다. 나무의 길이는 2 m 정도에 달하고 가지는 적갈색이며 '옴'같은 돌기가 촘촘하게 분포하고, 가지에 털은 없으나 5줄의 稜線이 있으며 2년째가 되는 가지는 흑갈색을 띤다. 잎은 어긋나서 나오고(互生), 밝은 녹색의 넓은 계란형의 모양을 하고 있으며 그 끝이 뾰족한 尖頭形이고 길이가 5~15 cm, 나비 4~10 cm 로서 표면은 털이 없으나 뒷면은 잎맥 위에 털이 있고 가장자리에 둔한 톱니가 있다. 葉柄은 길이 1.5~3 cm 로서 적갈색이며 털이 없고 마르면 잎과 더불어 흑색으로 된다. 꽃은 圓錐花序로 6~7월에 피고 頂生 혹은 腋生하며 길이 10~25 cm, 지름 5~6 mm 로서 하얀색이고 꽃받침잎과 꽃잎 및 수술은 각각 5개이며 子房은 3室이고 삼각형으로 1개이다. 열매는 翅果로서 연한 녹색이지만 흔히 붉은 빛이 돌고 9~10월에 익으며 3개의 날개가 있고 날개는 끝이 오목하며 길이와 나비가 각각 12~18 mm이다[1,2]. 중국에서는 동속 식물인 'Tripterygium wilfordii'를 '雷公藤'이라 하여[3] 이 두 식물의 성미와 효능을 유사한 것으로 설명하면서, 苦味를 가지고 있는 祛風除濕藥으로 분류하여 風濕으로 인한 積聚와 암 등의 치료에 사용하나 大毒하므로 사용 시 유의할 것과 살충, 소염, 해독작용 등이 보고되어 있다[4]. 분리된 성분으로는 triptoquinone-A[5], triptofordin-A[6], triptogerlin A-1[7] 등이 있으며 regelin과 regelinol[8]은 항암작용이 있는 성분으로 알려져 있다.

최근에 한국, 중국, 일본 등의 전통의학에서 사용되는 다양한 천연물로부터 새로운 항암제를 개발하려는 연구가 본격적으로 진행되고 있으며 韓醫學에서 사용되는 韓藥를 이용한 항암활성 연구도 활발히 진행되고 있다[9].

본 연자는 전보[10]에서 미역줄나무가 다양한 항암활성을 나타냄을 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 '뇌공등(雷公藤)'의 디클로메탄(CH_2Cl_2) 분획(dichloromethane extract of *Tripterygium regelii* SPRAGUE : DTR)의 농도별 처리가 A-549(폐암), HELA-S3(자궁경부암), SKMEL-2(흑색종) cells 증식에 미치는 영향과 순차적인 Column Chromatography를 통하여 분리된 화합물들의 ^{1}H-Nuclear Magnetic Resonance (^{1}H-NMR) spectrum 양상을 관찰하였으며, 이를 통하여 한약재로부터의 새로운 항암치료물질 개발 가능성을 모색하였다.

* 교신저자 : 박완수, 경기도 고양시 벽제동 산 57 국군벽제병원 한방과

· E-mail : han-gl@daum.net, · Tel : 031-963-6657

· 접수 : 2006/07/19 · 수정 : 2006/08/28 · 채택 : 2006/09/20

재료 및 방법

1. 실험재료

1994년 8월 강원도 사명산에 자생하는 미역줄나무 (*Tripterygium regelii* SPRAGUE)의 줄기와 잎을 채집하여 정확히 감정한 후 사용하였다.

2. 시약 및 기기

1) 시약

추출 및 분획용 시약은 1급 시약을 사용하였고 분취용 column chromatography에 사용한 흡착제로는 Kieselgel 60 (230-400 mesh, ASTM, Art. 9385, Merck)을 사용하였다. Thin layer chromatography용 plate는 precoated silica gel 60F254 plate (layer thickness 0.25 ㎜, 20×20 ㎝, Art. 5715, Merck)와 precoated RP-18F254S (layer thickness 0.25 ㎜, 20×20 ㎝, Art. 15423, Merck), precoated silica gel 60F254 plate (layer thickness 1 ㎜, 20×20 ㎝, Art. 13895, Merck)를 사용하였으며 ^{1}H-NMR spectrum 측정을 위해서는 Varian GEMINI 300 spectrometer (300 ㎒, Varian)를 사용하였다.

3. 세포 생존율 측정

Human Tumor disease-oriented screening test 방법 중의 하나인 MTT assay에 의하여 DTR의 암세포 증식억제효과를 검색하였다. 이 실험은 한국과학기술연구원 스크리닝실에 의뢰하여 실시하였다. 여기서 MTT assay란 살아있는 암세포 내의 미토콘드리아에 있는 succinate dehydrogenase라는 효소에 의하여 MTT시약(노란색)이 formazan으로 환원되는 것을 이용하는 것으로서 이 formazan이 진한 보라색으로 발색하는 점에 착안하여 microplate reader를 이용, 540nm에서의 Optical Density(흡광도: OD)를 측정하고 그 흡광정도에 따라 암세포의 생존율을 추정하는 것이며 여기서 약물로 처리한 암세포와 약물처리하지 않은 암세포와의 OD 수치를 비교하여 암세포 증식억제효과를 계산해 내었다. 실험에 사용된 Tumor Cell line은 A-549(폐암), SKMEL-2(흑색종), HELA-S3(자궁경부암) 등이다. Cell viability는 다음 공식으로 계산되었다. Cell viability (%) = 100 × AT/ AC, AC- absorbance of control, AT- absorbance of tested extract solution.

4. DTR로부터 화합물 분리와 ^{1}H-NMR 측정

미역줄나무(fresh weight : 5 ㎏)의 전초를 그늘에서 말려 작은 조각으로 자른 후 MeOH에 침전시켜 실온에서 3-4일 동안 추출하였다. 추출은 3회에 걸쳐 하였는데 1회에 MeOH 9 ℓ씩 사용하였다. 추출액을 여과하여 40 ℃ 이하에서 감압농축하여 MeOH extract (ext.)을 153 g 얻었다. 이 MeOH ext.을 증류수로 녹인 후 CH_2Cl_2을 가하여 분획을 얻었다. 미역줄나무의 CH_2Cl_2 분획이 초기단계의 암세포 성장억제실험에서 높은 활성을 나타내었으므로 CH_2Cl_2 ext.으로 silica gel 및 flash, RP-18 column chromatography를 반복 실시하여 화합물들을 분리하였다. 이 때 사용한 용매는 Hexane : CH_2Cl_2 = 1 : 4이고 MeOH의 양을 증가시켜 극성을 높여가며 화합물을 용출시켜 소분획으로 나누었으며 이 소분획을 CH_2Cl_2 : MeOH = 35 : 1, CH_2Cl_2 : EtOAc = 1 : 1, Hexane : EtOAc = 1 : 1의 혼합용매로 순차적인 column chromatography를 실시하였다. 분리된 화합물의 ^{1}H-NMR spectrum을 측정하였다.

5. 분리된 compound의 methylation과 ^{1}H-NMR 측정

위에서 얻은 화합물을 무수 CH_2Cl_2로 녹이고 CH_2N_2를 서서히 첨가하여 1시간동안 교반하였다. 이를 농축하여 silica gel을 사용한 column chromatography를 실시하였다. 이때 사용한 용매는 Hexane : EtoAc = 2 : 1이었고 또한 이를 통하여 얻어진 새로운 화합물의 ^{1}H-NMR spectrum을 측정하였다.

6. 통계처리

실험성적은 Mean ± S.E로 나타내었으며, 대조군과 각 실험군과의 평균의 차이는 ANOVA test로 검정하여 $p<0.05$일 때를 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

1. A-549에 대한 DTR의 증식억제효과 측정 결과

DTR의 A-549 세포에 대한 증식억제효과를 측정하기 위하여 시료 10, 100, 300 ug/ml의 범위에 대하여 96시간동안 배양한 후 세포 생존율을 측정한 결과 DTR이 처리된 군의 세포생존율은 대조군(100 %)에 비하여 각각 90.09 %($p<0.05$), 81.39 %($p<0.01$), 4.25 %($p<0.01$)로 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 1).

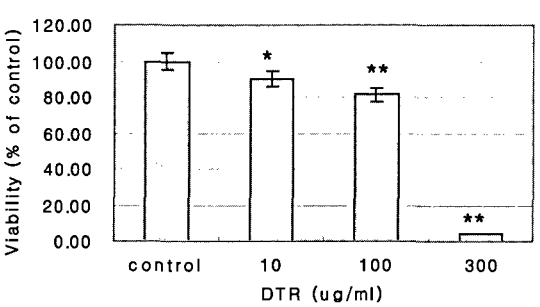

Fig. 1. Effects of dichloromethane extract of *Tripterygium regelii* SPRAGUE (DTR) on cell viability in A-549 cells. Cells were incubated in the presence or absence of DTR at 37 ℃ for 96 h. Cell viability was measured by MTT assay. Each column represents mean ± S.E with respect to 100% of control. *p(0.05, **p(0.01 vs control.

2. HELA-S3에 대한 DTR의 증식억제효과 측정 결과

DTR의 HELA-S3 세포에 대한 증식억제효과를 측정하기 위하여 시료 10, 100, 300 ug/ml의 범위에 대하여 96시간동안 배양한 후 세포 생존율을 측정한 결과 DTR이 처리된 군의 세포생존율은 대조군(100 %)에 비하여 각각 95.69 %($p<0.01$), 5.68 %($p<0.01$), 4.51 %($p<0.01$)로 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 2).

3. SKMEL-2에 대한 DTR의 증식억제효과 측정 결과

DTR의 SKMEL-2 세포에 대한 증식억제효과를 측정하기 위하여 시료 10, 100, 300 ug/ml의 범위에 대하여 96시간동안 배양한 후 세포 생존율을 측정한 결과 DTR이 10 ug/ml의 농도로 처

리된 군의 세포생존율은 대조군(100 %)에 비하여 121.18 %로 증가하였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다. 그러나 DTR이 100, 300 ug/ml의 농도로 처리된 군의 세포생존율은 대조군(100 %)에 비하여 각각 1.41 %($p<0.01$), 8.70 %($p<0.01$)로 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 3).

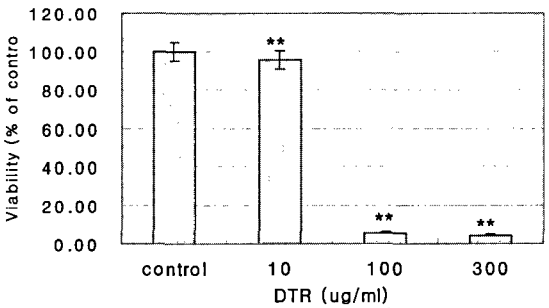

Fig. 2. Effects of dichloromethane extract of *Tripterygium regelii* SPRAGUE (DTR) on cell viability in HELA-S3 cells. Cells were incubatec in the presence or absence of DTR at 37 ℃ for 96 h. Cell viability was measured by MTT assay. Each column represents mean ± S.E with respect to 100 % of control. **p<0.01 vs control.

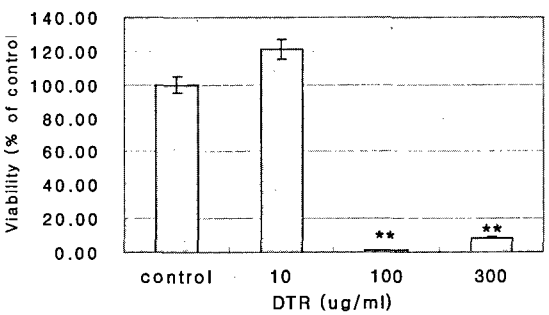

Fig. 3. Effects of dichloromethane extract of *Tripterygium regelii* SPRAGUE (DTR) on cell viability in SKMEL-2 cells. Cells were incubated in the presence or absence of DTR at 37 ℃ for 96 h. Cell viability was measured by MTT assay. Each column represents mean ± S.E with respect to 100 % of control. **p<0.01 vs control.

4. DTR로부터 분리된 화합물의 methylation과 ^{1}H-NMR spectrum측정 결과

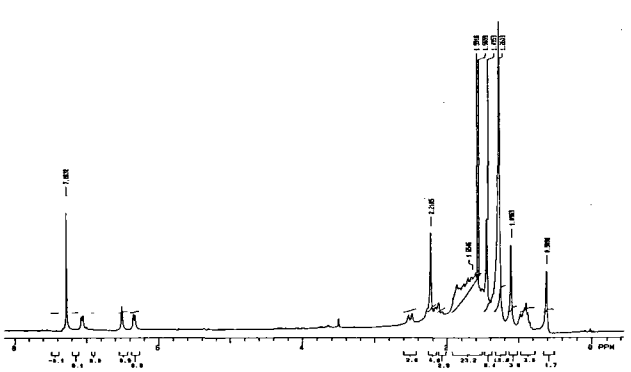

Fig. 4. 300 ㎒ ^{1}H nuclear magnetic resonance spectrum of compound I isolated from dichloromethane extract of *Tripterygium regelii* SPRAGUE in $CDCl_3$.

DTR로 순차적인 column chromatography를 실시하여 얻어진 compound I의 ^{1}H-NMR spectrum을 측정하였으며(Fig. 4), 이 화합물을 methylation시켜서 얻어진 새로운 화합물의 ^{1}H-NMR spectrum도 측정하였다(Fig. 5).

^{1}H-NMR spectrum data 분석 결과 분리된 화합물과 methylation된 화합물이 이미 전보[10]에서 보고된 Celastrol ($C_{29}H_{38}O_4$)과 Pristimerin (Celastrol이 methylation된 것: $C_{30}H_{40}O_4$)임을 알 수 있었다. Celastrol은 항암작용이 있는 화합물로 보고되어 있다[11].

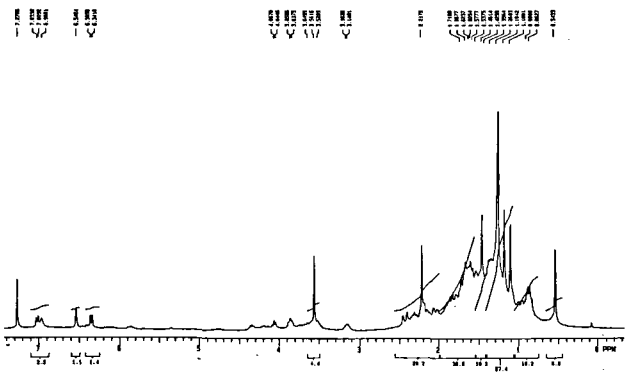

Fig. 5. 300 ㎒ ^{1}H nuclear magnetic resonance spectrum of a methylated compound I isolated from dichloromethane extract of *Tripterygium regelii* SPRAGUE in $CDCl_3$.

결 론

뇌공등(雷公藤, *Tripterygium regelii* SPRAGUE, 미역줄 나무)은 중국 등에서 항암제로 연구, 개발되어 사용되고 있다. 이러한 뇌공등의 디클로메탄분획(DTR)에 대하여 항암효능 검색실험(Antitumor Screening Test)과 순차적인 Column Chromatography를 통한 화합물 분리 및 ^{1}H-NMR spectrum 측정실험을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

DTR이 10, 100, 300 ug/ml의 농도로 96시간동안 처리된 A-549 cells의 세포생존율은 대조군(100 %)에 비하여 각각 90.09 %($p<0.05$), 81.39 %($p<0.01$), 4.25 %($p<0.01$)로 유의한 감소를 나타내었다. DTR이 10, 100, 300 ug/ml의 농도로 96시간동안 처리된 HELA-S3 cells의 세포생존율은 대조군(100 %)에 비하여 각각 95.69 %($p<0.01$), 5.68 %($p<0.01$), 4.51 %($p<0.01$)로 유의한 감소를 나타내었다. DTR이 100, 300 ug/ml의 농도로 96시간동안 처리된 SKMEL-2 cells의 세포생존율은 대조군(100 %)에 비하여 각각 1.41 %($p<0.01$), 8.70 %($p<0.01$)로 유의한 감소를 나타내었고 10 ug/ml로 처리된 군은 121.18 %의 증가를 나타내었으나 통계적 유의성은 없었다. 의 ^{1}H-NMR spectrum data 분석을 통하여 DTR로부터 분리된 compound I 은 항암효능이 있는 것으로 이미 알려진 Celastrol임을 알 수 있었다.

앞으로 뇌공등 디클로메탄(CH_2CL_2) 분획의 항암제로의 개발을 위해서 보다 정확한 세포고사(apoptosis) 기전연구와 in vivo 연구가 필요하리라 사료된다.

참고문헌

1. 이창복. 대한식물도감. 서울, 향문사. p 521, 1989.

2. R, Chen. Zhong Guo Shu Mu Fen Lei Xue. p 692, 1957.
3. 낙화생. 면역과 한방(안덕균 역). 서울, 열린 책들. pp 107-119, 1992.
4. 新文豊出版社. 중약대사전. 타이완, 新文豊出版社. p 5349, 1991.
5. Moritoki, H., Hisayama, T., Kida, K., Kondoh, W., Inoue, S., Takaishi, Y. Inhibition by triptoquinone-A of LPS- and IL-1 beta-primed induction of NO synthase in rat thoracic aorta. Life Sci. 59(3):49-54, 1996.
6. Hayashi, K., Hayashi, T., Ujita, K., Takaishi, Y. Characterization of antiviral activity of a sesquiterpene, triptofordin C-2. J Antimicrob Chemother. 37(4):759-768, 1996.
7. Ujita, K., Takaishi, Y., Tokuda, H., Nishino, H., Iwashima, A., Fujita, T. Inhibitory effects of triptogelin A-1 on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced skin tumor promotion. Cancer Lett. 68(2-3):129-313, 1993.
8. Hori, H., Pang, G.M., Harimaya, K., Iitaka, Y., Inayama, S. Isolation and structure of regelin and regelinol, new antitumor ursene-type triterpenoids from *Tripterygium regelii*. Chem Pharm Bull. 35(5):2125-2128, 1987.
9. 권강범, 김은경, 정은실, 황인진, 김우경, 심정섭, 김강산, 신병철, 송용선, 류도곤. HepG2 간암세포주기에 대한 附子 추출물의 효과. 동의생리병리학회지 18(2):427-430, 2004.
10. Park, W.S. Study on the Antitumor Activity of *Tripterygium regelii* Sprague. Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 19(2):441-445, 2005.
11. Allison, A.C., Cacabelos, R., Lombardi, V.R., Alvarez, X.A., Vigo, C. Celastrol, a potent antioxidant and anti-inflammatory drug, as a possible treatment for Alzheimer's disease. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 25(7):1341-1357, 2001.