

## 濟州道産 括蕒根으로부터 Trichosanthin의 분리 및 확인

정 덕 상 · 이 선 주  
제주대학교 자연과학대학 화학과

### Isolation and Identification of Trichosanthin of *Trichosanthis Radix* in Cheju Island

Duksang Jung · Sunjoo Lee

Department of Chemistry, College of Natural Science, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea

#### Abstract

Trichosanthin, a protein from the Korean medical herb *Trichosanthes kirillowii*, was isolated in two essentially quantitative steps involving Superdex chromatography and HPLC. Final purification of trichosanthin was achieved by reverse-phase HPLC employing a Vydac C4 column(0.46×25cm).

#### 1. 서 론

하늘타리(*Trichosanthes kirillowii* Maximowicz)는 우리나라의 동남부 및 중국, 몽고, 대만, 일본 등에 분포하는 박과에 속하는 다년생 초본으로 塊根은 비대하고, 줄기는 가늘고 길며 줄기에서 세 갈래의 덩굴손이 나와 다른 물체나 나무를 감고 뻗어 올라간다. 잎은 어긋나며 葉柄이 길고 5~7갈래로 깊게 또는 얇게 갈라지며, 끝은 날카롭거나 뭉뚝하고 밑은 심장형이며 거친 치아 모양의 톱니가 있다. 꽃은 7~8월에 피며 자웅이주이고 액출하며, 花梗이 길고 花冠은 白色으로 윗가장자리는 실 모양으로 분열한다. 꽃잎은 5개이며 裂片은 황색이고 수술은 3개이다. 열매는 瓠果로 卵圓形이고 성숙시 橙黃色을 띠며 많은 종자가 들어 있으며, 이 종자를 팔루인(括樓仁)이라고 한다. 塊根은 팔루근(括樓根, *Trichosanthis Radix*)이라고 하는데, 中藥學에서는 天花粉이라 한다. 팔루근은 맛은 쓰고 성질은 차며 폐, 위, 대장에

작용한다. 한방에서 身熱煩渴을 푸는 갈증약으로 咳嗽, 痰咳, 通經, 止渴, 解熱, 利尿, 排膿, 便秘, 催乳劑 및 糖尿病 등의 여러 곳에 사용하여왔다<sup>1,2,3,4,5,6,7</sup>.

팔루근에는 사포닌(약 1%),  $\Delta^7$ stigmasterol, 단백질, 아미노산, 당류 및 전분을 함유하고, 신선한 뿌리 중에는 천화분단백을 함유하고 있다고 알려져 있다<sup>4,5,6</sup>.

팔루근(生根)의 水抽出物 및 에탄올 抽出物은 진통 촉진효과가 있고, 또한 평활근의 수축작용이 있음이 보고되었으며<sup>8</sup>, 이 계열의 생약에서 분리된 trichosanthin(단백질 분획물)이 urinyl pregnandiol 과 estero의 분비량에 변화를 주고 있는데, 이는 특히 임신 2기, 3기에서 현저하다고 보고되어 있다<sup>9</sup>.

현재 중국에서는 신선한 팔루근을 이용하여 注射用 天花粉, 括蕒錠, 括蕒單 및 複方煎劑 등을 조제하여 임상에 응용하고 있다<sup>4,10</sup>. 약리작용으로는 천화분단백은 *in vitro*, *in vivo* 어떤 경우에도 태반의 營養膜細胞에 직접 작용하며, 또한 특이하게 작용한다<sup>11</sup>. 또 既分化合胞體細胞에 대해서 未分化合胞體細胞에 대한

보다 예민하게 반응하며, 선택적으로 胎盤絨毛合胞體營養膜細胞를 현저하게 변성, 괴사에 이르게 해, 각각 변성 받기 어려운 膠原纖維에도 변성이 일어난다. 이 단백질은 거의 營養膜細胞에만 변성괴사를 일으키고, 체내의 기타세포에 대한 영향은 극히 적다.

천화분체제는 mouse의 U-14(자궁경암 14), S-180, Ehrlich복수암세포의 증식을 억제하며, 융모성 gonatrophin의 생산까지도 억제하고, 실험동물의 固形癌 및 復水癌의 어느 경우에도 억제작용을 보였다고 보고되었다<sup>12,13</sup>.

임상응용으로는 絨毛膜上皮癌, 惡性胞狀奇胎, 乳癌, 胃癌, 脾臟癌, 肺癌 등의 치료에 사용하고 있는데, 천화분체제 단독투여 또는 화학요법 및 수술과 병용한 경우에 단기치료 47건 중 치료율은 97.9%에 달하여, 그 중 7건은 천화분단독투여로 치유된 것으로 보고되었다<sup>4</sup>.

또 1989년에는 trichosanthin이 HIV-1의 복제를 저해한다는 것을 알게되어 주목을 받아 ADIS환자의 치료에 좋은 결과를 나타내기도 했지만, 신경독성효과와 과민증의 부작용이 일어나 사용에 주의를 기울여 한다<sup>10,11,13</sup>.

그러나 이렇게 주목받고 있는 연구대상인 trichosanthin은 거의 중국산의 팔루근으로부터 추출된 것이다. 본 연구에서는 제주산 팔루근에서 trichosanthin을 분리·확인하여 중국산의 팔루근과 비교·고찰하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 재료 및 시약

하늘타리의 뿌리(팔루근)는 남제주군 의귀리 소재 파수원에서 1996년 늦가을에 채취한 것을 음지에서 건조된 것을 분쇄하여 실험에 사용하였다. Chromatograph용 고정상은 ICN사의 Superdex 75R(1.5×49.48cm)과 Sigma社의 CM-Sephadex C-25(1.0×50cm)를 각각 사용하였고, Dialysis Membrane은 Allied사의 Standard cellulose dialysis tubing(Vol/cm = 2ml), Filter Membrane 및 기타 다른 시약들은 Sigma 및

Aldrich 社의 제품을 사용하였다. 또한 Buffer Solution은 정제 과정과 가스 제거 과정을 거친 시약을 사용하였다. 증류수는 3차 증류수를 이용하였다.

### 2.2. 기기

LC는 ISCO사의 LC system 210, HPLC는 Amersham pharmacia biotec ACTA System (PH/C-900, UV-900, P-900, Frac-900)에 Vydac C4 column(0.46×25cm)을 장착하여 사용하였고, 전기영동은 Hoefer Mighty Small 2 SE 250/SE 260/SE, 원심분리기는 Hanil Mega 17R 그리고 질소가압농축기는 Amicon Model 8010을 사용하였다.

### 2.3. Trichosanthin의 분리 및 정제

이미 알려진 방법<sup>14</sup>에 따라, 하늘타리의 건조된 구근을 분쇄하여 분말로 만든 후 150 μm의 체로 거른 다음 그 분말 50.00g을 Phosphate Buffered Saline용액(PBS) 250ml에 현탁시킨 후 약 한 시간정도 교반시킨 다음, 크고 용해되지 않는 입자들을 거친 무명으로 한 번 걸러낸 후 4 °C 에서 하룻밤 교반시킨다. 교반된 혼합물을 여과시켜, 여액을 12,000 rpm으로 15분간 원심분리시킨다. 이 과정을 3회 반복한 후 상정액을 취해 10 kDa membrane으로 질소가압농축시킨다. Membrane에 걸러진 용액 10 ml를 pH 6.0의 0.1 M Sodium Phosphate 1 L에 하루밤동안 투석시킨다. 시료를 균질·정화시키기 위해 12,000 rpm으로 15분간 다시 한번 원심분리를 한다.

#### 2.3.1. Superdex 75R Chromatography에 의한 예비분리

0.1 M Sodium Phosphate(buffer A : pH 6.0)로 Superdex 75R 충전 column을 평형 조절시킨 후, 0.3 M NaCl이 함유된 완충용액(pH 6.0인 0.1M Sodium Phosphate)을 용리-buffer로 사용하여 시료용액을 흘러보내 용리시켰다. 이때 용리-buffer의 흐름속도는 0.3 ml/hr를 유지하였고, 총 전개시간은 약 3.5시간이 소요되었으며, 용리액의 흡광도는 280 nm에서 관측되었다. 용출분획은 각 튜브 당 1분으로 자동으로 시료채취가 가능하게 하였다.

2.3.2. CM-Sephadex Chromatography에 의한 분리확인

Buffer A로 평형 조절된 CM-Sephadex 충전 column에 시료용액을 흘려보내 용리시켰다. 시료의 용리과정에서 처음 3시간동안은 0.1 M Sodium Phosphate(buffer A : pH 6.0)를 용리-buffer로 이용하였고, 그 이후에는 buffer B, 즉 0.3 M NaCl이 함유된 완충용액(pH 6.0인 0.1M Sodium Phosphate)을 용리-buffer로 사용하였으며, 용리-buffer의 흐름속도는 80 ml/hr를 유지하였다. 이 때 용리액의 흡광도는 280 nm에서 측정되었고, PBS에 대하여 분명하게 작은 부분으로 분획되고 투석되었음을 알 수 있었다.

CM-Sephadex chromatography 전개시에 0.3 M NaCl이 함유된 buffer B의 사용 후에 나타난 peak부분을 받아 PBS용액에 - 20 °C에서 저장하였다. 그 중 일부를 취해, 15% SDS Polyacrylamine Gel 전기영동(SDS-PAGE)을 시행하였으며, 그 과정은 다음과 같다.

SDS Gel Recipes

Resoning Gel :

- 30 % Acrylamide stock soln. 5.0 ml
- 4 × Buffer 2.50 ml
- Mercaptoethanol 50 μl
- 1 % BPB 1 ml (bromophenol blue)
- 0.5 M Tris-HCl(pH 6.8) 1 ml
- Glycerol 1 ml
- H<sub>2</sub>O 2.39 ml
- TEMED 13 μl (N,N,N,'N'-tetramethylethylenediamine)

- 10 % Ammonium Persulfate 100 μl

Stocking Gel :

- 30% Acrylamide stock soln. 2.0 ml
- 4 × Buffer 2.50 ml
- H<sub>2</sub>O 5.4 ml
- TEMED 13 μl

- 10 % Ammonium Persulfate 100 μl

Seperating Gel : 103 V, 22 mA

전도체로 사용된 Buffer : TAE 1×Buffer

2.4. Trichosanthin의 확인

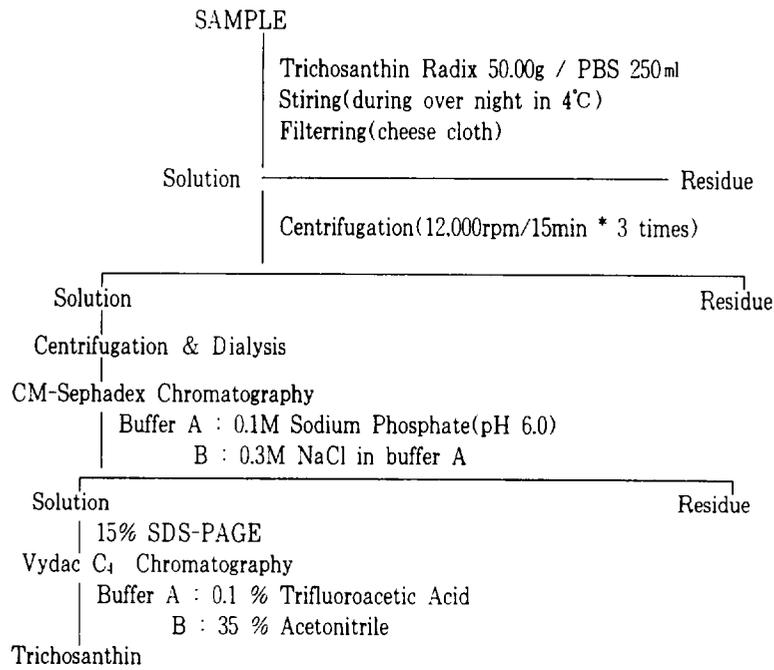
Trichosanthin을 함유하는 PBS용액 1 ml(70 μg/

ml)를 0.1 %Trifluoroacetic Acid가 함유된water/ acetonitrile로 평형된 Vydac C4 Column(0.46×25 cm)에 1.0ml/min(flow rate)으로 3번 주입시켰다. 처음 Chromatographic 조건은 0.1% Trifluoroacetic Acid의 용매에 35% Acetonitrile를 용해시켜 안정화시키고 60 분이상에 걸쳐 Acetonitrile의 농도를 30에서 60%로 완만하게 증가시키면서 Column을 전개시킨다. 215nm에서 흡수가 나타나는 유출액 1.5 ml를 받는다. 215nm에 흡수되는 Elution에 근거를 두어 일곱 개의 Pool에 I ~VII까지 번호표를 붙이고, 이 들 각각의 Pool을 동결 건조 시킨다. 건조된 Pool을 용량을 알아둔 5% Acetic Acid에 재용해 시키고, 환원제가 있는 상태에서 15%-SDS-PAGE를 실행하면 pool II에서 25,000 Da의 single band가 나타난다.

3. 결과 및 고찰

하늘타리의 건조된 구근에서 두 가지의 단계를 거쳐 trichosanthin을 분리·정제하였다. 50.0 g의 뿌리를 분말화(150 μm)하여 PBS용액에 용해시켜, 이 혼합물을 pH 6.0의 0.1 M Sodium Phosphate에 투석시키고 pH와 농도를 일정하게 유지시킨 상태에서 Superdex 75R column을 이용하여 예비 분리하였다. 이 실험에서 얻어진 Superdex 75R chromatogram을 Fig. 1에 나타내었다.

또 CM-Sephadex column을 이용하여 trichosanthin의 분리를 확인하였다. 이 실험에서 얻어진 CM-Sephadex chromatogram을 Fig. 2에 나타내었는데, 0.3 M NaCl이 함유된 buffer사용이후에 뜬 peak에서 충전물(CM-Sephadex)에 대하여 양이온의 형태로 흡착되어있던 단백질이 Na<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>가 함유된 buffer B 용액이 흘러 들어옴에 따라 충전제와 결합을 이루고 있던 자리를 buffer용액이 차지하게 되므로 단백질과 충전제와의 결합이 끊어져서 trichosanthin이 흘러나오게 된다. 이 과정에서 바늘처럼 생긴 백색 결정체인 순수한 Trichosanthin 단백질 약 10 mg이 얻어졌는데, 이 양은 실제로 시료의 동결건조 중 시료의 일부가 손실되고 남은 양이지만, 이는 하늘타리뿌리 총 무게의 2×10<sup>-4</sup>%에 해당된다. 이는 중국산의 1.4×



Scheme. 1 Scheme for isolation and identification of Trichosanthin

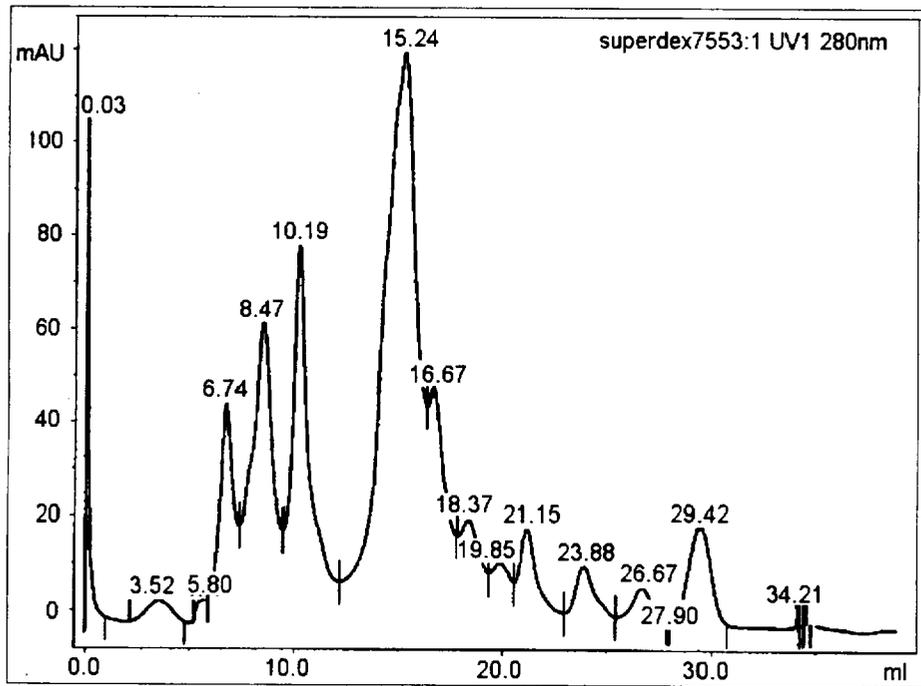


Fig. 1 Application of crude extract from *T. kirilowii* to Superdex 75R chromatography

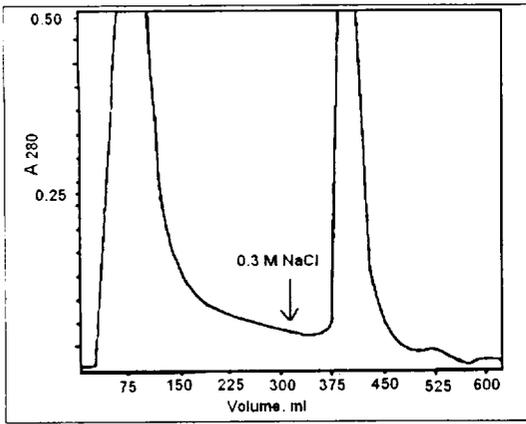


Fig. 2 Isolation of

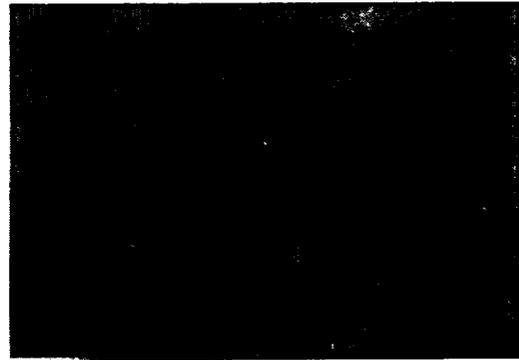


Fig. 3 SDS-PAGE profile of extract from *T. kirilowii*

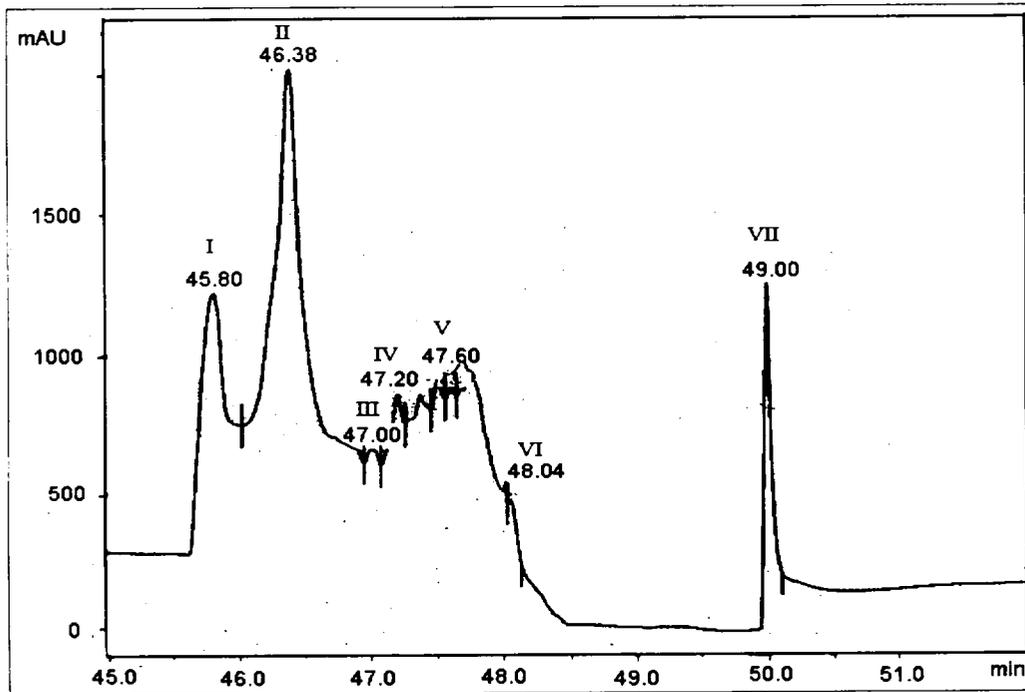


Fig. 4 Reverse-phase HPLC purification of trichosanthin.

\* The effluent stream was monitored at 215nm. 7 pools were collected(labeled I~VII)

10<sup>-4</sup>%보다는 다소 함량이 많은 것이다<sup>14</sup>. 이전의 연구에 따르면 Trichosanthin 단백질은 pH 8.5의 Barbiturate Buffer에서 바늘상 백색 결정체를 형성한다고 보고되었는데<sup>15,16</sup>. CM-Sephadex chromatography로 정제된

Trichosanthin도 같은 형태의 결정체를 형성함을 알 수 있다.

정제된 trichosanthin은 염이 존재하지 않는 상태에서 동결건조와 투석을 하는 과정에서 PBS에 용해

가 되지 않았는데, 이 경우에는 guanidium chloride와 같은 chaotropic 시약을 가하거나 산성조건을 만들어 주면 현탁되거나 용해되었다<sup>14</sup>.

정제된 Trichosanthin을 15% SDS-PAGE로 전기영동을 하였는데, 180 volt에서 40분 정도 전개시켰다. 그 결과 25,000 Da의 Single band가 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

또 실험 2. 4.에서 얻어진 Vydac C4 Column을 이용한 역상 HPLC의 chromatogram을 Fig. 4에 나타내었다. 역상 HPLC는 흡광도가 215nm인 곳을 찾아 Pool로 나누어서 일곱 개의 주요 구성성분으로 분리하였다. 환원제가 있는 조건하에서 15%SDS-PAGE에 의해 I~VII까지 검사하였더니 Pool VII에서만 25,000 Da의 질량을 갖는 단백질이 존재하는 것으로 나타났다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 제주산 팔루근에 함유되어 있는 Trichosanthin을 분리·확인하여 중국산의 팔루근과 비교하여 보았다. HPLC 및 SDS-PAGE결과, 중국산과 마찬가지로 25KDa의 단백질(Trichosanthin)이 얻어졌으며, 건조된 팔루근 총 무게의 약  $2 \times 10^{-4}$ % 이상이 순수한 trichosanthin단백질로 중국산(중국산,  $1.4 \times 10^{-4}$ %)보다도 약간 함량이 높게 나왔다. 이는 국내산 약용식물들의 생리활성물질이 함량이 다른 나라의 것보다도 비교적 높다는 연구결과와도 일치하는 면이 있으며, 약재로서 더 가치가 있다고 사료된다.

따라서 이 연구결과를 토대로 제주산 팔루근의 Trichosanthin단백질의 구조연구 및 Trichosanthin의 단백질합성억제 성질을 이용하여 하늘타리의 생약제제로서의 활용 연구에 이용할 것이다.

#### 감사의 글

본 연구는 1996년 제주대학교의 발전기금연구비를

지원 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

1. 許浚, "東醫寶鑑", 아카데미出版社, 서울, 1976: p.726.
2. 李泰浩 編著, "新訂對譯 大方藥合編", 杏林出版社, 서울, 1986: p. 195~196.
3. 陸昌洙, "原色韓國藥用植物圖鑑", 아카데미서적, 서울, 1989: p. 361.
4. 洪性範 譯, "臨床抗癌中草藥", 成輔社, 서울, 1990: p. 71~74.
5. 차진현, "東醫藥學", 일월서각, 서울, 1990: p. 310~311.
6. 金先熙 외, "本草學", 永林社, 서울, 1995: p. 165~166.
7. 張相文 외, "韓國資源植物學", 學文出版, 서울, 1996: p. 208~209.
8. 한덕룡, "중앙대학교 논문집", 1967, 12, 407..
9. T. J. Jiang, et al., *Tung. Wu Hsueh Pao*, 1977, 23(3), 243.
10. Y. Chan, et al., *Shanghai J. Chin. Med.*, 1982, 3, 30.
11. K. F. Cheng, *Obstet. Gynecol.(N.Y.)*, 1982, 59, 494.
12. Y. Wang, et al., *Pure Appl. Chem.*, 1986, 58, 789.
13. M.S. MaGrath, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1989, 86, 2844.
14. J.M. Maraganore, et al., *Biol. Chem.*, 1987, 262, 11628.
15. Shanghai Institute of Biochemistry in *Nucleic Acid and Proteins: The Proceedings of Symposium on Nucleic Acid and Proteins*, Van-Nostland Reinhold Co., New York, 1979, p. 318~323.
16. P. Kezhan, et al., *Scientia Sinica*, 1982, 25, 730.