

BSPE 00376-662-4

항암효과 검색을 위한
DNA cleavage assay에 관한 연구

A Study on the DNA cleavage assay for antitumor screening

1994. 3

한국해양연구소

제 출 문

한국해양연구소장 귀하

본 보고서를 “항암효과 검색을 위한 DNA cleavage assay에 관한 연구”사업의 최종보고서로 제출합니다.

1994년 3월

공동연구책임자: 정 지 형
 신 종 현
 서 영 완
연 구 원: 백 은 주
 도 은 미
 윤 중 배

요약문

I. 제목

항암 효과 검색을 위한 DNA cleavage assay에 관한 연구

II. 연구 개발의 목적 및 중요성

생리 활성 물질 개발에 있어서 생리 활성 검색법은 매우 중요한 위치를 차지한다. 근대에 들어 천연물화학 분야가 다시 각광을 받기 시작한것도 다양한 생리활성 검색법의 개발에 힘입은 바가 크다. 이상적인 생리 활성 검색법은 치료하고자 하는 질병과 매우 유사한 모델을 제공할 수 있어야 하며 경제적, 기술적인 측면에서도 유지비가 적게 들고 손쉽고 신속하게 결과를 볼 수 있어야 한다.

본 실험실과 같이 생리 활성 물질의 분리 및 구조 결정에 치중하는 여건에서는 아무래도 동물 실험법보다는 시험관내(*in vitro*) 검색법이 적합하다고 할 수 있다. 기존의 항암 효과 검색법을 비교 분석해 본 결과 DNA cleavage assay가 본 실험실 여건에 적합한 방법으로 사료된다. 현재까지 알려진 대부분의 항암제들은 주로 세포내의 RNA 합성억제, DNA 합성억제, DNA 복제저해, 단백질 합성저해, 세포분열억제 등의 작용기전에 의해 항암효과를 발휘한다. Bleomycin을 비롯한 몇몇 항암제는 암세포의 DNA에 손상을 줌으로써 결국 암세포의 증식을 억제하여 항암 효과를 발휘한다. 이러한 작용 기전에 근거하여 DNA 손상 물질을 탐색하는 방법이 바로 DNA cleavage assay이다.

본 실험실의 제반 여건에 적합한 DNA cleavage assay를 설치하여 해양 천연물의 항암 물질 검색에 이용하고자 본 실험에 착수하였다.

III. 연구 개발 목표 및 내용

1. 현재까지 개발된 대표적인 항암제들의 작용기전 및 이에 근거한 시험관내(*in vitro*) 항암 효과 검색법을 수집, 정리한다.
2. DNA cleavage assay를 본 실험실에서 상용 할 수 있도록 모든 조건을 최적화하여 정착시킨다.
3. 정착된 검색법을 이용하여 실제로 천연물에서 유래된 다양한 화합물들에 대해 검색을 실시한다.

IV. 연구 개발 결과 및 활용에 대한 건의

기존의 시험관내 항암 효과 검색법에 대한 자료를 수집하여 정리하였는데 이는 앞으로 본 실험실에서 새로운 검색법을 추가로 설치하게 될 경우 유용한 참고 자료가 될 수 있을 것이다. 또한 수록된 각각의 검색법을 비교 분석하여 장단점과 상호 보완점을 파악하여 새로운 검색법을 선정할 경우에 도움이 될 것으로 사료된다.

본 실험실 여건에 적합한 DNA cleavage assay를 설치하여 시험 운용하였다. 육상식물 및 해면동물로부터 유래된 다양한 물질들에 대해 검색을 실시하여 그 결과를 검토하였다. 본 실험실에 설치된 DNA cleavage assay는 앞으로 해양 천연물로부터 항암 물질을 개발하는데 필수적인 수단이 될 수 있을 것이며 이미 운용되고 있는 Brine shrimp assay와 상호 보완적으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

Summary

I. Title

A study on the DNA cleavage assay for antitumor screening.

II. Objectives and significance

Bioassay plays an important role in discovering and developing bioactive lead compounds. Recent progress in the research of natural products chemistry was greatly facilitated by the big progress in the development of new bioassay methods. An ideal bioassay system should fulfill several requirements. It should exhibit good correlation with actual disease model, and it should be affordable in economic and technical sense.

In a laboratory where isolation and structure elucidation of bioactive compounds is the main stream research, *in vitro* assay is usually preferred over *in vivo* assay. DNA cleavage assay is one of the assays which are applicable with ease in a natural products chemistry laboratory. Certain anticancer drugs including bleomycin exert anticancer activity by damaging DNA, thus blocking DNA synthesis in cancer cell. DNA cleavage assay is based on this type of mechanism of action.

Hence, we initiated this work to set up DNA cleavage assay for routine antitumor screening in our laboratory.

III. Contents and Scopes

1. The mechanisms of actions of the representative anticancer drugs and relevant *in vitro* assays based on those mechanisms were summarized.
2. Experimental condition of DNA cleavage assay was optimized for routine performance.
3. DNA cleavage assay was performed on several compounds originated from higher plants and marine sponges.

IV. Results and recommendation

In vitro antitumor assays were summarized and this information will serve as a useful source whenever it is necessary to set up an alternative assay procedure in our laboratory.

DNA cleavage assay was adopted as our main screening method. The experimental procedure was optimized and various compounds originated from higher plants and marine sponges were screened for activity. DNA cleavage assay will implement Brine shrimp assay and will prove itself to be very useful in screening for antitumor lead compounds from marine natural products.

목 차

요약문.....	5
그림 목차.....	15
제 1 장. 서론.....	17
1.1. 암질환의 현황.....	18
1.2. 암이란 무엇인가?.....	18
1.3. 암의 치료.....	19
1.4. 항암제의 작용 기전.....	20
제 2 장. 항암 효과 검색법.....	23
2.1. 시험관내(<i>in vitro</i>) 검색법.....	24
2.2. 세포 독성(cytotoxicity) 검색법.....	25
2.2.1. 쥐의 암세포를 이용하는 방법.....	25
2.2.2. 최근의 NCI 방법.....	25
2.2.3. 인체 암세포를 이용하는 방법.....	26
2.2.4. Selective two-tumor soft agar assay.....	27
2.2.5. Hypoxic versus aerobic culture conditions.....	27
2.2.6. Normal versus transformed cell culture assay.....	28
2.2.7. 약제 내성 세포를 이용하는 방법.....	28
2.3. 세포 분열 억제(antimitotic) 검색법.....	30
2.3.1. Polymerisation을 측정하는 방법.....	31
2.3.2. Astrocytoma cell을 이용하는 방법.....	32
2.3.3. 성계알을 이용하는 방법.....	32
2.4. 항전이(antimetastatic) 물질 검색법.....	33
2.4.1. 혈소판 응집 억제 작용 검색법.....	33
2.4.2. 양막 투과 검색법.....	34
2.4.3. Polycarbonate 막을 이용하는 방법.....	34

2.4.4. Collagenase 활성 저해 검색법.....	35
2.5. 세포 분화 검색법.....	35
2.6. 세포내 cyclic-AMP 관련 검색법.....	36
2.6.1. C-AMP 측정의 일반적인 방법.....	37
2.6.2. Adenylate cyclase에 대한 활성 검색법.....	37
2.6.3. C-AMP phosphodiesterase 억제 효과 검색법.....	38
2.7. DNA와의 상호 작용 검색법.....	39
2.7.1. 돌연변이 반응 검색법.....	40
2.7.2. Biochemical induction assay(BIA).....	40
2.7.3. DNA cleavage assay.....	41
2.7.4. Topoisomerase I, II 저해제 검색법.....	42
2.7.5. DNA와의 직접 반응 검색법.....	42
2.8. 면역 조절 활성 검색법.....	43
2.8.1. Lymphocyte 활성 검색법.....	43
2.8.2. Lymphokine 유도 검색법.....	44
2.9. 효소 활성 및 대사 저해 검색법.....	45
2.9.1. 대사 저해 물질 검색법.....	45
2.9.2. 효소 저해제 검색법.....	45
2.9.3. 엽산 대사 저해제 검색법.....	46
2.9.4. Adenosine deaminase 저해제 검색법.....	47
2.9.5. Calmodulin 저해제 검색법.....	47
2.10. 암의 발생, 진전, 및 증식에 관련된 검색법.....	48
2.10.1. 성장인자-수용체간 반응 저해제.....	48
2.10.2. Phorbol ester와 수용체 반응 또는 protein kinase C 활성 검색.....	49
2.10.3. 2차 전달 물질 생산 저해 검색법.....	51
2.10.4. Polyamine 대사 저해제 검색법.....	52
2.10.5. Plasminogen activator 검색법.....	52
2.10.6. 혈관 형성 저해제 검색법.....	53

제 3 장. 실험방법.....	55
3.1. 재료, 시약 및 기기.....	55
3.1.1. 재료 및 시약.....	55
3.1.2. 기기.....	55
3.2. 실험 방법.....	56
제 4 장. 결과 및 고찰.....	57
4.1. DMSO에 의한 영향 검정.....	60
4.2. Catechin-7-0-rhamnoside.....	62
4.3. Gentiopicrin 및 swertiamarin.....	64
4.4. Sesamoside를 비롯한 4종의 iridoid.....	66
4.5. Pectenotoxin II 및 psammaplin A.....	68
제 5 장. 결론.....	71
참고 문헌.....	73

Contents

Summary.....	7
List of Figures	15
Chapter 1. Introduction.....	17
1.1. Cancer incidence.....	18
1.2. What is cancer?.....	18
1.3. Treatment of cancer.....	19
1.4. Mechanisms of anticancer drugs.....	20
Chapter 2. Antitumor screening.....	23
2.1. <i>In vitro</i> screening.....	24
2.2. Cytotoxicity screening.....	25
2.2.1. Method employing murine cancer cell.....	25
2.2.2. Recent NCI method.....	25
2.2.3. Method employing human cancer cell.....	26
2.2.4. Selective two-tumor soft agar assay	27
2.2.5. Hypoxic versus aerobic culture conditions.....	27
2.2.6. Normal versus transformed cell culture assay.....	28
2.2.7. Method employing drug-resistant cell.....	28
2.3. Screening for antimetastatic activity.....	30
2.3.1. Measuring polymerisation.....	31
2.3.2. Use of astrocytoma cell.....	32
2.3.3. Use of sea urchin embryo.....	32
2.4. Antimetastatic screening.....	33
2.4.1. Assay for the platelet aggregation inhibition.....	33
2.4.2. Use of human amnion membrane.....	34
2.4.3. Use of polycarbonate membrane.....	34
2.4.4. Screening for collagenase activity inhibition.....	35

2.5. Cell differentiation assay.....	35
2.6. Assays for intracellular cyclic-AMP concentration.....	36
2.6.1. General methods of detecting c-AMP.....	37
2.6.2. Assays for adenylate cyclase activity.....	37
2.6.3. Assays for c-AMP phosphodiesterase inhibitor.....	38
2.7. Assays for interactions with DNA.....	39
2.7.1. Screening for mutagenesis	40
2.7.2. Biochemical induction assay(BIA).....	40
2.7.3. DNA cleavage assay.....	41
2.7.4. Screening for the inhibitors of Topoisomerase I and II.....	42
2.7.5. Screening for direct interaction with DNA.....	42
2.8. Immunomodulation assays.....	43
2.8.1. Screening for lymphocyte activation.....	43
2.8.2. Induction of lymphokines.....	44
2.9. Inhibition of enzymes and metabolisms.....	45
2.9.1. Screening for antimetabolites.....	45
2.9.2. Screening for enzyme inhibitors.....	45
2.9.3. Screening for folate metabolism blockers.....	46
2.9.4. Screening for adenosine deaminase inhibitors.....	47
2.9.5. Screening for calmodulin inhibitors.....	47
2.10. Assays related to tumor promotion, progression and proliferation control.....	48
2.10.1. Screening for growth factor-receptor interaction blockers.....	48
2.10.2. Antagonism of phorbol ester-receptor interaction and inhibition of protein kinase C activity.....	49
2.10.3. Screening for the inhibitors of second messenger production.....	51
2.10.4. Screening for the inhibitors of polyamine metabolism.....	52
2.10.5. Screening for the inhibitors of plasminogen activator.....	52
2.10.6. Screening for the inhibitors of angiogenesis.....	53

Chapter 3. Experimental.....	55
3.1. Materials, reagents and instruments.....	55
3.1.1. Materials and reagents.....	55
3.1.2. Instruments.....	55
3.2. Experimental procedure.....	56
Chapter 4. Results and Discussion.....	57
4.1. Effect of DMSO concentration.....	60
4.2. Catechin-7-0-rhamnoside.....	62
4.3. Gentiopicrin and swertiamarin.....	64
4.4. Iridoids.....	66
4.5. Pectenotoxin II and psammalin A.....	68
Chapter 5. Conclusion.....	71
References.....	73

List of Figures

Figure 1. Mechanisms of actions of anticancer drugs.....	21
Figure 2. Supercoiled covalently closed circular DNA (form I) and nicked circular DNA(form II).....	57
Figure 3. Compounds tested on DNA cleavage assay on catechin-7-0-rhamnoside.....	58
Figure 4. Effect of DMSO on DNA cleavage assay.....	61
Figure 5. DNA cleavage assay on catechin-7-0-rhamnoside.....	63
Figure 6. DNA cleavage assay on gentiopicrin and swertiamerin.....	65
Figure 7. DNA cleavage assay on iridoids.....	67
Figure 8. DNA cleavage assay on pectenotoxin II and psammaphin A.....	69

1 장 서론

현대의 수많은 질병 중에서도 암은 그 발생빈도 및 사망률이 매우 높아 각종 암의 치료제 개발에 전세계가 주력하고 있는 것은 주지의 사실이다. 천연물로부터 항암제를 개발하려는 노력이 최근에는 결실을 나타내기 시작하여 주목나무의 일종인 *Taxus brevifolia* 의 껍질로부터 taxol 이라는 성분이 난소암, 유방암등에 특효약으로 개발된바 있다. Taxol의 성공에 힘입어 천연물로부터의 의약품 개발 열기가 불어 현재는 많은 거대 제약기업들이 이 분야에 투자를 하고 있다.

해양 천연물로부터의 항암제 개발도 활발하여 군체명계 종류인 *Trididemnum solidum* 으로부터 didemnin B 라는 성분이 항암후보 물질로서 제2단계 임상실험(clinical phase II)에 들어가 있으며 그의 halichondrin B, bryostatin 등과 같은 물질들도 활발하게 연구되고 있는 중이다.

이와같이 우리 주변의 천연 동·식물 자원으로부터 유용한 약효물질을 찾아내는 연구과정에서 이들 약효를 검색하고 추적하는데 이용되는 생리활성 검색법(bioactivity assay)은 없어서는 안될 필수적인 연구수단이다.

본 실험실에서는 향후 항암물질의 발견 및 개발에 주력할 계획이므로 자체적으로 운영할 1차 항암효과 검색법을 절실히 필요로 하는 실정이다. 본 실험실에서 사용할 항암효과 검색법은 비전문가라도 쉽게 배워 사용할 수 있으며 시료 요구량이 적고 검색결과를 바로 볼 수 있어 항암물질 추적의 각 단계에서 신속하게 적용할 수 있어야 한다. 이러한 기준에서 볼때 DNA cleavage assay는 위의 조건들을 모두 만족시키는 검색법중의 하나이다.

이에 본 실험실에서는 DNA cleavage assay를 습득하여 자체운영할 수 있도록 정착시킨 후 이를 해양 천연물의 1차 검색 및 성분분리 과정의 monitoring 수단으로 이용하고자 본 과제에 착수하였다.

1.1. 암질환의 현황

해마다 각종 암질환으로 인해 수 많은 사람들이 목숨을 잃어가고 있으며 날로 늘어가는 각종 공해물질과 발암물질의 범람으로 암의 발생률도 날로 증가하고 있다. 우리가 살아가는 동안 60 - 70살 이전에 암에 걸릴 확률은 30 % 가 넘는다고 하니 3명중 1명은 암에 걸린다는 이야기다. 결국 현대를 살아가는 거의 모든 사람들이 암의 위협에 시달리고 있으며 일단 발병시에는 많은 경우 사망으로 이어진다.

전세계적으로 막대한 연구비가 암연구에 투입되고 있는 이유도 바로 여기에 있다. 다행히 지난 30년간의 연구결과로 각종 암에 대한 치료율이 꾸준히 향상되어 온 결과 현재는 전체 발암환자중 47 % 까지 완치가 되고 있다(치료종지후 5년내에 재발이 없으면 완치된 것으로 본다). 이것은 60년대의 암치료율 20 % 에 비하면 실로 괄목할만한 발전이다.

1.2. 암이란 무엇인가?

수많은 질병중에서도 암은 의학과 그 외 관련분야 과학자들에게 큰 도전이 되어왔다. 암이라는 치명적인 질병도 처음 시작은 인체의 일개 세포내의 미세한 변화에서 시작된다. 정상세포내에 존재하는 proto-oncogen이 활성화되어 유전자 자체에 변형을 일으키게 되면 세포증식 및 조직분화가 정상적으로 조절되지 못하고 견잡을 수 없이 세포가 증식하게 되어 암을 형성하게 된다. 급속히 증식하는 암조직은 결국 주변의 조직에까지 침입하여 파괴함으로써 사망에까지 이르게 하는 것이다.

암의 생리에 대한 이해는 생명현상의 근본적인 진행과정을 이해해야만 가능하다. 어떻게 일개 세포로부터 인체와 같은 복잡한 생명체가 형성되는가? 일개 세포에서 어떠한 과정을 거쳐 수많은 인체의 조직과 기관들이 분화되며 이들 조직과 기관들의 발달과 성장은 어떻게 조절되는가? 이러한 생명현상의 근본적인 질문에 대한 해답을 얻으려는 것이 곧 암연구의 목표이다.

암은 전신의 어느 부위에나 발생 가능하며 발생부위의 조직과 매우 유사한 경향이 있다. 그러므로 폐암은 결장암이나 유방암보다는 정상 폐조직과 더 유사하다. 또한 각 기관에 생기는 암은 각각 다르며 같은 기관에 생긴 암들도 부위에 따라 서로 다르다. 다양한 subtype들이 존재하기 때문이다. 이들 subtype들은 화학요법제(항암제)에 대한 감수성이 서로 다르며 따라서 같은 폐암이라도 subtype에 따라 각각 다른 질병으로 간주해야 한다. 이렇게 따지면 인체의 암질환은 300종류가 넘는 것으로 추정된다. 암연구가 시작된 이래 아직까지 광범위한 항암효과를 나타내는 약물을 개발할 수 없었으며 따라서 각각의 암질환에 유효한 선택적 항암제 개발에 주력해야 할 것이다.

암은 일반적으로 성질이 그 기원조직(정상조직)과 매우 유사하여 drug design으로 접근할 수 있는 특징점이 결여되어있다. 그리고 대부분의 암은 약간씩 다른 subtype들이 혼재하는 경우가 많아서 한가지 약제로 치료하면 감수성이 있는 subtype만 치료되고 내성이 있는 subtype은 살아남아 계속 암조직을 생성한다. 그리고 암의 병리현상은 매우 복잡해서 보통 20-30년에 걸쳐 발현되는 경우가 많다. 그러므로 인위적으로 방사능이나 발암물질로 야기시킨 암은 자연적으로 생성된 암과는 조직이나 약제 감수성이 다르기 때문에 암 연구에 이용하는데 한계가 있다.

1.3. 암의치료

현재 이용되고 있는 암치료법은 크게 3가지, 즉 수술요법, 방사선요법, 화학요법(약물요법)등으로 구분된다. 실제 임상에서는 이들 요법들을 2가지 이상 병행해서 사용하는 경우가 많다. 수술요법과 방사선요법은 주로 1차암이나 국소적인 임파선암등의 치료에 사용된다. 그에 비해 화학요법은 암이 전이되어 다른부위에 퍼진 경우 전신치료에 주로 이용되며 수술요법이나 방사선요법의 보조요법으로도 매우 중요하다.

암치료에 있어서 화학요법의 비중은 계속적으로 증가하고 있으며 화학요법에 의한 완치율도 점차 높아지고 있다. 지난 30년 동안의 암치료의 괄목할만한 발전은 바로 화학요법의 발전에 기인한 것이라고 할 수 있다.

1950년대에는 급성 백혈병에 걸리면 어린이의 경우 진단후 수개월내에 100 % 가 사망이 있으나 현재는 치료율이 60 % 가 넘는다. 이러한 화학요법제의 눈부신 성공에도 불구하고 나름대로의 한계가 있다. 첫째, 암세포가 화학요법제에 대해 쉽게 내성을 획득하므로 시간이 지남에 따라 치료효과가 소멸되어 버린다. 둘째, 화학요법제는 일반적으로 독성이 매우 강하다. 대부분의 화학요법제는 근본적으로 세포독성 물질이므로 암세포 뿐만 아니라 일반 정상세포에도 독성을 나타낸다. 암세포가 일반 정상세포와 다른점은 유전정보 발현(gene expression)의 특수성에 있다. 즉 암세포는 유전정보 발현을 조절하지 못하기 때문에 비정상적으로 세포가 급속히 증식되는 것이다. 이러한 기존 항암제의 한계를 극복하기 위해 계속 새로운 항암제의 개발이 요구되며 약제 내성을 억제하는 약물의 개발이 시급한 것이다.

1.4. 항암제의 작용기전

현재 사용되고 있는 대부분의 항암제는 세포내의 효소계나 효소기질에 작용하여 약효를 나타내는 것으로 생각된다. 이들 항암제는 주로 DNA 합성 또는 DNA 기능에 관여하는 효소에 작용하거나 기질과 반응하여 세포증식을 차단함으로써 궁극적으로 암세포를 사멸시키는 항암효과를 나타낸다. 이를 도식적으로 정리하면 Figure 1과 같다.

이미 알려진 화학요법의 표적은 크게 3가지로 나눌 수 있다.

- (1) 세포분열과 성장에 관계되는 모든 과정 즉, 복제(replication), 전사(transcription), 전이(translation), 분열(mitosis)등을 말한다.
- (2) 혈관형성(angiogenesis) 즉 암조직의 말초 모세혈관 형성과정.
- (3) 전이(metastasis), 즉 암세포가 떨어져 나와 혈액을 타고 인체의 다른 부위에 침입하여 새로운 암조직을 형성하는 과정.

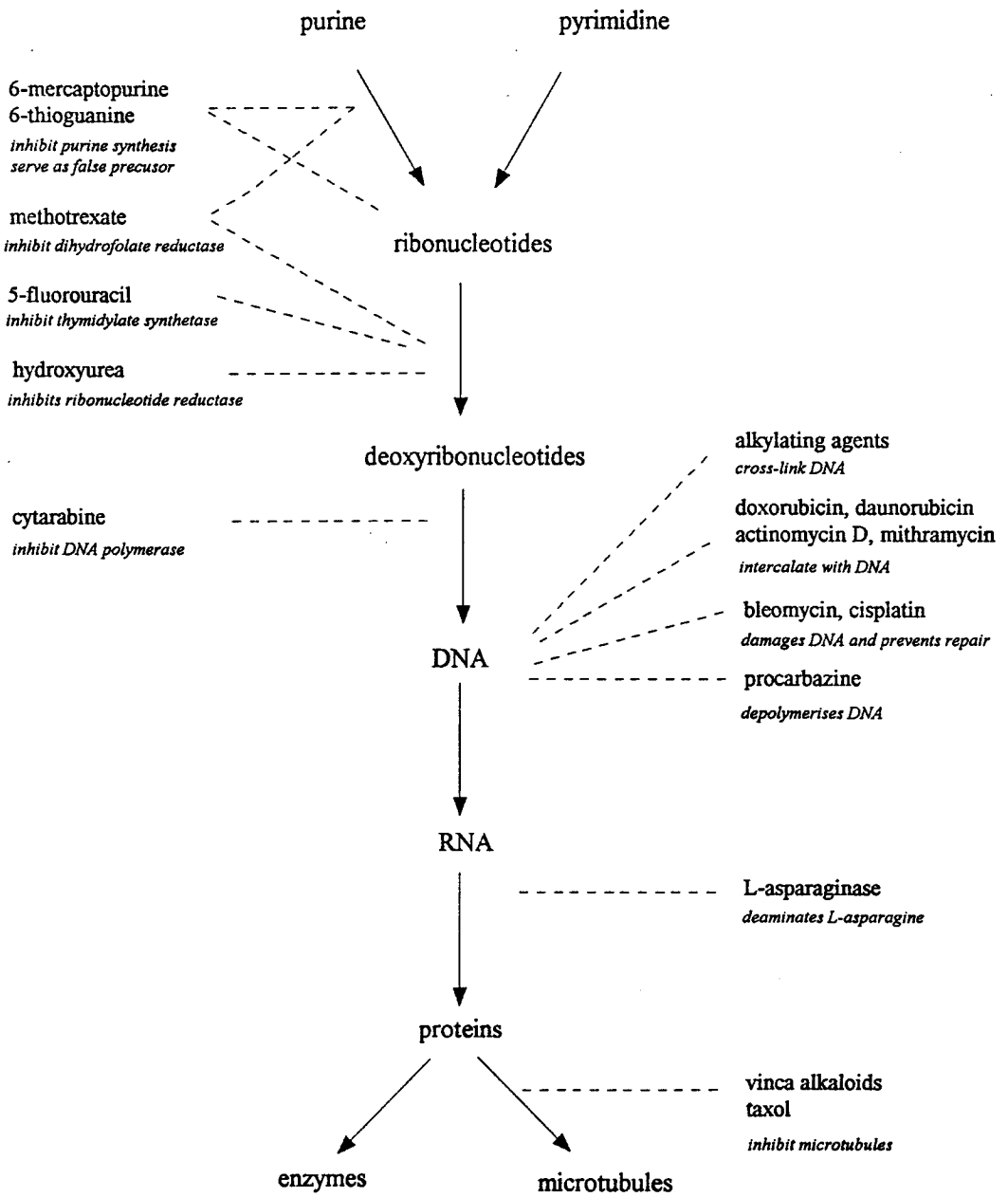


Figure 1. Mechanisms of actions of anticancer drugs.



세포의 분열과 성장은 암세포 뿐만 아니라 인체의 모든 세포에 공통적인 현상이기 때문에 이러한 표적에 작용하는 항암제는 정상세포에도 많은 피해를 준다. 특히 골수(bone marrow)와 위장관 표피세포(gastro intestinal epithelium) 및 모근세포는 세포분열이 매우 빨라 특히 항암제에 의한 독작용이 쉽게 나타난다. 흔히 항암제의 부작용으로 탈모현상이나 위장관 장애를 나타내는 것이 이 때문이다.

분자 생물학적으로 별로 밝혀진 바가 없는 분화(differentiation)도 화학요법의 표적으로 이용될 수 있다. 이 경우에는 암세포를 형태학적으로 정상세포와 동일하고 형질발현도 동일하게 만드는 것이 목표이다. 그러나 이러한 작용을 나타내는 약제는 사용을 중단하면 세포가 다시 암세포의 형태로 돌아가 버리는 단점이 있기 때문에 분화(differentiation)를 화학요법의 표적으로 삼는데에는 아직도 논란의 여지가 있다.

제 2 장 항암효과 검색법

항암효과 검색을 위해서는 다양한 방법들이 이용되고 있으며 이들 방법들은 문헌에 기술되어 있다(Schabel and Pittillo, 1961; Geran *et al.*, 1972; Umezawa, 1972, 1979a,b; Hanka, 1977, 1979; Venditti, 1981; Hamill, 1982).

현재까지 이러한 검색법에 의해 발견된 ellipticine, homoharringtonine 등이 임상실험 중에 있으며 taxol은 임상을 마치고 의약품으로 실용화 단계에 있다.

그외 bruceantin, indicine-N-oxide, acronycine, aristolochic acid, lapachol, maytansine, nitidine, tylocrebrine 등이 임상실험 단계까지 진행 되었으나 독성이 지나치거나 약효가 미달되어 탈락되었다. 하지만 천연물로부터 신약개발 연구는 암의 작용기전을 연구하는데 매우 유용했던 것만은 확실하다. 그 중요한 예로서 taxol(Schiff *et al.*, 1979; Parness *et al.*, 1982), bleomycin(Hecht, 1986), cc-1065(Warpehoski and Hurley, 1988), camptothecin(Hsiang *et al.*, 1985; Drlica and Franco, 1988), bryostatin, phorbol esters(Sako *et al.*, 1987; Blumberg, 1988), forskolin(de Souza *et al.*, 1983) 등이 있다.

Mechanism-based assay가 점점 널리 보급됨에 따라 이러한 종류의 유용한 신물질들은 앞으로 계속 발견될 것으로 예상된다. 천연물로부터 항암 후보물질을 찾는 데 사용되는 검색법의 이상적인 조건은 우선 신뢰도, 재현성 및 감도가 높아야 하고 무엇보다도 가장 중요한 것은 실제 인체에서의 항암작용과 상당히 밀접한 상관성이 있어야 한다.

우리가 흔히 언급하는 “항암작용”이라는 것도 실제 엄밀하게 말하자면 세포독성(cytotoxic), 항종양(antitumor), 항암(anticancer) 등의 3가지로 구분되어야 한다. 세포독성(cytotoxic)이라함은 어떤 물질이 배양된 암세포에 대해 독작용을 나타내는 것을 말한다. 이것은 정상세포와 암세포간의 선택적인 독성을 의미하지는 않는다. 암세포의 성장을 저해할 때 이를 cytostatic 이라하며 암세포를 사멸시킬때 이를 cytocidal이라고 구분해서 이야

기하기도 한다. 항종양(antitumor)이라함은 동물실험에서 암에 대해 억제작용이 있는 것을 말하고 정상조직과 암조직간의 상대적인 독성차이가 있음을 보통 의미한다. 항암작용(anticancer)이라함은 실제 인체에서 암치료 효과를 나타내는 경우를 말한다. 항암작용은 인체실험을 통해서만 판정될 수 있다.

2.1. 시험관내(*in vitro*) 검색법

항암효과 검색을 위한 시험관내 검색법(*in vitro* assay)은 크게 2가지로 나눌 수 있다. 즉 cellular assay와 molecular assay이다. Cellular assay에서는 세포자체를 이용하고 molecular assay에서는 효소, 약물수용체, DNA 등의 분리된 system을 이용한다.

Molecular assay의 특징은 매우 선택적이라는 것이다. 즉, molecular assay로는 특정 작용기전에 효과를 나타내는 물질만을 탐색하게 되므로 이러한 검색법에 의해 신물질이 발견될 확률은 매우 낮으며 따라서 방대한 종류의 시료를 검색해야 할 것이다. 하지만 특별한 목적으로 특정 작용기전에 큰 비중을 둔다면 이 방법을 적절하게 채용하여 상대적으로 단기간에 새로운 물질을 찾을 수 있을 것이다.

Cellular assay는 크게 세포독성(cytotoxicity)검색법과 그 외 검색법으로 나뉘어진다. 세포독성 검색법의 주된 문제점은 이 검색법에 검출되는 활성물질이 상당히 많다는 것이다. 그 중 많은 경우에 이미 알려져 있는 물질이거나 별 흥미가 없는 물질인 수가 있다. 이 검색법에 걸려드는 기타 활성물질들은 주로 중금속, 계면활성제, 단백질성제, 세포 호흡계 독성물질, DNA 손상물질, Na^+ 또는 Ca^{2+} channel 독성물질, 비선택적 산화제 등이다. 그러므로 진짜 흥미있는 활성물질을 적은 노력으로 가려내는 것이 쉽지 않은 문제점이 있다.

2.2. 세포독성(cytotoxicity) 검색법

2.2.1. 쥐의 암세포를 이용하는 방법

얼마 전까지만 해도 항종양 물질로 개발 가능성이 있는 물질을 추적 분리 하는데는 주로 세포독성 검색에 의존해 왔다. 주로 P388이나 KB cell이 이용되었는데 실험방법은 시료를 여러 농도에서 P388이나 KB cell에 처리하여 48시간 혹은 72시간 배양후 세포의 성장 상태를 측정한다. P388 cell의 경우는 세포 수를 세어보고(Arisawa *et al.*, 1984), KB cell의 경우에는 단백질의 양을 측정하여 관찰한다(Pezzuto *et al.*, 1983). 결과는 ED₅₀로 나타내며 NCI(Natural Cancer Institute)의 기준에 따르면 추출물의 경우는 ED₅₀가 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 순수물질의 경우는 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하이면 유의성이 있는 것으로 간주한다(Geran *et al.*, 1972).

이 방법은 신물질의 가능성이 있는 세포독성 물질을 분리하는데 매우 효과적이다. 그러나 종종 배양된 P388 cell에 독성을 나타내더라도 P388로 감염된 쥐를 이용하는 *in vivo* 실험에서는 효과가 없는 경우가 많다. KB cell의 경우도 마찬가지이다. 뿐만 아니라 이 방법에 의해서는 선별된 물질이 cytocidal한지 cytostatic한지를 구별할 수가 없는 단점이 있다.

2.2.2. 최근의 NCI방법

NCI(미국 국립 암연구소)에서는 일련의 인체 암세포를 사용하여 세포독성 물질을 검색하는 방법을 모색하였다. 목적은 인체의 1차 암에서 유래된 암세포를 배양하여 이에 선택적인 독성을 나타내는 물질을 찾아내는 것이었다(Suffness, 1987; Alley *et al.*, 1988; Scudiero *et al.*, 1988; Shoemaker *et al.*, 1988).

인체에서 유래한 다양한 암세포를 사용하는 것은 이론적인 면에서나 실제적인 면에서 매우 의미가 있다. 이 암세포들은 면역능력이 제거된 쥐(athymic mice)에 solid tumor로서

이식할 수가 있다. 그리하여 인체의 암세포를 이용한 *in vivo* 검사가 가능한 것이다. 여러 cell type에 대해 다양하게 검사를 할 수 있으며 특정 cell type에 선택성을 나타내는 물질이 분리되면 동일 type의 암환자에 특효를 나타낼 확률이 높은 것으로 보는 것이다.

임상결과에 관계없이 선택적 세포독성이 나타난다는 것은 특정 type의 암을 다른 type의 암으로부터 구별할 수 있는 세포 수준의 선택성이 있다는 것을 의미하며 이는 tumor-specific한 치료법을 개발할 수 있는 가능성이 엿보인다는 것을 의미하기도 한다.

2.2.3. 인체 암세포를 이용하는 방법

인체의 1차 암세포를 처리하여 반고형 배지에 배양하면 세포의 군락(colony)을 얻을 수 있다. 반고형 배지에서 정상세포들은 잘 자랄 수 없기 때문에 colony에 포함된 세포들은 human tumor stem cell로 정의할 수 있다.

이 stem cell들이 암의 생성과 전이에 관여하므로 화학요법제의 target으로 이용하는 방법을 생각해 볼 수 있다. 환자에게서 채취한 세균을 배양하여 이에 대한 감수성을 측정하여 적합한 항생제를 처방하듯이, 인체로부터 채취한 1차 암을 배양하여 이에 대해 각종 항암제의 감수성을 측정하여 적합한 약제를 처방하는 것이 가능할 것이다. 하지만 이러한 가설을 실험실이나 임상에서 실현하는데에는 많은 어려움이 있었다. 몇 가지 장애요인이 있는데 예를 들면, 800여 종류의 인체암을 배양했을때 그 중 25 % 만이 colony를 형성했으며 형성된 colony도 단일 농도에서 단일 투여기간에 이용할 수 있을 만큼만 얻어졌다(Von Hoff *et al.*, 1981). 그 동안 인체암을 배양하는 방법에 있어서 몇 가지 발전이 있었는데 한 예로 표피 성장인자(epidermal growth factor)를 첨가하는 것이다(Hamburger *et al.*, 1981). Human stem cell assay는 새로 발견된 항암제를 평가하는 초기 단계에 매우 가치가 있다. 또한 항종양 물질을 검색하는 데에도 이용될 수 있다(Shoemaker *et al.*, 1985). 개념에 있어서는 다르나 기술적으로는 stem cell assay와 유사한 것으로 항암제의 독성을 평가하는 방법이 있다. 흔히 알려진 바와 같이 항암제를 투여하면 골수(bone marrow)가 억제된다. 이

를 이용한 CFUgm, CFUmeg, CFUe에 대한 골수억제 효과의 검정방법이 자세하게 보고되었다 (Dexter *et al.*, 1977; de Jong *et al.*, 1985; Mivechi and Li, 1987; Young *et al.*, 1987).

2.2.4. Selective two-tumor soft agar assays

Corbett등(1986)에 의해 개발된 혁신적인 이 방법은 쥐의 백혈병세포(P388이나 L1210)와 인체 solid tumor(폐암, 결장암 혹은 췌장암)를 soft agar medium에 함께 배양하는 것이다. 항생제의 역가측정에 이용되는 Kirby-Bauer의 disc diffusion 방법을 이용하여 시료의 세포독성을 관찰하는데 시료에 의해 형성된 inhibition zone을 측정하여 각각의 cell type에 대한 억제효과를 본다.

특정 시료의 인체 solid tumor와 쥐의 암세포에 대한 상대적인 억제효과를 측정하여 solid tumor에 대한 선택적 독성이 높은 물질을 탐색한다. 종래의 P388이나 L1210을 이용하여 발견된 항암후보 물질들이 대부분 인체 solid tumor에 대해서는 별 효과가 없었기 때문에 시간과 인력의 낭비가 많았다. 그래서 쥐의 암세포와 인체 solid tumor에 대한 선택적 독성을 동시에 검색할 수 있게 개발된 것이 이 방법이다. Disc diffusion 방법은 약물확산의 기술적 어려움 때문에 96-well plate에 액체배지를 사용하는 방법으로 교체되었다. 이 방법은 매우 경제적이고 많은 수의 시료를 짧은 시간에 처리할 수 있으며 이렇게 발견된 물질들은 한단계 높은 실험을 할 만한 충분한 가치가 있는 것이다.

2.2.5. Hypoxic versus aerobic culture conditions

인체의 solid tumor는 여러 분획으로 나뉘어져 있다고 볼 수 있다. 즉 산소가 풍부한 부분, 산소가 부족한 부분, 그리고 산소가 매우 결핍된 부분 등이다(Satorelli, 1988). 이

들 각 부분은 항암제에 대한 감수성이나 내성이 각각 다르다. 그리고 빠른 속도로 증식하고 있는 암조직에서는 산소가 결핍된 경우가 많다. 시험관내 항암효과 검색은 주로 표준환경(aerobic)에서 실시하고 있지만 인체 solid tumor에 대한 치료는 각 분획에 따라 차별적으로 실시해야 한다는 것이다. 그러므로 암세포에 대한 약제 감수성은 저산소 상태(95 % nitrogen/5 % CO₂)와 표준상태에서 각각 측정할 수 있다(Teicher *et al.*, 1981).

2.2.6. Normal versus transformed cell culture assay

앞에서 강조했듯이 항암제 개발의 중요한 요건은 선택성이다. 몇 가지 특정 유전자는 인체 암의 발현과 연관성이 있다. 예를 들면 *ras*, *myc*, *abl*, *erb-b*, *src* 등의 유전자이다(Land *et al.*, 1983). 이러한 oncogene들이 상동화 됨에 따라 세포에 oncogene을 감염시켜 이러한 oncogene을 포함한 cell line을 만들 수가 있다. 이들 특정 oncogene을 포함한 cell line에 대해 선택적 억제효과를 나타내는 약물을 발견하면 이들 oncogene의 발현이나 기능을 조절할 수 있다는 것을 의미한다.

그 한 예로 Harvey *ras* oncogene(Yoakum *et al.*, 1985)으로 감염된 기관지 표피세포에 대해 약제 감수성 비교를 하였다(Lechner, 1981, 1982). 이 실험에서 정상세포의 성장속도가 *ras* 감염세포보다 많이 느리기 때문에 정확한 선택성을 비교하기 어려운 점이 있지만 장래에는 이 방법이 매우 유용하게 이용될 전망이다.

2.2.7. 약제 내성세포를 이용하는 방법

실제 암환자를 치료하는 과정에서 환자가 각종 항암제에 대한 내성이 생겨 결국 사망하게 되는 경우가 많다. 그러므로 항암제 개발과정에서 약제 내성을 고려할 필요가 있다. 약제 내성이 생기는 작용기전은 몇가지가 있는데 예를 들면 약물이 glutathione등과 결합되어

대사되어 배설되는 속도가 증가하는 경우, 또는 약물의 세포내 흡수율이 떨어져 버리는 것이다. 특히 중요한 작용기전은 다제내성(*mdr*, multiple drug resistance) 유전자의 발현이 증진되어 P-glycoprotein의 생산이 증가하는 것이다(Shen *et al.*, 1986; Choi *et al.*, 1988). P-glycoprotein은 energy-dependent drug efflux mechanism에 의해 약물을 세포밖으로 배출시켜 세포내에 약물이 축적되는 것을 억제하는 작용이 있는 것으로 추정된다. 그러므로 P-glycoprotein의 생산이 증가하면 약물의 세포내 농도가 저하되어 약효가 떨어진다. 이러한 기초적인 지식에 의거해 신약개발의 새로운 전략을 정립할 수 있다. 특정약물을 약제내성 세포와 그렇지 않은 세포에 대해 부여하여 세포독성을 비교할 수 있다. 검색에 적합한 세포는 KB-V1 cell line이다(Shen *et al.*, 1986). KB-V1 cell line에 대한 활성과 보통의 KB cell에 대한 활성을 비교하여 만약 이들 2가지의 cell에 대해 동등한 약효가 측정되면 이 약물은 약제내성 세포에 대해 효과가 있다는 것을 의미한다.

약제내성을 극복하는 또 다른 접근방법은 P-glycoprotein에 의해 매개되는 drug efflux 과정을 변형시키는 것이다. 약제내성을 역전시키는 몇 가지 물질들이 알려져 있는데(cf. Ramu *et al.*, 1984a, b) calcium antagonist와 calmodulin inhibitor등이 drug efflux를 감소시켜 세포내 약물축적을 증가시킨다(Tsuruo *et al.*, 1982). Doxorubicin에 내성이 있는 P388 cell을 사용하여 성공적으로 약제내성을 역전시키는 물질을 분리해냈다(Kunimoto *et al.*, 1987).

약제내성을 역전시키는 물질을 검색하는 방법은 2가지가 있다. 다제내성을 역전시키는 대부분의 물질은 vinblastine이나 doxorubicin이 P-glycoprotein에 결합하는 것을 억제한다(Akiyama *et al.*, 1988). 그러므로 radiolabelled vinblastine이나 doxorubicin이 수용체에 결합하는 것을 길항하는 물질을 찾으려면 된다. 또 다른 방법은 약제 내성세포(KB-V1)와 이에 내성 항암제를 유효농도 이하에서 함께 배양한다. 그후 검사 시료를 첨가한 뒤 함께 배양하여 항암제의 약효가 증가하는지를 관찰한다.

시료의 직접적인 작용에 의해서나 혹은 항암제의 약효를 증가시키는 작용에 의해서 내성세포에 대한 감수성이 증가된다고 해서 문제가 모두 해결되는 것은 아니다. 정상세포에서도 P-glycoprotein 저해제와 항암제를 같이 부여하면 독성이 증가하는 것으로 알려져 있기

때문이다. 비슷한 예로 calcium channel blocking drug도 다제내성에 길항작용을 나타내는 것으로 확인되었으므로 이러한 약효물질을 임상에 적용하는데 한계가 있다.

2.3. 세포 분열 억제(antimitotic) 검색법

세포내의 microtubule은 세포분열 과정에서 염색체가 양극으로 이동하는데 관여하는 중요한 세포 구성물질이다. 그러므로 화학적 방법 혹은 기타의 방법으로 microtubule의 기능을 차단하면 그 결과 세포의 증식을 막을 수 있다. colchicine, podophyllotoxin, maytansine, vincristine, taxol과 같은 많은 물질들이 세포 분열 억제 물질로 알려져 있다.

Microtubule은 MAPs(microtubule-associated proteins)(Murphy, 1982)와 tubulin(Borisy and Taylor, 1967a, b)으로 이루어져 있다. 그리고 tubulin은 α 와 β 두개의 subunit로 구성되어 있으며 microtubule내에 동량 존재한다(Bryan and Wilson, 1971).

Weisenberg(1972)에 의해 처음 시도되었듯이 동물의 뇌추출물을 이용하여 tubulin이 microtubule로 조합되는 과정을 추적할 수 있다. 이것은 순수한 tubulin을 분리하고 *in vitro* microtubulin assembly에서의 세포 분열 억제 물질을 추적하는데 매우 중요한 발전이다. Vincristine을 비롯한 대부분의 세포 분열 억제 물질들이 이 microtubule 조합 과정을 억제한다. 흥미롭게도 taxol은 microtubule의 조합 과정을 촉진하지만 depolymerisation 과정을 저해함으로써 세포 분열을 억제한다.

2.3.1. Polymerisation을 측정하는 방법

(a) Tubulin의 분리

Tubulin은 보통 소, 돼지 등의 뇌로부터 얻어진다. 정제 방법은 polymerisation의 열 의존성에 의거해 진행된다(Shelanski *et al.*, 1973; Weingarten *et al.*, 1974). 뇌조직을 0 - 4 °C에서 균질화하여 원심분리한 후 침전물은 제거하고 상등액은 37 °C에서 배양하고 polymerisation을 유도한다. 조합된 microtubule은 다시 원심분리하여 수득하고 다시 1 - 4 °C에서 depolymerise하여 현탁액을 만든다. 이 과정을 2 - 3회 반복하여 tubulin을 분리 정제한다.

(b) 시험관내 조합 반응(assembly reaction)

Microtubule은 GTP와 Mg^{2+} 의 존재하에서 자연적으로 형성된다(Weisenberg, 1972). 그리고 이 반응은 Ca^{2+} 에 매우 민감하기 때문에 EDTA와 같은 chelating agent를 용액에 첨가하여 반응시킨다. 이러한 조건하에서 조립 반응이 일어나는 과정을 350 nm에서의 산란 현상을 관찰하여 monitor 할 수 있다(Gaskin *et al.*, 1974).

Tubulin을 포함한 반응 물질에 검사 시료를 첨가하여 polymer 형성이 억제되면 그만큼 turbidimetric response가 감소할 것이다. 마찬가지로, microtubule이 형성된 용액에 활성 물질을 첨가하면 산란 현상이 줄어들 것이다.

한편, taxol은 GTP가 없는 상태에서도 polymerisation을 유도한다(Kumar, 1981). 그리고 자연적 microtubule 형성시에 taxol을 넣으면 산란 현상이 증가한다(Schiff *et al.*, 1979).

2.3.2. Astrocytoma(ASK) cell을 이용하는 방법

Astrocytoma(정상세포) bioassay는 이전부터 NCI에서 세포 분열 억제 물질의 검색에 사용되어 왔다(Suffness and Duoros, 1982). 이 세포들은 dibutyl cyclic-AMP로 1시간 동안 처리하면 형태 변화를 일으킨다. 세포들이 fibroepithelial form에서 astrocyte form으로 전환된 것이다. 그리고 이 형태 변화는 colchicine, podophyllotoxin, vincristine 등과 같은 세포 분열 억제 물질에 의해 역전된다. 이 검색법은 특히 세포 분열 억제 물질에 선별적이며 2시간 안에 결과를 볼 수 있다. 이 방법에 의해 combretastatin이 *Combretum caffrum*에서 분리된 바 있다(Pettit et al., 1982).

2.3.3. 성게(Sea urchin)알을 이용하는 방법

천연물로부터 분리된 podophyllotoxin, vinblastine과 같은 polymerisation 억제 물질은 sea urchin assay에서도 세포 분열을 억제하는 것으로 나타났다. 성체 성게에 0.5 - 0.6 M의 KCl을 주사하면 산란을 유도할 수 있다(White and Jacobs, 1981).

수컷으로부터 정자를 모아 시험관에 넣어 0 °C 정도에서 보관하고 암컷으로부터 오렌지색의 알을 모아 찬 해수로 씻어 알 표면을 싸고 있는 젤리상의 겹질을 제거한 다음 다시 해수에 섞어 slurry를 만든다.

정자 1 - 2방울을 50 ml 해수에 희석하여 그 중 1 ml를 취해 난자의 slurry에 첨가한다. 1 - 2분 안에 95 - 100 %의 알들이 수정되는데 이는 수정란에 생성되는 hyaline layer를 현미경으로 관찰하여 확인 할 수 있다.

수정 후 약 5분 후에 검사 시료와 수정란을 동량 섞어 2 - 3시간 배양한 다음 더 이상 세포 분열이 진행되는 것을 막기 위해 얼음에 재워 놓는다. 약 500 - 600개의 알이 현미경으로 관찰되는데 분열된 세포와 분열되지 않은 세포의 비율을 대조군의 그것과 비교하여 결과를 나타낸다. 이 방법은 세포 분열 억제 물질을 분리하는데 활성 물질 추적에 매우 유용할

뿐만 아니라 항암 후보 물질의 작용 기전을 연구하는데도 유용하게 쓸 수 있다. 성게알 외에 불가사리(*Asterina pectinifera*) 등의 수정란을 이용할 수도 있다(cf. Fusetani *et al.*, 1985).

2.4. 항전이(antimetastasis) 물질 검색법

전이(metastasis)란 악성 종양 세포가 1차 병소 부위에서 순환계를 타고 온몸에 퍼지는 과정을 말한다. 많은 경우 암은 치명적이나 국소적인 암은 수술이나 방사선 요법으로 치료될 수 있다. 암의 완치가 어려운 이유 중의 하나는 암이 전이 되기 때문이다.

보고된 바와 같이 (Liotta *et al.*, 1986; Nicolson, 1988; Poste and Fidler, 1980) 암의 전파에는 여러 단계가 관여한다. 이 과정에 대한 지식은 항전이 물질을 개발하는데 근간이 된다. 항전이 물질은 암치료의 보조 요법이나 예방 요법으로 아주 유용하다. 몇 가지 *in vitro* assay 방법을 소개하면 다음과 같다.

2.4.1. 혈소판 응집 억제 작용 검색법

전이 암세포는 혈소판 응집을 유도한다는 것이 알려져 있다(Hara *et al.*, 1980). 혈소판 응집이 일어나면 혈소판에서 암세포의 성장을 촉진하는 물질이 분비된다(Cowan and Graham, 1982). 그러므로 혈소판 응집을 억제하는 것은 암의 전이를 막는 한 방법이 될 수 있다(Ambrus *et al.*, 1982). 혈소판 응집을 정량적으로 측정하는 방법이 Born과 Cross(1963)에 의해 개발되었다.

간단히 기술하면, 혈소판이 풍부한 혈장을 원심분리로 얻어서 여기에 암세포를 첨가하여 혈소판 응집을 유도한다. 응집된 정도는 광투과가 증가하는 것으로 정량할 수 있다. *C. forskohlii*(Labiatae)의 뿌리로부터 분리된 forskolin이 혈소판 응집을 억제하는 것이 밝혀

졌다(Agarwal and Parks, 1982, 1983; Siegl *et al.*, 1982). 그리고 쥐의 폐에서 종양이 결집되는 정도를 감소시켰다(Agarwal and Parks, 1983). Forskolin은 혈소판 adenylylate cyclase를 활성화하므로 같은 기능을 하는 다른 물질도 항전이 후보 물질로 개발될 수 있을 것이다.

2.4.2. 양막투과 검색법

암세포는 인체 태반의 양막을 투과할 수 있는 것으로 알려져 있다(Liotta *et al.*, 1980; Russo *et al.*, 1981; Liotta, 1985). 인체태반의 양막은 암세포가 혈관 벽을 투과할 수 있는지를 실험하는 좋은 model system이 될 수 있다. 그러므로 암세포의 양막 투과를 억제하는 물질이 발견되면 이는 항전이(antimetastatic) 물질로 개발할 가능성이 있는 것이다. 실험방법은 태반의 양막을 Millipore filter위에 펴서 칸막이를 만든다. 암세포를 칸막이의 윗 부분에 검사 시료와 함께 넣고 아랫 부분에도 같은 농도의 시료를 넣는다. 그리고 inverted microscope를 이용하여 세포의 이동을 관찰한다. 또는 Millipore filter를 회수하여 haematoxylin으로 염색하여 양막을 통과한 세포수를 정량할 수도 있다.

2.4.3. Polycarbonate 막을 이용하는 방법

양막을 이용한 방법보다 좀 더 일반적으로 손쉽게 사용될 수 있는 것이 Hendrix(1987) 등에 의해 개발된 MICS(membrane invasion culture system)이다. Matrigel로 도포한 polycarbonate filter에 세포를 얹어 일정 시간 배양 후 membrane을 통과한 세포를 막 아랫쪽에서 수집하여 정량한다. 이 방법에서 검사 시료는 세포의 막 통과 이전이나 막 통과 중에 처리할 수 있다.

2.4.4. Collagenase 활성 저해 검색법

Collagenase는 암세포의 전이 과정에 관여하는 단백질 분해 효소로 알려져 있다(Liotta *et al.*, 1982). 일반적으로 Type IV collagenase가 암세포의 침입에 중요한 역할을 하는 것으로 간주되고 있다(Liotta, 1986). Yamanishi등(1973)에 의한 방법에 따르면 시료 물질의 collagenase에 대한 활성을 측정할 수 있다. 우선 암세포를 배양하여 얻은 후 이를 균질화시킨다. 이를 원심 분리하여(10,000 x g, 10 min) 상등액을 [¹⁴C]proline-labelled collagen과 함께 37°C에서 배양한다. 배양후 분해되지 않은 collagen을 원심 분리로 얻어서 상등액을 liquid scintillation으로 측정한다. 검사 시료와 함께 배양했을때, 검사 시료를 제거한 상태에서 배양했을때의 결과를 각각 비교하여 정량한다.

2.5. 세포 분화 검색법

세포 분화가 제대로 유도되지 않으면 비정상적인 암조직으로 발전할 수 있는데 몇 가지 물질들은 정상 세포 분화를 촉진하는 작용이 있는 것으로 알려져 있다(Bloch, 1984; Reiss *et al.*, 1986). 이러한 물질들은 저농도에서도 충분히 세포 분화를 유도하므로 암치료제로 매우 흥미가 있다. 이러한 물질들의 연구는 주로 HL-60 cell을 이용해 이루어졌다(cf. Collins *et al.*, 1978; Hayakawa *et al.*, 1983). 이 세포는 promyelocytic leukemia 환자로 부터 유래되었는데(Gallagher *et al.*, 1979), granulocyte나 macrophage와 유사한 세포로 분화된다. 다른 세포들도 이러한 분화 촉진 물질들에 의해 영향을 받는 것으로 알려졌다.

예를 들면 쥐(mouse)의 embryonal carcinoma(Beston *et al.*, 1984; Williams and Napoli 1985), fibroblasts(Marks *et al.*, 1985), hepatoma(Higgins, 1982), keratinocytes(Kilhenry *et al.*, 1985), neuroblastoma(Palfney *et al.*, 1977), tetratocarcinoma(Paulin *et al.*, 1979), 그리고 인체 결장암(Young *et al.*, 1980),

keratinocytes(Brown and Parkinson, 1985), 폐암(Tralka and Rabson, 1976), melanoma(Ziegler - Heitbrock *et al.*, 1985), squamous cell carcinoma(Reiss *et al.*, 1985), 및 쥐(rat)(Warburton *et al.*, 1981; Costlow, 1984), 그리고 개(Lever, 1979; Kennedy and Lever, 1985)의 세포등이다.

뿐만 아니라 이러한 분화 촉진제는 세포 표면이나 그 외의 (glyco)protein에 영향을 끼치며(Brown and Parkinson, 1985; Marks *et al.*, 1985; Reiss *et al.*, 1985; Ziegler - Heitbrick *et al.*, 1985), glucocorticoid와 prolactin 수용체(Costlow, 1984; Hirai *et al.*, 1985), methylation patterns(Beston *et al.*, 1984; Walker *et al.*, 1984; Linevsky *et al.*, 1985), NADase activity(Bonelli *et al.*, 1985), cell cycle(Craig *et al.*, 1984) 등에 영향을 미친다. 이러한 알려진 작용에 근거하여 천연물로부터 분화 촉진제를 검색하는 방법을 개발 할 수 있을 것이다. 예로서 ginsenoside는 hepatoma cell의 분화를 촉진하고(Odashima *et al.*, 1979), flavonoid가 쥐의 백혈병 세포의 분화를 촉진하는 것으로 보고되었다(Kinoshita *et al.*, 1985).

2.6. 세포내 cyclic - AMP 관련 검색법

세포내의 cyclic-AMP의 농도는 epinephrine이나 glucagon과 같은 물질에 의해 증가되며 진핵 세포에서의 각종 대사 과정이 c-AMP의해 매개되는 것은 잘 알려져 있다(Robinson *et al.*, 1971; Ross and Gilman, 1980). 아직까지 c-AMP가 관여하는 생리 현상의 중요성에 대해 완전히 밝혀지지는 않았지만 어떤 특정 세포에서는 c-AMP의 농도가 증가하면 세포 성장과 분화가 억제된다(cf. Goulding and Ralph, 1989).

앞에서 언급되었던 forskolin은 세포내의 c-AMP의 농도를 증가시키는 물질이다. 이러한 물질들을 고혈압 치료에 임상적용하는 것이 고려되고 있으며 positive ionotropic effect와 혈소판 응집억제 작용이 있다고 한다(de Souza *et al.*, 1983). 이러한 작용들은 c-AMP의 유도에 의해 일어나며 강심작용과 항전이(antimetastatic) 작용과도 연관이 있을 것

이다. 이러한 물질들은 c-AMP의 생리작용이나 c-AMP의 합성을 촉진하는 adenyate cyclase의 분자구조적 특성을 연구하는데에도 쓸모가 있다(Olgiati *et al.*, 1984).

2.6.1. C-AMP 측정의 일반적인 방법

혈장, 뇨, cell culture 또는 조직내에서의 c-AMP의 농도는 쉽게 측정된다. 검사조직을 buffer에서 균질화하여 산이나 ethanol로 처리하여 단백질을 제거한다. C-AMP의 농도는 radioimmunoassay에 의해 측정할 수 있으며(Gilman, 1970; Brown *et al.*, 1971) 0.2 pmol 정도의 c-AMP를 측정할 수 있는 kit가 상품화 되어있다. Radioactive c-AMP는 Salomon(1974) 등의 방법으로도 측정이 가능하다. 이 방법은 시료를 Dowex 50AG WX4, neutral alumina column을 순차적으로 통과하여 얻어진 c-AMP를 liquid scintillation counting으로 측정한다.

2.6.2. Adenyate cyclase에 대한 활성 검색법

(a) Tissue slices를 이용하는 방법

원래 Metzger와 Lindner(1981)의 방법에 의하면 토끼심장의 절편을 forskolin과 함께 배양하면 c-AMP 의존성 protein kinase의 활성이 증가한다. protein kinase 활성의 증가는 c-AMP 농도증가와 비례하며 forskolin의 작용은 가역적이다. 유사한 예로 forskolin의 쥐 뇌상피 절편에 대한 작용도 보고되었다(Seamon *et al.*, 1981). 뇌의 절편을 [³H] adenine으로 미리 전처리 한 후 검사시료와 함께 배양하여 radioactive c-AMP는 그후 분리하여 Salomon(1974)등의 방법으로 정량한다.

(b) Membrane preparations를 이용하는 방법

여러조직으로부터 원형질 막을 분리하여 adenylate cyclase의 원료로 사용한다(Seamon *et al.*, 1981, 1983; Seamon and Daly, 1981). 이 추출물은 radiolabelled ATP와 배양하여 시료물질을 처리한 후 radiolabelled c-AMP는 Salomon(1974)등의 방법으로 분석한다.

(c) Cell culture를 이용하는 방법

배양된 astrocytoma는 항생제 검색에 이용될 수 있는데 세포의 형태변화를 광학현미경으로 관찰 할 수 있다. 세포내 c-AMP의 농도를 증가시키는 물질을 첨가하면 항암제와 유사한 현상을 나타내리라 예측되었는데(Swanson *et al.*, 1988) 이는 사실로 밝혀졌다. 이 방법은 항암제를 신속하게 검색하는 방법으로 이용될 수 있을 것이다.

2.6.3. C-AMP phosphodiesterase 억제효과 검색법

C-AMP는 생체내에서 C-AMP phosphodiesterase에 의해 5' -AMP로 대사되기 때문에 수명이 짧다. 그러므로 세포내 C-AMP의 농도를 증가시키는 한가지 방법은 C-AMP phosphodiesterase를 억제하는 것이다. Theophylline이나 papaverine과 같은 잘 알려진 억제제이외에도 천연물에서 많은 물질이 보고되었다(Nikaido *et al.*, 1981, 1982; Wagner *et al.*, 1986). Phosphodiesterase 활성억제 효과를 측정하는 방법은 주로 Thompson과 Appelman(1971)의 방법에 따른다. Phosphodiesterase를 radiolabelled C-AMP 및 검사시료와 함께 일정시간 배양한 후 배양물을 끊어 반응을 중지시킨다. 이것을 5' -nucleotidase와 배양하는데 5' -nucleotidase는 5' -AMP를 adenosine으로 정량적으로 변화시킨다. 남아있는 C-AMP는 음이온 교환수지에 흡착시켜 원심분리하여 상층액의 adenosine은 liquid scintillation counting에 의해 control과 비교한다. 또는 Filburn과 Karn(1973)에 의한 chromatographic 방법이나 면역학적인 방법으로 남아있는 C-AMP의 양을 측정할 수 있다. 혹은 5' - nucleotidase 처리후 방출되는 무기 인산염을 비색법(colorimetry)으로 측정할 수도 있다(Ames, 1966).

2.7. DNA와의 상호작용 검색법

많은 수의 항암제가 DNA와의 작용에 의해 항암효과를 나타내는 것으로 알려져 있다 (Umezawa, 1979a; Lown, 1982). 예로서 alkylating agents(e.g. chlorambucil, cyclophosphamide, melphalan, streptozocin) antitumor antibiotics(e.g. bleomycin, doxorubicin, mithramycin), cisplatin 등이 있다. 이것은 일견 모순인 것처럼 생각된다. 왜냐하면 DNA의 일차구조를 화학적 혹은 물리적 방법으로 변형시키면 그것이 바로 암의 원인이 될 수 있다고 알려져 있기 때문이다. 하지만 이런 상반된 약리작용은 약물의 농도를 조정함으로써 조절이 가능할 지 모르며 분자단위에서 우리가 모르는 요소들이 이런 상반된 약리작용의 원인이 되고 있는지도 모른다. 그러므로 암을 치료하기 위해 발암물질을 사용하는 위험성이 내재되어 있을지 모르지만 이러한 약물들이 실제로 임상에서 유용하게 사용되고 있기 때문에 그 나름대로 충분히 가치가 있는 것이다. 최근에는 DNA의 특정부위에 작용하는 저분자물질에 관심이 집중되어 있는데 이러한 물질은 DNA의 sequence-specific특성과 구조를 연구하는데 매우 중요하다(cf. Warpehoski and Hurley, 1988). 또한 이러한 물질들이 세포내 혹은 virus의 oncogene이나 lymphokine의 발현을 선택적으로 조절할 수 있을지 모르기 때문에 치료용으로도 매우 전망이 밝다. 따라서 DNA에 작용하는 새로운 구조의 약물은 치료효과 뿐만 아니라 실제적, 이론적인 면에서도 매우 중요한 의미가 있다.

DNA 혹은 deoxyoligonucleotide와 ligand를 형성하는 저분자 물질을 검색하는 방법은 여러가지가 있는데 예를 들면 equilibrium dialysis(Pezzuto *et al.*, 1980), spectrophotometric titration(Pezzuto *et al.*, 1983), size-exclusion HPLC(McPherson and Pezzuto, 1983), perturbation of NMR spectra(Berman and Shafer, 1983)등이 있다. 순수한 항암제와 이들 방법들간의 상관관계는 많이 보고되어 있으나(cf. Shimi *et al.*, 1982; Zwelling *et al.*, 1982; Ferguson *et al.*, 1983; Komiyama *et al.*, 1983; Konopa, 1983), 식물 추출물과 같은 비순수 혼합물에 대해 적용하기에는 적합하지 못한 면도 있다.

2.7.1. 돌연변이반응 검색법

앞에서 언급했듯이 많은 항암제들이 DNA와 작용하여 약효를 나타낸다. 그러므로 DNA에 작용하여 돌연변이를 야기시키는 물질을 검색하여 항암후보 물질을 찾을 수 있는데 이 목적으로는 단연 Ames의 방법이 널리 이용된다(Maron and Ames, 1983). 이것은 *Salmonella typhimurium*의 histidine 의존성을 변형시키는 작용을 측정하는 다소 간단한 방법이다. 일반적인 돌연변이성 검사에는 TA97, TA98, TA100, TA102와 같은 균주가 추천할 만 하다. 시료 자체에 포함되어 있는 histidine에 의해서 false positive가 나올 수 있고 시료 자체의 항균작용 때문에 false negative가 나올 수도 있다. Ames의 *Salmonella test*외에도 유사한 방법이 많이 알려져 있다(Hollstein et al., 1979).

2.7.2. Biochemical Induction Assay(BIA)

BIA는 *E. coli* strain BR513을 이용하여 간단하고 신속하게 lambda - lac Z fusion phage의 induction을 측정하는 방법으로서 Elespuru와 Yarmolinsky(1979)에 의해 개발되었다. *E. coli* strain BR513에서는 lac Z gene(β - galactosidase 생산)이 phage lambda의 promoter와 융합되어있다. lac Z gene의 전사(transcription)는 lambda repressor(cI)를 제거함으로써 시작되는데 이 lac Z gene의 발현은 일반적으로 SOS response라고 불리는 현상에 의해 일어난다(Walker, 1985). 생물체가 DNA복제에 장애를 받는 열악한 환경에 처하게 되면 din(damage - inducible)gene의 유도를 포함한 일련의 SOS 기능이 일어난다. SOS반응의 결과 β - galactosidase가 생산되고 이것은 간단한 비색반응으로 측정할 수 있다. 이 방법은 항생물질과 미생물 발효액을 검색하는데 효과적으로 이용되었다(Elespuru and White, 1983). 이론적으로 이 방법은 lysogeny를 검색하는 방법보다 우수한데 그 이유는 같은 작용 기전을 측정할 수 있으나 phage infection과 생산에 필요한 요건들이 요구되지 않으며 기술적으로도 간단하고 정량도 더 정확하다. 이 방법의 단점은 DNA의 구조와 기능을 변형시킬수

있는 물질은 역시 lac Z gene 의 구조와 기능을 변화시킬 수 있다는 것이다. 그래서 *E. coli* strain BR513을 추가적인 plasmid로 변형하여 개선된 실험방법이 보고되었다(Bartus *et al.*, 1984). 이와 관련된 검색방법으로서 SOS chromatest라는 것이 있는데(Quillardet *et al.*, 1982) 이 방법은 lac Z gene에 융합된 SOS - regulated gene의 발현을 측정한다. 또한 'rec - assay'라고 불리는 방법이 개발되었는데 이는 repair - deficient 또는 recombinant - deficient 돌연변이가 DAN 손상작용 물질에 더 민감하다는 것을 이용한 방법이다(Sadaie and Kada, 1976; Yoshimoto *et al.*, 1978; Tanida *et al.*, 1981, Mazza; 1982).

2.7.3. DNA cleavage assay

DNA cleavage assay는 supercoiled covalently closed circular DNA를 기질로 사용하여 천연물로부터 항암후보 물질을 검색하는 방법이다. Supercoiled DNA내의 수천개의 염기중에서 어느 한군데만 끊어져도 form I DNA가 form II로 변하며 이것은 agarose gel electrophoresis에 의해 분리가 되므로 매우 감도가 높은 방법이다. Form I (supercoiled DNA)과 form II (nicked circular DNA)는 분자량이 같지만 압축된 형태의 form I DNA가 agarose gel 상에서 더 빨리 이동한다.

검사시료를 supercoiled DNA와 함께 일정시간 배양하여 이것을 1.2 % agarose slab gel 에서 전기영동하여 DNA strand의 절단여부를 본다(Sugiyama *et al.*, 1985; Barr *et al.*, 1988). 이 방법으로 발견된 물질에는 epicatechin(Chrisey *et al.*, 1988), procyanidin B₂(Chrisey *et al.*, 1988) 그리고 일련의 5 - alk(en)yl resorcinol등이 있다(Barr *et al.*, 1988; Scannell *et al.*, 1988).

2.7.4. Topoisomerase I, II 저해제 검색법

DNA 2중나선의 복제과정에 topoisomerase I, II가 관여하는데 이 효소들은 일시적으로 DNA 1가닥(topoisomerase I) 또는 2가닥 모두(topoisomerase II)를 해체시키거나 DNA 가닥을 다시 연결시키는데 작용한다. Drlica와 Franco(1988)에 의해 발표된 바에 의하면 coumarin, quinolone, anthracycline, ellipticine, epipodophyllotoxin 등이 topoisomerase II의 저해제로 알려졌다. 아직까지는 camptothecin만이 topoisomerase I의 저해제로 알려져 있다(Hutchinson, 1981). Camptothecin의 존재하에서 DNA는 topoisomerase에 의해 해체된다. 그러나 다시 DNA가닥이 연결되는 과정은 차단된다. 이 작용기전을 밝히기 위해 camptothecin에 내성이 있는 leukemic cell line을 분리하였는데 이 cell line의 camptothecin 내성은 바로 topoisomerase I에 대한 insensitivity(Andoh *et al.*, 1987)와 관련이 있다.

DNA topoisomerase I은 배양된 세포로부터 부분적으로 정제할 수 있다(Liu and Miller, 1981). 우선 세포핵을 분리하여 파괴한 다음 polyethyleneglycol을 첨가하여 DNA를 침전시킨다. 그후 상등액은 hydroxyapatite와 phosphocellulose column을 통과시킨다. 활성은 pBR 322 DNA의 relaxation으로 monitor한다. nicked circular DNA를 relaxed covalently closed circular DNA와 구별하기 위해서는 Andoh 등(1987)의 방법을 이용한다.

2.7.5. DNA와의 직접반응 검색법

HPLC를 이용하여 DNA와 상호반응하는 물질을 검색할 수 있는 방법이 개발되었는데(Pezzuto *et al.*, 1988a) analytical C18 HPLC column을 사용한다. DNA와 결합하는 물질을 DNA와 함께 HPLC에 injection하면 free DNA의 peak intensity가 그만큼 줄어든다. Doxorubicin, ellipticine, fagaronine을 사용하여 측정하였을때 측정감도는 0.005 % (w/w) 이하였다. 이 방법은 DNA와 결합하는 물질을 검색하는데 유용하며 사용방법이 간단하고 비용이 적게드는 장점이 있다.

2.8. 면역조절활성 검색법

항암, 항virus작용에는 여러 면역인자들이 관련되어 있으므로 면역반응의 증강을 통해 암의 치료방법을 찾는 것도 합리성이 있다. Differentiation factor와 growth factor는 별개로 간주되고 있지만 interleukin-4와 interleukin-5는 성장을 촉진하기도 하고 다른 조건에서는 세포 성숙을 촉진시키기도 한다(Tanabe *et al.*, 1987). 뿐만 아니라 분화촉진제에 의해 영향을 받는 여러 인자들이 역시 lymphokine에 의해서도 똑같이 영향을 받는 것으로 보고되어 있다. 그러므로 분화촉진제가 면역반응 촉진작용에 의해 그 효과를 나타내는지 모르며 분화촉진제가 세포로 하여금 lymphokine의 생산을 유도하는 것 같다.

2.8.1. Lymphocyte 활성 검색법

Murine splenocyte는 검사시료의 면역조절(immunomodulatory)활성을 검색하는데 이용될 수 있다(Weismann *et al.*, 1985). Bestatin, arphamenines A & B, amastatin등은 [³H] thymine의 incorporation을 증가시켰다. 이러한 mitogenic activity는 macrophage를 제거하거나 세포를 concanavalin A나 lipopolysaccharide로 전처리하면 나타나지 않았다. 비슷한 접근방법으로 Nakamura(1986)등은 murine splenocyte를 이용하여 245가지 미생물 배양액의 면역조절 활성을 검색하였다. Splenocyte를 분리 배양한후 미생물 배양액이 [³H]thymine incorporation에 영향을 미치는 concanavalin A, phytohaemagglutin 또는 lipopolysaccharide의 존재유무와 비교하였다. 최근에는 Wagner(1988)등이 인체 peripheral granulocyte와 lymphocyte를 이용해 면역조절 활성을 검색하였다. Heparinised peripheral blood로부터 Ficoll gradient centrifugation 방법으로 lymphocyte를 분리하여 실험에 사용하였다. 매우 낮은 농도에서(10 ng - 10 fg/ml) cytotoxic 또는 cytostatic한 물질들이 이 세포들을 활성화시켰다. 그러므로 이러한 세포 활성화 반응을 이용하여 면역증강제를 발견, 규명하는데 이용할 수 있을 것이다.

전임상(preclinical)연구에서 매우 낮은 농도(3 - 7 ng/ml)에서 cytosine arabinoside, adriamycin, methotrexate 등의 항암물질이 면역증강 효과를 나타내는 것이 밝혀졌다 (Sachs, 1982). 의약개발의 관점에서 보면 이러한 낮은 농도에서 약효를 볼 수 있으면 인체에 대한 독성문제를 쉽게 해결할 수 있을 것이다.

2.8.2. Lymphokine 유도 검색법

암과 관련된 면역 요법에 사용할 수 있는 lymphokine이 점점 늘어나고 있는데 예를 들면 interferon, interleukin, interleukin receptor, tumor necrosis factor, granulocyte / macrophage colony - stimulating factor 등이다. 적절한 약제를 저농도에서 사용하면 선택적으로 이들 물질의 생합성을 유도하여 항암 효과를 발현할 수 있을 것으로 보인다. γ - interferon과 interleukin I 유도 검색법은 lymphocyte를 검사 시료와 함께 처리하여 γ - interferon의 생산 여부를 Elisa test kit를 사용하여 분석한다. 반응물을 간단히 정제하여 γ - interferon에 대한 mouse monoclonal antibody로 전처리된 96 - well plate에 첨가한다. 그 다음에 인체 γ - interferon 표준량을 well에 첨가한다. 배양 후 plate를 washing 한 후 인체 γ - interferon에 대한 rabbit polyclonal antibody 용액을 첨가하여 배양한다. Plate를 다시 washing하여 peroxidase - conjugated goat anti - rabbit immunoglobulin 용액으로 처리한다. 최종적으로 plate를 세척하고 chromogenic solution으로 처리한 후 pH 2.3의 citric acid buffer로 처리한다. 그후 plate를 microplate reader로 판독하여 γ - interferon을 정량한다.

2.9. 효소 활성 및 대사 저해 검색법

2.9.1. 대사 저해 물질 검색법

Hanka 등에 의해 개발된 microbial system은 antimetabolite activity를 가진 물질을 검출하는데 적당하다(Hanka, 1977, 1979; Hanka *et al.*, 1978a). Antimetabolite에 대해 민감한 미생물은 특정 영양소가 결핍된 배지에서 더욱 더 성장이 억제된다는데 근거를 두고 있다. 이러한 차별적인 선택성(감수성)은 일반적인 항균효과와는 구별이 된다. 이 방법을 사용해 다수 물질이 분리되었다(Hanka, 1974, 1977, 1979; Hanka *et al.*, 1978a, b).

2.9.2. 효소 저해제 검색법

항암제는 몇몇 특정 효소 반응을 억제한다고 알려져 있는데 이를 이용하여 항암 물질을 검색하는 방법에 대해 모색이 되어왔다.

예를 들자면 orotidine 5' - phosphate decarboxylase(Appel, 1968; Hall *et al.*, 1982a-c), inosine 5' - phosphate dehydrogenase(Becher and Lohr, 1979; Hall *et al.*, 1982a-c), carbamyl phosphate synthetase(Kalman *et al.*, 1966; Hall *et al.*, 1982a-c), thymidylate synthetase(Kampf *et al.*, 1976; Hall *et al.*, 1982a-c); phosphorylation of deoxycytidylic acid(Maley and Ochoa, 1958), ribonucleotide reductase(Moore and Hurlbert, 1966; Hall *et al.*, 1982b, c), phosphoribosyl - 1 - pyrophosphate amidotransferase(Wyngaarden and Ashton, 1959; Hall *et al.*, 1982a-c), *in vitro* RNA, DNA or protein biosynthesis(Hall *et al.*, 1982a-c), aspartate transcarbamylase(Hall *et al.*, 1982b, c), formate incorporation into purines(Hall *et al.*, 1982a-c), (non)histone protein phosphorylation(Hall *et al.*, 1982a, c, e), oxidative phosphorylation(Hall *et al.*, 1982b, c, e), (deoxy)ribonuclease(Hall *et al.*, 1982c,

e), DNA or RNA polymerases(Hall *et al.*, 1982a, c), deoxythymidylate kinases(Hall *et al.*, 1982a - c), deoxythymidylate mono(di)phosphate kinases(Hall *et al.*, 1982a-c), S - adenosyl - L - methionine methyl transferase(Hall *et al.*, 1982c), hexokinase(Hall *et al.*, 1980), phosphofructokinase(Hall *et al.*, 1980), lactate dehydrogenase(Hall *et al.*, 1980), glucose - 6 - phosphate dehydrogenase(Hall *et al.*, 1980), fructose - 1,6 - diphosphatase(Hall *et al.*, 1980), malic dehydrogenase(Hall *et al.*, 1980), succinic dehydrogenase (Hall *et al.*, 1980), adenosine phosphatase(Hall *et al.*, 1980), glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase(Hall *et al.*, 1980), glucose - 6 - phosphatase(Hall *et al.*, 1980), 5' - nucleotidase(Ogawara *et al.*, 1985), DNA synthesis and repair with isolated nuclei(Coetzee and Ove, 1979), oestrogen receptor(Delbarre *et al.*, 1985), partial reactions of protein biosynthesis{poly U - directed polyphenylalanine(Hall *et al.*, 1983b; Pezzuto and Hecht, 1980), 80s initiation complex formation(Liou *et al.*, 1982), ternary complex formation(Liou *et al.*, 1982), tRNA aminoacylation(Liou *et al.*, 1982), initiation of protein synthesis(Hall *et al.*, 1983a), elongation of protein synthesis(Hall *et al.*, 1982d, 1983a)}등이다.

전반적인 단백질 합성 저해제도 항암 작용을 나타내는 것으로 알려져 있어 이 효과를 측정하는 다양한 *in vitro* system이 사용되었다(Barbieri *et al.*, 1980; Beran *et al.*, 1980; Gaspesri - Campani *et al.*, 1980; Gessner and Irvin, 1980; Hartley and Beevers, 1982; Zalacain *et al.*, 1982; Considine *et al.*, 1983; Ready *et al.*, 1984).

2.9.3. 엽산대사 저해제 검색법

Dihydrofolate reductase는 세포내 folate를 환원형으로 유지시킴으로써 간접적으로 purine nucleotide의 합성을 촉매한다. methotrexate로 매개되는 항암작용의 기전은

pleiotropic 하지만 (cf. Li and Kaminskas, 1984; Lonn and Lonn, 1988), 이 물질에 의한 항암작용의 기전은 dihydrofolate reductase의 저해에 의한 것으로 믿어진다(Chabner and Myers, 1982).

이 효소의 활성은 spectrophotometric 방법에 의해 손쉽게 측정될 수 있으며(Ho *et al* ., 1972; Zakrzewski and Nichol, 1960) antifolate를 검색하는 새로운 방법들도 보고되어 있다(cf. Omura *et al.*, 1985 b).

2.9.4. Adenosine deaminase 저해제 검색법

Adenine nucleoside류는 항암제로 매우 흥미있는 물질들이다. 하지만 Adenosine deaminase는 특정 암조직에서는 매우 활성이 높아서 이러한 adenine nucleoside류를 대사하여 불활성화 시킨다. 그런 이유에서 adenosine deaminase 저해제의 분리와 규명에 관심이 모아지고 있다. 이론적으로 이들 물질들은 adenosine nucleoside류의 약효를 높이기 위해 사용될 수 있다(Plunkett *et al.*, 1979; Glazer, 1980; Shannon and Schabel, 1980).

이 효소의 활성과 그에 대한 억제작용은 spectrophotometric 방법에 의해 측정될 수 있다(Kalckar, 1947). 이렇게 밝혀진 저해제에 대해서는 그 작용기전에 대해 연구가 되어있다(Newby, 1981; Omura *et al.*, 1985b, 1986; Schaumberg *et al.*, 1985).

2.9.5. Calmodulin 저해제 검색법

세포내에 Ca^{2+} 농도가 증가하면 이것이 calmodulin에 결합하여 구조변화를 일으키고 그 결과 활성화된 calmodulin이 효소와 반응하여 효소 활성이 증가된다.

여러 효소들이 Ca^{2+} 존재하에서 calmodulin에 반응하는데(e.g. phosphodiesterase, adenylylase, protein kinase, phosphatase, etc.). 이 현상은 세포증식과도 관련이 있다

(Hait and Lazo, 1986). 예를 들어 calmodulin의 농도는 세포주기의 G1에서 S phase로의 이행에 중요한 역할을 한다(Chafouleas *et al.*, 1982). 그러므로 Hait와 Lazo에 의해 보고된 바와 같이 다수의 calmodulin 길항제가 암의 화학 요법의 목표가 될 수 있다. 다수의 효소들이 calmodulin에 의해 활성이 좌우되므로 다양한 검색법을 생각할 수 있다. 일반적으로 phosphodiesterase를 이용하는데 검사 시료의 저해 작용을 Ca^{+2} /calmodulin의 존재 유무에 따라 검사하여 calmodulin에 대한 선택적인 길항 작용을 측정할 수 있다(cf. Kase *et al.*, 1986).

2.10. 암의 발생, 진전 및 증식에 관련된 검색법

2.10.1. 성장인자 - 수용체간 반응 저해제

악성 종양 세포는 growth factor를 생산하여 외부 수용체와의 작용으로 phenotypic expression에 영향을 미친다. 이 현상은 " autocrine secretion "이라 불리운다. oncogene의 발현으로 생산된 peptide를 비롯한 몇몇 peptide들은 암세포에서의 autocrine secretion과 연관이 있다. 예를 들면 transforming growth factor- α 와 유사하거나 동일한 단백질, 혈소판 유래의 성장인자, bombesin과 gastrin등이다. 이러한 인자들에 의해 유도되는 transforming 또는 mitogenic 반응은 수용체 분자와의 작용에 의한 것이기 때문에 이 과정에 대한 길항 작용으로 암세포의 성장을 억제할 수 있을 것이다. 이론적으로 이 반응은 암세포에 대해 선택적이다. 성장인자 길항제를 검색하는 데에는 표준 수용체 - ligand binding assay를 이용 할 수 있다(Chang and Lotti, 1986; Defeo - Jones *et al.*, 1988; Heimbrook *et al.*, 1988). Autocrine factor와 수용체와의 반응을 억제하는 목적은 이로 인해 일어나는 반응을 차단하기 위함이다. 그러므로 또 다른 방법은 그 반응자체를 억제하는 것이다. 그 중요한 예로 autocrine에 의해 매개되는 반응인 tyrosine kinase activity(Land

et al., 1983; Hunter and Cooper, 1985)가 있다. Tyrosine kinase 저해제를 검색하는 한 방법은, A431 세포로부터 분리된 원형질막을 epidermal growth factor, 저해제인 [³²P]ATP, 그리고 phosphate acceptor인 합성 peptide(Arg - Arg - Leu - Ile - Glu - Asp - Ala - Glu - Tyr - Ala - Ala - Arg - Gly)와 반응시켰다. 반응 후 peptide는 침전시켜 회수하여 anion - exchange paper로 잔여 [³²P]ATP를 제거하였다. 마지막으로 incorporation 정도를 scintillation counter로 측정하였다(Imoto *et al.*, 1987).

Protein - tyrosine kinase 활성이외에도 oncogene의 생산물에 의해 매개되는 다른 종류의 반응에 대한 지식도 축적되고 있으므로(Land *et al.*, 1983; Bell, 1986) oncogene 발현의 여러 반응의 저해제를 검색할 수 있는 방법의 설계가 가능하다. 뿐만아니라 DNA분자와의 site - specific 반응 가능성을 고려할때 oncogene의 발현을 선택적으로 조절할 수 있을 지도 모른다.

2.10.2. Phorbol ester와 수용체 반응 또는 protein kinase C 활성화 검색법

최근에 phorbol ester의 작용기전 및 수용체에 관해 많은 발전이 있었는데(Nishizuka, 1984; Takai *et al.*, 1984), 특히 중요한 것은 12 - O - tetradecanoylphorbol 13 - acetate(TPA)가 protein kinase C에 결합하여 이를 활성화 시킨다는 사실이다(Castagna *et al.*, 1982; Nishizuka, 1984; Takai *et al.*, 1984; Bell, 1986). 그리고 이것은 암의 발생에 매우 중요한 과정이다. 그러므로 phorbol ester의 촉매 작용 저해에 대해 연구하는 것도 합리적인 접근 방법이 될 수 있다(Inagaki *et al.*, 1986; Kase *et al.*, 1986, 1987; Sako *et al.*, 1987; Loomis and Bell, 1988; Osada *et al.*, 1988).

(a) Protein kinase C의 정제

Protein kinase C를 정제하는 방법은 여러 가지가 보고되었으며(Ashendel *et al.*, 1983, Uchida and Filburn 1984; Coussens *et al.*, 1986; Parker *et al.*, 1986) 여러가지 형태로 존재한다는 것이 알려져있다(Coussens *et al.*, 1986). 검색하는 목적으로는 부분적으로만 정제된 효소를 사용해도 충분하다. 예를 들어 Ashendel 등의 방법으로 돼지 뇌에서 시작하여 DEAE column chromatography를 거치면 충분히 정제된 물질을 얻을 수 있다. 활성 효소 분석은 [³H] PDBu(Phorbol - 12, 13 - dibutyrate)와의 binding으로 동정할 수 있다.

(b) Phorbol ester 수용체 검색법

부분적으로 정제된 protein kinase C를 [³H] PDBu, CaCl₂, phosphatidylserine 및 검사시료와 함께 배양한다. Binding은 polyethyleneimine - treated glass fibre discs를 사용하여 분석하고 비선택적인 binding은 500배 과량의 unlabelled PDBu의 존재하에서 측정한다(Perrella *et al.*, 1986). 비슷한 방법으로 Euphorbiaceae속 식물들의 phorbol ester 분포가 검색되었는데 142종중 55종이 활성을 나타내었다(Beutler *et al.*, 1990).

(c) Protein kinase C 검색법

부분적으로 정제된 protein kinase C를 TPA, CaCl₂, phosphatidylserine, histone(type III) 및 검사시료와 함께 배양한다. 일정시간 후 [³²P] ATP를 첨가하여 다시 배양한후 Whatman P81 cation - exchange paper를 사용하여 incorporation을 측정하여 대조군에 대한 상대비율로 나타낸다(Perrella *et al.*, 1986). Protein kinase C의 활성을 측정하는 방법은 일반적이며 검사시료가 phorbol ester - receptor반응을 저해하지 않는다는 가정하에 이루어진다. 만약 검사시료가 protein kinase C의 활성을 저해한다면 이것은 촉매작용을 저해하기 때문인지 아니면 TPA - induced stimulation을 저해하기 때문인지 확실하지 않다.

Protein kinase C의 저해제를 검색하는 또다른 방법은 Osada(1988)등에 의해 보고되었다. PDBu나 teleocidin 존재하에서 K562 cell은 plastic dish에 부착하여 'bleb formation'이라 불리는 형태적 변형을 일으킨다. Bleb형성은 protein kinase C의 활성화에 기인하는 것 같으며 protein kinase C의 저해제(e.g. staurosporine, isoflavones)는 bleb 형성을 저해한다. Bleb 형성을 유도하며 동시에 protein kinase C를 활성화시키는 새로운 항생물질이 발견되어 이 가설을 간접적으로 뒷받침한다(Magae et al., 1988). 이 물질의 binding site는 phorbol ester binding site와는 다르다. 이 검색방법에서는 결과를 광학현미경으로 쉽게 관찰할 수 있기 때문에 대규모 검색에 적당하다.

2.10.3. 2차 전달물질 생산저해 검색법

어떤 성장인자는 간접적으로 phospholipase C를 활성화시키는 것으로 밝혀졌다. phospholipase C는 phosphatidylinositol - 4, 5 - diphosphate(PIP_2)로부터 1, 2 - diacylglycerol(DG)과 inositol - 1, 4, 5 - triphosphate(IP_3)와 같은 2차 전달물질을 생산한다. DG는 일반적으로 protein kinase C에 결합하여 이를 활성화 시키는 2차 전달물질로 알려져 있다. 그리고 어떤 oncogene(e.g. *sis*, *ras*)은 성장인자(e.g. 혈소판에서 유래된 성장인자, PDGF) 그리고 그외 이 cascade에 관여하는 물질(e.g. G-protein)들과 유사하게 작용하는 것으로 보인다. 그러므로 이러한 TPA와같은 발암물질 이외의 인자로 인한 2차 전달계의 조절이 인체의 발암진행 과정에 연관되어 있을 것으로 보인다.

이러한 추정과 일치하게 dioctanoylglycerol이 최근에 stage II tumor promoter(Verma, 1988)로 밝혀졌다. 그러므로 이론적으로 DG나 PIP_2 의 생산을 저해할 수 있는 물질은 항암제로 사용될 수 있다.

2.10.4. Polyamine 대사저해제 검색법

Polyamine과 관련된 대사과정이 암 발생기전과 관련이 있다는 것은 잘 알려져 있다 (Tabor and Tabor, 1984). 그러므로 polyamine 합성 저해제가 항암제로 사용 가능하리라는 짐작을 할 수 있다. 예를 들면 ornithine decarboxylase, S-adenosylmethionine decarboxylase, aminopropyltransferase, polyamine transport 등에 대한 저해제 검색법을 생각할 수가 있는데 이미 몇 종류의 화합물들이 이들 효소에 대한 저해제로 밝혀졌다(Pegg, 1988).

Polyamine 합성의 첫번째 비가역 반응단계는 ornithine을 putrescine으로 전환시키는 과정이다. 이것은 ornithine decarboxylase에 의해 촉매된다. Yuspa(1976)등에 의해 처음 보고된 바와같이 phorbol ester는 mouse epidermal cell culture에서 ornithine decarboxylase의 활성을 증가시킨다. 그러므로 갓 태어난 BALB/c mice의 epidermal cell을 검색용으로 사용할 수 있다. 배양된 세포를 약 3-5일간 검사시료로 처리하고 그 후 PDBu로 처리한다. 세포층을 여러번 세척한 후 세포를 긁어모아 단백질을 측정하고 ornithine decarboxylase활성을 Lichti와 Gottesman(1982)의 방법으로 측정한다.

많이 연구되고 있는 또 다른 효소는 spermidine과 spermine synthetase 이다. 이 효소들은 과량 존재하기는 하지만 이 효소저해제를 규명하는 것이 충분히 의미는 있다(Coward and Pegg, 1987; Pegg, 1988). 검색방법과 bioassay-directed fractionation에 이용 예가 보고되어 있다(Hamaguchi *et al.*, 1987).

2.10.5. Plasminogen activator 저해제 검색법

Plasminogen activator는 plasminogen을 plasmin으로 분해시키는 단백분해 효소이다. 단백분해 효소는 일반적으로 세포증식, 발암기전, 세포변이 등과 관련이 있다. Chick embryo fibroblast와 HeLa cell culture에서 TPA는 plasminogen activator의 농도를 약 10

배정도 증가시킨다. HeLa cell은 유지가 손쉬우므로 plasminogen activator저해제 검색에 적절한 system이다.

우선 24 - well plate를 [¹²⁵I] fibrin으로 도포하고 여기에 cell을 접종하고 검사시료를 첨가한다(Unkeless *et al.*, 1973). 일정시간 배양후 배지를 채취하여 방출되는 방사능을 gamma counting으로 측정한다.

2.10.6. 혈관형성 저해제 검색법

암에서 기인하는 인자들은 endothelial cell의 증식과 혈관형성을 활성화 시키며, 암세포 수의 증가는 모세혈관의 증가를 전제로하기 때문에(Folkman, 1986) 혈관형성 저해제가 암의 억제에 작용하리라는 추론이 가능하다. 새로운 혈관형성 저해제를 발견하기 위해 여러 가지 검색법을 생각할 수 있다. 예를 들면 토끼의 각막(Gimbrone *et al.*, 1974)이나 배양된 endothelial cell (Folkman and Haudenschild, 1980)등을 이용할 수 있다. 가장 보편적이고 편리한 방법은 petri dish에서 배양된 chick embryo를 이용하는 것이다(Crum *et al.*, 1985; Folkman, 1985). Heparin을 표준혈관형성 촉진제로 사용하여 검사시료의 저해작용을 1 - 2 일내에 검정할 수 있다.

제3장 실험방법

Bleomycine을 positive control로 삼아 다양한 조건에서 DNA와 함께 전기영동을 실시하여 천연물의 검색에 적합한 조건을 확립하였다. 최종 실험 조건은 '3.2. 실험 방법'에 기재되어 있다. 이 방법에 의거하여 실제로 천연물에서 분리된 다양한 화합물들에 대해 검색을 실시하였다.

3.1. 재료, 시약 및 기기

3.1.1. 재료 및 시약

supercoiled DNA: ϕ x174 RFI DNA(Biolabs)

buffer: Tris-acetate-EDTA buffer(Sigma)

ethidium bromide(Nacalai tesque)

agarose(Sigma)

DMSO(dimethylsulfoxide)(Sigma)

bleomycin sulfate(Sigma)

Polaroid film: ISO 3000/36, 667(Polaroid)

3.1.2. 기기

incubator(Vision Scientific, VS-1203 P3)

electrophoresis kit(Sanplatech)

power supply(Vision Scientific, KMC-101)

UV lamp(Spectroline, ENF-240c)

UV DNA photographic system(Seolin Scientific)

3.2. 실험 방법

1. Supercoiled DNA (ϕ x174 RFI DNA)를 Tris-acetate-EDTA buffer(1x)에 녹여 약 1500ng/50 μ l의 농도가 되도록 조제하여 각각 test tube에 넣어 냉동고에 보관한다.
(Tris-acetate-EDTA buffer(1x)은 stock solution(10x)를 희석시켜 사용함.)
2. 검사시 필요한 DNA는 1번에서 준비한 DNA 용액에 buffer 20 μ l (6x)를 넣는다.
3. 앞에서 준비한 DNA용액 5 μ l와 검사 시료 5 μ l(검사 시료의 농도는 통상 1000 μ g/ml에서부터 시작한다)를 혼합한다.
(검사시료는 1 mg을 준비하여 1 ml의 solvent에 녹인다. 이때 사용하는 solvent는 시료가 친수성이 있을때에는 buffer(1x)에 녹이고 친수성이 없을때에는 10 % DMSO에 녹인다.)
4. 혼합 용액을 incubator에서 37 $^{\circ}$ C에서 5-6 시간 반응시킨다.
5. Ethidium bromide(1 %)를 함유한 0.7 % agarose gel을 준비한다.
(0.7 % agarose gel은 0.14 g의 agarose 분말을 20 ml의 buffer(1x)에 넣어 100 $^{\circ}$ C의 끓는 물에서 증탕으로 완전히 용해시킨후 60 $^{\circ}$ C의 oven에서 3-5 분가량 식힌다
음 ethidium bromide를 10 μ l 넣어준다.)
6. 준비된 agarose 용액을 mold에 고르게 부어 40분정도 굳힌다.
7. 반응 혼합액을 agarose gel에 loading 한 후 Tris-acetate-EDTA buffer에서 1 시간 동안 (100V, 60mA) 전기 영동한다.
8. 전기 영동 후 agarose plate를 UV 365nm에서 관찰하고 polaroid film으로 기록한다.
9. Positive control로서는 bleomycin을 사용한다.
10. 모든 glassware 및 용기는 사용전에 autoclave로 멸균한다.

제4장 결과 및 고찰

본 실험에 사용된 supercoiled DNA는 ϕ x174 RF1 DNA로서 ϕ x174 am 3cs 70으로 감염된 *E. coli*로부터 분리 정제된 것이다(Godson and Vapnek, 1973). ϕ x174 RF1 DNA는 supercoiled covalently closed circular 형태(form I)의 상태로 있는데 외부요인에 의해 염기배열의 어떤 위치에서든지 한가닥이 절단되면 nicked circular 형태(form II)로 변한다(Figure 2). Agarose gel상에서 form I이 form II보다 빨리 이동한다. 이는 같은 분자량이라도 form I의 분자형태가 더 압축되어있기 때문이다.

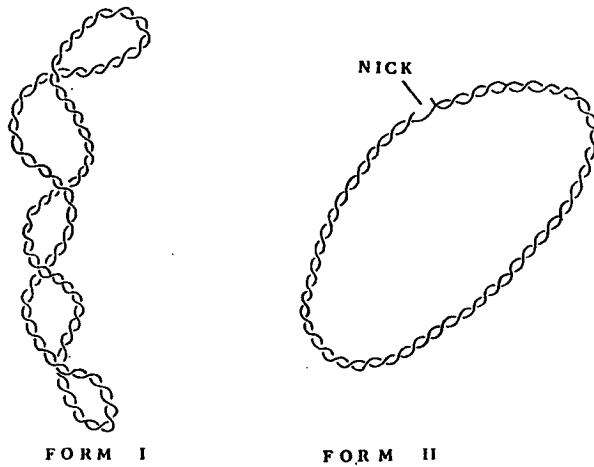


Figure 2. supercoiled covalently closed circular DNA(form I) and nicked circular DNA(form II)

DNA cleavage assay에 사용된 화합물들은 다음과 같다(Figure 3).

1. catechin-7-0-rhamnoside
2. gentiopicrin
3. swertiamarin
4. pectenotoxin II
5. psammaphin A
6. sweroside
7. cantleyoside
8. sesamoside
9. 8 - 0 - acetylshanziside methylester
10. shanziside methylester
11. loganin

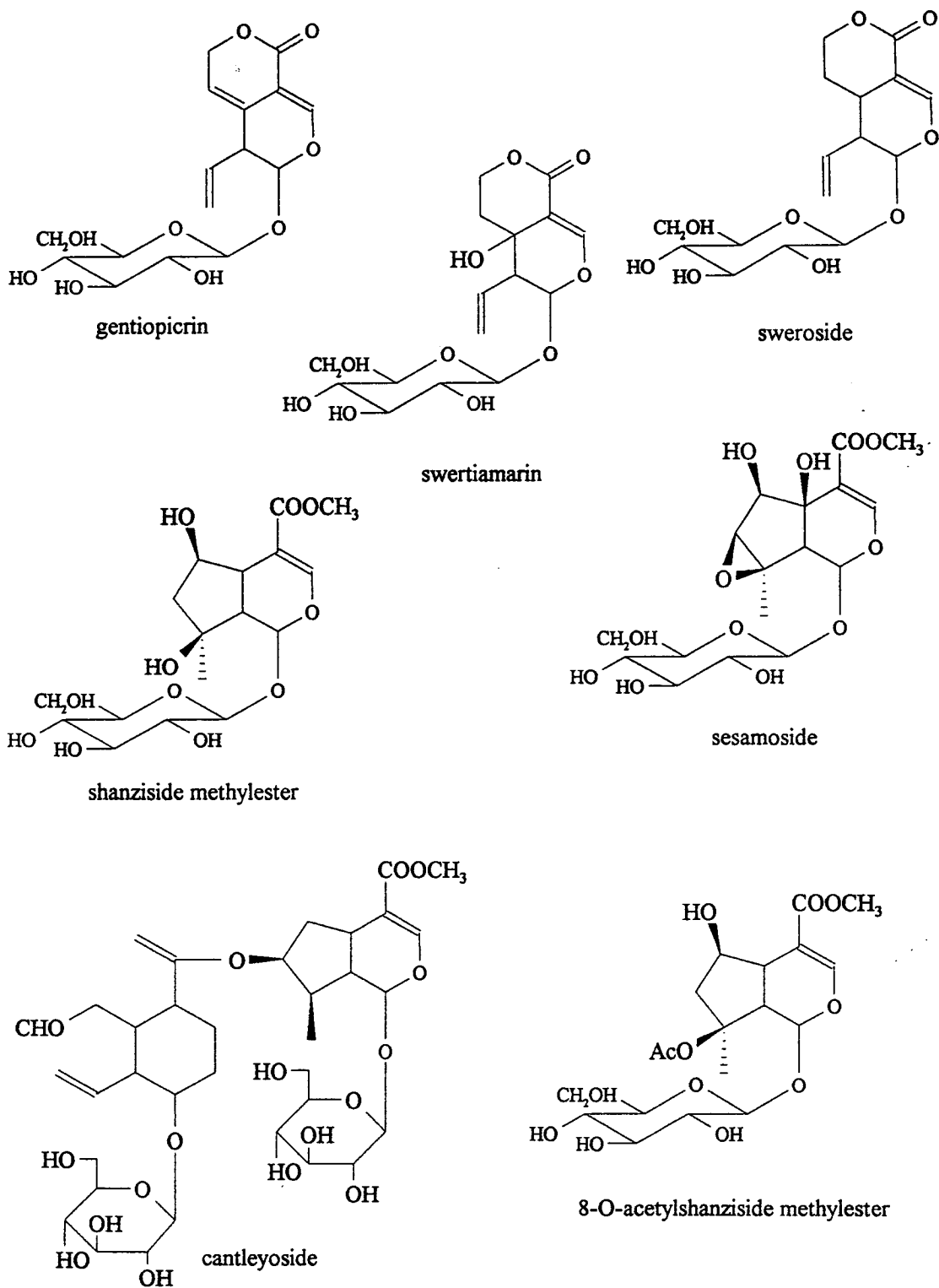
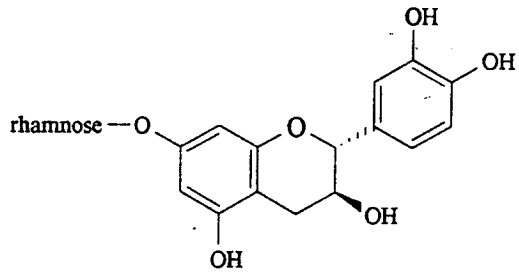
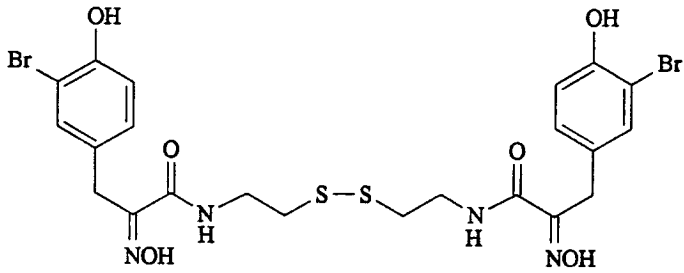


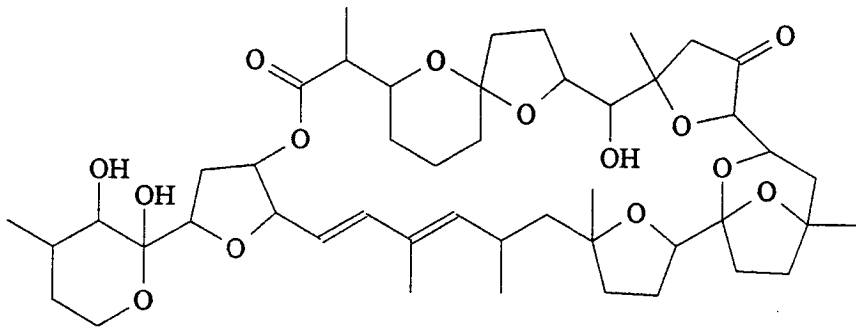
Figure 3. Compounds tested on DNA cleavage assay



catechin-7-O-rhamnoside



psammalin A



pectenotoxin II

Figure 3. Continued

4.1. DMSO에 의한 영향 검정

DNA cleavage assay는 검사시료를 buffer에 녹여서 시행하는 것이 원칙이나 천연물로부터 유래된 분획이나 물질을 검색할때 검사시료가 buffer에 잘 녹지않는 경우가 종종 있다. 이런 경우에 흔히 DMSO를 첨가하면 용해도를 높일 수가 있는데 일단 DMSO (dimethylsulfoxide)에 의한 영향을 관찰해 보았다. Figure 4에서 사진 하단부분이 well이 위치한 전개 출발점이다. 아랫쪽에 있는 band가 form II DNA, 그리고 윗쪽에 있는 band가 form I DNA이다. 1번 lane에는 부분적으로 절단된 DNA를 전개했는데 form I 과 form II band가 모두 나타났다. 2번과 5번 lane에는 DNA만을 전개시켰다. 2번 DNA는 5 시간 incubation시킨 것이고 5번 DNA는 incubation시키지않은 것이다. 사진에서 볼 수 있듯이 37 °C에서 5 시간 incubation 하는 동안에 자연적으로 절단되는 form I DNA의 양은 무시해도 좋을 것 같다. 3번과 4번 lane에는 각각 DMSO 10 %, 20 %와의 혼합물을 전개시켰는데 DMSO 가 DNA cleavage에 미치는 영향은 별로 없는 것 같다. 실험 결과 DMSO 20 %에서도 검색에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 하지만 DMSO를 사용하는 경우에는 항상 control에도 같은 농도의 DMSO를 첨가함으로써 보정을 해 줄 수 있다.

DNA를 장기간 보관하거나 또는 보관 상태가 불량하면 Form II로 상당량 변화된다. 그러므로 매 실험마다 동일 batch의 DNA를 control로 사용하였다(Figure 4).

1. Partially cleaved(oid) DNA 5 μ l
2. DNA control 5 μ l(incubated)
3. DNA 5 μ l + DMSO 10 %, 5 μ l
4. DNA 5 μ l + DMSO 20 %, 5 μ l
5. DNA (not incubated) 5 μ l

condition : 0.7 % agarose gel

60 mA, 100 V

incubation time : 5 hrs.

temperature : 37 $^{\circ}$ C

gel running time : 40 min.

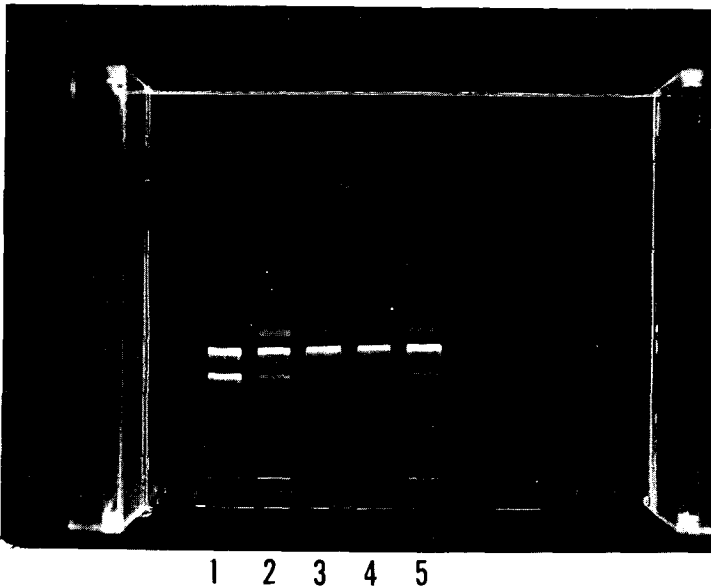


Figure 4. Effect of DMSO on DNA cleavage assay

4.2. Catechin-7-0-rhamnoside

Flavonoid의 일종인 epicatechin은 DNA cleavage assay에서 효과를 나타내는 것으로 보고되어 있다(Chrisey *et al.*, 1988).

Epicatechin과 catechin은 서로 이성체로서 B-ring과 C-ring의 결합 위치에서의 configuration만이 다르다.

Catechin에 rhamnose가 결합된 catechin-7-0-rhamnoside에 대해 검색을 실시하였다. 일차적으로 catechin-7-0-rhamnoside를 1000 ppm의 농도에서 검색하였다. Positive control로 사용된 bleomycin은 1 ppm의 농도에서도 뚜렷한 효과를 나타내는데 비해 catechin-7-0-rhamnoside는 DNA control과 별 차이가 없었으므로 효과가 없는 것으로 판정되었다(Figure 5).

Epicatechin과 달리 catechin-7-0-rhamnoside에서는 DNA cleavage 효과가 나타나지 않는 이유는 stereochemistry의 차이 때문이거나 glycoside 형태이기 때문인 것으로 짐작된다. Catechin-7-0-rhamnoside는 천연물과학연구소 강삼식 교수님으로부터 입수하였다.

1. DNA control 5 μ l
2. catechin-7-0-rhamnoside(1000 ppm, 5 μ l) + DNA 5 μ l
3. catechin-7-0-rhamnoside(100 ppm, 5 μ l) + DNA 5 μ l
4. catechin-7-0-rhamnoside(10 ppm, 5 μ l) + DNA 5 μ l
5. bleomycin(1000 ppm, 5 μ l) + DNA 5 μ l
6. bleomycin(10 ppm, 5 μ l) + DNA 5 μ l
7. bleomycin(1 ppm, 5 μ l) + DNA 5 μ l

condition : 0.7 % agarose gel

60 mA, 100 V

incubation time : 6 hrs.

temperature : 37 $^{\circ}$ C

gel running time : 40 min.

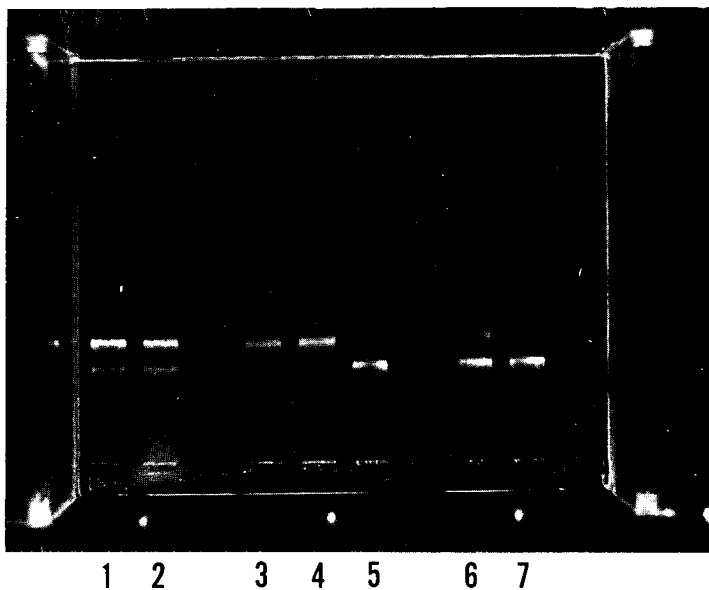


Figure 5. DNA cleavage assay on catechin-7-0-rhamnoside

4.3. Gentiopicrin 및 Swertiamarin

Gentiopicrin과 swertiamarin은 iridoid의 일종으로서 용담(*Gentiana Radix*)의 고미주성분으로 알려져 있으며 위액 분비 촉진 작용 등이 보고되어 있다. Gentiopicrin과 swertiamarin은 본 실험실에서 순수분리하였다.

DNA cleavage assay 결과 gentiopicrin과 swertiamarin이 1000ppm의 농도에서 어느 정도 효과를 나타내는 것으로 관찰되었다. Gentiopicrin이 swertiamarin에 비해 상대적으로 강한 효과를 나타내었다. (Figure 6)

1. DNA control
2. bleomycin(100 ppm, 10 μl) + DNA 15 μl
3. bleomycin(1 ppm, 10 μl) + DNA 15 μl
4. gentiopicrin(1000 ppm, 10 μl) + DNA 15 μl
5. swertiamarin(1000 ppm, 10 μl) + DNA 15 μl
6. partially cleaved(old) DNA 15 μl

condition : 0.7 % agarose gel

60 mA, 100 V

incubation time : 6 hrs.

temperature : 37 $^{\circ}\text{C}$

gel running time : 50 min.

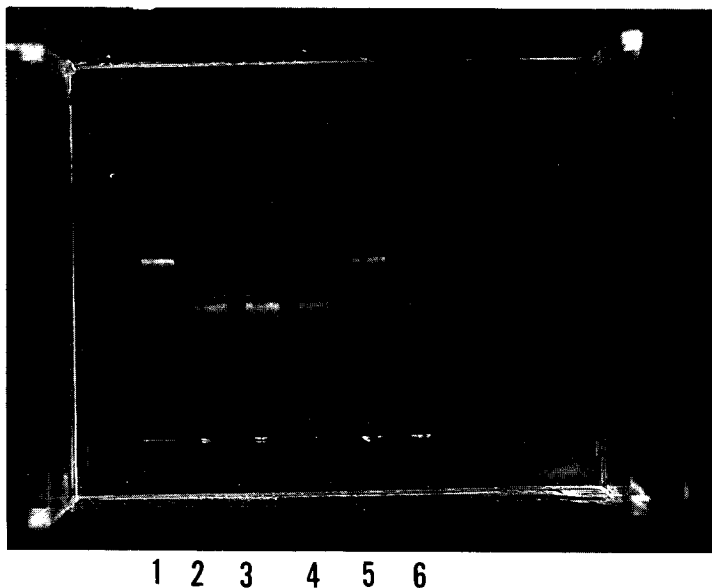


Figure 6. DNA cleavage assay on gentiopicrin and swertiamarin

4.4 Sesamoside를 비롯한 4종의 iridoid

Plomis umbrosa 및 *Dipsacus asper*의 성분인 8,5 - acetylshanziside methylester, sesamoside, shanziside methylester, cantleyoside sweroside 및 loganin에 대해 DNA cleavage assay를 실시하였다. 시료는 안동대학교 식품영양학과 손건호 교수님으로부터 입수하였다. 실험결과 이들 성분들은 1000 ppm의 농도에서도 DNA와 반응하지 않는것으로 나타났다(Figure 7).

1. DNA 5 μl + DMSO 10 % 5 μl
2. 8,5 - acetylshanziside methylester(1000 ppm, 5 μl) + DNA 5 μl
3. sesamoside(1000 ppm, 5 μl) + DNA 5 μl
4. shanziside methylester(1000 ppm, 5 μl) + DNA 5 μl
5. cantleyoside(1000 ppm, 5 μl) + DNA 5 μl
6. sweroside(1000 ppm, 5 μl) + DNA 5 μl
7. loganin(1000 ppm, 5 μl) + DNA 5 μl
8. bleomycin(1000 ppm, 5 μl) + DNA 5 μl
9. bleomycin(1 ppm, 5 μl) + DNA 5 μl

condition : 0.7 % agarose gel

60 mA, 100 V

incubation time : 6 hrs.

temperature : 37 $^{\circ}\text{C}$

gel running time : 55 min.

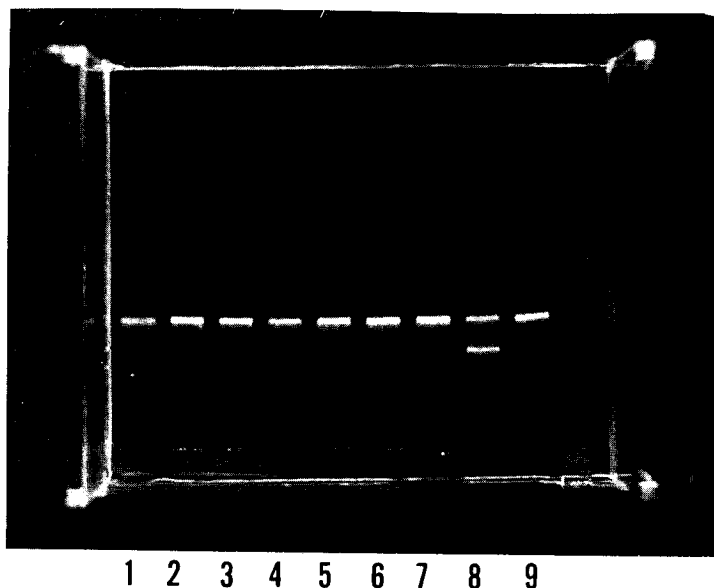


Figure 7. DNA cleavage assay on iridoids

4.5. Pectenotoxin II 및 psammaplin A

Pectenotoxin II 와 psammaplin A 는 본 실험실에서 해면동물 *Pachastrella sp.* 와 *Jaspis sp.*로부터 분리된 성분으로서 cell culture assay에서 cytotoxicity를 나타내는 물질들이다 특히 pectenotoxin II의 cytotoxicity는 매우 강하여 인체 결장암세포, 폐암세포, 유방암세포에 대하여 LD₅₀ 가 10⁻¹³ - 10⁻¹⁴ µg/ml 에 이른다.

DNA cleavage assay에서는 이 두 물질 모두 효과를 나타내지 않았다. 그러므로 이들 성분의 cytotoxicity는 DNA 손상에 의한것이 아니고 그외의 작용기전에 의한 것임을 알 수 있다(Figure 8).

1. DNA control
2. Pectenotoxin II (1000 ppm, 5 μ l) + DNA 5 μ l
3. psammaphin A (1000 ppm, 5 μ l) + DNA 5 μ l
6. bleomycin (1000 ppm, 5 μ l) + DNA 5 μ l
7. bleomycin (100 ppm, 5 μ l) + DNA 5 μ l
8. bleomycin (10 ppm, 5 μ l) + DNA 5 μ l
9. DNA 5 μ l + DMSO 10 % 5 μ l

condition : 0.7 % agarose gel

60 mA, 100 V

incubation time : 7 hrs.

temperature : 37 $^{\circ}$ C

gel running time : 50 min.

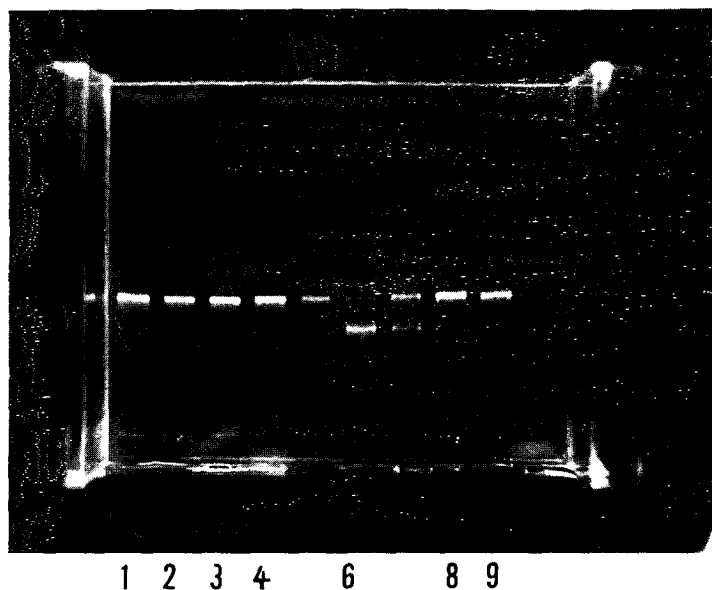


Figure 8. DNA cleavage assay on pectenotoxin II and psammaphin A

제 5 장. 결론

본 과제 연구 개발 목표인 DNA cleavage assay의 실험실내 정착을 완료하였다. 이를 이용하여 천연물로부터 분리된 다양한 물질들에 대해 검색을 실시하여 그 유용성을 입증하였다. 현재 본 실험실에서 사용하고 있는 Brine shrimp assay가 상당히 재현성이 좋고 일종의 *in vivo* assay에 가까우며 신뢰도가 높지만 시료량이 molecular assay에 비해 상당히 많이 요구된다는(통상, 조추출물의 경우에는 10 - 30 mg, 정제된 단일성분의 경우에는 1 - 10 mg) 문제점을 안고 있다. 그에 비해 DNA cleavage assay는 0.1 mg 이하의 시료로서도 충분히 검색이 가능하기 때문에 감도가 상당히 높은 편이다. '2.1. 시험관내(*in vitro*) 검색법'에서 언급되었듯이 Brine shrimp assay와 DNA cleavage assay는 본질적으로 서로 상반되는 장단점을 갖고 있다. 그러므로 이 두가지 검색법을 상호보완적으로 적절하게 사용하면 궁극적 연구개발 목표인 항암후보물질 개발에 상당히 도움이 될 것으로 사료된다.

참고문헌

본 연구의 문헌조사는 "Assays Related to Cancer Drug Discovery" (M. Pezzuto, in "Methods in Plant Biochemistry, Vol. 6, Academic Press, 1991)를 기초로하여 수행되었다.

Agarwal, K. C. and Parks, Jr., R. E. (1982), *Biochem. Pharmacol.* **31**, 3713 - 3716.

Agarwal, K. C. and Parks, Jr., R. E. (1983), *Int. J. Cancer.* **32**, 801 - 804.

Akiyama, S. -I., Cornwell, M. M., Kuwano, M., Pastan, I. and Gottesman, M. M. (1988). *Molec. Pharmacol.* **33**, 144 - 147.

Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H. and Boyd, M. R. (1988), *Cancer Res.* **48**, 589 - 601.

Ambrus, J. L., Ambrus, C. M. and Gastpar, H. (1982), In "Interaction of Platelets and Tumour Cells" (G. A. Jamieson ed.), pp. 83 - 95. Alan R. Liss, New York.

Ames, B. N. (1966), *Meth. Enzymol.* **8**, 115 - 118.

Andoh, T., Ishii, K., Suzuki, Y., Ikegami, Y., Kusunoki, Y., Takemoto, Y. and Okada, K. (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **84**, 5565 - 5569.

Appel, S. H. (1968), *J. Biol. Chem.* **243**, 3924 - 3929.

Arisawa, M., Pezzuto, J. M., Bevelle, C. and Cordell, G. A. (1984), *J. Natl. Prod.* **47**, 453 - 458.

Ashendel, C. L., Staller, J. M. and Boutwell, R. K. (1983), *Cancer Res.* **43**, 4327 - 4332.

Barbieri, L., Zamboni, M., Lorenzoni, E., Montanaro, L., Sperti, S. and Stirpe, F. (1980), *Biochem. J.* **186**, 443 - 452.

Barr, J. R., Murty, V. S., Yamaguchi, K., Singh, S., Smith, D. H. and Hecht, S. M. (1988), *Chem. Res. Toxicol.* **1**, 204 - 207.

Bartus, H. R., Mirabelli, C. K., Auerbach, J. I., Shatzman, A. R., Taylor, D. P., Johnson, R. K., Rosenberg, M. and Crooke, S. T. (1984), *Antimicrob. Agents Chemother.* **25**, 622 - 625.

Becher, H. J. and Lohr, G. W. (1979), *Klin. Wochenschr.* **57**, 1109 - 1115.

Bell, R. M. (1986), *Cell.* **45**, 631 - 632.

Beran, Y. M., Benzie, C. R. and Kay, J. E. (1980), *Biochem. Soc. Trans.* **8**, 357 - 359.

Berman, E. and Shafer, R. H. (1983), *Biopolymers.* **22**, 2163 - 2167.

- Beston, T. H., Hellewell, S. B. and Ingram, V. M. (1984), *Molec. Cell Biol.* **4**, 1800 - 1806.
- Beutler *et al.*, (1989). *Phytother. Res.* **3**, 188 - 192.
- Bloch, A. (1984), *Cancer Treatment Rep.* **68**, 199 - 205.
- Blumberg, P. M. (1988), Sixth Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res.* **48**, 1 - 8.
- Bonelli, T. J., Konno, S., Vuolo, L. L., Quaini, F. and Wu, J. M. (1985), *Biochem. Int.* **11**, 61 - 68.
- Borisy, G. G. and Taylor, E. W. (1967a), *J. Cell Biol.* **34**, 525 - 533.
- Borisy, G. G. and Taylor, E. W. (1967b), *J. Cell Biol.* **34**, 535 - 548.
- Born and cross, (1963). *J. Physiol.* **168**, 178 - 196.
- Brown, K. W. and Parkinson, E. K. (1985), *Int. J. Cancer.* **35**, 799 - 807.
- Brown, B. L., Albano, J. D. M., Ekins, R. P. and Sgherzi, A. M. (1971), *Biochem. J.* **121**, 561 - 562.
- Bryan, J. and Wilson, C. (1971), *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **68**, 1762 - 1766.
- Castagana, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1982), *J. Biol. Chem.* **257**, 7847 - 7851.
- Chabner, B. A. and Myers, C. E. (1982), In "Cancer. Principles and Practice of Oncology" (V. T. DeVita, Jr., S. Hellman and S. A. Rosenberg eds), pp. 156 - 197. J. B. Lippincott Co., Philadelphia.
- Chafouleas, J. G., Bolton, W. E., Hidaka, Boyd, III, A. D. and Means, A. R. (1982), *Cell.* **28**, 41 - 50.
- Chang, R. S. L. and Lotti, V. J. (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **83**, 4923 - 4926.
- Choi, K., Chen. C. J., Kriegler, M. and Roninson, I. B. (1988), *Cell.* **53**, 519 - 529.
- Chrisey, L. A., Shahidi Bonjar, G. H. and Hecht, S. M. (1988), *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 644 - 646.
- Coetzee, M. L. and Ove, P. (1979), *Process Biochem.* **14**, 26 - 37.
- Collins, S. J., Ruscetti, F. W., Gallagher, R. E. and Gallo, R. C. (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **75**, 2458 - 2462.
- Considine, R. T., Willingham, Jr., W., Chaney, S. G., Wyrick, S., Hall, I. H. and Lee, K. H. (1983), *Eur. J. Biochem.* **132**, 157 - 163.
- Corbett, (1986). In " *In Vitro and In Vivo* Medels for Detection of New Antitumour Drugs", Proceesings of a Workshop held at the 14th International Congress of

- Chemotherapy. Kyoto(L. J. Hanka, T. Kondo and R. J. White. eds). pp.5 - 14. University of Tokyo Press. Tokyo.
- Costlow, M. E. (1984), *Expl. Cell Res.* **155**, 17 - 23.
- Coussens, L., Parker, P. J., Rhee, L., Yang - Feng, T. L., Chen, E., Waterfield, D., Francke, U. and Ullrich, A. (1986), *Science*, **233**, 859 - 866.
- Cowan, D. H. and Graham, J. (1982), In "Interaction of Platelets and Tumour Cells" (G. A. Jamieson ed.), pp. 249 - 268. Alan R. Liss, New York.
- Coward and Pegg, (1987). *Adv. Enzyme Regul.* **26**, 107 - 113.
- Craig, R. W., Frankfurt, O. S., Sakagami, H., Takeda, K. and Block, A. (1984), *Cancer Res.* **44**, 2421 - 2429.
- Crum, R., Szabo, S. and Folkman, J. (1985), *Science*, **230**, 1375 - 1378.
- Defeo - Jones, D., Tai, J. Y., Wegrzyn, R. J., Vuocolo, G. A., Baker, A. E., Payne, L. S., Garsky, V. M., Oliff, A. and Riemen, M. W. (1988), *Molec. Cell. Biol.* **8**, 2999 - 3007.
- de Jong, J. P., Nikkels, P. G. J., Brockbank, K. G. M., Ploemacher, R. E. and Voerman, J. S. A. (1985), *Cancer Res.* **45**, 4001 - 4005.
- Delbarre, A., Oberlin, R., Roques, B. P., Borgna, J. L., Rochefort, H., LePecq, J. B. and Jacquemin - Sablon, A. (1985), *J. Med. chem.* **28**, 752 - 761.
- de Souza, N. J., Dohadwalla, A. N. and Reden, J. (1983), *Medicinal Res. Rev.* **3**, 201 - 219.
- Dexter, T. M., Allen, T. D. and Lajtha, L. G. (1977), *J. Cell. Physiol.* **91**, 335 - 344.
- Drlica, K. and Franco, R. J. (1988), *Biochemistry.* **27**, 2253 - 2259.
- Elespuru, R. K. and White, R. J. (1983), *Cancer Res.* **43**, 2819 - 2830.
- Elespuru and Yarmolinsky, (1979). *Environ. Mutagen.* **1**, 65 -68.
- Ferguson, L. R., MacPhee, D. G. and Baguley, B. C. (1983), *Chem.- Biol. Interactions* **44**, 53 - 62.
- Filburn and Karn, (1973). *Anal. Biochem.* **52**, 505 -516.
- Folkman, J. (1985), *Adv. Cancer Res.* **43**, 175 - 230.
- Folkman, J. (1986), *Cancer Res.* **46**, 467 - 473.
- Folkman, J. and Haudenschild, C. (1980), *Nature.* **288**, 551 - 556.
- Fusetani, N., Yasukawa, K., Matsunaga, S. and Hashimoto, K. (1985), *Tetrahedron Lett.* **26**, 6449 - 6452.

- Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F. and Gallo, R. (1979), *Blood*, **54**, 713 - 733.
- Gaskin, F., Cantor, C. R. and Shelanski, M. L. (1974), *J. Mol. Biol.* **89**, 737 - 758.
- Gasperi-Campani, A., Barbieri, L., Morelli, P. and Stirpe, F. (1980), *Biochem. J.* **186**, 439 - 441.
- Geran, R. I., Greenberg, N. H., McDonald, M. M., Schumacher, A. M. and Abbott, B. J. (1972), *Cancer Chemother. Rep.* **3**, 1 -103.
- Gessner, S. L. and Irvin, J. D. (1980), *J. Biol. Chem.* **255**, 3251 - 3253.
- Gilman, A. G. (1970), *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **67**, 305 - 312.
- Gimbrone, Jr., M. A., Cotran, R. S., Leapman, S. B. and Folkman, J. (1974), *J. Natl. Cancer Inst.* **52**, 413 - 427.
- Glazer, R. I. (1980), *Cancer Chemother. Pharmacol.* **4**, 227 - 235.
- Godson, N. and Vapnek, D. (1973), *Biochim. Biophys. Acta.* **299**, 516.
- Goulding, M. D. and Ralph, R. K. (1989), *Biochim. Biophys. Acta.* **1007**, 99 - 108.
- Hait, W. and Lazo, J. (1986), *J. Clin. Oncol.* **4**, 994 - 1012.
- Hall, I. H., Lee, K. H., Williams, Jr., W. L., Kimura, T. and Hirayama, T. (1980), *J. Pharm. Sci.* **69**, 294 - 297.
- Hall, I. H., Kasai, R., Wu, R. Y., Tagahara, K. and Lee, K. H. (1982a), *J. Pharm. Sci.* **71**, 1263 - 1267.
- Hall, I. H., Liou, Y. F. and Lee, K. H. (1982b), *J. Pharm. Sci.* **71**, 687 - 690.
- Hall, I. H., Liou, Y. F., Lee, K. H., Okano, M. and Chaney, S. G. (1982c), *J. Pharm. Sci.* **71**, 257 - 262.
- Hall, I. H., Liou, Y. F., Okano, M. and Lee, K. H. (1982d), *J. Pharm. Sci.* **71**, 345 - 348.
- Hall *et al.*, (1982e). *J. Pharm. Sci.* **71**, 741 - 744.
- Hall, I. H., Lee, K. H., Imakura, Y. and Sims, D. (1983a), *J. Pharm. Sci.* **72**, 1008 - 1011.
- Hall, I. H., Liou, Y. F., Lee, K. H., Chaney, S. G. and Willingham, Jr., W. (1983b), *J. Pharm. Sci.* **72**, 626 - 630.
- Hamburger, A. W., White, C. P. and Brown, R. w. (1981), *J. Natl. Cancer Inst.* **67**, 825 - 830.
- Hamaguchi *et al.*, (1987). *J. Antibiotics.* **40**, 717 - 719.

- Hamill, R. L. (1982), In "Bioactive Microbial Products: Search and Discovery" (J. D. Bu'lock, L. J. Nisbet and D. J. Winstanley, eds), pp. 71 - 104, Academic Press, London.
- Hanka, L. J. (1974), In "Progress in Chemotherapy". Proceedings of the 8th International Congress of Chemotherapy, Athens(G. K. Daikos ed.).
- Hanka, L. J. (1977), *Cancer Treatment Rep.* **61**, 591 - 595.
- Hanka, L. J. (1979), *Cancer Treatment Rep.* **63**, 1133 - 1136.
- Hanka, L. J., Bhuyan, B. K., Martin, D. G., Neil, G. L. and Douros, J. D. (1978a), *Fund. Cancer Chemother. Antibiotics Chemother.* **23**, 26 - 32.
- Hanka, L. J., Martin, D. G. and Neil, G. L. (1978b), *Lloydia* **41**, 85 - 97.
- Hara, Y., Steiner, M. and Baldini, M. G. (1980), *Cancer Res.* **40**, 1217 - 1222.
- Hartley, S. M. and Beevers, H. (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **79**, 5935 - 5938.
- Hayakawa, Y., Makagawa, M., Kawi, H., Tanabe, K., Nakayama, H., Shimazu, A., Seto, H. and Otake, N. (1983), *J. Antibiotics.* **36**, 934 - 937.
- Hecht, S. M. (1986), *Fed. Proc.* **45**, 2784 - 2791.
- Heimbrook, D. C., Boyer, M. E., Garsky, V. M., Balishin, N. L. and Kiefer, D. M. (1988), *J. Biol. Chem.* **263**, 7016 - 7019.
- Hendrix, (1987). *Cancer Lett.* **38**, 137 - 147.
- Higgins, P. J. (1982), *Pharmacology.* **25**, 170 - 176.
- Hirai, H., Murakami, T., Urabe, A. and Takaku, F. (1985), *Cancer Res.* **45**, 2456 - 2461.
- Ho, Y. K., Hakala, M. T. and Zakrzewski, S. F. (1972), *Cancer Res.* **32**, 1023 - 1028.
- Hollstein, M., McCann, J., Angelosanto, F. and Nichols, W. (1979), *Mutation Res.* **65**, 133 - 226.
- Hsiang, Y. H., Hertzberg, R., Hecht, S. and Liu, L. F. (1985), *J. Biol. Chem.* **260**, 14873 - 14878.
- Hunter, T. and Cooper, J. A. (1985), *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 897 - 930.
- Hutchinson, D. R. (1981), *Tetrahedron.* **37**, 1047 - 1065.
- Imoto, M., Umezawa, K., Isshiki, K., Kunimoto, S., Sawa, T., Takeuchi, T. and Umezawa, H. (1987), *J. Antibiotics.* **40**, 1471 - 1473.
- Inagaki, M., Kawamoto, S., Itoh, H., Saitah, M., Hagiwara, M., Takahashi, J. and Hidakoka, H. (1986), *Mol. Pharmacol.* **29**, 577 - 581.

- Kalckar, H. M. (1947), *J. Biol. Chem.* **167**, 461 - 486.
- Kalman, S. M., Duffield, P. H. and Brzozowski, T. (1966), *J. Biol. Chem.* **241**, 1871 - 1877.
- Kampf, A., Barfknecht, R. L., Shaffer, P. J., Osaki, S. and Mertes, M. P. (1976), *J. Med. Chem.* **19**, 903 - 908.
- Kase, H., Iwahashi, K. and Matsuda, Y. (1986), *J. Antibiotics.* **39**, 1059 - 1065.
- Kase, H., Iwahashi, K., Nakanishi, S., Matsuda, Y., Yamada, K., Takahashi, M., Murakata, C., Sata, A. and Kaneko, M. (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **142**, 436 - 440.
- Kennedy, B. G. and Lever, J. E. (1985), *J. Cell Physiol.* **123**, 410 - 416.
- Kilhenny, A. E., Morgan, D., Spangler, E. F. and Yuspa, S. H. (1985), *Cancer Res.* **45**, 2219 - 2225.
- Kinoshita, T., Sankawa, U., Takuma, T. and Asahi, K. I. (1985), *J. Pharmacobio - Dyn.* **8**, s - 122.
- Komiyama, T., Oki, T. and Inui, T. (1983), *Biochim. Biophys. Acta.* **740**, 80 - 88.
- Konopa, J. (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **110**, 819 - 826.
- Kumar, N. (1981), *J. Biol. Chem.* **256**, 10435 - 10441.
- Kunimoto, S., Xu, C. Z., Naganawa, H., Hamada, M., Masuda, T., Takeuchi, T. and Umezawa, H. (1987), *J. Antibiotics.* **40**, 1651 - 1652.
- Land, H., Parada, L. F. and Weinberg, R. A. (1983), *Science.* **222**, 771 - 778.
- Lechner (1981), *Cancer Res.* **41**, 2294 - 2304.
- Lechner (1982), *In Vitro.* **18**, 633 - 642.
- Lever, J. E. (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **76**, 1323 - 1327.
- Li, J. and Kaminskas, E. (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **81**, 5694 - 5698.
- Lichti and Gottesman, (1982). *J. Cell. Physiol.* **113**, 433 - 439.
- Linevsky, J., Cohen, M. B., Hartman, K. D., Knode, M. C. and Glazer, R. I. (1985), *Mol. Pharmacol.* **28**, 45 - 50.
- Liotta, L. A. (1985), *In "Progress in oncology"* (V. T. DeVita, A. Hellman, and S. Rosenberg eds). Vol. 1, pp. 28 - 41. J. B. Lippincott Co., Philadelphia.
- Liotta, L. A. (1986), *Cancer Res.* **46**, 1 - 7.
- Liotta, L. A., Lee, C. W. and Morakis, D. J. (1980), *Cancer Lett.* **11**, 141 - 152.

- Liotta, L. A., Thorgeirsson, U. P. and Garbisa, S. (1982), *Cancer Metastasis Rev.* **1**, 277 - 288.
- Liotta *et al.*, (1986). *Cancer Res.* **46**, 1- 7.
- Liou, Y. F., Hall, I. H., Okano, M., Lee, K. H. and Chaney, S. C. (1982), *J. Pharm. Sci.* **71**, 430 - 435.
- Liu and Miller, (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **78**, 3487 - 3491.
- Loomis, C. R. and Bell, R. M. (1988), *J. Biol. Chem.* **263**, 1682 - 1692.
- Lonn, U. and Lonn, S. (1988), *Cancer Res.* **48**, 3319 - 3323.
- Lown, J. W. (1982), *Acc. Chem. Res.* **15**, 381 - 387.
- Magae, J., Watanabe, C., Osada, H., Cheng, X. C. and Isono, K. (1988), *J. Antibiotics* **41**, 932 - 937.
- Maley, F. and Ochoa, S. (1958), *J. Biol. Chem.* **233**, 1538 - 1543.
- Marks, M. E., Ziober, B. L. and Brattain, M. G. (1985), *Cancer Res.* **45**, 1276 - 1284.
- Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), *Mutation Res.* **113**, 173 - 215.
- Mazza, G. (1982), *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 177 - 184.
- McPherson, D. D. and Pezzuto, J. M. (1983), *J. Chromatogr.* **281**, 348 - 354.
- Metzger and Lindner, (1981). *IRCS Med. Sci.* **9**, 99.
- Mivechi, N. F. and Li G. C. (1987), *Cancer Res.* **47**, 1538 - 1541.
- Moore, E. C. and Hurlbert, R. B. (1966), *J. Biol. Chem.* **241**, 4802 - 4809.
- Murphy, D. B. (1982), *Methods Cell Biol.* **24**(Part A), 31 - 49.
- Nakamura, (1986). *J. Antibiotics.* **39**, 1148 - 1154.
- Newby, A. C. (1981), *Biochem. Pharmacol.* **30**, 2611 - 2615.
- Nicolson, G. L. (1988), *Cancer Metastasis Rev.* **7**, 143 - 188.
- Nikaido, T., Ohmoto, T., Noguchi, H., Kinoshita, T., Saitoh, H. and Sankawa, U. (1981), *Planta Med.* **43**, 18 - 23.
- Nikaido, T., Ohmoto, T., Sankawa, U., Hamanaka, T. and Totsuka, K. (1982), *Planta Med.* **46**, 162 - 166.
- Nishizuka, Y. (1984), *Nature.* **308**, 693 - 698.
- Odashima *et al.*, (1979). *Eur. J. Cancer.* **15**, 885 -892.

- Ogawara, J., Uchino, K., Akiuama, T. and Watanabe, S. I. (1985), *J. Antibiotics*, **38**, 153 - 156.
- Oligiati, K. L., Toscano, D. G., Atkins, W. M. and Toscano, Jr., W. A. (1984), *Arch. Biochem. Biophys.* **231**, 411 - 415.
- Omura, S., Murata, M., Kimura, K., Matsukura, S., Nishihara, T. and Tanaka, H. (1985b), *J. Antibiotics*, **38**, 1016 - 1024.
- Omura, S., Ishikawa, H., Kuga, H., Imamura, N., Taga, S., Takahashi, Y. and Tanaka, H. (1986), *J. Antibiotics*, **39**, 1219 - 1224.
- Osada, H., Magae, J., Watanabe, C. and Isono, (1988), *J. Antibiotics*, **41**, 925 - 931.
- Palfney, C., Kimhi, Y., Littauer, U. Z., Reuben, R. C. and Marks, P. A. (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **76**, 937 - 942.
- Parker, P. J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M. D. and Ullrich, A. (1986), *Science*, **233**, 853 - 859.
- Parness, J., Kingston, D. G. I., Powell, R. G., Harracksingh, C. and Horwitz, S. B. (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **105**, 1082 - 1089.
- Paulin, D., Perreau, J., Jakob, H., Jakob, F. and Yaniz, M. (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **76**, 1891 - 1895.
- Pegg, A. E. (1988), *Cancer Res.* **48**, 759 - 774.
- Perrella, F. W., Hellmig, B. D. and Diamond, L. (1986), *Cancer Res.* **46**, 567 - 572.
- Pettit, G. R., Cragg, G. M., Herald, D. L., Schmidt, J. M. and Lohavanijaya, P. (1982), *Can. J. Chem.* **60**, 1374 - 1376.
- Pezzuto, J. M. and Hecht, S. M. (1980), *J. Biol. Chem.* **255**, 865 - 869.
- Pezzuto, J. M., Lau, P. P., Luh, Y., Moore, P. D., Wogan, G. N. and Hecht, S. M. (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **77**, 1427 - 1431.
- Pezzuto, J. M., Antosiak, S. K., Messmer, W. M., Saylor, M. M. and Honig, G. R. (1983), *Chem. Biol. Interactions*, **43**, 323 - 339.
- Pezzuto, J. M., Che, C. T., McPherson, D. D., Topcu, G., Erdeleier, C. A. J. and Cordell, G. A. (1988a), NIH Workshop: Bioassays for Discovery of Antitumour and Antiviral Agents from Natural Sources, Lister Hill Auditorium, National Library of Medicine, Bethesda, MD. 18 - 19 October.
- Plunkett, W., Alexander, L., Chubb, S. and Loo, T. L. (1979), *Cancer Res.* **39**, 3655 - 3660.
- Poste, G. and Fidler, I. J. (1980), *Nature*, **283**, 139 - 146.
- Quillardet, P., Huisman, O., D'ari, R. and Hofnung, M. (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **79**, 5971 - 5975.

- Ramu, A., Fuks, Z., Gatt, S. and Glaubiger, D. (1984a), *Cancer Res.* **44**, 144 - 148.
- Ramu, A., Glaubiger, D. and Fuks, Z. (1984b), *Cancer Res.* **44**, 4392 - 4395.
- Ready, M. P., Adams, R. P. and Robertus, J. D. (1984), *Biochim. Biophys. Acta.* **791**, 314 - 319.
- Reiss, M., Pitman, S. W. and Sartorelli, A. C. (1985), *J. Natl. Cancer Inst.* **74**, 1015 - 1023.
- Reiss, M., Gamba - Vitalo, C. and Sartorelli, A. C. (1986), *Cancer Treatment Rep.* **70**, 201 -218.
- Robinson, G. A., Butcher, R. W. and Sutherland, E. W. (1971), "Cyclic AMP". Academic Press, New York.
- Ross, E. M. and Gilman, A. G. (1980), *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 533 - 564.
- Russo, R. G., Liotta, L. A., Thorgeirsson, U., Brundage, R. and Schiffman, E. (1981), *J. Cell Biol.* **91**, 459 - 467.
- Sachs, L. (1982), *Cancer Surveys.* **1**, 321 - 342.
- Sadaie, Y. and Kada, T. (1976), *J. Bacteriol.* **125**, 489 - 500.
- Sako, T., Yuspa, S. H., Herald, C. L., Pettit, G. R. and Blumberg, P. M. (1987), *Cancer Res.* **47**, 5445 - 5450.
- Salomon, (1974). *Anal. Biochem.* **58**, 541 - 548.
- Sartorelli, A. C. (1988), *Cancer Res.* **48**, 775 - 778.
- Scannell, R. T., Barr, J. R., Murty, V. S., Reddy, K. S. and Hecht, S. M. (1988), *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 3650 -3651.
- Schabel, Jr., F. M. and Pitiello, R. F. (1961), *Adv. Applied Microbiol.* **3**, 223 - 256.
- Schaumberg, J. P., Hokanson, G. C., French, J. C., Smal, E. and Baker, D. C. (1985), *J. Org. Chem.* **50**, 1651 - 1656.
- Schiff, P. B., Fant, J. and Horwitz, S. B. (1979), *Nature.* **227**, 665 -667.
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Curren, M. J., Seniff, D. and Boyd, M. R. (1988), *Cancer Res.* **48**, 4827 - 4833.
- Seamon, K. B. and Daly, J. W. (1981), *J. Cyclic Nucleotide Res.* **7**, 201 - 224.
- Seamon, K. B., Padgett, W. and Daly, J. W. (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **78**, 3363 - 3367.
- Seamon, K. B., Daly, J. W., Metzger, H., de Souza, N. J. and Reden, J. (1983), *J. Med. Chem.* **26**, 436 - 439.

- Shannon, W. M. and Schabel, F. M. (1980), *Pharmacol. Ther.* **11**, 263 - 390.
- Shelanski, L. M., Gaskin, F. and Cantor, C. R. (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **70**, 765 - 768.
- Shen, D. W., Fojo, A., Chin, J. E., Roninson, I. B., Richert, N., Pastan, I. and M. M. (1986), *Science*. **232**, 643 - 645.
- Shimi, I. R., Abdallah, N. M., Ali, F. T. and Khater, H. D. (1982), *Int. J. Biochem.* **14**, 805 - 809.
- Shoemaker, R. H., Wolpert - DeFilippes, M. K., Kern, D. H., Lieber, M. M., Makuch, R. W., Melnick, N. R., Miller, W. T., Salmon, S. E., Simon, R. M., Venditti, J. M. and Von Hoff, D. D. (1985), *Cancer Res.* **45**, 2145 - 2153.
- Shoemaker, R. H., Monks, A., Alley, M. C., Scudiero, D. A., Fine, D. L., McLemore, T. L., Abbott, B. J., Paull, K. D., Mayo, J. G. and Boyd, M. R. (1988), *In "Prediction of Response to Cancer Therapy"* (T. C. Hall ed.), pp. 265 - 286. Alan R. Liss Inc., New York.
- Siegl, A. M., Daly, J. W. and Smith, J. B. (1982), *Mol. Pharmacol.* **21**, 680 - 687.
- Suffness, M. (1987), *In "Biologically Active Natural Products, Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe"* (K. Hostettmann and P. J. Lea, eds), pp. 85 - 104. Clarendon Prss, Oxford.
- Suffness, M. and Dours, J. (1982), *J. Nat. Prod.* **45**, 1 - 14.
- Sugiyama, H., Ehrenfeld, G. M., shipley, J. B., Kilkuskie, R. E., Chang, L. H. and Hecht, S. M. (1985), *J. Nat. Prod.* **48**, 869 - 877.
- Swanson, S. M., Jiang, J. X., de Souza, N. J. and Pezzuto, J. M. (1988), *J. Nat. Prod.* **51**, 929 - 936.
- Tabor, C. W. and Tabor, H. (1984), *Ann. Rev. Biochem.* **53**, 749 - 790.
- Takai, Y., Kikawa, U., Kaibuchi, K. and Nishizuka, Y. (1984), *Adv. Cyclic Nucleotide Prot. Phosphoryl. Res.* **18**, 119 - 158.
- Tanabe, T., Konishi, M., Mizuta, T., Noma, T. and Honjo, T. (1987), *J. Biol. Chem.* **262**, 16580 - 16584.
- Tanida, S., Hasegawa, T. and Yoneda, M. (1981), *Agric. Biol. Chem.* **45**, 2013 - 2018.
- Teicher, B. A., Lazo, J. S. and Sartorelli, A. C. (1981), *Cancer Res.* **41**, 73 - 81.
- Thompson and Appleman, (1971). *Biochemistry.* **10**, 311 -316.
- Tralka, T. S. and Rabson, A. S. (1976), *J. Natl. Cancer Inst.* **57**, 1383 - 1388.
- Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y. (1982), *Cancer Res.* **42**, 4730 - 4733.

- Uchida, T. and Filburn, C. R. (1984), *J. Biol. Chem.* **259**, 12311 - 12314.
- Umezawa, H. (1972), "Enzyme Inhibitors of Microbial Origin". University Park Press, Baltimore, London, Tokyo, 114 pp.
- Umezawa, H. (1979a), *Methods Cancer Res.* **16**, 43 - 72.
- Umezawa, H. (1979b), In "Kinins II: Systemic Proteases and Cellular Function" (s. Fujii, H. Moriya and T. Szuki, eds), pp. 319 - 340. Plenum Publishing Corporation, New York.
- Umezawa, H., Aoyagi, T., Ishizuka, M. and Takeuchi, T. (1979), *Gann Monogr. Cancer Res.* **24**, 159 - 178.
- Unkeless, J. C., Tobia, A., Ossowski, L., Quigley, J. P., Rifkin, D. B. and Reich, E. (1973), *J. Exp. Med.* **137**, 85 - 111.
- Venditti, J. M. (1981), *Sem. Oncol.* **8**, 349 - 361.
- Verma, A. K. (1988), *Cancer Res.* **48**, 1736 - 1739.
- Von Hoff, D. D., Casper, J., Bradley, E., Sandvack, J., Jones, D. and Makuch, R. (1981), *Am. J. Med.* **70**, 1027 - 1032.
- Wagner, H., Feil, B., Seligmann, O., Petricic, J. and Kalogjera, Z. (1986), *Planta Med.* **1986**, 102 - 104.
- Wagner et al., (1988). *Arzneim-Forsch. Drug. Res.* **38**, 273 - 275.
- Walker, G. C. (1985), *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 425 - 457.
- Walker, C., Ranney, D. F. and Shay, J. W. (1984), *J. Natl. Cancer Inst.* **73**, 877 - 885.
- Warburton, M. J., Head, L. P. and Rudland, P. S. (1981), *Exp. Cell Res.* **132**, 57 - 66.
- Warpehoski, M. A. and Hurley, L. H. (1988), *Chem. Res. Toxicol.* **1**, 315 - 333.
- Weingarten, M. D., Suter, M. M., Littman, D. R. and Kirschner, M. W. (1974), *Biochemistry.* **13**, 5529 - 5537.
- Weisenberg, R. C. (1972), *Science.* **177**, 1104 - 1105.
- Weismann, N., Leyhausen, G., Maidhof, A., Tanaka, W., Umezawa, H. and Muller, W. E. G. (1985), *J. Antibiotics.* **38**, 772 - 778.
- White, S. J. and Jacobs, R. S. (1981), *Mol. Pharmacol.* **20**, 614 - 620.
- Williams, J. B. and Napoli, J. L. (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **82**, 4658 - 4662.
- Wyngaarden, J. B. and Ashton, D. M. (1959), *J. Biol. Chem.* **234**, 1492 - 1496.

- Yamanishi, (1973). *Cancer Res.* **33**, 2507 - 2512.
- Yoakum, G. H., Lecher, J. F., Gabrielson, E. W., Korba, B. E., Malan - Shibley, L., Willey, J. C., Valeria, M. G., Shamsuddin, A. M., Trump., B. F. and Harris, C. C. (1985), *Science*. **227**, 1174 - 1179.
- Yoshimoto, A., Oki, T. and Inui, T. (1978), *J. Antibiotics*. **31**, 92 - 94.
- Young, S. K., Dean, T., Siddiqui, B., Whitehead, J. S., Arnstein, P., Bennett, J. and Hicks, J. (1980), *Cancer*. **45**, 1185 - 1192.
- Young, M. R., Newby, M. and Wepsic, H. T. (1987), *Cancer Res.* **47**, 100 - 105.
- Yuspa, (1976). *Nature*. **262**, 402 - 404.
- Zakrzewski, S. F. and Nichol, C. A. (1960), *J. Biol. Chem.* **235**, 2984 - 2988.
- Zalacain, M., Zaera, E., Vazquez, D. and Jimenez, A. (1982), *FEBS Lett.* **148**, 95 - 97.
- Ziegler - Heitbrock, H. W. L., Munker, R., Johnson, J., Petersmann, I., Schmoeckel, C. and Riethmuller, G. (1985), *Cancer Res.* **45**, 1344 - 1350.
- Zwelling, L. A., Michaels, S., Kerrigan, D., Pommier, Y. and Kohn, K. W. (1982), *Biochem. Pharmacol.* **31**, 3261 - 3267.