

鬼箭羽(*Euonymus alatus*(Thunb.) Sieb)가 肝癌細胞(Hep3B)와 子宮癌細胞(HeLa)의 成長抑制에 미치는 影響에 관한 研究

崔 達 永

東國大學教 漢醫科大學 韓方病理學教室

【초록】 귀전우(*Euonymus alatus* Sieb.)가 간암, 식도암, 위암, 자궁암등의 각종 암을 치료하는 방법으로 민방에서 많이 사용하고 있다. 실제 *Euonymus alatus*(Thunb.) Sieb의 추출물중 *Eupolyphaga simensis*(ES)는 HDL-C/TC ratio와 LCATactivity를 증진시킨다.

Human hepatoblastoma 세포인 Hep3B 세포의 성장억제를 유도하는 factor로는 TGF- β , Insulin 등으로 알려져 있다. 따라서 귀전우는 간에 있어 당 대사에 관여하는 plasma HDL3-C level은 낮게 유지함으로써 간에서 지방간 이행을 억제 하여 간에서의 암 발생을 억제하는 효과를 보인다.

실험에서 귀전우가 자궁암세포보다도 간암세포에 보다 높은 세포독성을 보임으로써 여러종류의 암에 모두 적용하기는 어렵다고 보여진다. 또한 귀전우가 바이러스에 의해 유도되는 간암과 hepatocellular Carcinoma 세포에서 효과가 있는지와 HCC에서 세포의 증식억제효과를 어떤 경로를 통해 이루어지는지 계속적으로 연구가 수행되어져야 될 것이다.

중심말 : 세포독성, 간암, 자궁암, 귀전우(*Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb)

I. 緒 論

疾病으로 인한 死亡原因이 과거의 傳染性 疾病에서 成人病과 癌 등의 非傳染性 難治疾患이 主從을 이루는 가운데 外因에서 內因으로 疾病의 構造가 變化하고 있다. 특히 平均壽命의 增加, 環境的 要因 등이 癌의 發生頻度를 높이고 있으며, 醫療技術의 發達로 과거에는 찾아내지 못하던 多樣한 種類의 癌을 찾아냄으로써 최근 50년간 腫瘍疾患은 急進의으로 증가되어 왔다. 癌은 전세계 어느 나라를 막론하고 死亡要因의 으뜸을 維持하고 있고, 불행히도 아직까지 특별

한 治療藥이나 治療方法이 發見되지 않고 있다. 현재 癌을 治療하는 主된 方法은 手術이나, 化學療法, 放射線療法 등과 같이 腫瘍의 物理的 除去나 破壞가 대부분을 차지하는 實情이다. 물론 이 같은 一種의 應急措置로 일부의 腫瘍에는 治療效果를 나타내기도 하지만, 대부분은 完治하지 못하고 오히려 患者나 家族에게 身體的, 精神的, 經濟的 苦痛을 加重시키는 일이 되고 있다.

이에 著者는 民間療法으로 다양하게 응용되고 있는 鬼箭羽의 效力을 檢定하기 위하여 實驗室에서 肝癌과 子宮癌의 細胞를 選定하여 本實驗에 着手하였다.

肝에서 由來된 癌腫은 起源에 따라 2가지로,

肝의 parenchymal細胞에서 나온 hepatocellular carcinoma(HCC)와 biliary epithelial에서 일어나는 cholangioma가 있다. HCC는 세계의인惡性癌腫인데 이로 因하여 年 間 약 百萬 名이 목숨을 잃고 있는 것으로 알려져있다.

그리고 子宮癌은 女性 癌의 90%以上을 차지하며 우리 나라에서 가장 많이 發生하는 女性癌으로 알려져있다. 과거 數十年동안 抗癌治療劑를 비롯한 여러 治療方法이 登場하였지만 子宮頸部癌바이러스(HPV) 感染에 의한 子宮頸部癌이 大部分을 차지한다(Choo, K. B. et al. 1989). 따라서 子宮癌 治療에 어느 정도의 成果가 있었지만, 劃期的인 治療劑의 開發은 없는 狀態이다.

本 研究에서 使用한 藥劑인 鬼箭羽는 化살나무(Euonymus alatus (Thunb.) Sieb.)의 날개모양의 가지 혹은 날개 모양의 附屬物로서 主로 女性의 血氣治療에 使用되어져 왔다.

著者는 鬼箭羽의 韓醫學의 效用과 民間療法의 口傳을 뒷받침할 수 있는 細胞上의 理化學的인 實驗을 통한 檢定을 實施하여 이를 確證함으로써 癌治療에 一翼을 주고자 試圖하였다.

II. 研究材料 및 研究方法

1. 研究材料

自生地인 東海안 寶鏡寺附近 溪谷에서 採取하여 乾燥한 鬼箭羽 37g을 5時間 동안 煎湯 抽出하고, 抽出物로부터 debris를 除去하기 위해 whattman filter paper #2 (whatman international L.T.D., England)를 使用하여 filter한 後 Standard Rotry Evaporator (Heidolph. W 2000, Germany)를 使用하여 濃縮시켰다. 濃縮된 藥材를 細胞에 處理하기 위해 高壓滅菌器 (sanyo. japan)를 使用하여 121℃, 1.5氣壓으로 滅菌시켜 利用하였다.

實驗에 使用한 hepatocellular carcinoma인 Hep3B細胞와 Cervical cancer cell인 HeLa細胞는 韓國細胞株銀行으로 부터 분양받아서, Hep3B는 DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium, high glucose, Cat No. SH30003.03, Promega,

U.S.A)培地를 使用하여 培養 하였고, HeLa細胞는 RPMI-1640(Sigma, U.S.A)培地를 使用하여 培養하였다.

2. 細胞培養

Hep3B細胞는 DMEM (high glucose)培地에 Sodium bicarbonate (sigma U.S.A) 2.2 g/l, Pyruvic acid (α -Ketopropionic acid;2-Oxopropanoic acid) 0.11 g/l, HEPES (N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]) 2.38 g/l, 2-mercaptoethanol 3.8 μ l/l 과 10 X penicilin -streptomycin (Gibco-BRL)을 最終濃度가 1X되게 넣고 pore size가 0.2 μ m인 filter를 使用하여 滅菌시킨 後 10% FBS (fital bovine serum, promega, USA)를 添加하여 5% CO₂, 37℃ cell culture incubator (Nuair,inc. model 4500, USA)에서 無菌狀態 系代培養하였고, HeLa細胞는 RPMI-1640培地에 Sodium bicarbonate (sigma U.S.A) 2.2g/l, 10 X penicilin -streptomycin (Gibco-BRL)을 最終濃度 1X되게 넣고 pore size가 0.2 μ m인 filter를 使用하여 滅菌한 後 10% FBS (fital bovine serum, promega, USA)를 添加하여 5% CO₂, 37℃ cell culture incubator (Nuair,inc. model 4500, USA)에서 無菌狀態 系代培養하여, 培養된 Hep3B와 HeLa細胞를 實驗에 使用하였다.

3. 細胞毒性實驗

Hep3B와 HeLa細胞를 1 * 10⁵ cells/ml의 濃度로 96 well cell culture plates (Nunc™, Iv brand products, 25cm², USA)에 藥材處理 1日 前에 分株하여 培養하였다. 藥材의 處理濃度를 medium volume의 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴의 濃度로 處理하여 24時間 培養하였다. 培養된 細胞는 0.4% trypan blue assay와 MTT assay (Wu FY. et al. 1993.) 를 遂行하여 細胞 生存率을 測定하였다. MTT(5mg/ml. 3-[4,5-Dimethylthiazol -2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue. sigma,USA)solution 을 well當 100 μ l를 藥材處理된 plate에 添加하여 3時間 동안 常溫에서 放置하여 Formazan이

形成되게 하였다. 여기에 100 μ l의 Solubilization solution (DMSO(dimethyl sulfoxid) : Ethanol= 1 : 1)을 添加하여 發色反應을 ELISA(enzyme linked immunosorbance assay) reader를 利用하여 570nm의 파장에서 (back ground 630 nm) 細胞의 Viability를 決定하였다.

4. 細胞模樣 觀察

細胞 모양의 觀察은 藥材處理 1日前에 Hep3B와 HeLa細胞를 5×10^4 cells/ml의 濃度로 cell culture plate (Falcon, 25cm², USA)에 培養하였다. 여기에 鬼箭羽의 濃度를 각기 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 의 濃度로 處理한 後 48時間을 cell culture incubator에서 培養하였다. 細胞 모양을 觀察하기 위해 細胞培養液을 除去하고 PBS (Phosphate buffered saline, 0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄, pH 7.4)로 두 번 洗滌한 다음 光學顯微鏡 (NIKON TMS, japan)으로 細胞模樣 變化를 觀察하였다.

5. SDS-PAGE

藥材가 處理된 細胞에 Lysis buffer (10 mM Tri-HCl, pH 7.2, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1% NP-40, 0.05% β -mercaptoethanol)를 添加하여 cell extract를 準備하였다. Cell extract의 電氣泳動은 Laemmli (1970)의 方法에 따라 遂行하였다. cell extract를 2X sample loading buffer (0.125 M Tris-Cl, 4% SDS, 20% v/v Glycerol, 0.2 M DTT, 0.02%

Bromophenol Blue, pH 6.8)를 cell extract와 同一한 volume으로 넣고 100 $^{\circ}$ C에서 5分間 끓인 後 遠心分離를 하여 ppt (pilet)를 除去한 後, 上層液을 10% polyacryamide slab gel (Discontinuous gel)에 loading한 後 150V에서 1時間 30分 電氣泳動을 하였다. Gel을 固定한 後 coomassie blue染色液 (0.125 g coomassie blue R-250, 200 ml methanol, 35ml acetic acid, 265 ml H₂O)을 使用하여 蛋白質을 2時間 染色하였다. 細胞의 蛋白質 樣相은 destain solution (7% acetic acid, 5% methanol)을 使用하여 脫色시킨 後 確認하였다.

III. 結果 및 考察

1. Viability of HeLa cells and Hep3B cells following incubation with *Euonymus alatus* Sieb

HeLa세포에 *Euonymus alatus* Sieb 추출물을 처리하여 24시간을 배양한 결과 *Euonymus alatus* Sieb의 처리 농도(v/v)가 10^{-1} 에서 는 세포독성을 대조군에 비해 강한 세포독성을 확인할 수 있었다(Table 1, Fig1). 그리고 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 은 대조군과 비교하였을 때 세포독성을 나타내지 않았다(Table1, Fig1). 이것으로서 *Euonymus alatus* Sieb가 Cervical cancer cell인 HeLa세포에 대한 *Euonymus alatus* Sieb의 세포독성 억제 농도에 따라 암세포의 증식에 영향을 미치는 것을 확인하였다.

Table. 1. Viability of HeLa cells with treated *Euonymus alatus* Sieb by trypan blue assay

	Control	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Total cells(cells/ml)	4.5×10^5	1.5×10^5	3.5×10^5	3.1×10^5	4.1×10^5
Dead cells(cells/ml)	0.0	0.99×10^5	2.0×10^3	4×10^3	0.1×10^5
Live cells(cells/ml)	4.5×10^5	0.51×10^5	3.48×10^5	3.06×10^5	4.0×10^5
Viability(%)	100.0	33.9	99.5	98.7	98.3

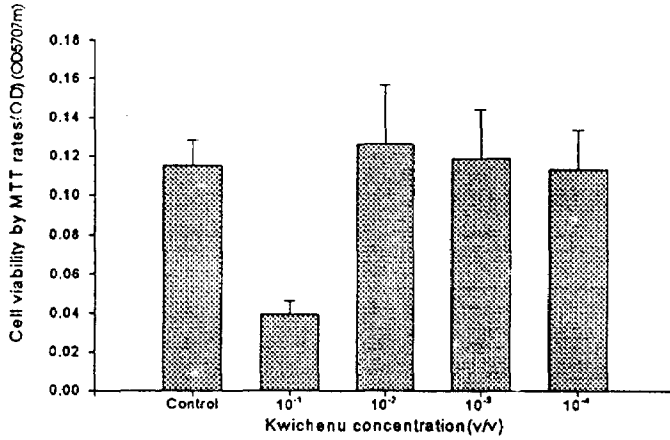


Fig. 1. Viability of HeLa cells in *Euonymus alatus* Sieb by MTT assay. *Euonymus alatus* Sieb concentration(v/v) Untreated(control), 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴.

Table 2. Viability of Hep3B cells with treated *Euonymus alatus* Sieb by trypan blue assay

	Control	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
Total cells (cells/ml)	5*10 ⁶	3.7*10 ⁵	4.2*10 ⁶	4.8*10 ⁶	4.5*10 ⁶
Dead cells (cells/ml)	0.0	2.75*10 ⁵	0.68*10 ⁶	0.33*10 ⁶	0.33*10 ⁶
Live cells (cells/ml)	5*10 ⁶	0.95*10 ⁵	3.52*10 ⁶	4.47*10 ⁶	4.17*10 ⁶
Viability (%)	100.0	25.7	83.8	93.2	92.6

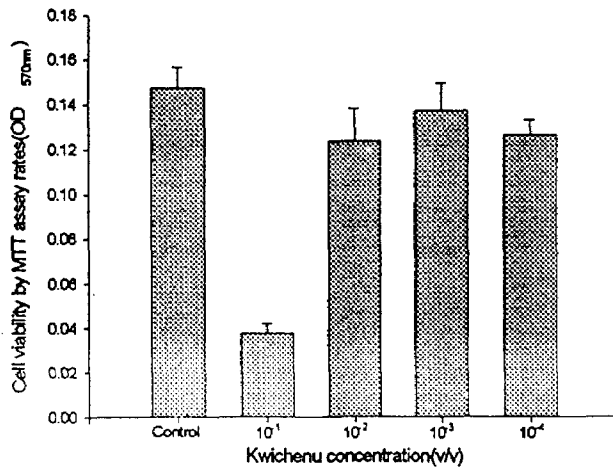


Fig. 2. Viability of Hep3B cells in *Euonymus alatus* Sieb by MTT assay. *Euonymus alatus* Sieb concentration(v/v) Untreated(control), 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴.



Fig. 3. A photograph of the Hep3B and HeLa cells with bangirun. A: Hep3B control E: HeLa control, B: Hep3B *Euonymus alatus* Sieb treated(10^{-1} v/v) and F: HeLa *Euonymus alatus* Sieb treated(10^{-1} v/v), C: Hep3B *Euonymus alatus* Sieb treated(10^{-2} v/v) and G: HeLa *Euonymus alatus* Sieb treated(10^{-2} v/v), D: Hep3B *Euonymus alatus* Sieb treated(10^{-3} v/v) and H: HeLa *Euonymus alatus* Sieb treated(10^{-3} v/v) 200X(NIKON TMS, japan).

Hep3B 세포에서는 *Euonymus alatus* Sieb의 처리가 자궁암 세포인 HeLa세포에 비해 간암 세포인 Hep3B에 효과적인 세포독성을 갖는 결과를 확인 하였다. *Euonymus alatus* Sieb 10^{-1} 농도에서는 HeLa세포에 비해 Hep3B세포에서 높은 세포독성(약 8%)을 나타내었다. 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 농도에서도 HeLa세포에 비해 Hep3B세포에서 세포의 증식을 억제하는 것을 확인하였다.(fig. 1., fig.2.)

2. Morphology of the Hep3B cell and HeLa cell in compliance with *Euonymus alatus* Sieb

Hep3B 세포에서 *Euonymus alatus* Sieb의 처리 농도가 10^{-2} (v/v)에서 세포모양은 정상세포에 비해서 많은 변화를 보이지 않는다. 하지만 10^{-1} 에서는 세포모양의 심한 변화를 유발하는 것을 확인하였다. 세포수는 정상세포수에 비해 많은 수의 감소에 하였다. 따라서 *Euonymus alatus* Sieb가 10^{-1} (v/v)의 농도에서는 Hep3B 세포의 세포분열을 저해하는 결과를 얻었다. 이에 반해 HeLa세포에서는 *Euonymus alatus* Sieb의 농도가 10^{-2} , 10^{-3} (v/v)에서는 세포의 수가 대조군에 비해 약5% 정도가 증가 하는 것을 확인 하였다.

3. Protein pattern

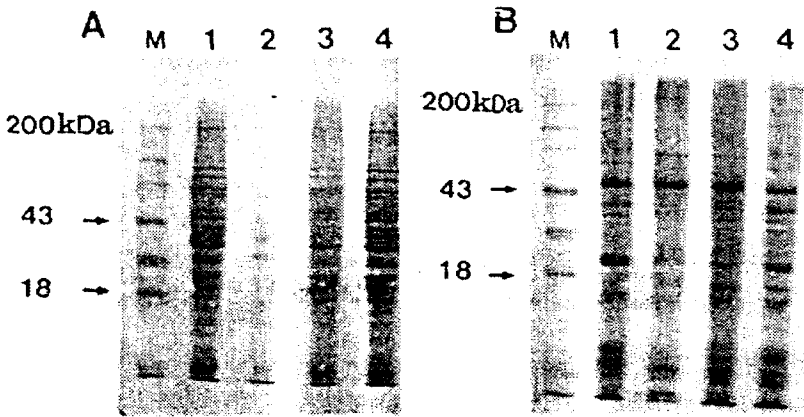


Fig. 4. Protein pattern Hep3B cell and HeLa cell with *Euonymus alatus* Sieb. Lane M; Protein moelculer Weight Standards(Gibcobri, 16001-018, U.S.A), Lane 1; control, Lane 2; *Euonymus alatus* Sieb treated(10^{-1} v/v), lane 3; *Euonymus alatus* Sieb treated(10^{-2} v/v), lane 4; *Euonymus alatus* Sieb treated(10^{-3} v/v), lane 5; *Euonymus alatus* Sieb treated(10^{-4} v/v). Protein were analyzed on 10% SDS-PAGE. The polypeptides on the gel were visualized by coomassie blue staining. A: Hep3B cell, B: HeLa cell

각기 다른 농도의 *Euonymus alatus* Sieb가 Hep3B세포에 처리되었을 때 *Euonymus alatus* Sieb 10^{-1} (v/v) 농도에서 세포독성이 강하게 나타나며 세포의 수가 감소하고, 세포 모양도 변화 하는 결과를 얻을수 있었다(Fig. 2., Fig. 3.). 세포의 수가 감소하는 것이 세포에서의 단백질 합성의 저해에 의한 것인가를 확인하기 위해 SDS-PAGE(sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophorisis)를 실행하였

다. 세포 단백질의 전기영동 pattern을 통해 10^{-1} 에서 세포단백질의 pattern이 대조군에 비해 현저하게 다른양상으로 분해된 pattern의 단백질들이 나타나는 것을 확인할수 있었다.(fig. 4.) 10^{-2} 에서부터는 대조군과 동일한 세포단백질의 pattern을 보여주고 있다. HeLa세포에서는 Hep3B와 비교 했을 때 세포 모양은 큰 변화가 없었다(fig. 3.). 그러나 저분자의 단백질에서는 단백질들이 분해된 형상을 나타내었다.(fig. 4.)

IV. Conclusion

각종 암의 발병원인으로는 현재까지 보고되었던 실험자료와 발병역학 자료에 의하면 유전적인 요인과 환경적 요인들과 관계가 있는 것으로 측정되고 있다.(Rober J. et al, 1994)

Euonymus alatus Sieb는 간암, 식도암, 위암, 자궁암 등의 각종 암을 치료하는 방법으로 민방에서 많이 사용하고 있다. 실제 Euonymus alatus Sieb의 추출물중 Eupolyphaga simensis(ES)는 HDL-C/TC ratio와 LCATactivity를 증진시킨다.

Human hepatoblastoma 세포인 Hep3B 세포의 성장억제를 유도하는 factor로는 TGF-β, Insulin등으로 알려져 있다. (Hungwc, et al 1993.) (Chou CK, et al 1987)

따라서 Euonymus alatus Sieb는 간에 있어 당 대사에 관여하는 plasma HDL3-C level은 낮게 유지함으로써 간에서 지방간 이행을 억제하여 간에서의 암 발생을 억제하는 효과를 보인다.

실험에서 Euonymus alatus Sieb가 자궁암세포보다도 간암세포에 보다 높은 세포독성을 보임으로써 여러종류의 암에 모두 적용하기는 어렵다고 보여진다. 또한 Euonymus alatus Sieb가 바이러스에 의해 유도되는 간암과 hepatocellular Carcinoma 세포에서 효과가 있는지와 HCC에서 세포의 증식억제효과를 어떤 경로를 통해 이루어지는지 계속적으로 연구가 수행되어야 될 것이다.

REFERENCE

1. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of the structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T5. Nature (London) 227; 680-685.
2. Rober J., Jae-Gahb Park and Adi Gazdar. 1994. Atlas of Human tumor cell lines. Academic press.
3. Park, J.-G., Lee, J.-HJ., Kang, M.-S., Park,

- K.-J., Jeon, Y.-M., Lee, H.-J., Kwon, H.-S., Park, H.-S., Y대, K.-S., Lee, K.-U., Kim, R.J., Song, S.-S., Kim, W.-H., Kim, C.-W., Kim, Y.-I. 1995. Charaterization of cell established from human hepatocellular carcinoma. Int. J. Cancer, 62; 276-282.
4. Chou CK, Ho LT, Ting LP, Hu CP, Su TS, Chang WC, Suen CS, Huang MY, Chang CM. 1987. Selective suppression of insulin-induced proliferation of cultured human hepatoma cells by somatostatin. J Clin Invest Jan;79(1):175-8
5. Wu FY, Liao WC, Chang HM. 1993. Comparison of antitumor activity of vitamins K1, K2 and K3 on human tumor cells by two (MTT and SRB) cell viability assays. Life Sci. 52(22):1797-804.
6. Hung WC, Chuang LY, Tsai JH, Chang CC. 1993. Effects of insulin on TGF-beta 1-induced cell growth inhibition in the human hepatoma cell lines. Biochem Mol Biol Int Jul;30(4):655-63
7. Choo KB, Chen CM, Han CP, Cheng WT, Au LC. 1996. Molecular analysis of cellular loci disrupted by papillomavirus 16 integration in cervical cancer: frequent viral integration in topologically destabilized and transcriptionally active chromosomal regions. J Med Virol May;49(1):15-22.
8. 新編 中藥大辭典. 1971. 新文豐出版公司

=Abstract=

Effect of Growth Inhibition in Hep3B cell and HeLa cell by treatment of *Euonymus alatus*(Thunb.) Sieb extracts.

Dal-Yeong Choi

Department of pathology college of Oriental Medicine, Dongguk University

Euonymus alatus(Thunb.) Sieb has been used for cancer therapy such as Liver cancer, esophagus cancer, stomach cancer, and uterine cancer in folk. *Eupolyphaga simensis*(ES) extracted from *Euonymus alatus*(Thunb.) Sieb increases HDL-C/TC ratio and LCAT activity.

TGF- β and Insulin has been known as factors to induce the suppression of proliferation of Hep3B, Human hepatoblastoma cell. Plasma HDL3-C involved in carbohydrate metabolism in the liver was maintained in low level by *Euonymus alatus*(Thunb.) Sieb. The low level of plasma HDL3-C suppresses the transition from normal liver to Fat liver. Finally, this result in suppression of cancer in liver.

In this study, *Euonymus alatus*(Thunb.) Sieb shows higher cell toxicity in hepatoblastoma cell(Hep3B) compared to the uterine cancer cell(HeLa). This means *Euonymus alatus*(Thunb.) Sieb seems not to affect in the all kinds of cancer.

In future, we will study whether *Euonymus alatus*(Thunb.) Sieb have an effect on the liver cancer induced by virus and hepatocellular carcinoma. Also, the mechanisms of suppression of cell proliferation in HCC need to be investigated.

Key words : 세포독성, hepatocellular Carcinoma, Cervical cancer, *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb