

榆根皮 抽出液이 HepG2 肝癌細胞에 미치는 抗癌效果 및 機轉에 對한 研究

한상일, 최수덕, 박용권, 김강산, 강병기

원광대학교 한의과대학 내과학교실

A Study on Antitumor Effect and Mechanism of *Cortex ulmi pumilae* Water Extract on HepG2 Hepatoma cell

Sang-il Han, Su-Deock Choi, Young-Kweon Park, Gang San Kim, Byung-Ki Kang

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Objectives : The effects of aqueous extracts of *Cortex ulmi pumilae* (a traditional medicine for cancer treatment in oriental medicine) on the induction of apoptotic cell death were investigated in human liver origin hepatoma cell lines, HepG2.

Methods : The death of HepG2 cells was markedly induced by the addition of extracts of *Cortex ulmi pumilae* in a dose-dependent manner. The apoptotic characteristic ladder pattern of DNA strand break was not observed in cell death of HepG2. In addition, it was not shown nucleus chromatin condensation and fragmentation under hoechst staining. However, by the using annexin V staining assay, externalizations of phosphatidylserine in HepG2 cell which were treated with *Cortex ulmi pumilae* extracts were detected in the early time (at 9 hr after extract treatment). Furthermore, LDH release was not detected in this early stage. Therefore, *Cortex ulmi pumilae* extracts-induced cell death of HepG2 cells is mediated by apoptotic death signal processes.

Result : The activity of caspase 3-like proteases remained in a basal level in HepG2 cells which treated with the extract of *Cordyceps sinensis*. However, it was markedly increased in HepG2 cells which treated with two extracts of *Cortex ulmi pumilae* (C.U.P.-C, C.U.P.-K) which were differently extracted (respectively, 2.3 and 3.3 fold). On a while, the phosphotransferase activities of JNK1 was markedly induced in HepG2 cells which were treated with two extracts of *Cortex ulmi pumilae*. On the contrary, the activation of transcriptional activator, activating protein1 (AP-1) and NF- κ B were severely decreased by these two extracts of *Cortex ulmi pumilae* (C.U.P.-C, C.U.P.-K). In addition, antioxidants (GSH and NAC) and intracellular Ca^{2+} level regulator (Bapta/AM and Thapsigargin) did not affect *Cortex ulmi pumilae* extracts-induced apoptotic death of HepG2 cells.

Conclusions : In conclusion, our results suggest that two extracts of *Cortex ulmi pumilae* (C.U.P.-C, C.U.P.-K) induces the apoptotic death of human liver origin hepatoma HepG2 cells via activation of caspase 3-like proteases as well as JNK1, and inhibition of transcriptional activators, AP-1 and NF- κ B.

Key Word : *Cortex ulmi pumilae*, HepG2 cell, apoptotic deaths

1. 緒 論

Apoptosis는 多細胞 生命體에서 정상적인 器官의 發達과 組織의 恒常性 維持에 必須적인 生理現狀의 하나인 細胞의 計劃된 죽음 (programmed cell death)을 말하는 것으로¹⁾, apoptosis는 壞死 (necrosis)와는 다른 獨特한 形態

와 生化學的인 特徵을 同伴하는 遺傳子 活性에 의하여 調節받는 生理過程이다. 一般적으로 細胞가 深刻한 傷害를 입었을 경우에 나타나는 壞死는 細胞膜의 破壞, 細胞의 膨脹 (swelling), 溶解 (lysis)를 동반하는데, apoptosis 현상은 빠른 細胞脫水現狀에 의한 細胞의 收縮, 細胞膜의 氣泡化 現狀 (blebbing)을 同

伴한다^{1,2)}.

Apoptosis의 誘導 機轉은 腫瘍致死 因子 (tumor necrosis factor)에 의한 細胞死滅 研究에서 信號傳達機轉이 밝혀지기 시작하였으며²⁾, 最近에는 caspase계 cysteine proteases (caspase family cysteine proteases)나 MAP kinase (mitogen activated protein kinase)의 重要性이 提示되고 있고, apoptosis에 관한 많은 분자생물학적

교신저자 : 한상일 (원광대학교 한의과대학 간계내과학교실, 전화 : 063)278-8877)

※ 이 논문은 '99학년도 원광대학교 교비지원에 의하여 수행되었음. (This paper was supported by wonkwang university)

지식이 축적되면서 apoptosis의 기전이 AP-1 (activator protein-1), NF-kB와 같은 조기 반응 유전자 (early immediate gene)와 많은 연관이 있음이 알려져 왔고, 이러한 인자들의 활성화 여부는 apoptosis 연구에 중요한 단서가 될 수 있다^{3,4)}.

榆根皮는 느릅나무과에 속한 落葉喬木인 느릅나무의 樹皮 및 根皮를 말하는 것으로, 性味는 甘平無毒하고 利水通淋·消腫·滲濕熱등의 效能이 있어 小便不通·諸淋·水腫·癰疽發背·丹毒 등에 應用되었고, 臨床的으로는 肝癌·腸癌·乳房癌 등에 利用되고 있다^{5,6)}.

本 研究에서는 榆根皮 抽出液이 사람의 肝癌에서 由來된 HepG₂ 肝癌細胞에 어떠한 影響을 미치는지를 究明하기 위하여, apoptosis의 기전 특히 caspase cysteine protease의 活性化도와 c-Jun N-terminal kinase (JNK) 및 전사활성인자 (transcriptional activator) 인 AP-1과 NF-kB의 活性變化와 役割을 관찰하여 有意한 結果를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 對象 및 方法

1. 材料

1) 藥材

榆根皮는 全北 鎭安에서 採取된 것과 中國産 榆根皮를 사용하였으며, 아울러 榆根皮의 抗癌作用이 細胞毒性에 의한 作用인지 比較하기 위해 中國産 冬蟲夏草를 使用하였다.

榆根皮 : Cortex ulmi pumilae (이하 C.U.P-K; 한국산, C.U.P-C ; 중국산)
冬蟲夏草 : Cordyceps sinensis (이하 C.S)

2. 方法

1) HepG₂ 肝癌細胞柱 培養

사람 肝癌으로부터 유래된 암세포주인 HepG₂ (ATCC) 는 CO₂ 세포배양기에서 (37°C, 5% CO₂) 10% fetal bovine serum (Hyclones)이 포함된 RPMI 1640 (Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD) 배지에서 배양하였다. 약 48시간 주기로 RPMI 1640 배양액을 교체하여 주며 log phase에 있는 세포에 한약재를 처리한 뒤 세포의 apoptosis 현상과 이에 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

2) 細胞 viability 測定

세포의 活性化도는 crystal violet staining 방법을 이용하였다⁷⁾.

3) Caspase계 cysteine protease 活性化度 測定

HepG₂ 세포를 (2 × 10⁶ cells) 4°C에서 15분 동안 lysing buffer에서 용해하고 14,000 rpm으로 15분 동안 원심 분리 시켰다. 원심분리하여 얻은 상층액은 BCA에 희석되어 형광표지된 기질 (YVED-AMC 혹은 DEVD-AMC)과 37°C에서 30분간 반응시킨 후 fluorometer (Molecular Devices Co, Sunnyvale, CA)로 측정하였다.

4) DNA추출 및 전기영동

DNA 분질현상을 알아보기 위해 Wizard Genomic DNA purification kit (Promega Co, Madison, WI)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. DNA 5 μg을 1.8% agarose gel에서 전기영동 (50 V, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV등 아래에서 DNA 분질을 관찰하였다.

5) In vitro immunocomplex kinase assay

먼저 배양된 HepG₂ 세포 (2 × 10⁶ 세포/treatment)에 다양한 시간 동안 500 μg/ml 농도의 韓藥材를 처리한 후 포집하여 cold PBS로 2회 세척한다. 이를 1ml의 추출용해완충액(Extraction Buffer(EB))를 가하여 30분동안 파쇄얼음상에서 용해시킨 후, 30분동안 12,000 rpm, 4°C에서 원심분리하여 상층액을 다른 튜브에 모았다. 여기에 JNK1 대한 항체(Anti-JNK1 (C17), Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, U.S.A)를 1 μg 넣고 2시간 동안 반응시켰다. 여기에 미리 EB buffer 로 씻어준 10% (v/v)의 pansorbin (Calbiochem, CA, U.S.A) 용액 100 μl씩을 넣고 1시간 동안 얼음 위에서 반응시켜 준 후 4,000rpm 에서 5분동안 원심 분리하여 상층액은 버리고 침전물을 다시 동일 EB buffer로 1회, PAN buffer로 2회 더 세척한 후 상층액을 버리고 면역반응 침전체를 얻었다.

Kinase 효소활성측정은 여기에 1 μg GST-c JUN과 2 μ Ci의 γ-32P ATP를 최종 20 μl의 kinase reaction buffer에 넣고 voltexing 에 의해 resuspension 시킨 후 30°C에서 20분 동안 반응을 진행시켰다. 여기에 20 μl의 SDS-PAGE sample buffer 를 넣고 98°C에서 5분간 끓인 후 12.5 %의 SDS-PAGE를 행한다. 이 gel을 말린 후 autoradiography에 의해 活性化 정도를 판단하였다. JNK1의 기질인 GST-c-Jun 단백질은 full sequence c-Jun cDNA의 아미노산 서열 1~79까지 만을 pGEX 2T vector에 삽입후에 E. coli BL-21(DE3)에서 발현시켰다. E. coli에서 발현된 GST-cJUN 단백질은 glutathione-conjugated sepharose

beads (Pharmacia Co, Sweden)을 이용하여 순수분리한 후 정량하여 사용하였다.

6) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

전사인자들의 활성을 측정키 위해 먼저 약제가 처리된 HepG₂ 세포에서 핵추출물을 Jeong등^{8,9)}의 방법으로 모았다.

7) Annexin V and Hoechst staining

Apoptosis의 초기과정부터 일어나는 phosphatidylserine(PS)의 막 안쪽으로부터 막 밖으로 이동을 관찰하기 위한 annexin V 염색법을 시행 하였다.

III. 結果

1. 榆根皮 抽出液이 HepG₂細胞의 細胞生存率에 미치는 影響

본 實驗에서는 榆根皮 抽出液과 冬蟲夏草 抽出液이 간암환자로 부터 유래된 HepG₂ 세포의 생존율에 어떤 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 추출액의 농도를 변화시키면서 세포의 치사도를 crystal violet staining 방법으로 측정하였다. C.U.P-K 및 C.U.P-C의 추출액은 모두 농도 의존적으로 간암세포의 생존율을 감소시켰다. 특히 1000 µg/ml의 추출액 처리 농도에서 C.U.P-K 및 C.U.P-C는 각각 40% 및 62% 정도의 생존율을 나타내었으며, 冬蟲夏草 抽出液은 1000 µg/ml의 농도에서도 HepG₂ 세포의 생존율에는 유의한 변화를 일으키지 못하였다 (Fig. 1).

2. HepG₂ 細胞 chromatin의 condensation과 fragmentation에 미치는 影響

榆根皮 및 冬蟲夏草 抽出液을 처리한 HepG₂ 세포의 죽음의 기전이 apoptosis 혹은 괴사(necrosis) 과정에 의하여 매개되는지를 확인하기 위해 apoptosis 현상의 특징인 agarose electrophoresis법을 이용한 ladder형 DNA 분절 및 Hoechst staining에 의한 nucleus의 염색을 통하여 chromatin의 condensation과 fragmentation을 확인 하였다. 먼저 agarose electrophoresis에 의한 DNA분절 현상을 관찰키 위해 C.U.P-K, C.U.P-C 및 冬蟲夏草를 500µg/ml 농도가 되도록 HepG₂ 세포주에 36 시간 처리한 후 DNA를 추출하고 1.5% agarose gel 에 전기영동하여 ethidium bromide 염색을 통하여 조사한 결과, 배양액 대조군이나 榆根皮 抽出液 그리고

冬蟲夏草 抽出液을 처리한 비교군에서도 ladder형의 DNA 분절이 관찰되지 않았다. 또한 Hoechst staining 에 의한 세포의 형광현미경하에서의 관찰에서도 세포죽음에 의한 세포 밀도의 감소는 보여졌지만 chromatin의 응축이나 분절 등은 관찰되지 않았다.

3. Annexin V staining에 의한 apoptotic cell death 觀察

Apoptosis가 일어나는 세포의 세포막에 존재하는 phospholipid phosphatidylserine(PS)이 apoptosis 초기 과정에서 막 안쪽으로부터 막 밖으로 이동하는 과정을 살펴보기 위하여, FITC 등의 표지 인자가 붙어 있는 annexin V 염색방법을 사용하여 관찰한 결과, 배양액 대조군을 처리하거나, 冬蟲夏草 추출액을 처리한 HepG₂ 간세포에서는 PS의 세포막 밖으로의 이동현상을 관찰 할 수 없었으나,

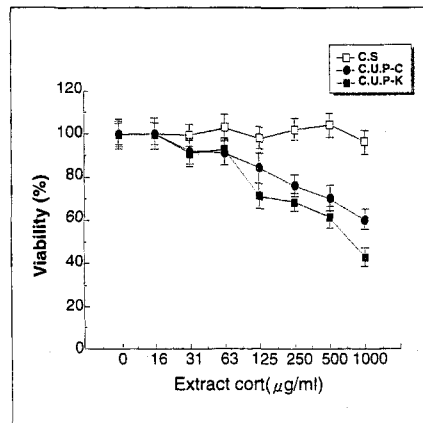


Fig. 1. Extracts of Cortex ulmi pumilae decreased the viability of HepG₂ cells in a dose dependent manner. A, HepG₂ cells were treated with various concentrations (from 1000 to 16 µg) of extract of Cordyceps sinensis (C.S.), and two extracts of Cortex ulmi pumilae (C.U.P.-C, C.U.P.-K) which were differently extracted. After 48 h later, the cells were tested for viability by Crystal violet staining. The data represented mean + S. D. of quadruplicates.

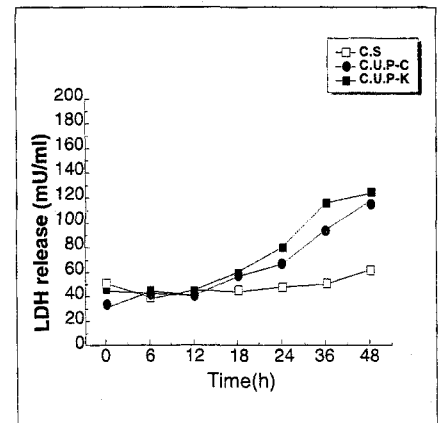


Fig. 2. LDH releases were measured. The cells were treated with 500 µg/ml of each extract for various periods. LDH releases were measured with culture supernants.

C.U.P-C 및 C.U.P-K 추출액의 경우는 모두 PS의 세포막 밖으로의 이동현상이 관찰되었다.

한편 독성물질 등에 의한 괴사(necrosis)성 세포죽음에서 일어나는 세포막의 손상은 annexin V의 세포막 투과를 유도시켜 false staining이 이루어질 수 있으므로 이를 확인키 위해 동일한 농도하에서 세포배양액에 방출되는 lactate dehydrogenase (LDH)양을 측정하였다. Fig.2의 결과에서처럼 annexin V staining을 행한 추출액 처리 9시간 전후에는 LDH 활성의 증가가 관찰되지 않았으며, 따라서 세포막은 손상되지 않고 PS만의 세포막 밖으로의 이동현상이 일어나고 있음을 의미하였고, 榆根皮 抽出液에 의한 세포죽음은 apoptosis 과정임이 확인되었다.

4. 榆根皮 抽出液이 caspase 活性化에 미치는 影響

위에서 관찰된 C.U.P-K 및 C.U.P-C 추출액에 의한 HepG2 간암세포의 apoptosis가 caspase의 활성화와 관계가 있는지를 확인하기 위하여 caspase계 cysteine proteases 중에서 caspase 1-like cysteine proteases 및 caspase 3-like cysteine protease의 활성 변화 정도를 추출액의 다양한 처리시간 후에 각각 조사하였다. 먼저 韓藥材 추출액을 500 μ g/ml 농도로 처리후 처리시간에 따른 caspase 1-like caspase의 활성 변화를 조사하였다(Fig. 3).

Caspase 1-like 활성도는 冬蟲夏草 추출액 처리 시에는 별다른 활성변화를 보이지 않았으나, C.U.P-K와 C.U.P-C 추출액을 처리 시에는 시간에 따른 약간의 caspase 1-like 활성의 감소가 나타났다. 또한 caspase 3-like 활성도는

冬蟲夏草 추출액 처리 시에는 별다른 활성변화를 보이지 않았으나, C.U.P-K와 C.U.P-C 추출액을 처리 시에는 시간 의존적인 caspase 3-like 활성증가가 나타났다. C.U.P-K 추출액의 경우 caspase 3-like 활성도는 약제 처리 후 12시간 후부터 그 활성도가 증가하기 시작해서 처리 후 18시간에 3.3배 정도의 caspase 3-like 활성증가를 보여 주었으며 그 이후에는 감소하였고, C.U.P-C 처리의 효과도 시간 의존적으로 작용하여, 24 시간 후에는 2.3배 이상 증가한 후 그 이후 감소하였으나, C.U.P-K가 C.U.P-C보다도 빠르고 강한 caspase 3-like 활성도를 나타냈다 (Fig. 4).

5. 韓藥材 抽出液이 JNK1 活性化에 미치는 影響

JNK는 세포의 성장과 분화와 관련됨이 많이 연구되어 있지만, 이들 kinases는 스트레스(stress) 상황에서 세포의 apoptosis에도 관여함이 보고 되고 있다. MAP kinase중에서 apoptosis의 신호전달을 담당하는 JNK1이 韓藥材 추출액에 의한 세포죽음시 영향받는지 조사하였다. 먼저 韓藥材 추출액을 500 μ g/ml 농도로 처리 후 처리시간에 따른 JNK1의 활성변화를 조사하였다. JNK1의 활성도는 세포의 생존율에 변화를 주지 않는 冬蟲夏草 추출액 처리 시에는 미약한 활성변화를 보였으나, C.U.P-K 추출액을 처리시에는 시간에 따라 보다 강한 JNK1의 활성증가가 나타났다.

C.U.P-K 추출액에 의한 JNK1 활성은 약제 처리 3 시간 후에 최고치로 증가하여 12시간 까지 활성이 유지되었다.

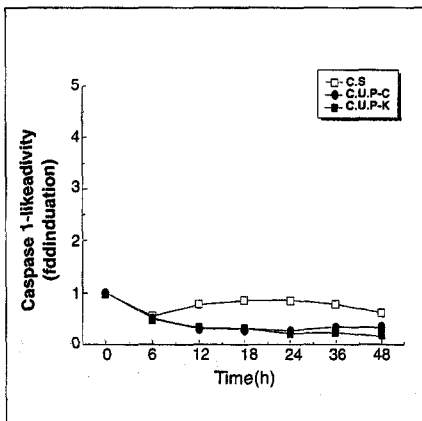


Fig 3. Two extracts of Cortex ulmi pumilae (C.U.P.-C, C.U.P.-K) did not induce the enzymatic activation of caspase 1-like proteases in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with 500 μ g/ml of each extract for various time intervals. Lysate from the cells used to measure the activity of caspase 1-like proteases by using fluorogenic peptide including acetyl-YVAD-AMC as substrates.

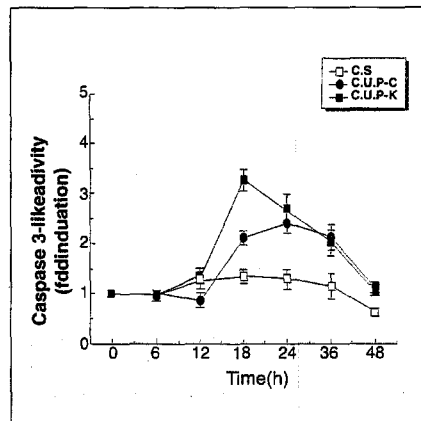


Fig 4. Two extracts of Cortex ulmi pumilae (C.U.P.-C, C.U.P.-K) induced the enzymatic activation of caspase 3-like proteases in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with 500 μ g/ml of each extract for various time intervals. Lysate from the cells used to measure the activity of caspase 3-like proteases by using fluorogenic peptide including acetyl-DEVD-AMC as substrates.

6. 榆根皮 抽出液이 전사활성인자 (transcriptional activator) AP-1 및 NF- κ B 활성화에 미치는 影響

위에서 관찰된 C.U.P-C 및 C.U.P-K 추출액에 의한 HepG2 세포의 apoptosis가 AP-1 전사인자의 활성변화와 관계가 있는지를 확인하기 위하여 추출액의 다양한 처리시간 후에 처리된 세포들을 모아 nuclear extract만을 얻은 후 electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 방법으로 AP-1 활성을 조사하였다. AP-1 전사인자의 활성도는 冬蟲夏草 추출액 처리시에는 약제를 처리하지 않은 초기부터 활성화되어 있었고, 약제 처리 3시간 후까지는 활성이 유지되다가 6시간 후 부터는 AP-1 전사인자의 활성을 보이지 않았으며, C.U.P-K와 C.U.P-C 추출액의 경우는 10분간의 약제 처리만으로도 이미 90% 이상의 AP-1 전사인자의 활성 감소를 보여 주었다.

C.U.P-K 및 C.U.P-C 추출액에 의한 HepG2 세포의 apoptosis가 NF- κ B 전사 인자의 활성변화와 관계가 있는지를 확인하기 위하여 다양한 처리 시간 후에 nuclear extract만을 얻은 후 electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 방법을 사용하여 NF- κ B 활성을 조사하였다. NF- κ B 전사인자도 역시 세포에 韓藥材를 처리하지 않은 초기부터 정상적인 생리작용에 기인되어 활성화되어있는 형태로 나타났으며, 冬蟲夏草 추출액 처리시에는 처리 후 12 시간까지도 30% 정도의 활성이 유지되었으며, C.U.P-K와 C.U.P-C 추출액의 경우 10분간의 약제 처리만으로도 이미 90% 이상의 NF- κ B 전사인자의 활성 감소를 나타내었고, 이후 6시간 까지 서서히 그 활성이 증가하였다가 다시 감

소하는 경향을 보였다.

IV. 考 察

韓醫學에서 癌에 對한 認識은 이미 二千餘年前《內經》에서부터 始作하여 《靈樞·刺節眞邪論》¹⁰에서 “以手按之堅有所結· · · · · 日以益大 則爲骨疽”라 하여 骨腫과 類似한 내용을 기술한 이후, 巢¹¹는 《諸病源候論》에서 石癰·石疽에 對하여 言及하기 始作하였으며, 歷代 文獻^{12,13}에서는 덩어리가 觸知되는 塊狀에 따라 ‘癰疽’, ‘癭瘤’, ‘翻花瘡’, ‘喉痺’, ‘疔疔’, ‘反胃’, ‘疔瘡’, ‘血蟲’, ‘乳癌’ 등으로 多樣하게 表現하고 있다.

韓藥 單一藥物의 抗癌效果에 대한 實驗的 報告로는 金 등¹⁴이 人蔘·鹿茸으로 抗體生産抑制를 緩和시킨 結果를, Odajima¹⁵는 人蔘이, Sasaki¹⁶는 甘草가, Tang 등¹⁷은 白朮이, Moon 등¹⁸은 蓬朮이 各各 相當한 抗癌效果가 있음을, 任¹⁹은 魚腥草·鹿血·猪苓·穿山甲 등이 強力한 抗癌效果 뿐만 아니라 正常 免疫細胞에 대해서도 毒作用을 나타내지 않는다고 發表하였고, 方劑構成에 의한 抗癌效果에 대한 實驗的 報告로는 金 등²⁰이 扶正抗癌湯이 직접적인 抗腫瘍效果를, 魯 등²¹이 消積補中丸이, 金 등²²이 白花蛇舌草가, 朴 등²³이 巴豆加大黃이 效果가 있음을 各各 報告하였다.

本 研究에서는 韓醫學에서 癌患者의 治療에 사용되고 있는 榆根皮의 抗癌效果를 사람의 肝癌細胞에서 유래된 HepG2 細胞柱를 사용하여, 榆根皮 抽出液이 직접적으로 癌細胞柱에 다양한 신호전달 과정이 關여하는 apoptosis를 일으켜 세포 죽음을 초래할 수 있는지를 밝히고자 실험하였으며, 아울러 근래 韓藥材의 수급과정에서 문제가 되는 輸

入藥材와의 效能을 比較하기 爲해 輸入 産 榆根皮와 冬蟲夏草를 사용하여 抗癌 效果를 관찰하였다.

먼저 이러한 韓藥材들이 HepG2 세포주에 직접적으로 살상작용을 일으키는지를 알아보기 爲하여 各各의 추출액을 농도별로 처리한 結果, C.U.P-K와 C.U.P-C는 농도에 비례하는 암세포의 죽음을 초래하는 세포독성이 있었으나, 冬蟲夏草는 유의한 세포독성이 나타나지 않아 冬蟲夏草는 apoptosis와는 관련이 없는 것으로 관찰되었다(Fig. 1).

한편 독성물질 등에 의한 괴사(necrosis)성 세포죽음에서 일어나는 세포막의 손상은 annexin V의 세포막 투과를 유도시켜 false staining이 이루어질 수 있으므로 이를 확인키 爲해 동일한 농도하에서 세포배양액에 방출되는 lactate dehydrogenase (LDH)양을 측정하였는데, annexin V staining을 행한 추출액 처리 9시간 전후에는 LDH 활성의 증가가 관찰되지 않았다. 따라서 세포막은 손상되지 않고 PS만의 세포막 밖으로의 이동현상이 일어나고 있음을 확인하였으며, 榆根皮 抽出液에 의한 세포죽음은 apoptosis 과정으로 인정되었다. 그러나 榆根皮나 冬蟲夏草 추출액들을 처리한 HepG2 세포의 죽음의 기전이 apoptosis 혹은 괴사(necrosis) 과정에 依하여 매개되는지를 확인하기 爲한 apoptosis 현상의 특징인 agarose electrophoresis법을 이용한 ladder형 DNA 분절 및 Hoechst staining에 依한 nucleus의 염색을 통하여 chromatin의 condensation과 fragmentation을 확인한 結果 어느 군에서도 ladder형의 DNA 분절이 관찰되지 않았고, 또한 Hoechst staining에 依한 세포의 형광 현미경하에서의 관찰에서도 세포죽음에 依한 세포 밀도의 감소는 나타냈지만

chromatin의 응축이나 분절 등은 관찰되지 않은 점은 유근피 추출액에 의한 HepG2 암세포의 죽음이 necrotic 세포 죽음의 가능성을 나타내는 것처럼 보였으나, Naora 등²⁴⁾은 nbl이라 불리는 특정 유전자의 세포내 존재 여부가 apoptotic 자극시 DNA ladder현상의 유무에 직접적인 관계가 있으며, 또한 본 실험에서 사용된 동일한 HepG2 간암세포의 경우 이러한 nbl 유전자의 결여로 여러 가지 apoptotic 자극에 의해서도 DNA ladder현상이 나타나지 않는 apoptosis성 죽음을 보여준다고 보고하여, 본 실험에서 관찰한 DNA ladder 및 chromatin의 condensation이 나타나지 않는 세포 죽음 역시 apoptosis에 의함을 확인할 수 있었다.

따라서 楡根皮 抽出液 등에 의한 HepG2 암세포의 죽음은 DNA분절 및 핵의 변화가 수반되지 않는 apoptosis성 세포죽음일 가능성을 제시한다. 또한 C.U.P-K 및 C.U.P-C 추출액 등에서 18시간 이후에 서서히 LDH활성의 증가가 관찰되었으나 이는 괴사에 기인된 것이라기 보다는 apoptosis 후의 세포죽음에 의해 세포의 분해가 이루어지면서 방출되는 LDH 때문이라 思料된다.

본 연구에서 楡根皮 抽出液에 의한 apoptosis에서도 역시 caspase 3-like 효소활성이 증가함을 관찰할 수 있었다 (Fig. 6). 즉, C.U.P-K 및 C.U.P-C의 처리효과는 시간 의존적으로 작용하여 18~24시간 사이에 최고 활성을 보이다가 그 이후 감소하였으며 C.U.P-K가 C.U.P-C보다도 빠르고 강한 caspase 3-like 활성도를 나타내어 C.U.P-K 및 C.U.P-C 추출액이 HepG2 유래 세포에서 caspase의 활성을, 특히 caspase 3-like cysteine protease 활성을 증가시켜서 apoptosis로 유도했음을 알 수 있다.

한편 이러한 시간 의존적인 caspase 활성화 경향은 LDH의 시간 의존적인 활성화증가와 연관지어 볼 때 LDH 활성의 증가는 약제의 toxic effect에 의한 necrosis성 죽음에 기인된 것이라기보다는, 일련의 apoptosis성 신호전달과정 및 caspase 3-like cysteine protease 활성화증가로 유도된 apoptosis성 세포죽음 및 세포분해 과정에서 방출된 LDH의 증가로 기인됨이 추정된다.

전사활성인자 AP-1은 jun 단백질 (c-jun, junB, junD)과 fos 단백질 (c-fos, fosB, fra1, fra2) 이 류신 repeat라 불리는 부위를 통하여 동종 혹은 이종 결합하는 형태로 구성되며, 수많은 자극이나 세포주기에 따라 다양하게 발현되어 조절된다. 최근 이러한 AP-1 전사인자가 apoptosis의 조절에 깊이 관여하고 있다고 보고되고 있다. 본 연구에서도 세포죽음이 유발되는 楡根皮 抽出液 등의 韓藥材 처리시 처리초기부터(10분 처리) 급격한 AP-1 전사인자의 활성화가 유도되는 결과를 나타내었으며, 이러한 전사인자의 활성화감소는 세포의 정상적인 성장 및 기능수행에 필요한 유전자들의 발현 장애를 가져와 암세포의 apoptosis에 이르게 하는 것으로 사료된다.

NF-kB는 p50/p65 두 개의 subunit로 이루어진 단백질로, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF, M-CSF 등 염증반응에 관련된 유전자의 전사적 활성을 조절하는 역할을 한다. 또한 NF-kB는 각기 다른 자극에 의해서 발생하는 apoptosis에 저항성을 나타내는 것으로 보고되고 있다. NF-kB는 자극이 없을 때에는 inhibitory 단백질인 I κ B- α 나 또는 I κ B- β 와 결합하고 있어 핵 안으로 이동하지 못하지만, 적절한 신호가 전달되면 I κ B- α 나 또는 I κ B- β

가 파괴되어 NF-kB가 활성화가 된다.

NF-kB의 부적절한 활성화는 급성염증반응, 급성기반응 (acute phase response), 방사선 손상, 죽상경화증 (atherosclerosis) 및 악성종양과 같은 여러 가지 질병의 유발과 밀접한 관련이 있다고 보고되고 있다.

본 연구에서도 간암세포주인 HepG2 세포주는 아무런 약제처리 과정 없이 그 자체만으로도 강한 NF-kB활성이 되어있는 상태를 보여주며, 楡根皮 抽出液 처리시 10분 만에 거의 90%이상의 활성이 감소되는 급격한 활성화저하를 나타내었다. 이러한 급격한 NF-kB 전사인자의 활성화감소가 직접적으로 세포의 증식 및 유지 등에 필요한 유전자의 발현을 저해하여 세포의 죽음을 초래하리라 사료된다. 그런데 NF-kB 전사인자의 경우는 AP-1 전사인자의 활성화변화는 달리 처리 10분 후에 보이는 급격한 활성 감소 이후에 楡根皮 抽出液들 처리후 6시간까지 서서히 NF-kB의 활성 증가가 관찰되었다. 아마도 이러한 점진적인 활성 증가는 apoptosis 과정에 요구되는 단백질들의 발현에 필요한 유전자들의 전사를 증진시키기 위한 것으로 사료되며, 이러한 楡根皮 抽出液들에 의한 간암세포주 HepG2 세포의 세포고사는 AP-1활성의 급격한 저해, NF-kB 전사인자의 급격한 감소 및 다시 활성화되면서 새로운 apoptosis 관련 단백질들의 발현에 의해 유발되리라 생각된다.

많은 항암제에 의한 apoptosis성 세포죽음에 있어서 반응성 산소기 (reactive oxygen species) 등을 포함한 oxidative stress가 깊이 관련되어 있음이 알려져 있다.

본 연구에서 楡根皮 抽出液들에 의한 HepG2 간암세포의 죽음시 이러한

oxidative stress의 관련여부를 판단하고자 glutathione과 N-acetylcysteine(NAC) 등의 anti-oxidant를 동시 처리한 경우에 楡根皮 抽出液에 의한 세포고사의 정도에는 아무런 영향을 주지 못함을 확인하였다. 이러한 결과는 楡根皮 抽出液의 항암효과가 oxidative stress를 유발시켜 이루어 지는 것이 아님을 시사하였다.

또한 세포내 Ca^{2+} 의 변화 또한 여러 가지 아포시스성 세포죽음과 밀접하게 관련되어 있음이 알려져 왔다. cytosolic Ca^{2+} chelator로 알려진 Bapta/AM이나, endoplasmic reticular Ca^{2+} -ATPase 저해제로서 세포질내 Ca^{2+} level을 증가시키는 작용을 하는 thapsigargin의 처리는 韓藥材에 의한 세포고사에 아무런 영향을 주지 못하였다. 따라서 이는 楡根皮 抽出液에 의한 HepG2 세포의 세포고사기전이 직접적인 세포내 Ca^{2+} level의 조절이외의 다른 경로를 통해 진행되고 있음을 의미한다.

이상의 연구결과를 종합하면 楡根皮 抽出液에 의한 간암세포의 사멸은 이 추출액이 암세포의 apoptosis 신호전달기전인 CPP32-like cysteine protease와 JNK1을 활성화시키는 반면, AP-1과 NF-kB 같은 전사활성인자는 불활성화시킴으로써 楡根皮 抽出液이 암세포의 apoptosis에 관여하고 있음을 알 수 있어, 현재 한의학에서 응용되고 있는 楡根皮는 과학적으로 항암제로서의 가치가 있음을 알 수 있었다. 앞으로 楡根皮 抽出液이 간암세포의 apoptosis에 미치는 연구가 계속되어야 할 것으로 思料된다.

V. 結論

韓醫學에서 肝癌·腸癌·乳房癌 등에 응용되고 있는 楡根皮 抽出液이 사람의 간암에서 유래된 HepG2 細胞에 어떠한 영향을 미치는지를 究明하기 위하여, caspase cysteine protease의 활성도와 c-Jun N-terminal kinase (JNK) 및 전사활성인자 (transcriptional activator)인 AP-1과 NF-kB의 활성변화등 apoptosis에 대한 과정들을 관찰하였던 결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 楡根皮 抽出液을 간암세포 HepG2에 투여한 결과 1000 μ g/ml 抽出液 처리 농도에서 C.U.P-K 및 C.U.P-C는 각각 40% 및 62%로 생존율이 감소되었다.

2. 楡根皮 抽出液 등에 의한 세포 죽음시 DNA분절 및 핵의 변화등을 관찰하지 못했으나, Annexin V staining과 LDH양 측정결과 세포막 밖으로의 이동현상을 관찰할 수 있었다.

3. 楡根皮 抽出液 500 μ g/ml 농도로 처리후 처리시간에 따른 caspase 1-like, caspase 3-like의 활성변화를 조사한 결과 caspase 3-like cysteine protease의 활성이 증가되었다.

4. 楡根皮 抽出液을 HepG2 세포에 투여한 후 EMSA방법을 통해 AP-1과 NF-kB활성을 조사한 결과 모두 감소되었다.

以上の 結果로 보아 楡根皮 抽出液에 의한 肝癌細胞의 枯死는 이 抽出液이 癌細胞의 apoptosis 신호전달기전인 caspase 3-like cysteine protease와 JNK1을 活性化시키는 반면, AP-1과 NF-kB같은 전사활성인자를 不活性化시키므로서 apoptosis가 촉진됨을 알 수 있었으며, 楡根皮 抽出液의 항암효과를 확인할 수 있었다.

VI. 參考文獻

- Cohen JJ. : Apoptosis. Immunol. Today 1993;14:126-130.
- Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. : Cell death the significance of cell death. Int. Rev. Cytol. 1980;68:251-306.
- Alnemri ES, Livingstone DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. : Human ICE/CED-3 protease nomenclature. Cell 1996;87:171.
- Enari M, Talanian RV, Wong WW, Nagata S. : Sequential activation of ICE-like and CPP32-like protease during Fas-mediated apoptosis. Nature 1996;380:723-726.
- 孟立春 外 : 抗癌中藥一千方, 北京: 中國醫藥科技出版社, 1994;5-17.
- 李宗彥 : 臨床腫瘤學手冊, 中國: 北京醫科大學 中國協和醫科大學聯合出版社, 1992;1-27.
- Kim Y. M., Talanian R. V., and Billiar T. R. : Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increase in caspase 3-like activity via two distinct mechanisms. J. Biol. Chem 1997;272:31138.
- Jeong JY, Jue DM : Chloroquine inhibits processing of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. J Immunol 1997;158:4901-4907.
- Sen R, Baltimore D. : Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. Cell 1986;47:921-928.
- 楊維傑 : 黃帝內經靈樞經釋, 서울: 成輔社, 1980;549.
- 巢元方 : 巢氏諸病源候論, 臺中: 昭人出版社, 1960;370.
- 葉銘洪 : 治癌中藥及處方, 臺北: 華聯出版社, 1981;4-10, 48-50, 282-283.
- 黃文東 外 : 實用中醫內科學, 上海: 上海科學技術出版社, 1988;486-496, 621-623, 627-631, 634.
- 金光湖 外 : 水腫 漢藥材가 制癌劑 및 Glucocorticoid의 抗腫 生産抑制作用에 미치는 影響. 趙永植 博士 華甲紀念論文集, 1981;1041-1050.
- Odajima Yoshio : Effects of Ginseng on cancer cell. Yakuyo Ninjin sono

- Kenkyu to Shinpo 1981;198-209.
16. Sasaki S. : Antitumor agents from medical plants. Jpn. Kokai Tokyo koho Jp 1983;58,118,820.
 17. Tang Defang, Hao Yohung, Liu Zuoya, Miao Shulin, Wei Hua, Wu Jian. : Constituents of the essential oil from rhizome of *Actactylodes macrocephala* produced in pingjiang (China) and their antitumor effects. *Yaouxue Tongbao* 1984;19(9): 555-558.
 18. Chang Kiu Moon, Byeong Gon Lee, Soo Whan Lee, Tak Lim Kang : Effect of antitumor polysaccharides from *Albizza julibrissin* on Immune function. *Arch. Pharmacol Res.* 1985;8(4): 277-282.
 19. 임재훈 : 수종의 한약물이 암세포 감수성에 미치는 영향. *경희한의대논문집*, 1986;9: 242-266.
 20. 金柄住 : 扶正抗癌湯의 抗腫瘍效果에 관한 實驗的 研究. 원광대학교 대학원, 1996.
 21. 魯勤政 : 消積補中丸의 抗腫瘍效果에 관한 實驗的 研究. 원광대학교 대학원, 1995.
 22. 金台峴 : 白花蛇舌草 煎湯液 投與가 마우스의 抗腫瘍 免疫反應에 미치는 影響. 원광대 대학원, 1995.
 23. 朴鐘郁 : 巴豆加大黃의 抗腫瘍效果와 自然殺害細胞의 活性에 미치는 影響. 원광대대학원, 1996.
 24. Naora H, Nishida T, Shindo Y, Adachi M, Naora H. : Constitutively enhanced nbl expression is associated with the induction of internucleosomal DNA cleavage by actinomycin D. *Biochem. Biophys. Res. Comm* 1996;224, 258-264.