

권백물추출물의 선별적인 항암작용에 대한 연구

이성원 · 안성훈 · 곽근신 · 곽 섭 · 이장천¹ · 문연자 · 우원홍*

원광대학교 한의화전문대학원 한약자원개발학과, 1: 상지대학교 한의과대학 본초방제학교실

Study on Selective Anti-cancer Effects by the Water-extracts of Selaginella Tamariscina in Cancer Cell lines

Sung Won Lee, Seong Hun Ahn, Gun Sin Gwak, Sup Kwak, Jang Cheon Lee¹, Yean Ja Mun, Won Hong Woo*

Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University

1: Department of Oriental Medical Prescription Sangi University

Selaginella Tamariscina is widely used in the traditional oriental herbal medicine for its anti-inflammatory, anti-cancer effects. The effects of aqueous extracts of Selaginella Tamariscina (ST) on the cell viability and induction of apoptotic cell death were investigated in A549, Raw 264.7, C6-glioma, Jurkat and HL-60 cells. The cell viability after treating with extract of Selaginella Tamariscina was quantified by MTT assay method. The results showed that ST decreased the cell viability in HL-60 and Jurkat cells not in A549, Raw 264.7 and C6-glioma cells. And we also observed the chromatin condensation and DNA fragmentation in HL-60 and Jurkat cells. The enzyme activity of caspase-3, tightly regulated by an apoptosis activating complex, were markedly increased in HL-60 cells treated with the ST by dose-dependent manner. In conclusion, our results suggest that the extract of Selaginella Tamariscina may induce the selective apoptotic cell death in HL-60 and Jurkat cells via activation of caspase-3

Key words : Selaginella Tamariscina (ST), apoptosis, caspase-3, DNA fragmentation

서 론

암이란 신체의 정상세포가 여러 가지 위험인자들-내적인 인 유전적 요소와 외적인 암발생 유발요소로 작용되는 발암 화학물질 · 방사선 · 자외선 · 우주선 · 계속적인 염증과 손상, 암 유발 바이러스(Oncogenic virus) 감염 등-로 인하여 정상적인 세포주기의 절제에서 벗어나 변성하여 분열, 증식을 초래, 주변의 조직이나 장기 등으로 전이하는 악성소모성 질환이다¹⁻⁵⁾. 암의 치료는 수술 · 방사선요법 · 항암화학요법 등의 3대 치료법이 널리 사용되어 왔으며, 그 중 항암화학요법은 Chlorambucil, Cyclophosphamide, Melphalan, Nitrogen Mustard, Cisplatin, Cytarabine, Mitocmycin-C, Bleomycin 등을 작용기전, 성분, 세포주기 등에 따라 적용 · 투여하는 암치료요법이다⁶⁻⁸⁾. 그러나, 이는 암세포에 대한 직접적인 살상작용으로 정상세포 특히 세포분

열이 활발한 조직세포에도 손상을 일으켜 골수기능저하, 위장관 점막손상, 탈모 등의 여러 부작용이 병발하고 있다⁹⁾. 따라서 항암세포의 직접적인 살상보다는 면역요법이나 세포분화유도법, 혈관형성저해법, apoptosis 등의 간접적으로 암세포사멸을 유도하는 연구가 최근 활발히 이루어지고 있다. 세포고사(apoptosis)는 세포내부에 존재하는 programmed cell death를 말하는 것으로 necrosis와는 다르게 유전자활성의 조절¹⁰⁾에 의하여 형태학적인 변화와 생화학적인 변화가 동반된다. 형태학적인 특징으로 세포 크기의 축소(Shrinkage of cell size)와 세포막 융기가 돌출하는 현상(membrane blebbing), 세포소체(apoptotic body)의 특징을 나타내며, 또한 세포소기관등 원형 구조를 대체적으로 유지하는데 비해, 핵내에서는 염색사 응축(chromatin condensation), 핵 분절(nuclear fragmentation)이나 DNA 분절 등의 특이한 변화가 동반된다¹¹⁾. 최근에 항암제로 주목받고있는 taxol, camptothecin 류, vincristine, vinblastine 등의 항암제 등은 朱木, 喜樹, 長春花로부터 분리된 바 있는 항암제로서 세포고사를 유도하고 있다고 밝혀지고 있어¹²⁾, 한의학에서 사용되고 있는 한약제에 대한 항

* 교신저자 : 우원홍, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의화전문대학원
E-mail : whwoo@wonkwang.ac.kr, Tel : 063-850-6845

· 접수 : 2002/09/02 · 수정 : 2002/09/27 · 채택 : 2002/11/29

암제로서의 연구개발가능성을 시사하고 있다. 이에 본 실험은 임상에서 활용되고 있는 한약제제의 항암작용을 규명하기 위한 일환으로 활혈화어 기능이 있는 권백¹³⁾에 대하여 현대인으로부터 빈발되고 있는 뇌종양, 폐암, 혈액암 등의 암 세포주에 대한 세포 생존율을 측정하고 결과 HL-60과 Jurkat cells에서 세포생존율이 유의하게 감소함을 확인하였으며, 나아가 HL-60에서 세포 사멸 작용을 전기영동으로 관찰한 결과, 권백은 혈액암에서 apoptosis의 특징적 소견을 나타내는 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시료의 제조

본 실험에 사용한 권백 (*Selaginella tamariscina*)로서 우리유 통약업사(서울)에서 구입하여 사용하였다. 권백 100g에 증류수 1ℓ를 가하여 3시간 끓여서 거즈로 여과하고 3200rpm으로 원심 분리 후 감압여과한 여과액을 농축기(Rotary evaporate)로 농축하여 -70℃(Deep freezer)에서 12시간 이상 동결시킨 후 Freezer dryer로 동결건조시켜 건조 분말 12.03g(수득율 ; 약 12%)을 적당한 농도로 증류수에 용해시킨 후 0.22 μm membrane filter로 여과한 것을 사용하였다.

2. 세포배양

A549, Raw 264.7, C6-glioma, Jurkat, HL-60(한국세포주은행)의 배양은 CO₂ 배양기(37℃, 5%)에서 10% fetal bovine serum이 포함된 RPMI-1640(Gibco BRL, Life Technologies Inc., U.S.A.)배지에서 Raw 264.7, C6-glioma, Jurkat, HL-60 세포를 배양하였고. 10% FBS가 포함된 DMEM(Gibco BRL, Life Technologies Inc., U.S.A.)배지에는 A549 세포를 배양하였다. Raw 264.7, C6-glioma, A549 세포는 4일 마다 3ml의 trypsin-EDTA(Gibco BRL, Life Technologies Inc., U.S.A.) 용액을 사용하여 계대배양을 실시하였으며, Jurkat, HL-60 세포는 포집하여 4일마다 계대배양하였다. 권백물추출물을 처리한 뒤 세포의 apoptosis 현상과 이에 연관된 生化學的 實驗을 수행하였다.

3. 세포생존율 측정

37℃, 5% CO₂ 하에서 배양후 Denizot와 Rita의 방법³⁴⁾을 따라 MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide)용액을 모든 well에 50 μl/well 씩 가해 주고 다시 4시간 더 배양하였다. 배양종료시 배양기를 300rpm에서 10분간 원심분리한 후 생성된 formazan을 결정을 DMSO에 용해시켜 micro plate reader로 540nm에서의 흡광도를 측정하였다. 결과 분석은 실험군의 평균 OD540값을 구하여 대조군(100% 생존군)의 평균 OD540값에 대한 백분율로 환산하였다.

4. Hoechst stain

세포사멸 과정에서 일어나는 DNA 분절화와 염색질 농축을 관찰하기 위하여 Hoechst 염색을 시행하였다. 한약재 처리된 세

포들을 4% formaldehyde 용액에서 고정시킨 후 PBS로 씻어주고 Hoechst 33342(Sigma Chemical Co., St. Louis, NY., U.S.A.) 염색시약을 PBS에 10 μM이 되게 희석하여 10분간 염색한 후 다시 PBS로 세척하고 형광현미경으로 관찰하였다.

5. DNA 추출과 전기영동

DNA 분절현상을 확인 방법은 Miller 등의 방법³⁵⁻³⁷⁾에 준하여 실시하였다. 세포의 genomic DNA 추출은 Wizard genomic DNA purification kit (promega, Madison, WI, U.S.A.)를 이용하였으며, Isopropan alcohol 침전에 의하여 응축된 DNA 70% 에 탄올에 세척한 후 진공 건조시켰다. TE완충 용액(50mM HEPES pH, 7.4, 150mM NaCl, 1% deoxy-chocolate, 1mM EDTA, 1mM PMSF)에 용해된 DNA 5 μg을 1.5% agarose gel에 50V, 3시간 동안 전기영동을 실시하여 Ethidium bromide에 염색하여 UV하에서 관찰하였다.

6. Caspase-3 활성도 측정

HL-60 세포에 시간, 농도 의존적 처리한 후 세포를 원심 분리하여 포집하였다. 포집된 세포를 생리식염수로 1회 세척후, 4℃에서 30분 동안 추출완충용액(1% Triton X-100, 0.32M sucrose, 5mM EDTA, 1mM PMSF, 1 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml Leupeptin, 2mM dithiothreitol(DTT), 10mM Tris/HCl, pH 8.0)으로 용해하여, 20분동안 13,000rpm으로 원심분리시켰다. 원심분리하여 얻은 상층액은 Bradford(Bio-rad)법으로 정량하여 assay buffer(100mM HEPES, pH7.5, 10% sucrose, 0.1% chaps, 1mM PMSF, 1 μg/ml Leupeptin, 2mM DTT)에 희석시킨 후, caspase-3 활성도 측정은 형광을 나타내는 기질로서 100 μM의 7-amino-4 coumrin(AMC)-DEVD motif-specific peptide (Calbiochem. co. San Diego, CA)를 사용하였고, 대조군은 AMC화합물만을 용액에 넣어 반응시킨 후, 형광표지된 기질과 37℃에서 30분간 배양시킨 후 fluorometer로 측정하였다. 이때 caspase-3의 활성에 의해 발생하는 형광은 380nm의 여기파장(excitation wavelength)과 460nm의 방출파장(emission wavelength)를 사용하였다.

7. 통계분석

실험에서 얻은 결과는 One-way ANOVA test를 이용하여 통계 처리하였고, p<0.05, p<0.01 수준에서 유의성을 검정하였다.

실험결과

1. 권백물추출물이 A549 세포에 미치는 영향

권백물추출물이 A549 세포에 세포 생존에 미치는 영향을 조사하기 위하여 권백물추출물 0, 50, 100, 200, 400 μg/ml를 각각 포함한 배양액에서 48 시간 배양한 후 A549의 생존율을 MTT assay에 의한 결과는 다음과 같았다(Fig. 1-A). 정상군의 생존율을 100.00%로 환산하였을 때 권백물추출물의 농도를 50 μg/ml 처리에서 97.63±3.2%의 생존율로 나타났으며, 100, 200, 400 μg/ml 처리에서는 각각 97.01±2.5%, 96.49±2.9% 그리고

92.59±1.7%으로 대조군에 비하여 유의한 생존율의 변화를 나타내지 않았으며, Hoechst 염색에 의한 세포내의 핵을 형광현미경 관찰에서도 염색질의 농축과 분절화 현상이 관찰되지 않았다(Fig. 1-B).

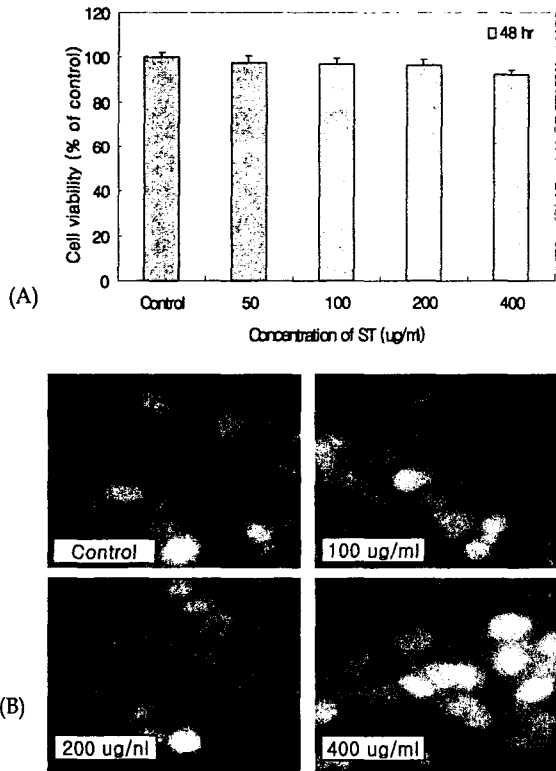


Fig. 1. Effect of selaginella tamariscina(ST) on cell viability and DNA fragmentation as dose-dependent manner in A549. Cell were seed 1×10^5 per well and treated with ST for 48 hr. ST: water-extract of selaginella tamariscina. (A) The effects on cell viability by ST. The value were determined by MTT assay(A540). Data as Mean±SD. (B) The effects of ST on nuclear condensation and DNA fragmentation.

2. 권백물추출물이 Raw 264.7세포의 세포생존에 미치는 영향

권백물추출물이 Raw 264.7 세포 생존율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 권백물추출물 농도를 0, 50, 100, 200, 400 µg/ml를 배양액에 첨가하여 48 시간 배양한 후 MTT 방법에 의하여 조사한 결과 권백물추출물농도 0, 50, 100, 200, 400 µg/ml처리에서 세포생존율은 각각 98.63±1.5%, 97.01±2.9%, 96.49±4.1%, 94.51±3.5%로 관찰되어 권백물추출물 농도 의존적인 처리는 세포 생존율에 영향을 미치지 않음이 관찰되었다(Fig. 2-A). 또한 Hoechst 염색에 의한 세포내 핵 관찰(재료 및 방법 참조)에서도 염색질의 농축과 핵분절화 현상이 관찰되지 않았다(Fig. 2-B).

3. 권백물추출물이 C6-glioma 세포 생존율에 미치는 영향

다음은 권백물추출물이 뇌종양 세포주인 C6-glioma 세포의 세포생존율에 미치는 영향을 조사하였다. 권백물추출물의 농도를 각각 0, 50, 100, 200, 400 µg/ml로 세포배양액에 처리하여 48 시간 배양 후 MTT assay를 통하여 대조군(권백물추출물 : 0 µg/ml 처

치군) 세포생존율을 100%으로 환산하여 분석하였다. 권백물추출물 각각의 농도 50, 100, 200, 400 µg/ml처리에서 세포생존율은 각각 98.98±3.2%, 98.55±2.8%, 97.55±2.9%, 97.57±1.9%로 나타나 세포생존율에 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 3-A). 또한 Hoechst 염색에 의한 세포내 핵 관찰(재료 및 방법 참조)에서도 염색질의 농축과 핵분절화 현상이 관찰되지 않았다(Fig. 3-B).

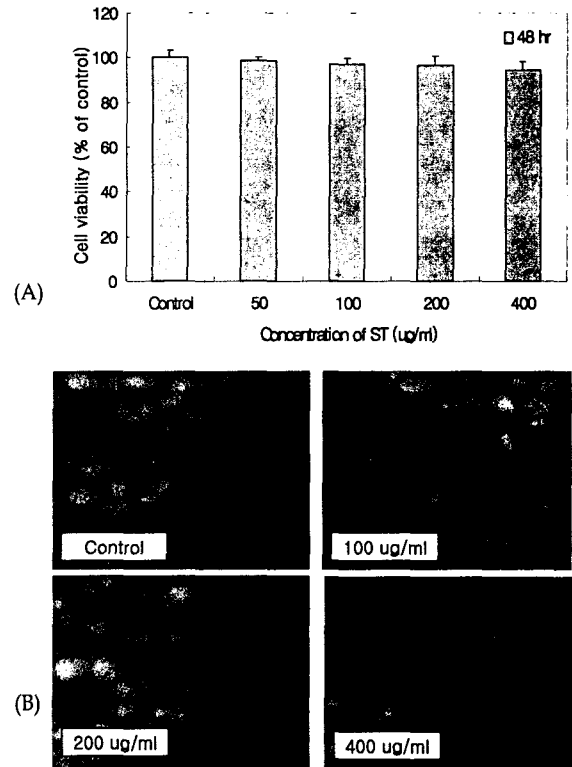


Fig. 2. Effect of Selaginella tamariscina(ST) on cell viability and DNA fragmentation as dose-dependent manner in Raw 264.7. Cell were seed 1×10^5 per well for 24 hour and exposed to the various concentration of ST for 48 hr, respectively. (A) Cell viability was measured by MTT assay. The results represented the mean±SD(n=4). (B) The nuclear condensation and DNA fragmentation were observed by Hoechst stain.

4. 권백물추출물이 Jurkat 세포주의 세포생존율에 미치는 영향

권백물추출물이 Jurkat 세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 권백물추출물을 각각 0, 50, 100, 200, 400 µg/ml 농도 별로 24 시간과 48 시간 처리한 후 MTT assay를 통하여 조사한 결과, 세포배양액에 24 시간 처리한 후 Jurkat 세포의 세포생존율은 권백물추출물 각각 50, 100, 200, 400 µg/ml에서 90.58±2.3%, 77.81±1.9%, 77.2±1.5%, 50.46±1.0%으로 유의한 감소가 관찰되었다. 48 시간 세포배양액에 처리시에는 권백물추출물 50 µg/ml와 100 µg/ml에서 각각 82.92±2.7%, 75.33±3.1%로 감소하였고 200 µg/ml와 400 µg/ml의 농도에서는 각각 63.54±1.2%와 40.00±1.1%로 대조군에 비하여 모두 유의하게 감소하였다(Fig. 4-A). 형광현미경하에서 Hoechst 염색에 의한 세포핵 관찰에서도 염색질의 농축과 핵분절화 현상이 관찰되었다(Fig. 4-B)

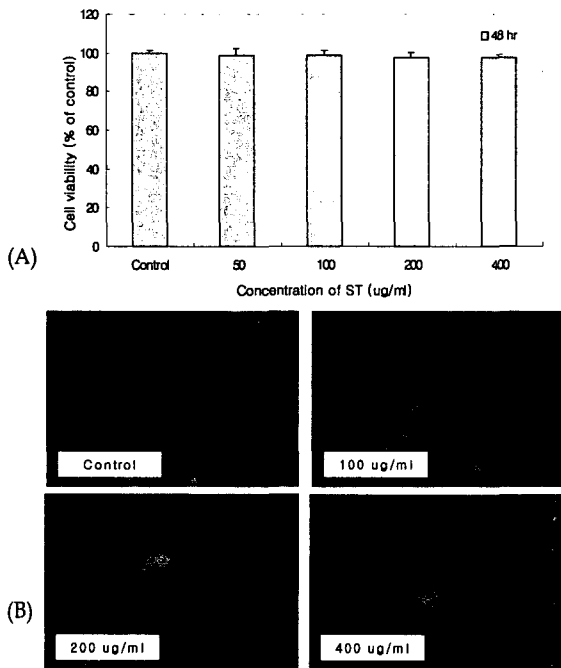


Fig. 3. Effect of *Selaginella tamariscina*(ST) on cell viability and DNA fragmentation as dose-dependent in C6-glioma. C6-glioma cells were seed 1×10^5 per well and treated with various concentrations of ST. (A) The cell viability was measured by MTT assay. The data represented as mean±S.D. (B) The nuclear condensation and DNA fragmentation were observed by Hoechst stain. Cells were showed normal nuclear morphology with diffused chromatin structure.

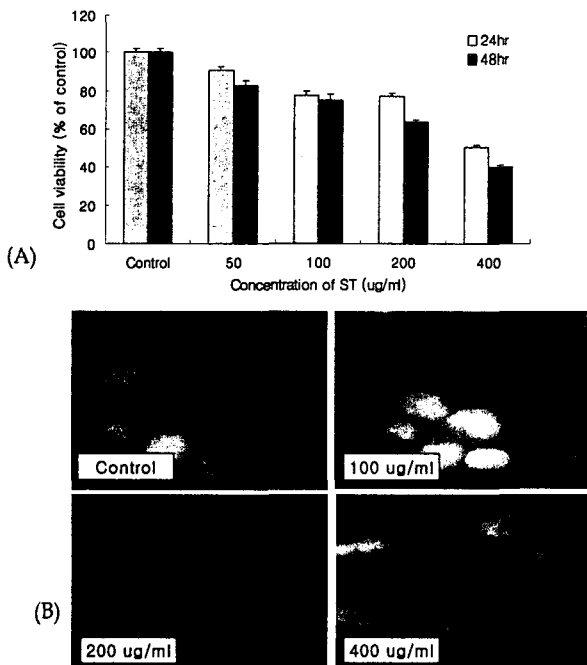


Fig. 4. Effect of *Selaginella tamariscina*(ST) on cell viability and DNA fragmentation as dose-dependent manner in Jurkat cells. Jurkat cells were seed 1×10^5 per well and treated with various concentrations of ST-extract. (A) The cell viability was measured by MTT assay. The data represented as mean±S.D. (B) Fluorescent staining of nuclei in Jurkat cells by Hoechst 33342. Control cells were showed normal nuclear morphology with diffused chromatin structure. However, apoptotic cells with fragmented nuclei are observed in the ST-extract treated cells for 48 hr.

5. 권백물추출물이 HL-60 세포의 세포생존율에 미치는 영향

권백물추출물이 HL-60 세포의 세포생존율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 권백물추출물을 각각 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 처리한 후 24시간과 48시간 배양하여 MTT assay로 세포생존율을 관찰하였다. 권백물추출물 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 를 24 시간 처치군에서는 각각 96±1.7%, 87±1.2%, 81±1.1%, 75±1.1%의 세포생존율을 보여 약 25%의 세포생존율 감소를 나타내었으며, 48 시간 처치군에서는 각각 87±0.9%, 85±1.1%, 76±1.2%, 55±1.3%의 세포생존율이 관찰되어 약 45%의 세포생존율 감소가 관찰되었다(Fig. 5-A). 또한 권백물추출물 0, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 를 세포배양액에 처리하고 48 시간 배양 후 Hoechst stain을 실시하여 형광현미경 하에서 세포를 관찰한 결과, 염색질의 농축과 핵의 분절화 현상이 권백물추출물농도 의존적으로 관찰됨을 알 수 있었다(Fig. 5-B).

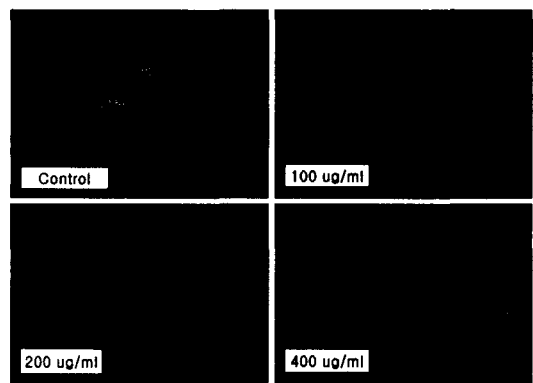
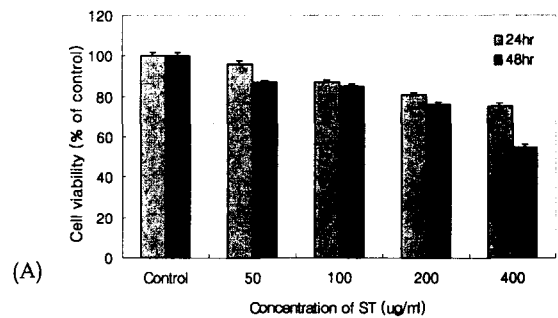


Fig. 5. Effect of *Selaginella tamariscina*(ST) on cell viability and DNA fragmentation as dose-dependent manner in HL-60. HL-60 cells were seed 1×10^5 per well before treated with various concentrations (from 50 $\mu\text{g/ml}$ to 400 $\mu\text{g/ml}$) of ST-extract. (A) Cells were treated with ST. After 24 hr and 48 hr, the cell viability was measured by MTT assay. The data represented as mean±S.D. (B) Fluorescent staining of nuclei in HL-60 by Hoechst 33342. Media control cells were showed normal nuclear morphology with diffused chromatin structure. However, apoptotic body and nuclear fragmented were observed of ST-extract treated with the above concentration for 48 hr.

6. 권백물추출물이 HL-60 세포의 DNA 분절화에 미치는 효과

이상의 실험 결과, 권백은 혈액암세포주인 HL-60과 Jurkat 세포에서 세포사멸 유도작용이 있음을 확인할 수 있었으며 Hoechst stain 관찰을 통하여 apoptosis의 특징적 소견인 염색질의 농축과 nuclear fragmentation이 관찰됨을 알 수 있었다. 따라서, 실험진행과정상 유의성이 높았던 HL-60 세포주에서 권백

물추출물이 유도하는 cell death 기전이 apoptosis에 의하여 매개 되는지 조사하기 위하여 세포고사의 또다른 특징인 DNA 분절을 확인하고자 하였다. 권백물추출물을 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 준비되어진 HL-60 세포주에 처리하고 48 시간 배양한 다음, HL-60 세포를 수거하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 1.5% 아가로스젤에 전기영동하여 DNA 분절 현상을 Et-Br 염색을 통하여 조사한 결과, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리된 세포에서 DNA 분절 현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 6).



Fig. 6. Effect of Selaginella tamariscina (ST) on DNA fragmentation analyze in HL-60. HL-60 cells were treated with 200, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ST for 48 hr. Genomic DNA was isolated and separated on 1.5% agarose gels electrophoresis. The DNA was stained with ethidium bromide and visualized under UV light: Lane 1, Control; Lane 2, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ST; Lane 3, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ST

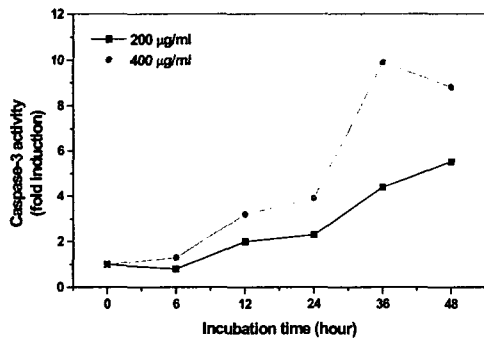


Fig. 7. Effect of Selaginella tamariscina(ST) on the enzymatic activity of caspase-3. HL-60 cells were treated with 200, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ST for various period. Cell lysates were prepared using lysis buffer. The protein were measure by Bior-rad. Each of the protein(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) reacted fluorogenic substrate 7-amino-4-coumarin(AMC)-DEVD (100 ng/ml). The treatment of ST (200, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) increased the enzymatic activity of caspase-3 in HL-60 cells.

7. 권백물추출물이 HL-60에서 Caspase-3의 활성화에 미치는 영향

Caspase-3는 Yama, Apopain 등으로 불리는 유전자로 과 발현 시킬 경우, apoptosis가 유도되고³⁶⁾, Caspase-3 activity inhibitor를 사용하면 apoptosis 억제가 유도되는 등³⁹⁻⁴⁰⁾ apoptosis에서 중추적인 역할을 하고 있는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 다음의 진행된 실험은 HL-60 세포에서 caspase-3 activity를 관찰하여 권백이 유도하는 apoptosis 과정의 신호전달기전을 알아보려고 하였다. 권백물추출물 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 세

포 배양액에 처리하여 0, 6, 12, 24, 36, 48 시간 배양한 후, 수집된 세포를 용해하여 얻은 단백질에 Caspase-3 형광기질인 Ac-DEVD-7-amino-4-methylcoumarin(AMC)를 이용하여 caspase-3 protease의 효소 활성도를 측정하였다(재료 및 방법 참조). 권백물추출물 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한 경우 caspase-3 activity는 36 시간에 권백물추출물을 처리하지 않은 대조군에 비하여 4.4배 증가하였고 48 시간에는 5.5배의 증가를 보였으며, 권백물추출물 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 경우에는 36시간에 9.9배의 증가를 보였으나 48 시간에는 8.8배로 약간의 감소를 보였다(Fig. 7).

고 찰

세포고사(programmed cell death)는 apoptosis라고 불리며 생체의 생명현상을 유지하기 위한 능동적인 작용으로 signal을 따라 세포 내 여러 유전자들이 발현하여 일어나는 세포사멸 기전이다. Apoptosis에 의하여 죽어가는 세포의 형태적, 생리적 특징으로는 세포막 박리, 세포의 수축, 핵의 응축, DNA의 분절, 세포막을 이루는 지질인 포스파티딜 세린(phosphatidyl serine)의 세포 외부로의 노출 등이 보고되었다¹⁰⁾. 현재 사용되는 항암제의 수는 대략 50여 가지가 있으며 향후 항암연구가 진행됨에 따라 더욱 증가될 전망이다. 항암제는 작용기전, 성분, 세포주기 등에 따라 여러 가지로 분류할 수 있고, 항암제의 선택은 암의 종류, 환자 몸에 발병한 위치, 암의 진행정도에 따른 병기, 암이 정상 신체 기능에 미치는 영향 등을 고려하여 결정된다. 항암제의 종류에는 암세포 핵 내부의 DNA에 손상을 입혀 결과적으로 암세포가 자라는 것을 막는 약품으로, carboplatin, cyclophosphamide, melphalan 등이 있으며, 암세포가 성장하거나 분리하는 것을 막는 약품으로 bleomycin, Adriamycin, doxorubicin 등이 있고, 암세포를 자극하는 호르몬의 작용을 막는 약품으로 aminoglutethimide, flutamide, goserelin 등이 있다. 그러나 이들은 암세포에만 선택적으로 작용하는 것이 아니라 정상세포, 특히 세포분열이 활발한 조직세포에도 손상을 입히기 때문에 골수기능저하, 위장관 점막손상, 탈모 등 여러 부작용이 나타난다⁹⁾. 그러므로 정상세포에는 아무런 독성을 미치지 않으면서 특정 암세포만을 특이적으로 공격하여 파괴하는 항암제의 개발이 절실히 요구되고 있으며, 천연물질을 이용한 항암제로의 개발 가능성을 입증하기 위한 실험 보고들이 늘어나고 있다¹⁴⁾. 특히 한약제재에서 개발된 cyclophosphamide, adriamycin, vincristine, taxol 및 bleomycin 등은 세포고사를 유도한다고 밝혀져⁶⁻⁸⁾ 널리 사용되고 있으며 천연물에서의 항암제 개발 타당성을 높게 시사하고 있다. 권백은 부처손과에 속하는 다년생 초본인 부처손의 전초이며 여러 한의서적에서 권백은 治五臟邪氣, 陰中寒熱痛, 癥瘕, 血閉, 絕子¹⁵⁾ 止咳逆, 治脫肛, 散淋結, 頭中風眩, 強陰益精¹⁶⁾ 등의 효능이 기재되어 있으며 이를 근거로 살펴보면 收斂止血, 活血去瘀의 효능¹⁷⁾을 가지고 있음을 알 수 있다. 최근에 발표된 권백의 실험 연구결과에서 이 등¹⁸⁾은 권백물추출물이 human myeloid leukemia cell line U937 세포에서 p53의 발현증가와 G1 arrest의 induction 증가를 보고하였고, Kuo 등¹⁹⁾은 권백이 mesangial cell

에서 proliferation을 억제한다고 보고하였다. 이의 항암작용과는 다소 거리가 있지만 blood sugar와 serum lipid peroxide를 낮추고 serum insulin을 증가시킨다는 보고²⁰⁾와 sotetsuflavon, amentoflavon, isocryptomerin, cryptomerin B, apigenin 등의 성분이 함유되어 있다는 보고²¹⁻²³⁾가 있었다. 따라서 본 연구는 임상에서 항암효과가 있다고 알려진 권백의 항암작용을 조사하기 위하여 현대인에게 빈발하고 있는 폐암, 면역암, 뇌종양, 혈액암 등을 선정하였고, 이에 실험적으로 접근 가능한 A549, Raw 264.7, C6-glioma, Jurkat, HL-60 세포 등을 선정하여 권백의 항암효과를 알아보았다. 권백물추출물을 A549, Raw 264.7, C6-glioma, Jurkat, HL-60 세포주에 농도 의존적으로 0, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한 후, MTT assay에 의한 세포생존율을 관찰하였다. A549, Raw 264.7, C6-glioma 세포주에서는 24시간과 48시간 후의 세포생존율의 변화는 관찰되지 않았으나 (Fig. 1-A, Fig. 2-A, Fig. 3-A), 혈액암 세포주인 Jurkat과 HL-60 세포에서는 권백물추출물 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의한 세포생존율의 감소가 관찰되었다(Fig. 4-A, Fig. 5-A). 이러한 결과는 권백물추출물이 A549, Raw 264.7, C6-glioma에서는 세포 독성이 미치지 않는 반면에 혈액암 세포주인 Jurkat과 HL-60 세포에서는 특이적으로 세포의 생존에 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다. 이러한 세포의 죽음이 물리적인 세포괴사에 의한 것인지 생리적인 세포사멸에 의한 현상인지를 확인할 필요성이 제기되어 세포사멸의 형태학적인 특징과 생화학적인 특징을 조사하였다. 세포사멸(apoptosis)의 형태적 변화는 세포막 돌출, 세포골격이 위축(cytoskeleton clooapse), 핵에서의 염색질 농축(chromatin condensation)과 핵 분절(DNA fragmentation) 등의 변화가 동반된다¹⁰⁾. 핵 분절 현상은 endonuclease가 활성화되어 세포내 DNA가 180~200개 염기쌍 이하의 oligonucleosome길이의 DNA fragment로 절단되는 현상을 말하며, 전기영동 관찰에서 DNA fragment에 의하여 관찰되는 DNA laddering은 세포사에 있어서 apoptosis의 생화학적 지표로 이용된다²⁴⁻²⁵⁾. Hoechst stain은 핵의 외형적 상태를 형광현미경하에서 관찰하는 방법으로 apoptosis의 특징적 소견인 chromatin condensation과 DNA fragmentation을 관찰할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 apoptosis의 특징적 소견을 관찰하기 위하여 Hoechst stain과 전기영동법을 이용하였다. 권백물추출물 0, 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 각각의 세포주에 48시간 배양한 후 Hoechst stain을 통하여 세포핵을 관찰한 결과, A549, Raw 264.7, C6-glioma 세포에는 염색질 농축과 핵 분절 현상 등의 변화가 관찰되지 않았으나(Fig. 1-B, Fig. 2-B, Fig. 3-B), Jurkat 세포에서는 권백물추출물 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리에서부터 세포막 외부 용기의 돌출현상과 사멸소체를 배지 속에서 볼 수 있었으며 세포핵이 여러 개로 쪼개어진 분절 현상도 관찰할 수 있었고(Fig. 4-B), HL-60 세포에서도 권백물추출물 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서부터 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 농도 의존적으로 세포막 돌출과 사멸소체 및 핵 분절이 증가함을 관찰할 수 있었다(Fig. 5-B). 또한 권백물추출물 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 HL-60의 배양액에 처리하여 48 시간 배양 후에 전기 영동 분석결과, 48 시간에 DNA 분절 현상을 관찰 할 수 있었다(Fig. 6). 최근 연구에 의하

면 세포괴사를 유발시키는 신호전달기전에서 가장 중요한 기전 중 하나가 바로 caspase의 활성화이다²⁶⁻²⁷⁾. Caspase는 아미노산 배열의 상동성에 따라 추정된 진화계통수에 의하여 ICE(caspase-1), ICH(caspase-2), CPP32(caspase-3)를 중심으로 하는 세가지 형태로 나눌수 있으며, 그 중에서도 caspase-3(Yama, apopain)라는 효소는 32 kDa인 불활성화 상태로 존재하다가²⁹⁻³⁰⁾ TNF- α , TNFR-1, Fas-Fas ligand, growth factor deprivation, virus, DNA damagem, granzyme 등의 여러 가지 death signal로 인해 p17(17 kDa)와 p12(12 kDa)의 소단위로 쪼개져 활성을 갖게 된다³¹⁻³²⁾. caspase-3의 활성화 경로가 세포괴사에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다³³⁾. 본 연구에서는 caspase-3 protease의 효소활성을 조사하기 위하여 형광기질인 Ac-DEVD-amino-4-methylcoumarin (AMC)를 이용한 caspase-3 활성도를 측정 한 결과, 권백물추출물 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리하여 배양에서도 24 시간부터 증가하여 36 시간에는 5.5배, 9.9배의 증가율이 보였다(Fig. 7). 한의학에서 활혈화어의 효능이 있다고 알려진 권백의 항암작용을 연구한 이상의 실험결과, 권백물추출물은 A549, Raw 264.7, C6-glioma 세포주에 대한 세포독성작용이 관찰되지 않았으나, 혈액암 세포주인 Jurkat, HL-60 세포주에서 caspase 3-like cysteine protease의 활성도의 증가를 통하여 chromatin condensation과 DNA fragmentation 등의 소견을 나타내는 세포괴사작용을 유도하고 있으며 더 자세한 메커니즘에 관한 실험연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업 (HMP-99-O-01-0003)에 의해 수행되었기에 감사드립니다.

참고문헌

1. 대한병리학회 : 병리학. 서울. 高文社. pp.201-222, 231-258. 1997.
2. 송계용외 : 핵심병리학 서울 고려의학 pp.147-189. 1998.
3. 서울대학교 의과대학편 : 종양학. 서울. 서울대학교출판부. pp.137-148, 1993-205. 1998.
4. 문구 외 : 암동서의결합치료1. 원광대학교출판국. pp.253-303, 383-460. 1999.
5. 東西醫學融合研九會編 : 臨床東西醫學. 서울. 영림사. pp. 538-546. 1997.
6. 이병구. 팔진탕합화적환과 Adriamycin의 병용처리시 나타나는 synergistic 항종양효과에 관한 연구. 원광대학교 대학원 박사학위논문, 1999.
7. 이영진. 만성골수성백혈병 K562 세포에서 Hydroxyurea에 의한 아포토시스연구. 전북대학교 대학원 박사학위논문, 2000
8. 전성호, 성노현. 면역계의 아픏토시스. 유전, 2:129-146, 1998
9. Ruddon, R. W. Chemical carcinogenesis. In principles of drug action (3rd), Churchill Livingstone, p735 1990.

10. Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., Currie, A. R. Cell death: the significance of cell death. *Int. Rev. Cytol.* 68, 251-306, 1980.
11. Wyllie, A. H. Apoptosis *Br. J. Cancer* 67:205-208, 1993.
12. Hideji Itokawa : Anthraquinones-naphtho-hydroquinones and naphthohydroquinone- dimers from *Ribia corbifolia* and their cytotoxic activity, *Chem. Pharm. Bull.* 41(10), 1869-1872, 1993
13. 辛民教, 臨床本草學. 永林出版社. 서울. pp 448-449. 1988.
14. Ito, N., Shimura, K. Studies on antitumor activity of traditional chinese medicines. *jpn J. cancer chemother.* 12, 2149 1985.
15. 神農本草經輯注. 馬繼興. 人民衛生出版社. pp 88-89. 1995.
16. 名醫別錄(輯校本). 梁·陶弘景. 人民衛生出版社. pp34-35. 1986.
17. 臨上本草學. 辛民教. 永林出版社. 서울. pp 448-449. 1988.
18. In-Seon Lee, Akiyoshi Nishikawa, Fumio Furukawa, Ken-inchiro Kasahara, Soo-Un Kim. Effects of *Selaginella tamariscina* on in vitro tumor cell growth p53 expression, G1 arrest and in vivo gastric cell proliferation. *Cancer Letters* 144, 93-99. 1999.
19. Kuo YC, Sun CM, Tsai WJ, Ou JC, Chen WP, Lin CY. Chinese herbs as modulators of human mesangial cell proliferation: preliminary studies. *J Lab Clin Med* 132(1) : 76-85, 1988.
20. Miao N, Tao H, Tong C, Xuan H, Zhamg G. The *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring complex in the treatment of experimental diabetes and its effect on blood rheology. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 21(8):493-5, 512, 1996.
21. Okigawa M, et al. *Phytochemistry*, 10(12):3286, 1971.
22. Shin D I, et al. *Saengyak Hakhoechi*, 22(4):207-10(CA, 117:66577j), 1991.
23. Arthur H R. Symposium on Phytochem. p.236, 1964.
24. Nagata, S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res.* 256(1), 12-18, 2000.
25. Buja, L. M., Eigenbrodt, M. L., eigenbrodt, E. H. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med.* 117(12), 1208-1214, 1993.
26. Cohen, G. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326:1-16, 1997.
27. Barinaga M. Death by Dozens of cuts. *Science* 280:32-34, 1998.
28. Thornberry N. caspases; Key mediators of apoptosis. *Chem & Biol.* 5(5):97-103, 1997.
29. Friedlander R., Brown R. and Galiardini V., Wang J., Yuan J. Inhibition of ICE slows ALS in mice. *Nature* 388:31, 1997.
30. Salvatore, M., Hensens, O., Zink, D., Liesch, J., Jurgens, T., Borris, R., Raghoobar, S., Mccauley, E., Kong, L., Gartner, S., Koch, S., Pelaez, F., Diez, M., Cascales, C., Martin, I., Polishookv, J., Balick, M., Beck, H., King, S., Hsu, A. and Lingham, R.: L-741, 494, a fungal metabolite that is an inhibitor of interleukin-1 β converting enzyme. *J. Nat. Prod.*, 57(6):755-760, 1994.
31. Klaus, S. O., Davide, F. Apoptosis signal by death receptors. *Eur. J. Biochem.* 254, 439-459, 1998.
32. Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. DEF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during Apoptosis. *Cell*, 89, 175-184, 1997.
33. Tewari, M., Quan, K. O., Desonyers, S., Zeng, Beider, D. R., Poirier, G. G., Salvesen, g. S. and Dixit, V. M. Yama, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate Poly(ADP-Ribose) polymerase. *Cell* 81(2): 801-809, 1995.
34. F.D. Denizot, L. Rita : Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J. Immunol. Methods* 22 271-277. 1986.
35. Miller, S.A., Dykes, D.D. and Polesky, H.F.: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids Res.* 16, 1215. 1988.
36. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration : Occupational exposure to bloodborne pathogens, final rule. *Federal Register* 56, 64175. 1991.
37. Beutler, E., Gelbart, T. and Kuhl, W.: Interference of heparin with the polymerase chain reaction. *BioTechniques* 9, 166. 1990.
38. Muzio, M. et al.: FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85:817-827. 1996.
39. Srinivasula, S.M. et al.: Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*> 93:14486-14491. 1996.
40. Zhou, Q. et al.: Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases, *J. Biol. Chem* 272 : 7797-7800. 1997.