

반지련의 Methyl chloride 분획이 U937 단핵 세포 암주의 세포고사에 미치는 영향

차윤이 · 이은옥 · 이주령 · 강인철 · 박영두¹ · 안규석² · 김성훈*

경희대학교 동서의학대학원, 1: 경희대학교 생명공학연구원, 2: 경희대학교 한의과대학

Apoptotic effect of MC fraction of *Scutellaria barbata* in human leukemic U937 cells

Eun Ok Lee, Yun Yi Cha, Ju Ryoung Lee, In Cheol Kang¹, Young Doo Park¹, Kyoo Seok Ahn², Sung Hoon Kim*

Department of Oncology, Graduate School of East-West Medical Science,

1: School of Biotechnology & Plant Metabolism Research Center, 2: Oriental Medical College, Kyunghee University

Scutellaria barbata has been used as a traditional Chinese Herb for treating liver, lung and rectal tumors. In the present study, cytotoxic effect of *Scutellaria barbata* MC fraction was investigated and it was found to inhibit proliferation of human leukemic U937 cells with an IC50 of approximately 10 µg/ml in a dose-dependent manner. We also demonstrated that *Scutellaria barbata* MC fraction caused apoptosis in U937 cells. In the flow cytometric assay, the MC fraction-treated U937 cells showed an increase in hypo-diploid Sub G1 DNA contents. DNA fragmentation was observed by TUNEL assay. An increase of Bax:Bcl-2 ratio, activation of caspase-9, caspase-3, and cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) were demonstrated by western blot analysis. Taken together, these results exerted that the MC fraction suppressed human leukemic U937 cell proliferation by inducing apoptosis via the mitochondrial pathway.

Key words : MC fraction, *Scutellaria barbata*, apoptosis, U937

서 론

반지련(半枝蓮)은 꿀풀과에 소속되는 다년생의 초본이며 학명은 *Scutellaria barbata*이다. 중국 감소성, 광서, 광둥, 사천, 화북, 강서, 복건, 귀주, 운남성 등에 분포하며 대만에서도 자생한다. 반지련은 강소식약지(江蘇植藥志)에 들어 있으며 통경초(通經草), 자연초(紫蓮草), 병두초(井頭草), 아췌초(牙刷草), 수한신(水韓信), 반향화(半向花), 재생초(再生草), 협엽향천잔(狹葉向天薑), 사방마란(四方馬蘭) 등의 여러 이름이 통용되고 있다. 약의 성질은 신(辛), 고(苦), 한(寒)하고, 청열해독(淸熱解毒), 활혈(活血), 구어혈(驅瘀血), 화어이뇨(化瘀利尿), 소종해독(消腫解毒), 항암(抗癌), 해열(解熱), 진통(鎮痛), 지혈(止血), 해독(解毒)작용을 한다. 반지련은 전초에 alkaloid, steroid, flavonoid, phenols 등을 함유하고 있고 뿌리에는 woogonin, 7-D-methyl woogonin 및

기타의 flavonoid가 들어 있다^{1,2}. 중국에서 반지련은 전통적으로 간, 폐, 직장암의 치료에 사용되었다. 최근 연구에서 반지련은 항돌연변이, 항암, 항박테리아 효과를 나타내는 것으로 보고되었다³⁻⁵. 모든 다세포 생물은 일정 시간이 지나면 세포 고사(apoptosis)로 죽는 능력을 가지고 있다. 그러나 종양 세포는 세포 고사에 저항성을 가지고 있다. 세포 고사가 일어나는 경로에는 두 가지가 알려져 있다⁶. 하나는 대다수의 항암제에 의해 활성화되는 미토콘드리아를 통한 세포 고사이다. 이 경로에는 미토콘드리아 내에 있는 Bcl-2 family의 균형의 변화⁷와 그에 따른 cytochrome c의 미토콘드리아로부터의 방출, caspase 9의 활성화가 포함된다. 또 다른 경로는 원형질막에 있는 death receptor와 death ligand의 결합으로 인한 caspase 8의 활성화이다. caspase 9과 caspase 8은 공통적으로 caspase 3, 6, 7 등을 활성화시켜서 세포 고사를 일으킨다. 이번 연구에서는 반지련으로부터 얻은 분획이 U937에 미치는 독성의 영향과 세포 고사를 일으키는 과정을 밝히고자 한다.

* 교신저자 : 김성훈, 경기도 용인시 기흥읍 서천리 1, 경희대학교 동서의학대학원
· E-mail : sungkim7@khu.ac.kr · Tel : 031-201-2179
· 접수 : 2003/02/13 · 수정 : 2003/03/30 · 채택 : 2003/05/20

재료 및 방법

1. 약제

대효 제약으로부터 반지련 전초 (全草) 1kg을 구입하여 실험에 사용하였다.

2. 유기 용매를 이용한 약제의 추출

건조된 반지련 전초 1 kg을 메탄올 (Methyl alcohol) 1 L에 일정 시간 담근 후 여과하는 과정을 3번 반복하였다. 약제를 추출한 용매는 evaporator를 이용하여 말려서 가루 (122 g)를 얻어내었다. 메탄올 추출물 115 g을 800 ml의 hexan (Hexane)과 800 ml의 물로 녹인 후 층을 분리하여 hexan 층을 따로 걸어서 말렸다. 여기에 hexan을 또다시 800 ml 부어서 분리하는 과정을 두 번 더 반복하였다. 나머지 물 층에 메틸 클로라이드 (Methyl chloride, MC) 800 ml을 넣어서 다시 메틸 클로라이드 층을 분리하는 것을 3번 반복하였다. hexan, MC층과 마찬가지로 에틸 아세테이트 (Ethyl acetate, EA), 부탄올 (Buthanol) 층도 얻었고 마지막 물 층도 모아서 가루로 만들었다. 이와 같이 6가지 종류의 용매로 추출한 반지련 분획 들은 세포 독성 실험에 사용되었다.

3. TLC (Thin layer chromatography) 패턴 분석

반지련 분획들을 메탄올에 녹여서 10 mg/ml로 만든 후 silica gel로 코팅된 60 F254 판 (Merck, Germany)에 찍어서 클로로포름 (Chloroform)과 메탄올을 8대 1 볼륨으로 섞은 용매 상에서 전개하였다. 전개 된 판은 말린 후 10% 황산에 묻혀 열을 가하여 발색시켰다.

4. 세포 압주 및 배양

실험에 사용된 세포 압주는 America Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA)으로부터 얻은 U937 단핵암세포주이다. U937은 10%의 fetal bovine serum (FBS)를 함유한 RPMI 1640 배지로 5% CO₂, 37°C의 조건에서 키우고 2일이나 3일마다 배지를 갈아주었다.

5. 세포 독성 측정

세포 독성은 XTT (2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) (Sigma, Canada)를 이용하여 측정하였다. 반지련 분획을 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 40 mg/ml의 농도로 만들었다. 각각의 약제를 RPMI 1640 배지로 10, 20, 40, 80, 160 µg/ml의 농도로 희석하여 50 µl씩을 96 well plate에 넣었다. 여기에 U937을 RPMI 1640으로 4×10⁵/ml로 만들어서 well 당 50 µl씩 (2×10⁴/well) 넣어 최종 약제 처리 농도를 5, 10, 20, 40, 80 µg/ml로 만들었다. 37°C에서 24 시간 동안 배양시킨 후 1 mg/ml의 XTT와 1.53 mg/ml의 phenazine methasulphate (PMS)를 100:1 비율로 섞어서 well당 50 µl씩 넣어주고 37°C에서 90분 가량 배양하였다. 흡광도는 ELISA reader로 450 nm의 파장에서 측정하였다.

6. 약제 처리

반지련 MC층 분획을 DMSO로 40 mg/ml의 농도로 만든 후 4°C에 보관하여 실험에 사용하였다. 약제를 RPMI 1640 배지로 6 well plate에서 희석하여 10, 20, 30 µg/ml의 농도로 2 ml씩 만들었다. 그 후 2×10⁶의 U937을 포함한 PPMI 1640을 well당 2 ml씩 넣어 최종 농도를 5, 10, 15 µg/ml로 만들었다. 이것을 5% CO₂, 37°C 조건에서 24시간 동안 배양한 후 실험하였다.

7. TUNEL assay

Fluorometric TUNEL system kit (Promega, USA)를 사용하여 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) assay를 수행하였다. 간단히 말하면, 약제 처리 후에 세포를 원심분리로 수거하고 PBS로 씻은 후 PBS 10 µl로 다시 현탁하였다. 대조군 세포는 PBS 30 µl를 넣어서 현탁하고 10 µl의 현탁액을 poly-L-lysine으로 코팅한 microscope slide에 도포하였다. 세포가 마른 후 그 위에 4% methanol-free formaldehyde 용액으로 덮어주어 얼음에서 25분간 세포를 고정시켰다. 그 후 PBS로 2번 씻어주고 PBS로 만든 0.2% Triton X-100 용액으로 5분간 세포막에 구멍을 내었다. 세포를 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) incubation buffer와 37°C에서 1시간 동안 어둡고 습기가 있는 조건에서 반응시킨 후 2X SSC로 실온에서 15분 동안 반응시켜 tailing reaction을 멈추게 하였다. 세포를 3번 PBS로 씻어주고 1 µg/ml의 propidium iodide 용액으로 어두운 곳에서 15분간 반응시켜서 세포를 염색하였다. PBS로 씻어준 후 30% glycerol 한 방울을 떨어뜨려 주고 cover slip으로 덮어 준 후 형광현미경으로 관찰하고 사진을 찍었다.

8. Western blot analysis

대조군과 약제 처리한 U937을 모아서 lysis buffer (50 mM Tris-HCl (PH7.4), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, and 1mM EDTA)로 분해하였다. 이것을 원심분리하고 상층액을 모은 후 Dc protein assay를 이용하여 단백질을 정량하였다. 20 µg의 단백질을 NuPAGE™ 4~12% Bis-Tris gel (Invitrogen,)로 분리하고 gel을 transfer buffer (25 mM Tris-HCl, 250 mM Glycine, and 20% MeOH)에 적신 후 단백질을 nitrocellulose membrane에 이동시켰다. membrane을 5% non-fat dried milk를 포함한 PBS에 담가서 반응시켜 비 특이적인 결합을 억제시켰다. 3% non-fat dried milk를 포함한 TBS-T에서 각각의 primary antibody (Bcl-2 (6C8) (Pharmigen,) 1:2000, Bax (B-9) (SantaCruz, CA) 1:1500, cleaved caspase-9 (Asp 315) (Cell signaling,) 1:1000, pro caspase-3 (E-8) (SantaCruz,) 1:2000, cleaved caspase-3 (Asp 175) (Cell signaling,) 1:1000, PARP (4C10-5) (Pharmigen,) 1:1000, β-actin (AC-15) (Sigma, USA) 1:5000)와 반응시키고 TBS-T로 씻어준 후 각각에 대한 secondary antibody와 반응시켜 주었다. 각각의 단백질은 enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit (Amersham Biosciences, UK)를 사용하여 확인하였다.

9. Cell cycle analysis

대조군과 약재처리한 U937을 원심 분리하여 모은 후 2 ml의 차가운 PBS로 씻어 주었다. 상층액을 버리고 침전물에 70%의 차가운 에탄올을 넣어 준 후 -20°C 에서 밤새 고정시켰다. 고정된 U937을 원심분리하고 PBS로 씻어 준 후 100 μl 의 2 mg/ml RNase A를 넣어주고 37°C 에서 90 분간 배양하였다. PBS로 만든 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PI를 500 μl 씩 넣어준 후 DNA의 양을 flow cytometry로 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 반지련 분획의 TLC 패턴 및 U937에 대한 세포독성

TLC 패턴에서 관찰할 수 있는 바와 같이 각각의 반지련 분획은 여러 개의 물질을 함유하고 있다 (Fig 1). 반지련 분획을 농도별로 U937에 24 시간 동안 처리한 결과 물 층을 제외한 나머지 분획들이 농도에 의존적으로 독성을 나타내었다. IC50 값을 비교한 결과 핵산, MC, EA 분획이 비슷한 독성을 나타내었고, 그 중에 MC 층이 IC50 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 정도로 가장 높은 독성을 나타내었다 (Fig 2).



Fig. 1. TLC analysis of scutellaria barbata solvent extracts. A, methyl alcohol extract; B, hexane extract; C, methyl chloride extract; D, ethyl acetate extract; E, buthanol extract; F, water extract.

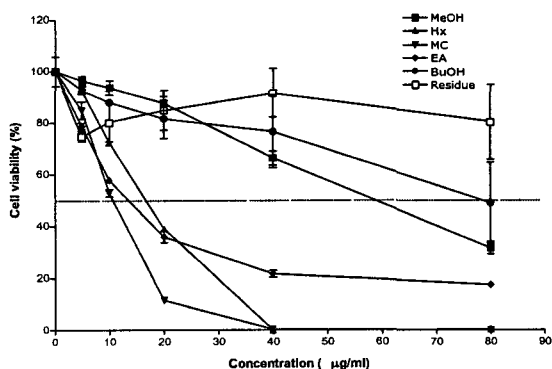


Fig. 2 Cytotoxic effects of scutellaria barbata fractions on human leukemic U937 cells measured by XTT assay.

2. 반지련 MC 분획은 U937의 세포고사를 유도한다.

반지련 MC 층이 U937의 세포 고사에 미치는 영향을 살펴보기 위해 우선 반지련 MC 층을 농도별로 U937에 24시간 동안 처리한 후 DNA의 함유량을 flow cytometry로 측정하였다 (Fig 3). 약재 처리 결과 U937의 DNA 함유량은 농도에 의존하여 S phase의 양이 감소하였고, G0-G1 phase의 양은 증가하였다. 세포 고사가 일어났다는 표시인 sub G1 phase의 양은 점차로 증가하여 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리했을 때 16.11%까지 증가했다. 또한 TUNEL assay를 수행함으로써 이 약재가 U937에 세포 고사를 일으킨다는 사실을 증명하였다 (Fig 4). 반지련 MC층을 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 24 시간 처리했을 때 DNA fragmentation이 일어났다는 사실을 관찰할 수 있었다. 세포 고사가 일어났다는 사실은 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리했을 때 PARP가 절단된 사실로도 확인할 수 있었다 (Fig 5).

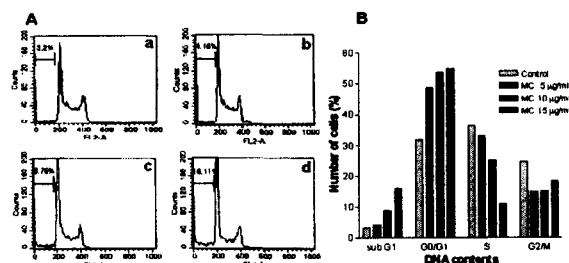


Fig. 3. Cell cycle analysis of U937 cells treated with graded concentrations of scutellaria barbata MC fraction for 24 h. The percentages of cells in the different phases of the cell cycle were measured by flow cytometry. A, U937 cells were a, non-treated; or treated with b, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; c, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; d, 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

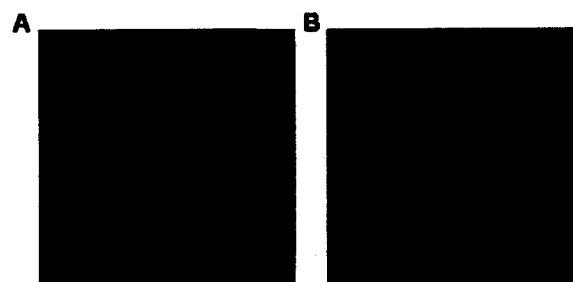


Fig. 4. DNA fragmentation was detected by TUNEL assay. A, non-treated cells; B, U937 cells treated with scutellaria barbata MC fraction at 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 24 h.

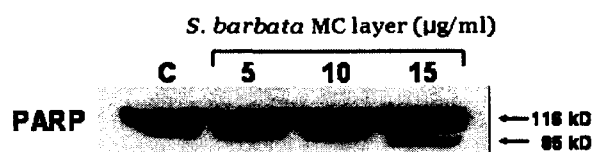


Fig. 5. Western blot analysis of the effect of scutellaria barbata MC fraction on the cleavage of PARP. Lane 1, non-treated; lane 2, treated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; lane 3, treated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; lane 4, treated with 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

3. 반지련 MC 분획은 미토콘드리아의 경로를 통해서 U937에 세포 고사를 일으킨다.

항 세포 고사 단백질인 Bcl-2의 양은 반지련 MC 분획을 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 U937에 24 시간 처리했을 때부터 급격히 감소하였다. 반면 세포 고사 단백질인 Bax의 양은 약재의 농도에 따라 서서히 감소하였다 (Fig 6A). 그러나 Bax가 Bcl-2에 비해 서서히 감소하였으므로 Bax:Bcl-2의 비율은 결과적으로 증가하였다. 미토콘드리아 경로에 포함되는 caspase 9이 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에 서부터 활성화된 것을 관찰하였고 caspase 3가 활성화 된 것도 관찰할 수 있었다 (Fig 6B).

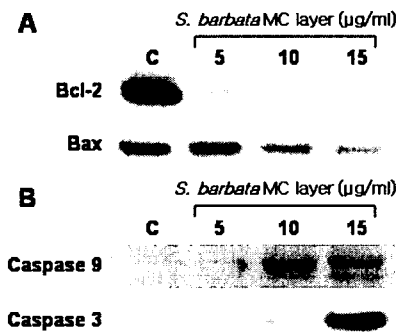


Fig. 6. Western blot analysis for the level of Bcl-2 family and activation of caspases. A. The level of Bcl-2 family, Bcl-2 and Bax. B. The activation of caspase 9 and caspase 3. Lane 1, non-treated; lane 2, treated with 5 $\mu\text{g/ml}$; lane 3, treated with 10 $\mu\text{g/ml}$; lane 4, treated with 15 $\mu\text{g/ml}$.

결 론

이 연구에서는 반지련을 methyl chloride (MC)로 추출한 약재가 U937에 미치는 영향을 조사하였다. U937에 대한 세포 독성을 XTT assay 로 측정하고 결과 반지련 MC 층은 IC50=10 $\mu\text{g/ml}$ 정도의 비교적 높은 독성을 나타내었다. 반지련 MC 층을 농도별로 처리한 후 Cell cycle를 측정하였을 때 hypo-diploid sub-G1 peak가 증가하는 것과 DNA fragmentation의 관찰, PARP가 절단된 사실을 통해 반지련이 U937에 세포 고사를 일으킨다는 것을 알 수 있었다.

그리고 세포 고사의 좀 더 자세한 경로를 밝히기 위해 약재를 처리한 후 미토콘드리아에 존재하는 Bcl-2 family인 Bcl-2와 Bax의 양을 측정하고 결과 Bax:Bcl-2 비율이 증가하였고 caspase 9 과 caspase 3의 양이 증가하였다. 이 사실로 반지련이 U937에 미토콘드리아 경로를 통해 세포 고사를 일으킨다는 것을 알 수 있었다. 앞으로도 좀 더 자세한 작용 기전의 연구와 유효물질의 분리가 계속 되어져야 할 것이다.

감사의 글

본 과제는 한방치료기술 과제(01-PJ9-PG1-01CO05-0004)의 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. 구명, 서홍화; 항종류본초도보, 상무인서관, 30-32, 1990.
2. 계우빈 : 항암중약약리여응용, 흑룡강과기, 441-442, 1999
3. Wong BY, Lau BH, Yamasaki T, Teel RW : Modulation of cytochrome P-450IA1-mediated mutagenicity, DNA binding and metabolism of benzo[a]pyrene by Chinese medicinal herbs. Cancer Lett 68:75-82, 1993.
4. Wong BY, Lau BH, Jia TY, Wan CP : Oldenlandia diffusa and Scutellaria barbata augment macrophage oxidative burst and inhibit tumor growth. Cancer Biother Radiopharm 11:51-56, 1996.
5. Sato Y, Suzaki S, Nishikawa T, Kihara M, Shibata H, Higuti T : Phytochemical flavones isolated from Scutellaria barbata and antibacterial activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Ethnopharmacol 72:483-488, 2000.
6. Frederik H. Igney, Peter H. Krammer : DEATH AND ANTI-DEATH: TUMOUR RESISTANCE TO APOPTOSIS. Nature Reviews Cancer 2:277 - 288, 2002.
7. Suzanne Cory, Jerry M. Adams : The bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. Nature Reviews Cancer 2:647 - 656, 2002.