

과루인 Methylene Chloride층의 세포고사 유도 효과

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

경희대 동서의학대학원 중앙학 실험실, 1: 경희대학교 생명공학연구원, 2: 경희대학교 한의과대학

Apoptotic Effect of MC Fraction of *Trichosanthis Kirilowii Maxim* in Human Leukemic U937 Cells

Yun Yi Cha, Eun Ok Lee, Ju Ryoung Lee, In Cheol Kang, 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

The Methylene Chloride(MC) fraction of *Trichosanthis kirilowii Maxim* has been investigated anti-tumor activities in vitro. The MC fraction of *Trichosanthis kirilowii Maxim* significantly inhibited the proliferation of human leukemic U937 cell with an IC50 of approximately 10µg/ml in a dose-dependent manner. We found that the MC fraction upregulated of caspase9 and caspase-3 activity and cleaved PARP expression but it didn't affect bax and bcl-2, which were demonstrated by western blot analysis. Taken together, these results exerted that the MC fraction suppressed human leukemic U937 cell proliferation by inducing apoptosis, suggesting the MC fraction of *Trichosanthis kirilowii Maxim* is possible to show anti-cancer activity in vivo.

Key words : MC fraction, *Trichosanthis Kirilowii Maxim*, apoptosis, U937

서 론

과루인은 박과(Cucurbitaceae)식물 하늘타리의 건조근(乾燥根)으로 과루근, 팔루, 약과, 과루등, 천선, 하늘수박 이라 불리기도 하는 외과의 다년생초본이다. 생김새는 편평한 난형으로 넓은 난형이고 때로는 타원형을 이루고 대개는 좌우 비대칭을 이룬다. 길이는 9-18mm, 너비는 5-10mm이고 두께 약 3mm로 바깥면은 회갈색이나 어두운 적갈색 또는 옅은 갈색이다. 좁아진 한쪽 끝에는 제점과 발아구가 있고 이 부분은 약간 돌출 되고 둥글다. 또한 가장자리에 따라서 너비 1-3mm의 줄이 있는 것과 이것이 명확하지 않는 것이 있다. 종피를 벗기면 길이 회녹색으로 보이는 자엽이 있다. 냄새는 없고 맛은 쓰며 기름기가 있다. 주로 우리나라 남부지방·중부지방의 산야지 또는 낮은 지대 부락 근처의 구릉지나 숲 가장자리에 자생하며 중국의 하북, 하남, 산둥, 산서, 강소, 안휘, 절강, 섬서성 등지에 분포한다. 맛은 달고 조금 쓰며(甘微苦) 성은 凉하다. 한방에서는 열매, 씨, 뿌리를 타박상·

어혈등에 약재로 사용하며 당뇨병·해열·해수·이뇨·중풍·황달·피부병 등의 약재로도 사용되고 있고 생진지갈(生津止渴), 강화윤조(降火潤燥), 배농소종의 효능이 있고 열병구갈, 소갈, 폐열조해, 유옹, 창종 등의 치료에도 응용한다. 또한 천화분 담백(trichosantin)을 임신한 생쥐나 개에 투여시 태자(胎仔)를 죽이며 수침액은 토기에 주입하였을 때 혈당상승 작용을 보인다^{1,2)}. 이러한 작용외에도 과루인은 한의학적으로 유방암에 효과가 있다고 하나 그 기전이 명확하게 밝혀져 있지 않았고 세포독성이 있는 것으로 보아 세포고사에 영향이 있을 것으로 예상되었다. 이에 본 연구에서는 세포고사를 초점으로 하여 실험하였다. 세포는 세포고사와 세포괴사 두 가지 방법으로 죽는데 세포고사는 우리 몸의 프로그램에 의해 계획되어있는 죽음으로 작은 몸체가 생겨 세포 안의 리소자임이나 프로테아제가 밖으로 분출되지 않아 다른 세포에 영향을 주지 않으며 작게 조각난 세포들은 식세포의 식균작용에 의해 없어지는 죽음이다^{3,4)}. 세포괴사는 이와 달리 여러 가지 외인성에 의해 자연적이지 못한 죽음에 이르는 방법으로 세포가 부풀어 터지게 되어 세포 안의 여러 가지 물질이 주변 세포에 영향을 주게 된다^{3,4)}. 이러한 원리를 바탕으로 암세포의 세포고사를 유도하는 물질을 찾아낼 수 있다면 암치료에 효과적

* 교신저자 : 김성훈, 경기도 용인시 기흥읍 서천리 1, 경희대학교 동서의학대학원 · E-mail : sungkim7@khu.ac.kr · Tel : 031-201-2179 · 접수 : 2003/02/27 · 수정 : 2003/04/15 · 채택 : 2003/05/22

일 것이라 생각하였고 독성실험, Fluorescence associated cell sorter analysis, Western blotting 등의 방법으로 과루인이 세포 고사에 효과가 있는지를 실험하였다.

재료 및 방법

1. 약제

대효 제약에서 과루인 1kg을 구입하여 실험에 사용하였다.

2. 유기 용매를 이용한 약제의 추출

건조된 과루인 1 kg을 메탄올 (Methyl alcohol) 1 L에 일정 시간 담근 후 여과하는 과정을 3번 반복하였다. 약제를 추출한 용매는 evaporator를 이용하였고 이러한 과정을 통하여 얻어낸 가루를 800ml의 물에 녹였다. 물에 녹인 메탄올 추출물을 800 ml의 hexan (Hexane)과 섞은 후 층을 분리하여 hexan 층을 따로 걷어 내어 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. 에틸 아세테이트 (Ethyl acetate, EA), 부탄올 (Buthanol) 층도 hexan, MC층과 같은 방법으로 각각 3번씩 반복하여 분리해 내었다.

3. TLC (Thin layer chromatography) 패턴 분석

반지런 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 배지에서 5% CO₂, 37°C의 조건에서 배양하였다.

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. 과루인 분획을 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 60mg/ml의 농도로 만들었다. 각각의 약제를 RPMI 1640 배지로 10, 20, 40, 80, 120 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, 60 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 nm에서 측정하였다. control은 배지만을 사용하여 같은

시간 배양하였고 세포 생존 백분율은 control의 흡광도의 값으로 실험 흡광도 값을 나누어준 후 100을 곱하였다(%)^{5,7}.

6. 약제 처리

과루인 MC층 분획을 DMSO로 60 mg/ml의 농도로 만든 후 4°C에 보관하여 실험에 사용하였다. 약제를 RPMI 1640 배지로 6 well plate에서 희석하여 20, 40, 60 µg/ml의 농도로 2 ml씩 만들었다. 그 후 2×10⁶의 U937을 포함한 PPMI 1640을 well당 2 ml씩 넣어 최종 농도를 10, 20, 30 µg/ml로 만들었다. 이것을 5% CO₂, 37°C 조건에서 24시간 동안 배양한 후 실험하였다.

7. FACS analysis

Annexin V-FITC는 세포에 고사가 일어난 백분율을 측정하는데 사용하여 정량 측정하는데 사용되는데 이것은 고사가 일어나는 세포는 세포안쪽에 존재하던 phospholipid phosphatidylserine(PS)이 세포밖으로 나오게 되는 것을 이용한다. Annexin V는 이가의 칼슘이온에 의존적인 phospholipid-binding 단백질로 PS에 매우 친화적이다 이러한 성질을 이용하여 고사가 일어나 세포의 밖으로 돌출된 PS와 반응하게 하는 것이다. 방법은 Cell(2 × 10⁶)과 약제를 동시처리하여 배양한 후 cell을 수거하여 PBS로 세척하였다. 1X binding buffer 100 µl에 부유시킨 후 Annexin V-FITC 와 PI를 각각 5µl씩 넣고 실온 암실에서 15분간 염색한 후 1X binding buffer 400µl를 넣어준 후 FACS 분석하였다⁸.

8. TUNEL assay

Fluorometric TUNEL system kit (Promega, USA)를 사용하여 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) assay를 수행하였다. 약제 처리 후에 세포를 원심분리로 수거하고 PBS로 씻은 후 PBS 10µl로 다시 현탁하였다. 대조군 세포는 PBS 30µl를 넣어서 현탁하고 10µl의 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 실내 온도에서 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 덮어준 후 FITC filter 형광현미경으로 관찰하고 사진을 찍었다.

9. Western blot analysis

Caspase가 활성화되면 sequence specific proteolytic activity를 가지게 해서 세포의 DNA 복제 및 유전자 발현과 관련된 단백질 및 핵의 구조유지, 세포의 항상성유지 등과 관련된

단백질들을 파괴시키거나 관련된 단백질을 활성화시켜 세포고사를 유도하게 된다. 이렇게 caspase를 활성화시키는 신호는 크게 막단백질을 통한 신호, mitochondria를 통한 신호, endoplasmic reticulum을 통한 신호로 크게 세가지로 나누어 질 수 있으며, 면역세포의 granule속의 효소 및 단백질에 의한 caspase의 activation기작도 존재한다. caspase와 같은 단백질을 측정하는 방법으로 western blotting을 시행하였다. Cell(2 x 10⁶)과 약재를 동시처리하여 배양한 후 대조군과 약재 처리한 cell을 수거하여 PBS로 세척하였다. 100 µl lysis buffer(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10% Triton X-100, 0.1% SDS, 1mM EDTA, protease inhibitor cocktail)를 넣고 얼음상에서 30분간 방치한 후 12,000 rpm, 4℃에서 20분간 원심분리하였다. 상층액의 단백질을 Bio-Rad DC protein assay kit II를 이용하여 정량한 후 20 µg의 단백질을 4x SDS sample buffer와 혼합하여 5분간 끓였다. 얼음상에서 5분간 식힌 후 살짝 원침하여 4-12% SDS-polyacrylamide gels에서 전기영동하였다(gel running buffer : 25 mM Tris, 250 mM glycine, 0.1% SDS). 이후 300 mA 에서 2시간동안 nitrocellulose membrane (Amersham pharmacia biotech, UK)에 transfer하였다(transfer buffer : 25 mM Tris, 250 mM glycine, 20% MeOH). Transfer된 membranes을 0.1% Tween 20 와 5% skim milk가 포함된 TBS buffer로 실온에서 3시간 blocking시킨 후 mouse anti-human bcl-2(Santa Cruz, CA, USA, 1:2000 dilution), mouse anti-human bax(Santa Cruz, CA, USA, 1:2000 dilution), mouse anti-human caspase-3(Santa Cruz, CA, USA, 1 : 2000 dilution), rabbit anti-human cleaved caspase 3(Cell signaling, 1 : 1000 dilution), mouse anti-human PARP (Pharmingen, San Diego, CA, 1:1000 dilution), β-actin(A5316, Sigma chemical CO., USA, 1 : 10,000 dilution)primary antibodies를 0.1% Tween 20 와 3% skim milk가 포함된 TBS buffer에 희석하여 4℃에서 overnight으로 반응시켰다. 0.1% Tween 20이 포함된 TBS buffer로 10분간 4회 세척후 1 : 2000 희석한 goat anti-mouse IgG Hoseradish peroxidase (HRP) conjugated secondary antibody (Zymed) 또는 1 : 2500 희석한 anti-rabbit gG Hoseradish peroxidase (HRP) conjugated secondary antibody(Pierce)를 실온에서 2시간 반응시켰다. 0.1% Tween 20 이 포함된 TBS buffer로 10분간 4회 세척후 ECL western blotting detection kit (Amercham Pharmacia biotech, UK)로 발색시킨후 Agfa X ray films에 노출시켜 현상하였다.

결과 및 고찰

1. 분획

과루인을 Methanol에 담궈 추출한후 Hexane, Methylene Chlorie, Ehtylene Acetate, Buthanol로 추출하였다(fig. 1).

2. TLC pattern

각각의 층을 Chloroform:Methanol을 8:1로 전개하였을 때

다음과 같이 전개된다(fig. 2).

3. 세포독성

U937(단핵 세포 암주)을 대상으로 과루인의 각층으로 세포독성을 실험한 결과 Metylene chloride층에서 가장 낮은 농도 (IC50=8µg/ml)에서 독성을 보였다(fig. 3).

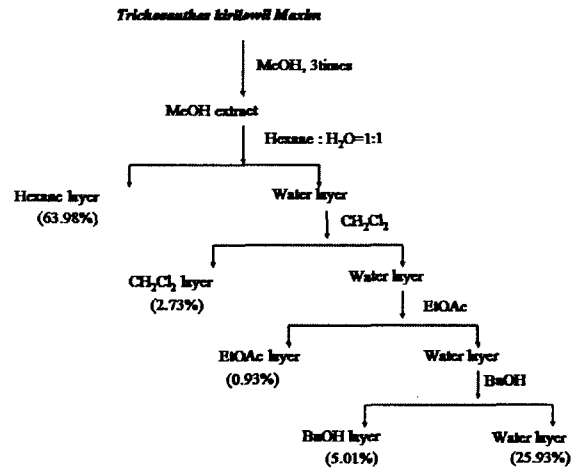


Fig. 1. Schematic diagram of Trichosanthes kirilowii Maxim fractions

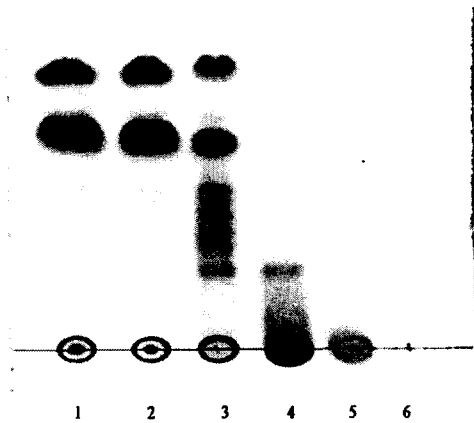


Fig. 2. TLC pattern of Trichosanthes kirilowii Maxim fraction on Chloroform : MeOH = 8:1. Lane 1, Methanol; Lane 2, Hexane; Lane 3, Methylene chloride; Lane 4, Ethyl acetate; Lane 5, Buthanol; Lane 6, Residual.

4. FACS annalysis

Fluorecytometry로 측정하였을 때 10µg/ml, 20µg/ml에서 세포고사의 경향을 나타내다가 30µg/ml에서는 세포괴사로 전환 되는 것이 관찰되었다(fig. 4).

5. Western blot annaysis

세포고사가 일어난 현상을 뒷받침하기 위해 여러 단백질의 발현량에 관하여 실험하였다. 일반적으로 apoptosis는 어떤 신호에 의해 최종적으로 caspase 3가 활성화되는데 caspase 3에 대한 집중적인 연구 결과 이 효소가 사멸 과정에서 DNA

repair 효소인 poly(ADP-ribose)polymerase (PARP), inhibitor of caspase activated deoxyribonuclease (ICAD), nuclear lamin B, gelsolin과 같은 기질을 분해한다고 알려졌다⁹⁾. 이러한 이론에 비추어 볼 때 과루인의 MeOH추출물에서는 caspase 3가 농도가 증가할수록 증가하는 현상을 볼 수 있었고 PARP도 농도가 10, 20, 30 ug/ml로 증가할수록 116 kD에서 85kD으로 쪼개지는 현상을 볼 수 있었다. 또한 과루인의 MC층에서도 caspase 3가 농도가 증가할수록 증가하는 현상을 볼 수 있었고 PARP도 농도가 10, 20, 30 ug/ml로 증가할수록 116 kD에서 85kD으로 쪼개지는 현상을 볼 수 있었으므로 과루인이 세포고사에 영향이 있는 것으로 보여진다. 하지만 bcl-2와 bax에는 영향이 없는 것으로 보여진다(fig. 5).

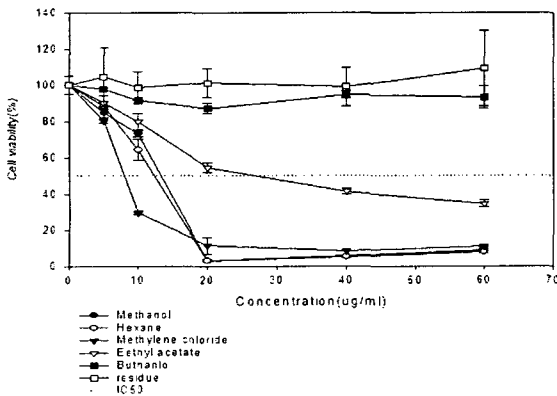


Fig. 3. Effects of the *Trichosantes kirilowii* Maxim fractions on cell viability in U937. Cells were treated with different concentrations of *Trichosantes kirilowii* Maxim fractions for 24h as determined by the XTT assay. All data was near \pm SD.

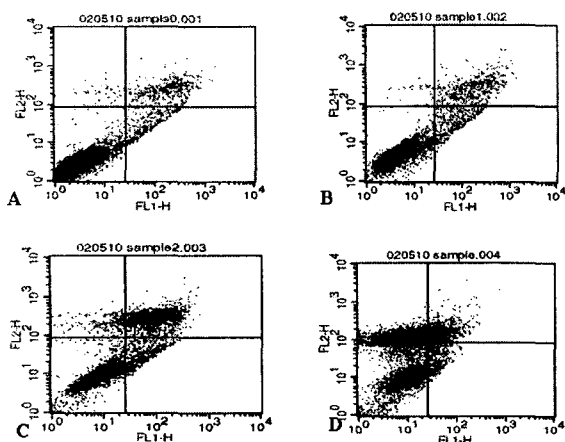


Fig. 4. FACS analysis of U937 cell after treated with Methylene chloride layer of *Trichosantes kirilowii* Maxim for 24h.

6. TUNNEL assay

세포고사를 관찰하기 위하여 TUNNEL assay를 수행하였다. 이러한 실험의 결과 FITC filter 현미경으로 관찰하였을 때 apoptotic body가 관찰되었다(fig. 6).

A는 control, B는 30 μ g/ml의 농도로 과루인 MC층을 처리하였을 때 초록색으로 apoptotic body가 관찰되었다. (C, D는 apoptotic body만을 확대하여 본 그림.)

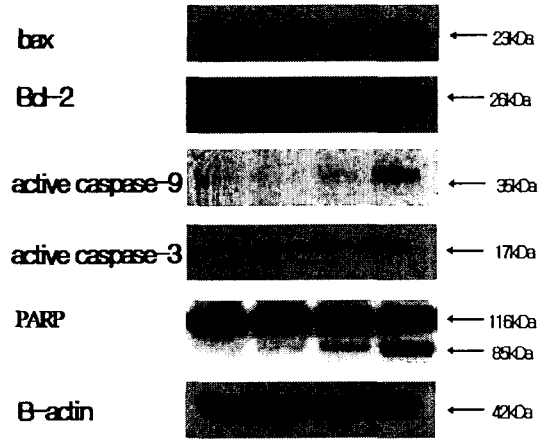


Fig. 5. Western blot analysis of bax, Bcl-2, PARP, pro-caspase 9 and 3 and β -actin in U937 cells after treated with methylene chloride layer of *Trichosantes kirilowii* Maxim for 24h.

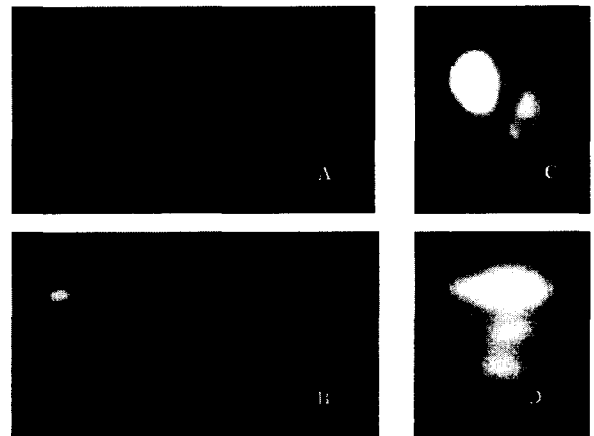


Fig. 6. TUNNEL assay of U937 cell after treated with Methylene chloride layer of *Trichosantes kirilowii* Maxim for 24h.

결론

과루인을 Methanol에 추출하여 실험한 결과 U937(단핵 세포 암주) Methylene chloride층에서 IC50값이 가장 낮게 나타났으며, FACS analysis를 수행한 결과 약한 세포고사의 경향을 보였다. 또한 Western blot analysis에서도 PARP가 쪼개지는 현상이 확연히 나타났고 caspase-9과 3가 늘어나는 것으로 보아 세포고사가 일어남을 확인할 수 있었으며 TUNNEL assay에서도 apoptotic body를 확실히 관찰 할 수 있었다. 이상의 결과로 보아 과루인의 Methylene chloride층에는 세포고사를 유도하는 유효물질이 존재할 것이라고 생각되며 앞으로 과루인에서 유효물질을 분리하여 작용기전에 관한 연구가 수반되어야 할 것이다.

감사의 글

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

참고문헌

1. Traditional Sin-Japanese Medicine with Color Picture Tsuneo Namba: HOIKUSHA. 217-219
2. Phamalogical Action and Application of Anticancer Traditional chinese Medicine 흑룡강 출판사
3. Lyonel G. Israels, Ester D. Israel. Apotosis. The Oncologist 4:332-339, 1999.
4. Richard A. Goldsby, Thomas J, Kindt, Barbara A. Osborne Immunology(fourth edition) pp.31-33
5. E. Wai-ching Chan et al. Triptolide induced cytotoxic effect on human promyelocytic leukemia, T cell lymphoma and human hepatocellular carcinoma cell lines. Toxicology Letters 22:81-87, 2001.
6. Yan Zhao, Jin Cao, Hong Ma, Jianwei Liu. Apoptosis induced by tea polyphenols in HL-60 cells. Canc Lett 121:163-167, 1997.
7. T Mosmann. Rapid colorimetric assat for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol/ Methods 65:55-57 1983.
8. Vermes I, C. Haanen, H. Steffens-Nakken and C. REutelinsperger. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J. Immunol. 184:39-51 1995.
9. Tewari et al., 1995.