

夏枯草 ethyl acetate분획의 U937세포에 대한 세포고사 유도효과

이은옥 · 김성훈*

경희대학교 동서의학대학원 종양학실험실

Effect of ethyl acetate layer of *Prunellae Spica* on the induction of apoptosis in U937 cells

Eun Ok Lee, Sung Hoon Kim*

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

Prunellae Spica is a flower petal of *Prunella vulgaris* var. *lilacina* used for treatment of lymphoma, breast cancer, hepatitis and pathological fluid related diseases in oriental medicine. We tried to evaluate the mechanism of *Prunellae Spica* in the treatment of cancer. The ethyl acetate layer of *Prunellae Spica* showed a good cytotoxicity on U937 cells with IC50 of 8 ug/ml. It induced apoptosis in U937 dose-dependently by cell cycle analysis following PI staining. We also confirmed it induced DNA fragmentation in U937 cells from the concentration of 10 ug/ml. From western blot assay we observed the ethyl acetate layer of *Prunellae Spica* downregulated procaspase-3 and cleaved PARP in a dose dependent manner, whereas it didn't affect bax and bcl-2. Taken together, these results indicate the ethyl acetate layer of *Prunellae Spica* can induce apoptosis in U937 cells suggesting it can be potently applied to cancer.

Key words : *Prunellae Spica*, U937 cells, DNA fragmentation, procaspase-3, PARP, cell cycle analysis, apoptosis

서 론

하고초는 꿀풀(*Prunella vulgaris* var. *lilacina*)에 속하는 여러 해살이풀로 꿀풀, 두메꿀풀, 흰꿀풀의 지상부이다¹⁾. 중국에서 한약으로 이용되고 있는 지식이 우리나라에 전해져서 우리나라에서는 한방과 민간에서 폐결핵, 황달, 고혈압, 자궁염 등에 약재로 많이 이용되고 있다²⁾. 김 등³⁾의 연구결과에 의하면 응성 자발성 고혈압을 유발시킨 백서에서 하고초 등을 가미한 처방에서 혈압을 유의적으로 감소시켰다고 보고하였다. 하고초 전초의 물추출물로부터 human immunodeficiency virus type-1 활성이 억제되었다는 보고도⁴⁾ 있었다. 또한 하고초의 이뇨작용, 수렴작용, 지혈작용들을 보고⁵⁾한 바 있으며 하고초 약침액이 효과적으로 cytochrome P4501A1 효소의 활성을 저해시키고, 발암물질과 DNA의 결합을 저해시킬 뿐만 아니라 free radical을 소거하고 polyamine의 대사를 저해함으로써 외부 물질 또는 대사물에 의해 일어날 수 있는 암 발생을 억제하였다고 보고하였다⁶⁾. 그러나

항암활성에 관련된 효과 연구가 적었고 한방에서는 자궁암, 난소종양, 유방암등의 처방에 사용되어지고 있는바 항암 활성중 암세포의 성장을 조절하고 암세포의 직접살상을 유도하는 apoptosis에 초점을 맞추어 실험하였다.

재료 및 방법

1. 재료추출

하고초는 대효제약에서 구입하여 사용하였다. 하고초를 분말화하여 methanol에 3회 담근 후 추출된 용액을 감압농축하여 동결건조 후 분말을 얻었다. Methanol분말을 물에 녹인 후 물과 1 : 1로 유기용매를 혼합하여 hexane, methylene chloride, ethyl acetate, buthanol순으로 분획하여 동결건조후 분말을 얻어 실험에 사용하였다.

2. Cell

Human leukemia U937 cells을 10% fetal bovine serum이 들어간 RPMI 1640 배지에서 배양하였으며 약제처리시에는 serum free배지를 사용하였다.

* 교신저자 : 김성훈, 경기도 용인시 기흥읍 서천리1, 경희대학교 동서의학대학원 · E-mail : sungkim7@khu.ac.kr Tel : 031-201-2179 · 접수 : 2003/01/06 · 수정 : 2003/02/05 · 채택 : 2003/03/20

3. Cytotoxicity⁷⁾

U937 세포주를 well당 2×10^4 으로 깔고 약재를 동시처리하였다. 24시간 배양후 PMS(sigma P-9625, 1.53 mg/ml) 10 ul와 XTT(sigma X-4251, 1 mg/ml) 1ml을 혼합하여 well당 50 ul를 첨가한 후 2시간 후에 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. Cell cycle analysis⁸⁾

Cell(2×10^6)과 약재를 동시처리하여 배양한 후 cell을 수거하여 PBS로 세척한 후 75% cold ethanol을 넣고 -20°C에서 1시간이상 방치하였다. 원심분리 한 후 상층액을 제거하고 PBS로 세척하였다. PBS 100 ul에 cell을 부유시킨 후 RNase A(20 mg/ml) 10 ul를 처리하고 37°C에서 30분간 방치하였다. PI (50 ug/ml) 400 ul를 첨가한 후 실온, 암실에서 30분간 방치후 FACS분석하였다.

5. DNA fragmentation⁹⁾

Cell(2×10^6)과 약재를 동시처리하여 배양한 후 cell을 수거하여 PBS로 세척하였다. Lysis buffer(10 mM Tris-Cl(pH7.4), 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100) 450 ul를 넣고 강하게 혼합한 후 30분동안 ice상에서 방치한 후 강하게 혼합하였다. 12,000 rpm, 20분간 원침후 상층액을 다른 튜브로 옮긴 후 proteinase K(20 mg/ml) 12.5 ul(final 0.5 mg/ml), SDS(10%) 50 ul(final 1%)를 넣고 50°C에서 2시간 또는 37°C에서 overnight하였다. 동량의 Phenol/Chloroform/isoamyl alcohol(v/v/v=25:24:1) 을 넣어준 후 15초간 vortex한 후 12,000 rpm 10-15분간 원침하고 상층액을 새로운 튜브에 넣고 한번 더 반복 추출하였다. 1/10vol. 3M sodium acetate(pH 5.2)를 넣어주고 2.5vol.의 cold EtOH 100%를 넣어 DNA를 침전 시킨 후 -70°C에서 30분 이상 방치 또는 -20°C에서 overnight한 후 12,000 rpm, 4°C, 10분간 원침 후 상층액 제거하고 70% EtOH로 washing후 남은 EtOH를 말린다. RNase A(final 4 mg/ml)를 처리한 후 37°C에서 1시간 방치후 1.8% agarose gel에서 전기영동하였고 EtBr로 염색하여 관찰하였다.

6. Western blotting

Cell(2×10^6)과 약재를 동시 처리하여 배양한 후 cell을 수거하여 PBS로 세척하였다. 100 ul 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°C에서 20분간 원심분리하였다. 상층액의 단백질을 Bio-Rad DC protein assay kit II를 이용하여 정량한 후 20 ug 의 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 mA에서 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 buffer 로 실온에서 90분간 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), 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°C에서 overnight으로 반응시켰다. 0.1% Tween 20이 포함된 TBS buffer로 10분간 3회 세척후 1 : 2000 희석한 goat anti-mouse IgG Hoseradish peroxidase (HRP) conjugated secondary antibody(Zymed)를 실온에서 90분간 반응시켰다. 0.1% Tween 20이 포함된 TBS buffer로 10분간 3회 세척후 ECL western blotting detection kit (Amersham Pharmacia biotech, UK)로 발색시킨후 Agfa X ray films에 노출시켜 현상하였다.

결과 및 고찰

1. 하고초 MeOH추출물 및 유기용매 분획의 수율

하고초 분말 100 g에서 MeOH추출물 2.2 g(수율은 2.2%)을 얻었다. MeOH추출물을 각각 유기용매로 분획한 결과 hexane, methylene chloride, ethyl acetate, butanol, residue층의 수율은 45.98, 13.76, 11.69, 8.74, 20.98%로 대부분 hexane에 녹는 물질들이었다(Fig 1.).

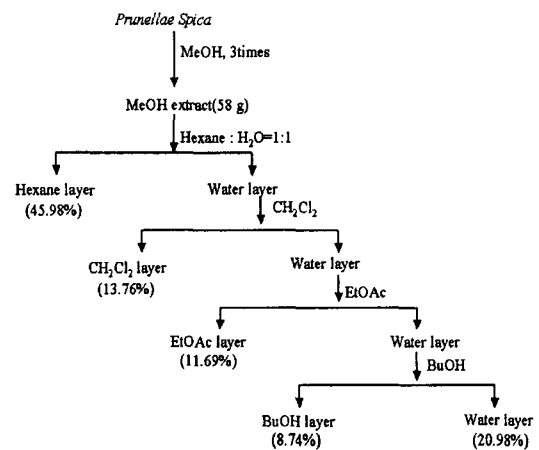


Fig. 1. Schematic diagram of Prunellae Spica fractions

2. 하고초 유기용매 분획의 세포독성

용매분획의 농도는 5, 10, 20, 40, 80 ug/ml로 처리하였으며 residue층에서는 독성을 나타내지 않았다. Butanol, hexane, methylene chloride층 순으로 독성을 나타냈으며 특히 ethyl acetate층은 IC50 8 ug/ml(Fig 2.)로 강한 독성을 나타내었으며 육안으로 apoptotic body를 확인 할 수 있어서 본 연구에서는 하고초 ethyl acetate층을 시료로 하여 U937 세포고사에 미치는 영향을 실험하였다.

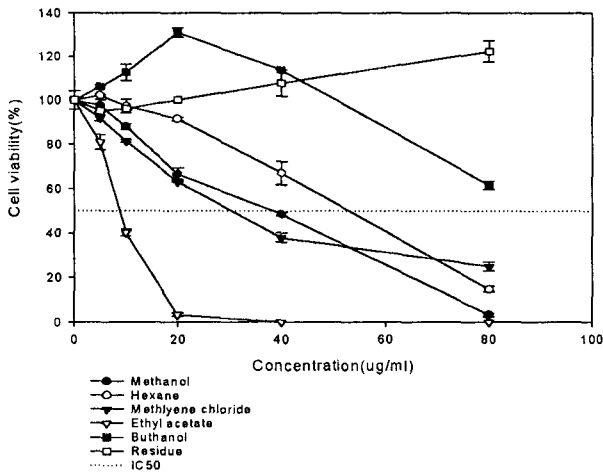


Fig. 2. Effects of the *Prunellae Spica* fraction on cell viability in U937. Cells were treated with different concentrations of fraction for 24 h as determined by the XTT assay. All data was mean \pm SD.

3. Cell cycle analysis

일반적인 cell cycle은 DNA의 함량에 따라 G1, S, G2, M phase로 나뉘어져있으나 apoptosis가 일어나면 sub-G1 peak가 나타나게 된다¹⁰⁾. 하고초 ethyl acetate층을 0, 5, 10, 15 ug/ml로 처리하여 PI로 staining한 후 FACS분석하여 DNA함량정도를 관찰하였다. 하고초 ethyl acetate층을 넣지 않은 세포에서의 sub-G1 peak가 2.37% 유도된 것에 반해 하고초 ethyl acetate층의 농도가 증가할수록 각각 2.74, 10.19, 17.85로 농도 의존적으로 sub-G1 peak가 증가하여 apoptosis가 유도되는 것을 관찰 할 수 있었다 (Fig 3.).

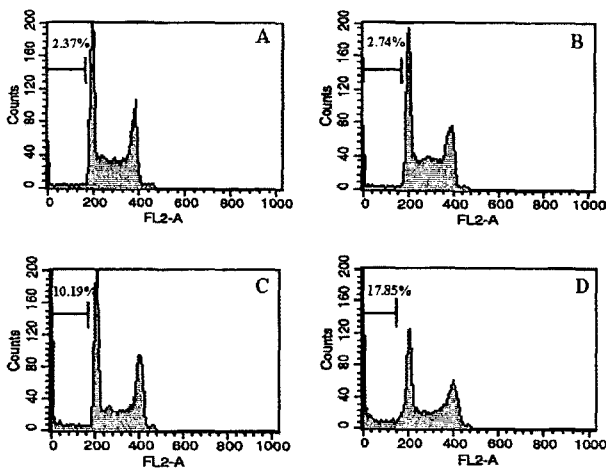


Fig. 3. Cell cycle analysis of U937 cells by flow cytometry. Cells were treated with 0(A), 5(B), 10(C), 15(D) ug/ml of *Prunellae Spica* ethyl acetate layer for 24 h and evaluated for DNA content after propidium iodide staining. *The position of the cells with sub-G1 DNA content is indicative of apoptosis.

4. DNA fragmentation

DNA fragmentation은 여러 가지 protease의 활성으로

DNA가 조각져서 나타나는 현상으로 apoptosis 진행과정의 중요한 특징⁹⁾으로 necrosis와 구별된다. 실험 결과 하고초의 ethyl acetate층에서 농도가 증가할수록 DNA의 fragmentation현상이 증가하는 것을 확인할 수 있었고 ethyl acetate층 10과 15 ug/ml 에서는 positive control로 사용된 camptothecin 1 μ M과 같은 정도의 fragmentation현상을 관찰할 수 있어 하고초의 ethyl acetate층이 U937 세포에 대해 apoptosis를 유도함을 확인하였다 (Fig 4.).

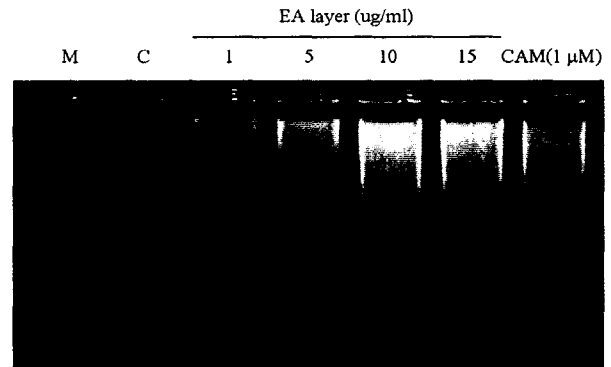


Fig. 4. DNA fragmentation assay of U937 cells after treated with ethyl acetate layer of *Prunellae Spica* for 24h. Fragmented DNA was analyzed on 1.8% agarose gel. M, Marker 100 bp; C, Control; CAM, 1 μ M

5. Western blotting

일반적으로 apoptosis는 어떤 신호에 의해 최종적으로 caspase 3가 활성화되어 DNA repair효소인 PARP를 조각하는 시작으로 나타나는데 caspase 3가 활성화 되기 위해서는 미토콘드리아에서 bcl-2 family들이 관여하는 것으로 알려져 있다¹¹⁾. 하고초 ethyl acetate층에서는 농도가 증가할수록 pro형태의 caspase 3가 약하게 감소하는 현상을 볼 수 있었고 PARP도 농도가 5, 10, 15 ug/ml로 증가할수록 116 kD에서 85kD으로 조각지는 현상을 볼 수 있었다. 반면에 bcl-2와 bax에는 아무런 영향이 없었다(Fig 5.).

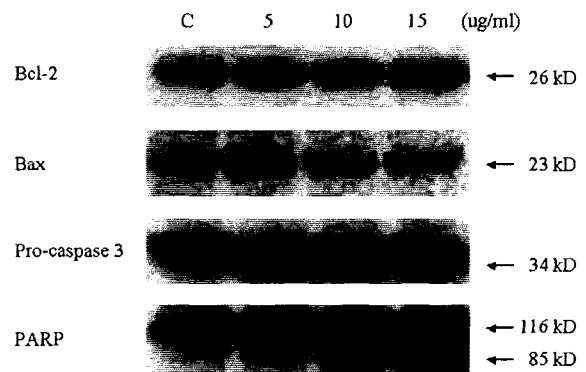


Fig. 5. Western blot analysis of apoptosis regulatory proteins expression in U937 cells. Cells were treated with 0, 5, 10, 15 ug/ml of *Prunellae Spica* ethyl acetate layer for 24 h. The 10 g of proteins were separated on 4-12% NuPAGE Bis-Tris gels, transferred to nitrocellulose and probed with specific antibodies. The proteins were detected by ECL.

결 론

하고초 분획으로 U937 세포에 대한 apoptosis 유도효과에 대해 실험하였다. 하고초 분획중 ethyl acetate층에서 가장 강한 독성을 나타내었고 cell cycle을 분석한 결과 apoptosis진행중에 나타나는 sub-G1 peak가 농도에 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 또한 apoptosis특징으로 나타나는 DNA fragmentation현상도 관찰할 수 있었다. Apoptosis유도 과정중 미토콘드리아와 관련된 단백질인 bax와 bcl-2는 아무런 영향이 없었으나 caspase 3가 활성화되어 pro-form의 caspase 3가 감소되었고 PARP가 쪼개지는 현상을 western blot으로 확인하였다. 이에 따라 하고초 ethyl acetate층은 U937세포에서 apoptosis를 유도함을 확인하였고 항암과 관련하여 약제로서 사용되어지리라 기대된다. 앞으로 apoptosis유도 과정의 기작을 밝힐 필요가 있고 ethyl acetate층에서의 유효한 물질을 분리하는 작업도 필요하리라고 본다.

감사의 글

이 논문은 보건복지부 2001년도 중점공동연구지원 연구개발사업(01-PJ9-PG1-01CO05-0004)의 지원에 의해 수행되었기에 감사 드립니다.

참고문헌

1. 한국 약학대학 협의회 약전분과회. 대한 약전 제 7개정 해설, 1104. 문성사, 서울, 1999.
2. Sun Ju Lee. Korean Folk Medicine, 121, publishing center of seoul national university, seoul. 1966.
3. 김의태, 최승훈, 안규석, 문준전. 용담사간탕 및 조구등, 하고초, 차전자 가미방이 고혈압에 미치는 영향. 동의병리학회지, 1990.
4. Lam TL., Lam ML., Au TK., Ip DT., Ng TB., Fong WP., Wan DC. A comparison of human immunodeficiency virus type-1 protease inhibition activities by the aqueous and methanol extracts of chinese medicinal herbs. Life Sci. 67(23) : 2889-96, 2000.
5. 김주선, 강삼식, 이정순, 장승엽, 원도희. 하고초로부터 Ursolic acid의 함량분석. 생약학회지 31(4) : 416-420, 2000.
6. 남경수, 박신화, 조경희, 임종국, 손윤희. 발암과정 생화학적 표식자를 이용한 하고초 약침액의 암예방 활성 촉진. 생약학회지. 32(2) : 163-167, 2001.
7. Jost, L. M., Kirkwood, J. M. and Whiteside, T. L. Improved short-and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells. J. Immunol. Methods 147 : 153-165, 1992.
8. Herrmann, M., Lorenz, H. M., Vollm R., Grünkem M., Woithm W. and Kaldenm J. R. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. Nucleic Acids Res. 22 : 5506-5507, 1994.
9. Haupt, Y., Rowan, S., Shaulian, E., Vousden, K. H. and Oren, M. Genes Dev. 9 : 2170-2183, 1995.
10. Kaufmann SH., Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. Trends Cell Biol. 11(12) : 526-534, 2001.
11. Reed JC. Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. Trends Mol Med. 7(7) : 314-9, 2001.