

계혈등 EtOAc subfraction-2가 종양전이 억제효과에 관한 연구

이현철 · 허정은 · 이종수² · 유시용¹ · 김성훈*

경희대학교 동서의학대학원 종양학실험실, 1: 한국화학연구소, 2: 대웅제약

Inhibitory effect of EtOAc Subfraction-2 of Spatholobus Suberectus Dunn. on tumor Metastasis

Hyun Chul Lee, Jeong Eun Huh, Jong Soo Lee¹, Shi Yong Ryu², Sung Hoon Kim*

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

1: Korea Research Institute of Chemical technology, 2: Jungang Research Institute, Daewoong Pharmaceutical Co.

Spatholobus Suberectus dunn. has been applied to blood stasis in oriental medicine. We selected one potent ethylacetate subfraction-2 from Spatholobus Suberectus Dunn.(SSD) from anti-metastasis screening. It exerted the cytotoxicity against HT1080 and B16BL6 with the IC50 of 60 ug/ml and also significantly inhibited tumor cell induced platelet aggregation (TCIPA). It effectively didn't inhibit cell adhesion of HT1080 to matrigel coated wells, while it inhibited the cell invasion of HT1080 at the doses of 10, 20, 40 µg/ml by Boyden chamber assay. It effectively suppressed lung metastasis by B16BL6 melanoma in C57BL6 mice. These results indicate that the EtOAc subfraction-2 of Spatholobus Suberectus Dunn. can be applied to cancer treatment with anti-metastatic activity.

Key words : Metastasis, Cytotoxicity, TCIPA, Invasion

서 론

오늘날 국민 건강을 저해하는 주요 질환이 과거와는 달리, 산업사회로의 전화에 따른 생활양식 및 환경의 변화로 인하여 각종 난치병이 주종을 이루고 있어¹⁾, 사회적으로 심각한 문제로 대두되고 있다. 특히 악성종양이라 일컫는 암은 발생 원인과 기전이 명백히 알려져 있지 않고, 생물학적 성상의 복잡성²⁾과 더불어 치료에 대응되는 화학약품의 독성작용으로 인한 과민반응과 부작용으로 인해 치료의 한계성을 나타내고 있다³⁾. 이러한 현실적인 한계성과 문제점으로 인하여 최근에는 암의 효과적인 치료법 개발을 위하여 신규물질 개발에 막대한 연구비가 투자되고 있으며, 한의학이 대체의학으로써 인식되어 이에 대한 많은 연구가 행해지고 있다. 계혈등은 예로 부로 빈혈을 치료와 혈전 용해에 관한 치료에 한약제로 쓰이고 있다. 암세포는 primary cancer로부터 혈관이나 림프선을 통하여 다른 장기로의 전이하는데 있어, 혈관을 통한 전이가 면역세포가 많이 존재하는 림프선보다 전이 성공에 더 안정적인 측면이 있다. 그렇기 때문에 혈관에서

암세포가 다른 혈관 내벽에 부착하고 혈류의 속도와 혈관 내 면역세포를 피하는 기작을 연구함에 있어 platelet aggregation은 암세포의 전이의 한 단계를 실험해 보는 좋은 도구가 된다. 특히 이 연구에서 실험한 혈소판 응집 억제제는 Tumor cell induced platelet aggregation(TCIPA)이기 때문에 보다 직접적으로 암세포가 혈관 내에서 일으키는 혈소판 응집에 대한 효과를 확인할 수 있었다. 계혈등 EtOAc층은 MMP-2(matrix metalloproteinase-2)와 TIMP(Tissue inhibitors of metalloproteinase)의 발현에는 영향을 미치지 못한 반면 uPA(urokinase-type plasminogen activator)를 억제함으로써 암세포의 침윤을 막은 결과보고된 바가 있다⁴⁾. 이러한 항전이 효과를 나타내는 계혈등 EtOAc층을 세부분획하여 분획간의 항전이에 대한 효과를 비교함은 세부분획 중 하나가 EtOAc층보다 더욱 좋은 항전이에 대한 효과를 나타낼 거라는 가정에서 실험하였다. 계혈등 EtOAc층의 subfraction-2가 TCIPA의 억제 효과, tumor Invasion 억제효과, 폐장전이 억제효과에 탁월한 효과가 유의성 있게 나타나 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 동물 및 약제

* 교신저자 : 김성훈, 경기도 용인시 기흥읍 서천리1, 경희대학교 동서의학대학원
· E-mail : sungkim7@khu.ac.kr Tel : 031-201-2179
· 접수 : 2003/02/13 · 수정 : 2003/03/09 · 채택 : 2003/04/10

동물은 4주령의 C57BL/6 수컷을 대한바이오링크사에서 공급받은 후 고형사료와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃를 계속 유지하면서 2 주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 본 실험에 사용한 약제는 건조된 계혈등을 분쇄하여 미세한 가루로 만들어 80% MeOH로 그 구성 성분을 3회 반복추출하여 감압 농축한 후 Ethyl Acetate층을 분획하여 감압농축 후 동결 건조하여 가루로 준비하였다. Ethyl Acetate에 대한 Fractionation에 사용된 방법은 Open Silica gel column chromatography와 Thin Layer Chromatography를 통해서이다. 분획에 따르는 용매는 CHCl₃ : MeOH : H₂O (9:3:1, 7:3:1, 6:4:1)의 비율 조절을 통해서 분획하였다.

2. 세포 및 배양^{5,6)}

사용된 암주는 B16BL6 와 HT1080이며, 배지는 56℃에서 불활성 시킨 10% FBS가 포함되고 1% 항생제(Penicillin-G 10만 units/ Streptomycin 100mg)와 Sodium bicarbonate가 들어간 RPMI1640 과 MEM 배지를 사용해서 5% CO₂, 37℃의 배양기에서 배양했다. 계대 배양시에는 Trypsin-EDTA를 이용해서 재현탁액을 만들었다. 혈관형성에 관한 실험은 HUVEC을 M199에 20% FBS 와 ECCG 3 µg/ml 와 5 unit/ml heparin이 첨가된 배지로 5% CO₂, 37℃의배양기에서 배양하여 3~7계대 후 사용했다.

3. HT1080, B16BL6 암주에 대한 세포독성 측정

Fosmann이 개발한 방법으로 MTT assay이로 세포 독성을 측정하였다. 5% CO₂, 37℃의배양기에서 10% FBS가 첨가된 RPMI1640과 MEM 배지를 사용하여 배양된 암주를 Trysin-EDTA를 이용하여 현탁액을 만들고 원심분리기를 이용하여 상층액 제거 후 10% FBS첨가된 RPMI1640 과 MEM 배지로 96 well plate에 1×10⁴ cells/well로 분주 후 24시간동안 5% CO₂, 37℃의 배양기에서 배양하였다. serum이 없는 배지를 이용하여 subfraction을 농도별로 각각의 well에 처리하고 24시간 배양 후 MTT assay를 하였다. 흡광도는 ELISA reader로 570 nm에서 측정하였다. IC50는 50%성장이 억제된 약제의 농도를 말한다.

4. B16BL6 세포를 이용한 Platelet aggregation assay^{7,8)}

혈소판 응집 억제능은 platelet aggregometer를 이용한 Born 등의 탁도(Optical density) 측정법으로 Chrono Log를 이용하였다. 실험 혈소판은 경기 적십자 혈액원에서 연구용 혈액 중 혈소판 농축액으로 그 수치를 자동 혈구계산기, Minos-ST (COBAS co. France)를 이용하여 공급받았으며 이를 2.5×10⁸ cells/ml 혈소판수를 맞추어 PRP(platelet rich plasma)로 사용하고, 이 PRP의 일부를 다시 1000g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 PPP(platelet poor plasma)로 사용한다. 혈소판 응집효과는 Whole Blood Lumi-Aggregometer (Chrono-Log Co. Ltd., U.S.A)를 사용하여 platelet aggregation을 측정하였다. 혈소판응집 유도 암주로는 B16BL6을 사용한다. 이로부터 Tumor Cell Induced platelet aggregation에 대한 Inhibition은 Chrono-Log program을 이용하여 start point, end point를 맞추어 자동 계산하였다.

5. Invasion assay^{9,10,11)}

Polycarbonate membrane(pore size : 8µm)을 matrigel(50µg)로 1시간 동안 충분히 코팅한 후 24시간 동안 공기중에 말린다. Boyden chamber의 lower compartment에는 0.1% BSA가 들어있는 conditioned media를 30µl씩 분주 하였다. Upper compartment에는 0.1% BSA가 들어 있는 HT1080 세포 현탁액(1×10⁶)을 FBS가 없는 RPMI1640 배지를 사용하여 세포와 약제를 섞어서 50µl씩 농도별로 분주 하였다. 37℃ 5% CO₂ 배양기에서 4시간 배양시킨 후 membrane을 꺼내어 metanol로 고정시킨 후 Diff Quic. 용액으로 염색한 후 광학현미경(×200)으로 invasion된 세포를 세었다.

6. B16BL6 암주를 이용한 폐장전이 억제실험¹²⁾

In vitro에서 배양한 B16BL6 폐암세포를 실험에 사용하였다. 이들 세포들을 실험에 사용하기 위하여 Trypsin-EDTA 용액으로 부착면으로부터 분리시켜 HBSS 용액으로 세포수가 2×10⁴ cells/ml이 되도록 세포현탁액을 만들었다. 18-20 g 인 C57BL/6에 1×10³cells/0.2ml을 꼬리 정맥주사하였다.

검액은 B16BL6 암세포를 이식한 날부터 200µg/mice 과 500µg/mice 두가지 농도 7개의 군으로 3일에 한번씩 21일간 총 7회로 구강 투여하였다. 암이식 21일 후에 cervical dislocation으로 치사시킨 다음 개복하여 폐에 전이된 암세포 colony를 계산하였다.

6. 통계처리

실험결과들은 mean±SD과 mean±SE로 나타내었고, 통계처리는 student t-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 하여 유의성 여부를 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 계혈등 EtOAc의 subfraction

계혈등 EtOAc 7g 을 Open silica gel Chromatography를 통해 EtOAc subfraction-1(EA sub-1) 0.87g과 EtOAc subfraction-2 (EA sub-2) 4.80g의 두 분획을 얻었다. TLC의 A는 EtOAc fraction 이고, B는 subfraction-1 이고, C는 subfraction-2 이다.

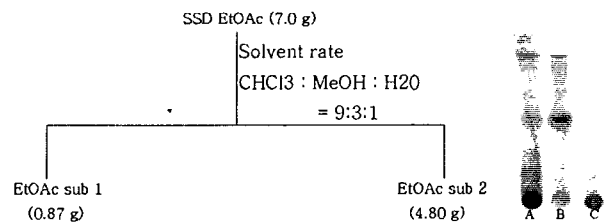


Fig. 1. Schematic diagram and Thin Layer Chromatography of subfractions of Spatholobi suberectus Dunn. The rate of mobile Solvent, CHCl₃: MeOH:H₂O is 7: 3: 1. A: EtOAc fraction of SSD, B: subfraction-1 of EtOAc, C: subfraction-2 of EtOAc.

2. 세포 독성

HT1080, B16BL6 암주에 대한 세포독성의 측정에서 EtOAc subfraction-1 (sub-1)는 IC50 100 $\mu\text{g/ml}$ 과 350 $\mu\text{g/ml}$ 였고 EtOAc subfraction-2(sub-2) 는 IC50 가 50 $\mu\text{g/ml}$ 과 200 $\mu\text{g/ml}$ 였다. sub-2가 sub-1에 비해 약간 강한 세포독성을 보였고, sub-2 와 EtOAc 의 세포 독성 경향이 비슷했다(Fig. 2).

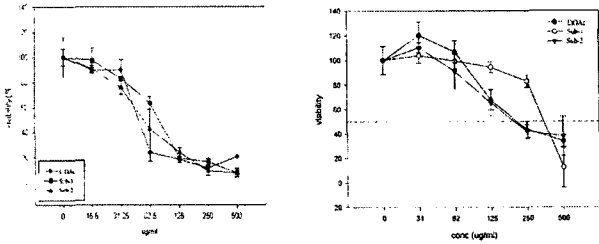
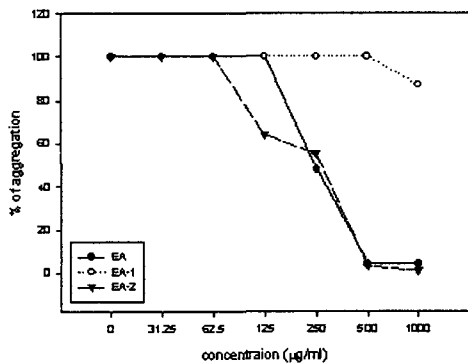
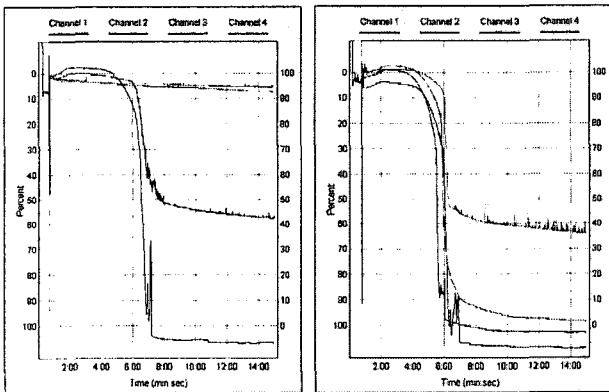


Fig. 2 Cytotoxicity of subfractions of EtOAc from *Spatholobi suberectus* Dunn.(SSD) on HT1080 and B16BL6. HT1080 and B16BL6 (1×10^4 / well) were incubated 96 wells, Sub-1 and Sub-2 were treated with free RPMI. 24h later, MTT metabolite of surval cells were detected by 560 nm ELISA reader.



Channel 1: control
Channel 2: 250 ug/ml
Channel 3: 500 ug/ml
Channel 4: 1000 ug/ml

Channel 1: control
Channel 2: 31.25 ug/ml
Channel 3: 62.5 ug/ml
Channel 4: 125 ug/ml

Fig. 3. Aggregation of platelets in B16BL6 cells treated with Sub-2. Platelet rich plasma(300 ul) plus 10 ul of either sample in appropriate vehicle or vehicle alone was incubated for 3 min in a dual aggregometer at 37°C. Light transmittance was recorded and B16BL6 melanoma cells (2×10^5 , 200 ul) were added to initiate platelet aggregation.

3. TCIPA 억제 효과

EtOAc 층의 혈소판 응집 억제능은 B16BL6의 암세포와 platelet를 교반하였을 때 대조군의 경우 응집이 7분 이내에 일어나는 것을 기준으로 하였을 때, EtOAc 의 혈소판응집억제효과는 250, 500, 1000 ug/ml농도 의존적으로 sub-2와 같은 농도에서 같은 효과를 나타냈다. sub-1은 대조군에 비해 거의 응집억제를 하지 못한 반면, sub-2는 250, 500, 1000 ug/ml을 혈소판과 B16BL6 암주와 반응시켰을 때, 250 ug/ml에서 부터 응집이 지연되었고40%이상 억제 되었고 농도가 높아짐에 따라 100%의 응집을 억제하였다(Fig. 3). EtOAc층이 125 ug/ml에서 sub-2보다 억제 효과가 조금 큰 것을 제외하고 나머지 농도에서는 sub-2와 같은 억제효과를 보이고 있다.

4. 암세포의 Invasion 억제 효과

Platelet aggregation에서 유의한 결과를 보인 계혈등의 sub-1 과 sub-2 로 HT1080암주의 invasion 억제 실험을 수행하였다. EtOAc의 경우 10, 20, 40 ug/ml의 농도 의존적으로 침윤된 암세포의 수가 감소하였고 특히 40 ug/ml에서 음성대조군에 비하여 약 4.8배이상 침윤세포의 수가 유의적으로 감소하였다. 또 EA sub-2의 경우 20 ug/ml과 40 ug/ml에서 음성대조군에 비하여 각각 약 2.1%, 4.6%의 침윤세포의 수가 유의적으로 감소하였으며 그 결과 sub-2가 sub-1에 비하여 전이 억제효과가 높았다 (Fig. 4). 그러나 EtOAc 층에 비하여 sub-2 암세포의 Invasion 억제 효과가 농도별로 크게 나타났다.

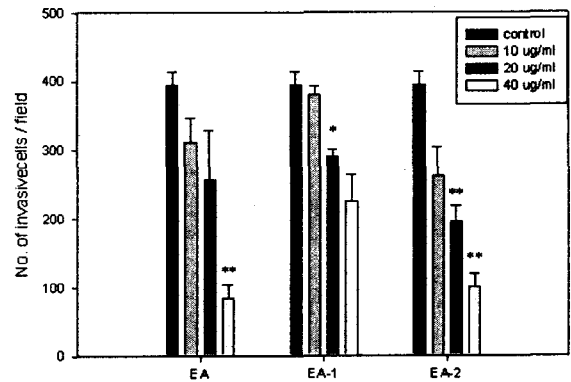


Fig. 4 Inhibitory effect of subfraction-2(sub-2) on the invasiveness of HT1080 cells. The invade cells through Matrigel-coated poretics polycarbonate membrane filters after 3hr incubation in a Boyden blind chemotaxis chambers were stained with thiazane dye solution and measured by counting the stained cells.

5. 폐장 전이 억제 효과

EtOAc, sub-1, sub-2를 농도별로 폐장전이 억제 실험을 실행하였다. Colony를 counting한 결과 control group의 colony가 162개로 EtOAc 200 ug/mice에서 102개의 colony를 형성하여 15%의 억제효과를 보였고, 500 ug/mice에서는 91개로 약 20% 억제하였다. sub-1은 200 ug/mice에서 110개의 colony로 약 14%의 억제효과를 보였고, 500 ug/mice에서 63개 colony로 약 28%를 억제 효과를 보였으며, sub-2은 200 ug/mice에서 70개의

colony로 22%를 억제효과를 보였고, 500 ug/mice는 55개로 약 31%의 전이 억제효과를 보여 sub-2가 sub-1보다 유의하게 전이 억제를 보였다. (Fig. 5) EtOAc 층에 비하여 EA sub-2의 전이억제 효과는 200 ug/mice에서는 7%의 증가된 억제효과를 나타냈으며, 500 ug/mice에서는 11%의 증가된 억제효과를 나타냈다. 이는 폐장전이 억제 효과로 EtOAc보다는 sub-2가 더욱 활성을 가지고 있다는걸 나타낸다.

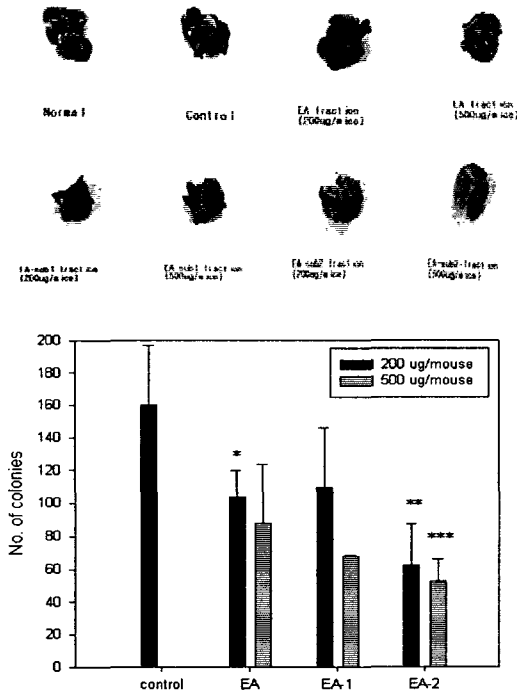


Fig. 5. Effect of administration of subfraction-2 from *Spatholobi suberectus* Dunn (SSD) on experimental lung metastasis produced by the intraportal vein injection of colon B16BL6 melanoma cells.

결론

계혈등(*Spatholobus Suberectus* Dunn.)의 EtOAc층과 sub-2는 세포독성이 농도별로 비슷한 독성을 가지고 있으며 TCIPA의 억제효과 또한 비슷한 효과를 나타낸다. 그런데 HT1080의 Invasion assay의 억제 효과에 대한 차이는 두드러지게 나타나고 또한 폐장전이 억제 효과에서도 sub-2가 EtOAc층에 비해 두드러지게 효과를 보였다. 우리는 ethyl acetate subfraction-2(sub-2)가 암세포의 전이를 강하게 억제하는 것을 보여줬다. 이 결과들은 ethyl acetate subfraction-2(sub-2)가 암세포의 전이억제제로서 가능성을 제시하고 있고, 더욱 세분화된 fraction들이 항전이에 더욱 강력한 억제효과를 나타낼 수 있다는 가능성을 시사하고 있다.

감사의 글

이 논문은 과학재단 과제인 항어혈성 한약재로부터 분리된 전이 억제제의 작용기전 연구과제 (과제번호 2000-2-20500-010-30-3)의 지원에 의해 수행되었는바 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 통계청 : Annual report on the cause of death statistics (Based on vital registration), Seoul, yoo-hansa, 1997.
2. 송계용 외 : 핵심병리학, 서울, 고려의학, pp.151-160, 1998.
3. 전국의과대학교수 : 오늘의 진단 및 치료, 서울, 한우리, pp.85-95, 1999.
4. Kang IC, Kim SA, Song GY, Baek NI, Park YD, Ryu SY, Saiki I, Kim SH. : Effects of the ethyl acetate fraction of *Spatholobi caulis* on tumour cell aggregation and migration. *Phytother Res* Feb;17(2):163-7, 2003.
5. Kallmann BA, Wagner S, Hummel V, Buttman M, Bayas A, Tonn JC, and Rieckmann P. Characteristic gene expression profile of primary human cerebral endothelial cells. *FASEB J.* 16(6):58-91, 2002.
6. Sang-oh Yoon, Moon-moo Kim, and An-Sik Chung. Inhibitory effect of selenite on invasion of HT1080 tumor cells. *J. Biol. Chem.* 276(23); 20085-20092, 2001.
7. Kang IC, Kim SA, Song GY, Baek NI, Park YD, Ryu SY, Saiki I, Kim SH. : Effects of the ethyl acetate fraction of *Spatholobi caulis* on tumour cell aggregation and migration. *Phytother Res* Feb;17(2):163-7, 2003.
8. Jurasz P, Sawicki G, Duszyk M, Sawicka J, Miranda C, Mayers I, Radomski MW. : Matrix metalloproteinase 2 in tumor cell-induced platelet aggregation: regulation by nitric oxide. *Cancer Res* Jan 1;61(1):376-82, 2001.
9. Yudoh, K., Matsuno, H. and Kimuram, T. : alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibits in vitro invasiveness through the extracellular matrix and in vitro pulmonary metastasis of B16 mouse melanoma. *J Lab Clin Med.* 133(2), pp120-8, 1999.
10. Li, D., Yee, J. A., McGuire, M. H., Murphy, P. A. and Yan, L. Soybean isoflavones reduce experimental metastasis in mice. *J Nutr.*, 129(5), pp1075-8, 1999.
11. Kang, Y. H., Kim, W. H., Park, M. K. and Han, G. H. : Antimetastatic and antitumor effects of benzoquinonoid AC7-1 from *Ardisia crispa*. *int J Cancer.*, 93(5), pp736-40, 2001.
12. Martin J. Humphries., Kazue Matsumoto, Sandra L. White. and Kenneth Olden : Inhibition of experimental metastasis by castanospermine in mice : Blockage of two distinct stages of tumor colonization by oligosaccharide processing inhibitors, *Cancer Reserach*, 46, pp.5215-5222
13. Robert, A. Wanda, A Igor, P. : Assays for angiogenesis, *Pharmac., Ther.*, 51, pp.1-11, 1991.
14. Marks MG, Shi J, Fung MO, Z, Trzyna M, Pokala V, Ilnat MA, and Li PK., Effects of putative hydroxylated thalidomide metabolites on blood vessel density in the chorioallantoic membrane (CAM) assay and on tumor and endothelial cell proliferation. *Biol Pharm Bull* 25(5): 597-604, 2002.