

## 우루시올-에탄올 수분산 미립자의 자궁경부암세포에 대한 독성효과

김진우 · 유규은 · 장홍석 · 안웅식 · 최종오\* · 전흥재†

\*한국 표준과학 연구원, 가톨릭대학교 의과대학  
(2003년 12월 25일 접수 · 2004년 2월 6일 승인)

## Cytotoxic Effect of Urushiol-ethanol Micro-particles on Human Cervical Carcinoma Cells

Jin Woo Kim, Kyu Eun Ryu, Hong Seok Jang, Woong Shick Ahn, Jongoh Choi\* and Heung Jae Chun†

\*Chemical Analysis Laboratory, Korea Research Institute of Standards and Science, Taejeon 305-600, Korea  
College of Medicine, Catholic University, Seoul 137-701, Korea

(Received December 25, 2003 · Accepted February 6, 2004)

**ABSTRACT**—The urushiol-ethanol corpuscle of 320 nM in average particle size was prepared and concentrated by ultra homogenization and centrifugation. The cytotoxic profiles of this particle for use as anti-tumor agent have been evaluated *in vitro* in cultures of human fibroblasts (MRC-9) and cervical carcinoma cells (CUMC-3). The cytotoxicity assays revealed that the inhibitory effect of  $10^{-5}$  M urushiol-ethanol particle on the growth of MRC-9 was hardly detected, while CUMC-3 cells exhibited over 50% of growth inhibition under the same conditions. In addition, a clear multiple-unit ladder pattern of apoptotic DNA was observed for the urushiol treated CUMC-3 cells. Thus, the results indicated that urushiol inhibited growth of cervical carcinoma cells by inducing apoptosis, which is a mechanism observed with other typical antitumor agents.

**Key words**—Urushiol-ethanol micro-particle, Anti-tumor reagent, Apoptosis

동양에서는 예로부터 우루시올 (웃산)이 인간이 지니고 있는 고질적인 만성병으로 알려진 위장병 및 냉, 대하에 효과가 있다고 알려져 있으며, 수세기에 걸쳐서 현제에 이르기까지 인간의 생명을 위협하는 암에도 효과가 있다고 구전되어 오고 있다. 따라서 국내에서도 예로부터 수많은 환자들이 웃산을 옷차 및 옷담 등의 형태로 복용해 오고 있다. 하지만, 아직 동양에서는 우루시올의 약물효과에 대한 체계적인 연구가 이루어지지 않았으며, 정확한 효과 또한 규명되어지지 않은 상태에 있다.

이와는 반대로, 현대의학이 발달된 구미 선진국들에서는 우루시올의 항암작용에 관한 연구에 큰 관심을 보이고 있다.<sup>1,2)</sup> 우루시올은 피부 혹은 피질(cortex) 세포와 접촉 시 알러지(allergy) 혹은 염증(inflammatory) 반응을 일으키는 세포들을 자극하게 된다. 우루시올은 표피와 접촉 시 알러지 및 염증 반응을 일으키는 T lymphocyte 및 monocyte의 생성을 극도로 촉진시키며, 이러한 세포들은 여러 종류의 cytokine, chemotactic factor 및 adhesion molecule 등의 생성을 유도하여 우루시올과의 접촉부위로 이동을 증가시킨다.<sup>3)</sup> 따라서 우루시올이 표피에 접촉되거나 혹은 체내에 주입되게 되면, 생성된 cytokine, chemotactic factor, 또한 adhesion mole-

cule 등이 면역세포 및 염증세포의 수를 극대화시켜, 체내의 면역기능을 증가시키게 된다. 이러한 현상은 암환자의 경우에 있어서 면역기능의 강화를 유발시킨다는 점에서 매우 중요하다.<sup>1,2)</sup>

우루시올은 자가면역 증가의 효과 이외에 분자구조의 성격상 암세포를 직접적으로 공격하여 암세포를 제거시키는 이른바, 항암제로서의 특성을 지니고 있다. Hydroquinone, 비타민 K1, K2, K3 그리고 Mitomycin C 등의 항암제는 암세포의 핵막 내로 직접 침입하여 암세포의 DNA와 결합을 하게 되며, 이러한 항암제 등에 의하여 결합된 DNA는 mitosis 기능을 잃게 되어, 괴사 혹은 고사를 일으키게 된다. 언급된 항암제(alkylating agent)들이 암세포의 DNA에 결합되는 이유는 항암제들의 체내 주입 시 여러 종류의 산화-환원 효소들에 의하여 free radical을 형성하게 되며, 또한 암세포의 비정상적인 활동성 및 번식력에 기인한 이상 농도의 free radical의 생성 및 이들의 항암제와의 이동반응(free radical transfer reaction)에 기인한다.<sup>3,4)</sup> 중요한 점은 우루시올은 그 구조상으로 볼 때, hydroquinone의 관능기인 aromatic di-alcohol을 지니고 있으며 산화환원효소 혹은 체내의 ROS(Reactive Oxygen Species) 등에 의하여 비타민 K1의 유도체로 변환될 수 있다.<sup>5,6)</sup> 따라서 우루시올은 항암 능력 및 항 전이능력이 평가되어 천연 신약 제제로서의 그 활용 여부가 검토되어야 하는 신물질이다.

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : 02)590-2416, E-mail : chunhj@catholic.ac.kr

본 연구에서는 선행연구를 바탕으로, 친유성인 우루시올을 효과적으로 약제화하기 위한 우루시올-에탄올 미립자를 제조하였으며, 이 미립자들이 자궁경부암세포에 미치는 영향을 확인하였다.<sup>7)</sup> 이를 위하여, 수분산된 우루시올-에탄올 미립자 용액은 자궁경부암세포에 접종되었으며, MTT 및 DNA fragmentation analysis에 의하여 항암효과가 관찰되었다.

## 실험 방법

### 시약 및 기기

우루시올(pentadecyl, 8-pentadecyl, 8,11-pentadecyl, 8,11,13-pentadecatrienyl group 등으로 치환된 3-substituted catecols의 혼합물)은 한국표준연구원 제공받았으며, 에탄올, isopropanol, NaCl, EDTA, Trisma base, SDS, HCl, agarose, EtBr은 모두 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Waymouth's MB 752/1 medium, penicillin, streptomycin, FBS, PBS는 Gibco(NY, USA)사 것을 사용하였고 MTT assay kit(CT01, Chemicon international Inc., CA, USA), FragELTM DNA fragmentation detection kit(Oncogene Research Products, MA, USA)를 각각 구입하여 사용하였다. 기기로는 호모게나이저(Model STD, Silverson Machines, MA, USA), 초고속 원심분리기(Avanti J-25I, Beckman, Netherelands), zetapotential-meter(ELS-800, Otsuka, MD, USA), 세포배양기(LJO-150, 제이오텍, 한국), ELISA reader(ELx800, Bio-Tek, VT, USA)을 사용하였다.

### 우루시올-에탄올 미립자의 제조

우루시올-에탄올 미립자의 제조방법은 본 연구팀의 선행 연구 결과물에 자세히 설명되어 있으나, 간략히 기술하면 다음과 같다.<sup>7)</sup> 우루시올 5 ml을 에탄올 20 ml에 용해한다. 용해된 우루시올을 1000 ml의 3차 증류수에 분산시키고, 호모게나이저(Model STD, Silverson Machines, MA, USA)에 의하여 7,000~15,000 rpm하에서 3분 동안 교반시킨다. 교반 후 얻어진 우루시올 분산체는 초고속 원심분리기에 의하여 7,000 rpm에서 원심분리에 의하여 농축시킨다. 우루시올-에탄올의 미립자 입자의 평균 직경 및 그 분포는 zetapotentialmeter에 의하여 측정되었으며, Sampling time은 20  $\mu$ sec, angle은 90°, 온도는 25.4°C, refractive index는 1.331, flow rate는  $8.952 \times 10^{-9}$  ml/sec이었다.

### 세포의 배양

정상인의 육아세포(normal human fibroblasts, MRC-9)와 자궁경부암세포(cervical carcinoma cells, CUMC-3) 등이

본 실험에 사용되었다.<sup>8)</sup> 세포들은 Waymouth's MB 752/1 medium에 의하여 배양되었으며 위 배양액의 보조제로 100 IU/ml penicillin, 100 IU/ml streptomycin, 10% FBS가 사용되었으며 세포 및 세포의 배양액은 5%의 CO<sub>2</sub>의 공급하에 37°C에서 보존되었다.

### 세포의 성장에 우루시올이 미치는 영향에 대한 검토

**MTT Assay**—세포의 성장에 우루시올이 미치는 영향을 검토하기 위하여 지속적으로 성장하는 세포들을 96-well culture plate를 사용하여 배양하였으며, 각 well당 사용된 세포의 수는  $1 \times 10^3$ 이었다. 12시간 동안 배양 후, 각기  $5 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M의 농도인 우루시올을 육아세포 및 암세포에 접종하였으며 접종 후 세포는 36시간 동안 다시 배양되었다. 각 농도에 대해서 3회의 실험이 반복되었다. 우루시올이 세포성장의 억제에 미치는 영향은 MTT assay kit를 사용하여 측정하였다. 배양과정의 최종 4시간 동안 PBS(phosphate buffered saline)에 희석된 10  $\mu$ l의 MTT reagent가 각 well에 첨가되었다. 이 때 100  $\mu$ l의 isopropanol/0.04 N HCl이 역시 첨가되었으며 ELISA plate reader에 의하여 540 nm 영역에서 흡광도가 측정되었다. 세포감소의 백분율은 다음과 같이 계산되었다 :  $[1 - OD_{exp} / OD_{control}] \times 100$ (여기서 OD는 optical density임). 모든 데이터에 대한 유의성 검정은 Student's *t*-test를 적용하여 미립자 처리군을 대조군과 비교해  $p < 0.05$ 일 때 유의성 있는 차이가 있는 것으로 처리하였다.

**DNA Fragmentation Analysis**—육아세포 및 자궁암세포는  $5 \times 10^5$  M 우루시올에 의해서 접종되었으며(각기 9, 18, 24 및 48시간 동안 배양되었다.) 배양된 세포들은 100  $\mu$ g/ml의 단백질 분해효소 K를 함유하고 있는 lysis buffer(10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0.5% SDS, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4)에 의하여 48시간 동안 분해되었다. DNA를 침전시키기 위해서 전체 부피의 1/5에 해당하는 5 M NaCl과 같은 용량의 isoamyl alcohol이 첨가되었다. 생성된 DNA pellet은 TE buffer(1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.8)에 의하여 다시 용해되었으며 0.1  $\mu$ g/ml의 RNase A에 의하여 처리되어 37°C에서 4시간 동안 보존되었다. 각 시료에 대해서 5  $\mu$ g의 DNA가 1% agarose gel 표면에 fractionate되었으며 ethidium bromide에 의하여 자외선 하에서 관찰될 수 있도록 염색되었다.

세포자연사가 진행중인 세포의 수를 재확인 및 분별하기 위해서 FragELTM DNA fragmentation detection kit(Oncogene Research Products, MA, USA)가 사용되었다. 이 분석에서 terminal deoxynucleotidyl transferase가 DNA frag-

mentation에 의하여 생성된 3'OH(apoptotic signals)에는 biotin이 표지된 deoxynucleotide를 첨가하는 반응을 촉매하는 원리를 이용하였다. 이 과정을 간단히 말하면 slide는 Tris-buffered saline에 의하여 재수화 되었으며 세포들은 protease K에 의하여 투과성을 가지게 되었다. 내인성 peroxidase는 과산화수소에 의하여 그 활성이 중지되었다. 그 후 세포들은 terminal deoxynucleotidy transferase에 의하여 biotin으로 표지되었다. Biotin에 의하여 표지된 nucleotide는 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate에 의한 발색 반응이 확인되었다. 색반응(coloring reaction)은 diaminobenzidine에 의하여 수행되었다. 진한 갈색의 diaminobenzidine의 signal은 DNA fragmentation이 일어난 양성반응을 나타내는 반면 청록색에서 녹색에 이르는 반점들은 DNA fragmentation이 일어나지 않은 음성반응을 보이는 세포들을 나타내고 있다.

**결과 및 고찰**

**우루시올의 수분산화**

수분산화란 물에 난용성인 약물을 계면활성제를 사용하여 투명 혹은 반투명하게 분산시키는 과정을 일컫는다. 대표적인 예로는 비타민 A 및 D 등의 지용성 비타민을 함유한 주사제를 들 수 있다. 우루시올은 비타민 A 및 D 등의 지용성 비타민과 그 구조 및 물성이 비슷하다. 물에 거의 불용성인 우루시올은 주로 알코올, 에테르, 혹은 벤젠 등의 비극성 용매에 용해된다. 본 연구에서는 우루시올을 가용화시킬 수 있는 용매 중 중성 계면활성제이며 정상세포에 대한 독성작용이 가장 약한 에탄올을 사용하여 우루시올을 미립자 형태로 분산화 시켰다.

Figure 1은 우루시올-에탄올 미립자의 크기분포를 보여주고 있다. 그림 1-A는 무질서한 입자의 크기분포를 보이는 반면, 1-B는 좌우가 비교적 균형이 있는 분포를 보이고 있다. 이와 같은 분포도의 차이는 우루시올-에탄올 미립자의 제조에 있어서 교반 속도 및 최종단계인 원심분리법에 의하여 좌우된다고 사료된다. 초고속 교반에 이은 초고속 원심분리는 우루시올-에탄올 미립자가 항암제로 쓰일 수 있는 나노 크기의 미립자를 제조 및 추출해 낼 수 있다는 것을 암시한다.

MTT Assay-Figure 2는 세포의 성장에 대한 우루시올의 dose-response를 보여주고 있다. 접종 후 36시간 경과 후 우루시올은  $5 \times 10^{-6}$  M에서  $5 \times 10^{-5}$  M의 영역에서 우루시올의 농도가 증가함에 따라 각각 40%에서 70% 정도로 자궁암 세포의 성장을 억제함을 보여주고 있다. 이의는 대조적으

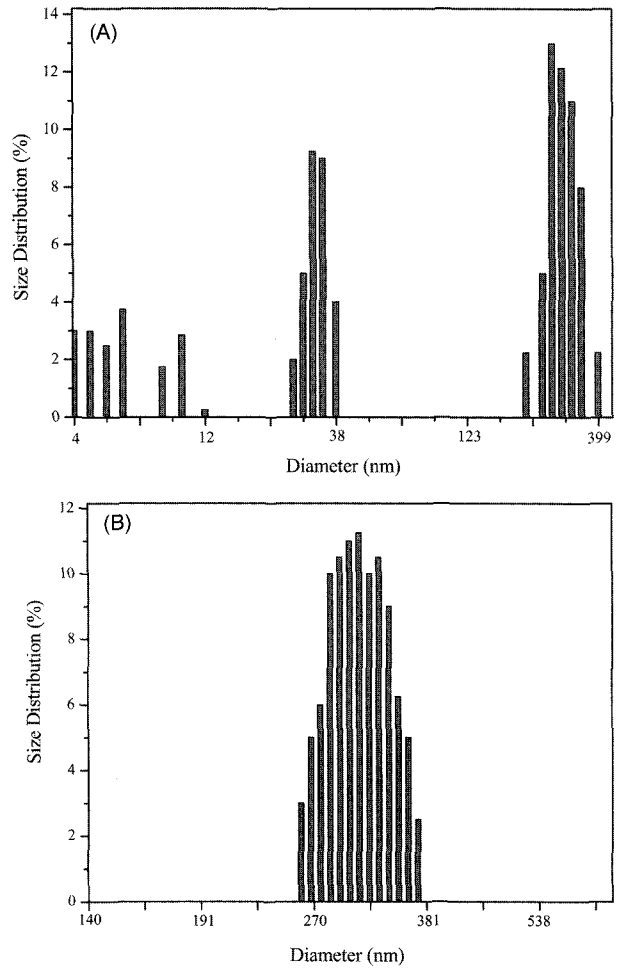


Figure 1-Size distribution of urushiol-ethanol particles. (A) homogenization at 7,000 rpm and (B) homogenization 15,000 rpm; average diameter of (B) is ~320 nm.

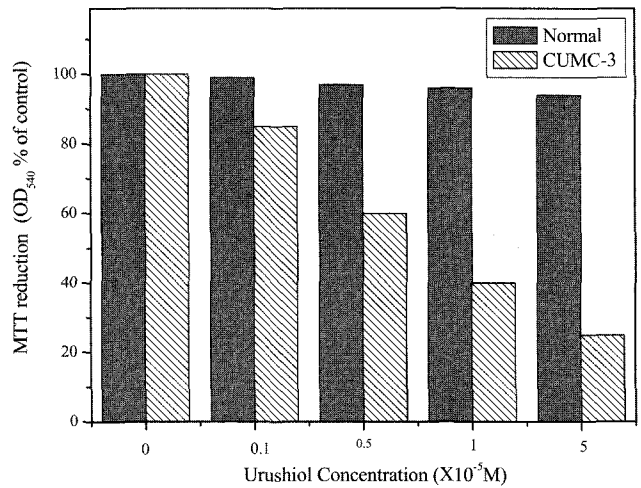
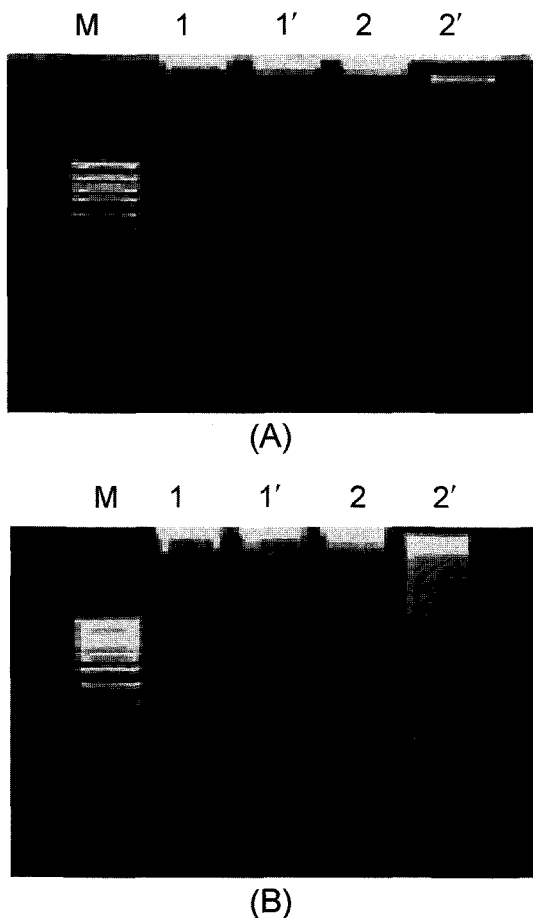


Figure 2-MTT reduction capacity values are expressed as the percentage of control values, obtained by cell incubations (n=3, p < 0.05).

로 실험에 control로 사용된 우루시올 미처리 정상 육아세포들은 점진적으로 배양됨을 보여주었다.  $5 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M의 우루시올이 접종된 정상육아 세포군의 성장억제의 백분율은 각각 5, 6 그리고 10%이었다. 정상육아 세포의 단층성장은 우루시올에 의해서 억제되지 않는 것으로 밝혀진다. 이 결과는 선행연구에서 얻은 우루시올의 난소 암세포의 성장억제와 비슷한 경향을 보이고 있다. 단지 난소 암세포에 대하여는  $10^{-3}$  M 농도에서도 성장억제력을 보여주었다.<sup>7)</sup> 기존의 항암제는 암세포뿐만 아니라 정상세포도 함께 사멸하였으나, 본 실험의 연구결과에 따르면, 우루시올은 정상세포에는 나쁜 영향을 미치지 않고 암세포만 효과적으로 사멸시켜 기존의 항암제의 부작용을 최소화 하면서 단점을 극복할 수 있는 가능성을 보여주었다. 그러므로 우루시올을 항암제로 개발할 수 있으리라 기대된다.

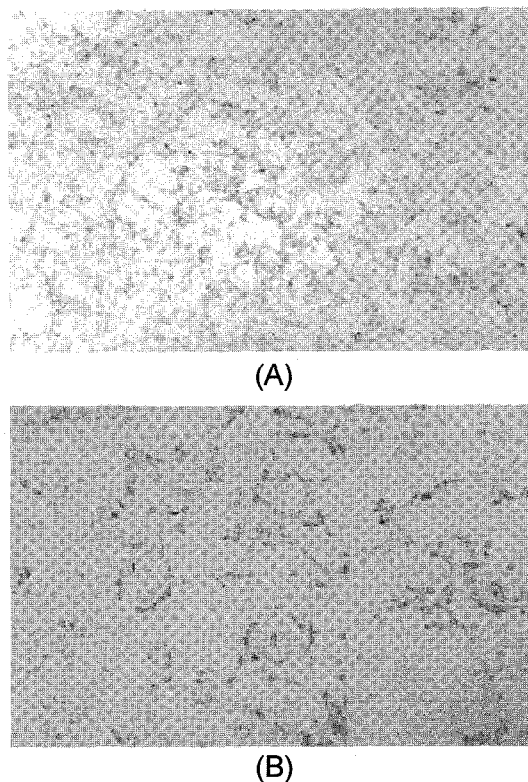
**DNA Fragmentation Analysis**-기존에 사용되고 있는 항



**Figure 3**-Detection of apoptosis by DNA fragmentation upon treatment with  $5 \times 10^{-5}$  M urushiol. (M) marker, (1) MRC-9 untreated, (1') MRC-9 treated, (2) CUMC-3 untreated and (2') CUMC-3 treated; (A) 24 h incubation and (B) 48 h incubation.

암제의 대부분은 암세포에 세포자연사(apoptosis)를 유도하여 암세포의 증식을 막는 것으로 알려져 있다. 이렇게 세포자연사가 일어나는 것을 확인하는 방법에는 여러 가지가 보고되고 있는데, 본 실험에서는 암세포의 성장억제효과를 나타내는 우루시올이 세포자연사에 의한 것인지를 확인하기 위해서 세포자연사의 가장 특이적인 현상으로 알려진 DNA fragmentation을 관찰하였다. DNA fragmentation이 일어나는 것은 세포자연사가 일어나면서 분비가 증가되는 endonuclease에 의해 nucleosome이라는 반복적인 구조를 가지는 DNA에 nucleosome 단위로 fragmentation이 일어나게 됨으로써 관찰되어진다. 따라서 전기영동 후 gel상에서 DNA ladder를 관찰할 수 있으며 이는 세포자연사를 판정할 때 가장 흔히 사용되는 방법이다.

Figure 3은 각 세포에 대한 DNA fragmentation assay 결과를 보여주고 있다. 세포자연사에 유일한 영역인 oligonucleosomal ladder에의 DNA의 fragmentation은  $5 \times 10^{-5}$  M의 우루시올이 처리된 정상 및 암세포에 있어서 24시간 경과할 때까지 발견되지 않았다. 그러나 48시간 동안 우루시올을 처리한 후에는 자궁암세포에서 DNA의 fragmentation이 관찰되었다. 세포자연사 과정 중에 있는 세포의 형태학적



**Figure 4**-Frag ELTM DNA fragmentation detection; (A) untreated CUMC-3 and (B) treated CUMC-3.

변화는  $5 \times 10^{-5}$  M의 우루시올이 처리된 자궁암세포의 경우에 있어서 쉽게 관찰되었다. 짙은 갈색으로 염색된 apoptic cell들은 대략 20% 정도 발생되었다(Figure 4). 위의 실험 결과들로 미루어 우루시올은 암세포에 특이적으로 세포자연사를 유도해서 성장을 억제시키는 효과가 뚜렷하였고, 따라서 항암제로의 개발 가능성이 충분하다는 결론을 얻을 수 있었다.

본 실험에서 사용한 우루시올은 구조적으로 hydroquinone, 비타민 K1-K3, 그리고 mitomycin C 등과 비슷한데 이들 중 특히 비타민 K3의 경우는 이미 암세포에서 세포자연사를 유발한다는 보고가 되어있다.<sup>6)</sup> 이 경우에는 세포주기 진행이나 세포의 변형시에 빠르게 활성화 되는 것으로 알려져 있는 proto-oncoprotein인 c-myc, c-fos 등과 관련되어 세포 주기의 진행억제효과와 세포자연사가 유도되는 것으로 보고되고 있다. 즉 비타민 K3에 의한 세포자연사의 기전 초기에 이 두 가지 단백질의 발현이 중요한 역할을 한다는 것이다. 이 밖에도 비타민 K2의 경우도 백혈병 세포에서 세포자연사를 유도한다는 보고가 있다.<sup>7,9)</sup> 이렇게 우루시올과 비슷한 구조를 가지는 물질들의 항암능력이 보고되면서 본 연구의 가치를 뒷받침 하게 되었고 더 나아가 우루시올을 개발, 제제화함으로써 항암제로 개발할 수 있는 가능성을 열어 주고 있다고 사료된다.

## 결 론

본 연구에서는 우루시올-에탄올 미립자를 제조하여, 이 미립자의 자궁암세포에 미치는 영향을 고찰하였다. 우루시올의 자궁암세포에 대한 성장억제 효과를 살펴보았을 때, 정상세포인 MRC-9의 경우는 우루시올에 대하여 성장억제 효과를 보이지 않았으나, 자궁경부암 세포인 CUMC-3의 경우에는 현저한 성장억제 효과를 확인 할 수 있었다. 성장억제 효과의 apoptosis 여부 확인을 위하여 apoptosis의 가장 특이적인 현상으로 알려진 DNA fragmentation을 관찰하였다. 그 결과 우루시올에 대한 성장억제 효과를 나타내지 않았던 MRC-9에서는 DNA ladder가 관찰되지 않았으나, CUMC-3에서는 선명한 ladder가 발견되었다. 따라서 우루시올 역시 기존의 항암제와 마찬가지로 암세포의 자연사를 유도하여 성장억제를 일으킨다는 것을 확인하였다.

## 감사의 말씀

본 연구는 산업자원부의 산업기술개발과제 (961-90-01)의 지원에 의하여 수행되었습니다.

## 문 헌

- 1) S.H. Kaufmann, Apoptosis: *Pharmacologic Implications and Therapeutic Opportunities*, Academic Press, San Diego, CA, USA (1997).
- 2) N.J. Reynold, J.Y. Yi, G.J. Fisher, K.D. Cooper, J.J. Voorhees and C.E. Griffins, Down-regulation of Langerhans cell protein kinase C-beta isoenzyme expression in inflammatory and hyperplastic dermatoses, *Br. J. Dermatol.*, **133**, 157-167 (1995).
- 3) R.J. Schmidt, L. Khan and L.Y. Chung, Are free radicals and not quinones the haptenic species derived from urushiols and other contact allergenic mono- and dihydricalkylbenzenes: The significance of NADH, glutathion, and redox cycling in the skin, *Arch. Dermatol. Res.*, **282**, 56-64 (1990).
- 4) R.A. Floyd, *Free Radical and Cancer*, Marcel Dekker, New York, USA, Chap. 1 (1982).
- 5) J.L. Bolton, E. Piha, L. Shen, E.S. Krol, S.L. Iverson, Z. Huang, R.B. van Breeman and J.M. Pezzuto, The reactivity of o-quinones which donot isomerize to quinone methides correlates with alkylcatechol-induced toxicity in human melanoma cells, *Chem. Biol. Interact.*, **106**, 133-148 (1997).
- 6) F.Y. WU, W.C. Liao and H.M. Chang, Comparison of antitumor activity of vitamin K1, K2 and K3 on human tumor cells by two (MTT and SRB) cell viability assays, *Life Sci.*, **52**, 1797-1804 (1993).
- 7) J. Choi, C. Park, J. Choi, H. Rhim and H.J. Chun, Cytotoxic effect of Urushiol on Human Ovarian Cancer Cells, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **11**(3), 399-405 (2001).
- 8) J.W. Kim, S.J. Kim, S.M. Han, S.Y. Paik, S.Y. Hur, Y.W. Kim, J.M. Lee and S.E. Namkoong, Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human cervical cancers, *Gynecologic Oncology*, **71**, 266-269 (1998).
- 9) M. Yang, N.B. Nazbat, X. Jiang, S.M. Kelsey, D.R. Blake, A.C. Newland and C.J. Morris, Adriamycin stimulates proliferation of human lymphoblastic Leukaemic cells via a mechanism of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) production, *British J. of Haematology*, **95**, 339-344 (1996).