Kor. J. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 32, No. 1, 67–71 (2004)

Bauhinia forficata 추출물의 인체 암세포에 대한 성장억제 및 세포사멸 유도 활성

임혜영 · 이철훈*
한양대학교 의과대학 유전학교실

Antiproliferative Effect and Apoptotic Induction of *Bauhinia forficata* Extract in Human Cancer Cells. Lim, Haeyoung and Chul-Hoon Lee*. *Department of Medical Genetics, College of Medicine, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea* – Pata de Vaca (*Bauhinia forficata*) is a tree which grows naturally in the rainforests and tropical parts of Peru and Brazil, as well as tropical zones of Asia, eastern Paraguay and northeastern Argentina. The active fraction (Pata-50) of the 70% ethanol extract from Pata de Vaca was sequentially fractionated by HP-20 Diaion column chromatography and C-18 column chromatography, and its characteristics were investigated. The growth of all cancer cells tested except for MCF-7 was inhibited in a concentration-dependent manner by Pata-50. Its IC_{50} values were estimated to be 40.4 μg/ml on AGS, 51.3 μg/ml on HT-29, 52.1 μg/ml on HepG2, 65.2 μg/ml on A549, and 77.5 μg/ml on HeLa cells. A flow cytometric analysis of HepG2 cells revealed induction of apoptosis, but cell cycle regulation was not affected. The HepG2 cell population of apoptosis region increased in a concentration-dependent manner by Pata-50.

Key words: *Bauhinia forficata*, Pata de Vaca, Pata-50, antitumor activity

약용식물의 추출물이나 그것으로부터 분리한 단일성분에 대한 생리활성의 효능효과를 탐색하는 연구는 이미 오랜 기간 동안 수행되고 있다. 특히 최근 인간의 삶의 질이 향상되면서 발생되는 성인병, 특히 당뇨병이나 암 질환의 예방 및 치료가 약용식물을 통해서 시도되고 있다. 그러므로, 더욱더 많은 연구소재를 탐색하여 새로운 효능효과의 발굴이 요구된다. 그러나 한국적 약용식물의 경우엔 너무나 오랜 동안, 많은 연구자들에 의해 연구되어 새로운 효능 및 효과를 발굴할 수 있는 확률이 상대적으로 낮은 편이므로, 그 동안 연구분야에서 소외되어 왔던 연구소재를 선정하는 것이 매우 중요하다. 이러한 관점에서 볼 때 열대 우림 지역에서 자생하는 무궁무진한 식물자원 들을 대상으로 탐색하는 것이 상당한 가능성을 내포하고 있다.

남미의 아마존 유역의 열대 우림 자생식물인 Pata de Vaca (*Bauhinia forficata*)는 이미 오래 전부터 민간요법에 따른 다양한 치료제로 쓰이고 있으며, 특히, hyperglycemic, diuretic, 및 depurative herbal medicine으로 브라질에선 오랜 동안 사용되고 있고[5], 특히 당뇨의 혈당량을 조절하는 용도로는 60년 이상 사용되고 있는 "Vegetable Insulin"이다[4]. 주로 토닉이나 차의 형태로 복용되고 있으며[2], 이 외에도 당뇨의 합병증인 polyurea, renal disorders, 기타 urinary problems에 널리 복용되기도 한다[4, 8]. 또한 elephantitis(상피병), snakebite 등에 내복용 및 외용약으로 사용되기도 하며, 매독성의 피부질환에도 그 효과가 인정되고 있다[4]. 최근에는 북미에서도 많은 관심을 갖고 당뇨병환자 등의 치료제로 사용되고 있다[9, 10].

실제로 Pata de Vaca의 당뇨치료 효과에 대한 임상실험이나[1, 3], 약효물질의 순수분리가 시도되었으며[12], 다른 다양한 새로운 연구들이 보고되고는 있으나[6, 16], 항암효과에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 Pata de Vaca의 70% ethanol 추출물을 column chromatography에 순차적으로 적용시켜 활성분획을 분리하여, 세포성장 억제 활성 및 세포사멸에 관한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

Pata de Vaca는 Raintree Nutrition, Inc.(Texas, U.S.A.)로부터 구입하였으며, 세포배양에 필요한 RPMI-1640, MEM (Minimal Essential Medium), fetal bovine serum, trypsin-EDTA, penicillin/streptomycin은 GIBCO BRL(Grand Island, NY, U.S.A.)에서 구입하였다. 세포성장 억제 활성 측정에 필요한 MTT(3-(4,5-dimethylthiozol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide)와 DMSO(dimethylsulfoxide)는 Sigma Chemical (St. Louis, U.S.A.)에서 구입하였으며, Flow Cytometry 분석에 필요한 PBS(Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)는 GIBCO BRL, Propidium iodide와 RNase A는 Sigma

*Corresponding author
Tel: +82-2-2290-8289, Fax: +82-2-2298-5737
E-mail: chhlee@hanayng.ac.kr

Chemical에서 구입하였다. 시료 추출 및 분리를 위한 용매나 기타 시약은 특급품 이상을 사용하였다.

활성분획의 분리

Pata de Vaca의 건조 잎을 분쇄기로 분말화한 후, 70% 에탄올로 80°C에서 3시간 동안 환류 추출하였다. 그 추출액을 여과시키고, 여과액을 감압 농축하여 에탄올을 제거한 후, 이온교환 수지인 HP-20 Diaion column chromatography에 흡착시켜 30, 50, 70 및 100% isopropanol(IPA)로 단계별로 용출시켰다. 이 용출액들을 각각 감압 농축 후 냉동 건조시켜 MTT assay를 통해 항암활성 실험을 수행한 후, 가장 활성이 좋은 70% IPA 분획을 역상 분리 수지인 C-18 column chromatography에 적용시키고, 30, 37, 50, 70 및 100% IPA로 단계별로 용출 시켰다(Fig. 1). 이 용출액들을 다시 감압 농축하여 냉동 건조시킨 후, 상기와 동일하게 MTT assay를 수행하였다. 그 결과, 활성이 가장 뛰어난 50% IPA 분획(Pata-50)을 6종의 인체 암세포주에 처리하여 MTT assay를 수행하였으며, 또한 HepG2 세포주에 대한 flow cytometry analysis도 수행하였다.

암세포주 및 배양조건

Human cervical adenocarcinoma 세포주 HeLa, human hepatocellular carcinoma 세포주 HepG2, human stomach cancer 세포주 AGS, human lung cancer 세포주 A549, human colon cancer 세포주 HT-29 및 human breast cancer 세포주 MCF-7은 ATCC(American Type Culture Collection, Rockville, NY, U.S.A.)에서 구입하였으며, 사용 배지로는 HeLa 세포주는 MEM, 그 외 나머지 세포주는 RPMI-1640을 사용하였다. MEM과 RPMI-1640에 10%(v/v) fetal bovine serum을 혼합한 배지에 100 units의 streptomycin/penicillin을 첨가한 후, 37°C, 5% CO_2가 공급되는 배양기에서 배양하였다. 세포의 상태는 현미경으로 관찰하여 생육상태를 확인하고 사용하였다.

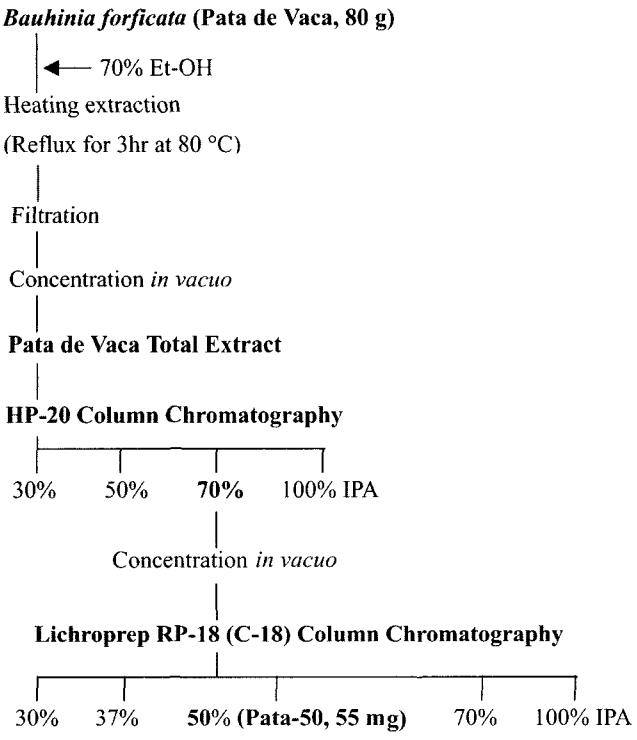

Fig. 1 Schematic diagram for the isolation of Pata-50 from *Bauhinia forficata* (Pata de Vaca).

세포성장 억제 활성 측정

Pata-50의 세포성장 억제 활성을 측정하기 위하여 6종의 암세포에 대한 MTT assay를 실시하였다[13]. 96 well plate에 다양한 농도(0~120 μg/ml)의 Pata-50이 포함된 배지 50 μl와 5×10^3 cell/ml 농도의 암세포주가 포함된 배지 50 μl을 넣어 총 100 μl/well가 되게 한 후, 그 microplate를 37°C, CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 성장억제를 측정하기 위해 각 well에 MTT dye를 1.6 mM이 되도록 분주한 후, formazan 형성을 위해 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. Formazan이 형성된 각 세포를 1,500 rpm으로 원심분리하고 상층액을 제거한 뒤, solubilization/stop 용액으로서 DMSO을 각 well에 100 μl씩 분주하고 형성된 formazan이 잘 녹을 때까지 흔들어준 뒤, ELISA reader(Molecular Devices Corp., Sunnyvale, U.S.A.)로 570 nm에서의 흡광도를 측정하여 암세포의 증식 정도를 측정하였다. 대조군은 시료의 용매를 첨가한 것으로 하였으며, 암세포 성장을 대조군에 비하여 50% 억제하는 시료의 농도를 IC_{50}으로 나타내었다.

세포주기 조절 및 세포사멸 유도에 관한 분석(Flow Cytometry Analysis)

다양한 농도의 Pata-50를 처리한 HepG2 세포주($3\sim5\times10^6$ cells/ml)를 PBS로 두 번 세척한 후 0.5 ml PBS로 세포를 잘 부유 시키고, 70% ethanol(in PBS) 5 ml을 넣고 조심스럽게 섞어준 후 4°C에서 12시간 고정시켰다. 고정된 세포를 15,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, PBS(1% BSA 함유) 5 ml로 세척하였다. 세척 후 다시 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 PBS(1% BSA 함유) 0.5 ml를 넣고 현탁시켰다. 여기에 0.1 mg/ml RNase A를 처리하고 37°C에서 30 분간 반응시킨 후, 0.2 mg/ml propidium iodide(P.I.) 용액을 넣고 4°C에서 빛을 차단하고 30분간 염색한 뒤, FASTAR flow cytometry (Becton Dickinson, San Diego, U.S.A.)로 측정하였다.

단백질 추출 및 Western blot 분석

다양한 농도의 Pata-50을 처리한 HeLa 세포주를 1,500 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 모은 뒤 PBS로 세척하였

다. 세척된 HeLa cells에 lysis buffer(50 mM Tris/HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, protease inhibitor)를 넣고 suspension 한 뒤, 얼음 위에서 20분간 유지시킨 후 용해된 세포를 15,000 rpm, 4°C, 30분간 원심분리하였다. 상층액을 취하여 새 튜브에 옮기고 그 추출된 단백질을 정량하였다. 단백질(30-50 μg)을 10-14% SDS-PAGE에 분리시킨 후 PVDF membrane으로 이동시켰다. 이동시킨 PVDF membrane에 5% 탈지 분유가 포함된 TBS-T buffer를 처리하여 non-specific binding site를 억제시킨 후, TBS-T buffer로 세척하였다. 세포사멸에 관여하는 단백질의 항체를 이용하여 membrane에 부착시킨 후 단백질의 발현 양상을 보기위해 ECL-plus reagent (Amersham, Buckinghamshire, UK)로 반응시켜 X-ray film에 노출하여 관찰하였다.

결과 및 고찰

Pata de Vaca의 암세포성장 억제 활성

Pata de Vaca의 추출물 및 분획물들의 세포성장 억제 활성을 측정하기 위하여 MTT assay를 실시하였다.

70% ethanol 추출물은 인체 간암세포인 HepG2 세포주에 대하여 비교적 높은 농도인 391 μg/ml의 농도에서 IC_{50}를 나타냈으며, 그 추출물을 HP-20 Diaion column chromatography에 흡착시켜 얻은 분획물인 30, 50, 70 및 100% IPA 분획들은, HepG2 세포주에서는 각각 304, 328, 73, 379 μg/ml의 IC_{50}를, 인체 위암세포인 AGS 세포주에서는 각각 81, 434, 72, 387 μg/ml의 IC_{50}를 나타냈다. 이 가운데 저해 활성이 가장 강한 70% IPA 분획을 C-18 column chromatography에 적용 시켜 얻은, 30, 37, 50, 70 및 100% IPA 분획들의 저해 활성 IC_{50} 값은 30 %는 92 μg/ml, 37%는 58 μg/ml, 50%는 52 μg/ml로 나타났으며, 70과 100% 분획물은 test한 농도 범위(120 μg/ml)안에서는 IC_{50} 값을 보이지 않았다. C-18 column 분획물 중 가장 활성이 강하고 수율이 높은 50% IPA fraction(Pata-50)의 세포성장 억제활성을 더욱 다양한 세포주에서 알아보기 위하여 6종의 암세포에 대한 MTT assay를 실시하였다. 사용한 암세포주로는 HepG2, HT-29, AGS, A549, HeLa 및 MCF-7이며, Pata-50을 농도별(0, 20, 40, 60, 80, 120 μg/ml)로 처리하여 24시간 배양한 후 측정하였다. Fig. 2에서 볼 수 있듯이, Pata-50에 의한 세포성장 억제는 MCF-7을 제외한 나머지 세포주에 대해서 농도의존적인 저해활성을 보였으며, IC_{50}는 40.4~77.5 μg/ml의 농도 범위에서 나타났다. 특히, AGS의 경우, 40 μg/ml의 농도에서 대조군에 비해 49%가 저하되었고, 60 μg/ml에서는 급격히 사멸하여 91%의 저해효과를 보였다. HT-29와 HepG2의 경우에는, 대조군에 비해 60 μg/ml의 농도에서 각각 71%, 64%가 저해되었으며, 80 μg/ml의 농도에서는 각각 99%, 83%로 급격하게 사멸한 것으로 나타났다. 이외에

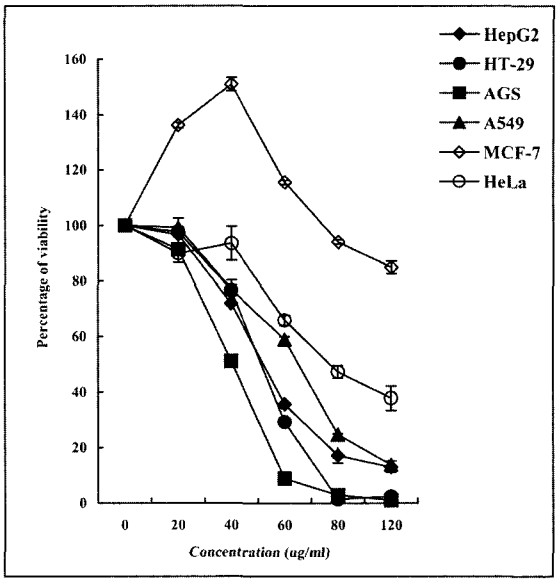

Fig. 2 Antiproliferative effect of cell growth of Pata-50 on AGS, HT-29, HepG2, A549, HeLa, and MCF-7 as determined by MTT assay. Data point represents means of three experiments. IC_{50} values: 40.4 μg/ml on AGS cell, 51.3 μg/ml on HT-29 cell, 52.1 μg/ml on HepG2 cell, 65.2 μg/ml on A549 cell, and 77.5 μg/ml on HeLa cells.

A549나 HeLa 세포주의 경우는 HepG2 등에 비해 약간 낮은 정도의 저해 활성을 보였다.

Flow cytometry를 통한 Pata-50의 세포주기 조절 및 세포사멸 유도

HepG2 세포주에 Pata-50을 농도별(0, 25, 50, 80, 110 μg/ml)로 처리하여 12시간 동안 배양한 후, 세포주기의 변화와 세포사멸로 유도되는 세포의 분포를 측정하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이, Pata-50은 HepG2에 대하여 농도 의존적으로 세포사멸을 유도시키고 있으나, 세포주기 조절에는 아무런 영향을 미치지 않고 있음을 알 수 있다. 특히, HepG2 세포주에 Pata-50을 50 μg/ml 이하로 처리할 경우에는 apoptosis가 유도된 세포의 비율이 10% 미만이지만, 80 μg/ml 및 110 μg/ml을 처리하면 28.6% 및 56.2%로 급격히 증가하였다.

Western blot을 통한 Pata-50의 세포사멸 유도

Apoptosis는 크게 두 경로를 통해서 유발되는데, 첫 번째 경로는 세포 표면의 receptors를 통한 death signal의 전달이며, 대표적인 receptor로는 Fas와 TNF receptor를 들 수 있으며, 이 경우엔 caspase-8이 활성화된다[14]. 또 다른 경로는 세포내의 미토콘드리아의 Bax와 Bcl-2 등을 통한 caspase-9의 활성화를 들 수 있다[7, 11]. 이 두 경로를 통해 활성화된 caspase-8과 9은 소위 caspase-cascade를 거쳐, 결국 caspase-3를 활성형으로 변형시키게 되며, 핵 속에서 이

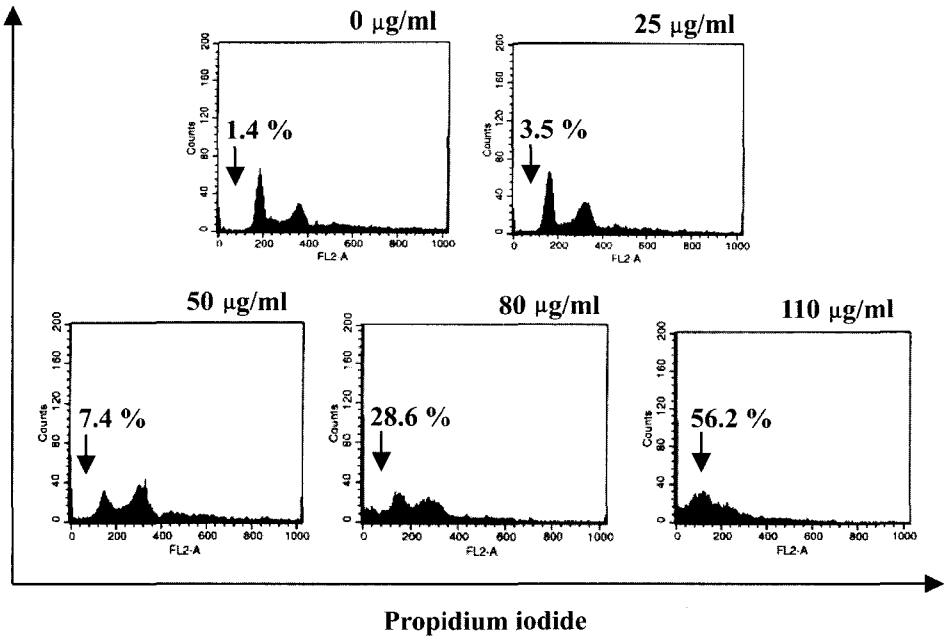

Fig. 3 Histogram of flow cytometry analysis showing the effect of Pata-50 on cell cycle and apoptosis in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with various concentration of Pata-50 for 12h. The cells were then stained with propidium iodide, and nuclei were analyzed for DNA content by flow cytometry using Cell Quest software. A total 10,000 nuclei were analyzed from each sample.

caspase-3가 최종적으로 poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)를 파괴하게 된다[15]. DNA repair enzyme인 PARP가 파괴되면, 세포는 결국 apoptosis에 의해 제거된다[7].

Flow cytometry analysis를 통해서 Pata-50이 apoptosis를 유도한다는 사실을 확인하였으므로, 세포사멸에 결정적인 단백질의 발현 양상을 관찰하기 위해, HeLa 세포주에 Pata-50을 농도별(0, 25, 50, 80 μg/ml)로 처리하여 Western blot을 실시하였다. Fig. 4에 나타난 바와 같이, HeLa 세포주에 Pata-50을 80 μg/ml의 농도로 처리하였을 때, 불활성형인

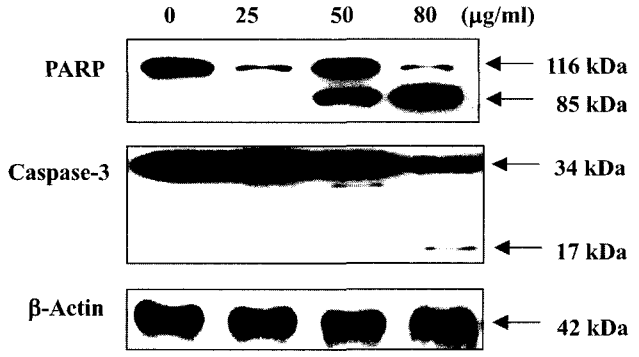

Fig. 4 Effect of Pata-50 on activation of caspase-3 and cleavage of PARP. HeLa cells were exposed with various concentration of Pata-50 for 12 h. Thereafter the cells were lysed and equal amounts of cellular proteins were separated by 10-14% SDS- polyacrylamide gels and transferred onto PVDF membranes. The membranes was proved with the antibodies against caspase-3, PARP, and β-actin, which served as the internal control. Proteins were visualized using ECL detection system.

procaspase-3가 17 kDa으로 cleavage되면서 활성형인 caspase-3로 전환됨을 보였다. 또한 caspase-3의 활성으로 인해, 핵 내에 존재하여 DNA의 손상을 치료하는 PARP가 116 kDa에서 85 kDa으로 cleavage가 일어나, 불활성화되는 것을 확인할 수 있었다. 발현 단백질들의 일정한 정량을 알아보기 위해 house keeping gene인 β-actin을 사용하였다.

본 연구로부터 Pata de Vaca의 추출물 및 분획물, 특히 Pata-50이 인체 암세포에 대한 성장 억제 활성 및 세포사멸을 유도한다는 사실이 확인되었으므로, 후속연구로서 Pata-50으로부터 단일물질을 분리 정제하여 구체적인 항암작용 기작을 규명하기 위한 연구를 수행 중이다.

요 약

남미 아마존 유역의 열대 우림 자생식물인 Pata de Vaca (*Bauhinia forficata*)의 추출물로부터 활성분획을 분리하여, 세포성장 억제활성 및 세포사멸 유도에 관해 조사하였다. MTT assay를 통해 그 저해 활성을 비교 분석해 가면서 Pata de Vaca의 70% ethanol 추출물을 HP-20 Diaion column chromatography 및 C-18 column chromatography에 순차적으로 적용시켰다. 그 결과, 저해 활성이 가장 강하며 수율이 높은 Pata-50을 분리하여, 6종의 암세포주에 대한 MTT assay를 실시하였다. Pata-50에 의한 세포성장 억제는, MCF-7을 제외한 나머지 세포주인 HepG2, HT-29, AGS, A549 및 HeLa 세포에 대해서 농도 의존적인 저해활성을 보였으며, IC_{50}는 40.4~77.5 μg/ml의 농도 범위에서 나타났다.

Pata-50의 세포성장 억제를 확인하였으므로, HepG2 세포에서 Pata-50에 의한 세포주기의 변화와 세포사멸로 유도되는 세포의 분포를 측정하기 위하여 flow cytometry analysis를 실시하였다. 그 결과, Pata-50은 HepG2에 대하여 농도 의존적으로 세포사멸을 유도하지만, 세포주기 조절에는 아무런 영향을 미치지 않고 있음을 알 수 있었다. 특히, Pata-50을 50 μg/ml 이하로 처리할 경우에는 apoptosis가 유도된 세포의 비율이 10% 미만이지만, 80 μg/ml 및 110 μg/ml을 처리하면 28.6% 및 56.2%로 급격히 증가하였다. 다음으로, 세포사멸에 결정적인 단백질의 발현 양상을 관찰하기 위해, HeLa 세포주에 Pata-50을 농도별로 처리하여 Western blot으로 분석하였다. Fig. 4에 나타난 바와 같이, HeLa 세포주에 Pata-50을 80 μg/ml의 농도로 처리하였을 때, caspase-3가 활성화되었으며, 이로 인해, PARP가 116 kDa에서 85 kDa으로 cleavage되어, 불활성화되는 것을 확인할 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 한국과학재단의 특정기초연구사업(R01-2003-000-10594-0)의 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCE

1. Almeida, R. and M. F. Agra. 1984. Levantamento da Flora Medicinal de Uso no Tratamento da Diabete e Alguns Resultados Experimentas, VIII Simposip de Plantas Medicinais do Brasil. pp. 23. September 4-6. Manaus-AM. Brasil.
2. Bernardes, Antonio. 1984. A Pocktbook of Brasilian Herbs, A Shogun Editora e Arta Ltda: Rio de Janeiro, Brazil.
3. Costa, O. A. 1945. Estudo Farmacoquimico da Unha-de-Vaca, *Rev Flora Medicinal.* **9**(4): 175-189.
4. Cruz, G. L. 1995. Dicionario Das Plantas Uteis Do Brasil, 5th ed., Bertrand: Rio de Janeiro, Brazil.
5. de Almeida, E. R. 1993. Plantas Medicinais Brasileiras, Conhecimentos Populares e Cientificos. Hemus Editora Ltda. Sau Paulo, Brazil.
6. Easterling, J. 1993. Traditional Uses of Rainforest Botanicals.
7. Hall, M. and G. Peters. 1996. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinase, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv. Cancer. Res.* **68**: 67-108.
8. Herboper, SA. 1997. Package inserts and instructions for use for packaged medicinal plants sold by Herboper, SA., Lima, Peru.
9. Juliane, C. 1931. Acao Hipoglicemiante de "Bauhinia forficata", Link, Novos Estudos Experimentails, *Rev. Sudam Endocrin. Immol. Quimiot.* **14**: 326-334.
10. Juliane, C. 1929. Acao Hipoglicemiante da Unha-de-Vaca, *Rev. Med. Pharm. Chim. Phys.* **2**(1): 165-169.
11. Katdare, M., M. P. Osborne, and N. T. Telang. 1998. Inhibition of aberrant proliferation and induction of apoptosis in preneoplastic human mammary epithelial cells by natural phytochemicals. *Oncogene Report.* **5**: 311-315.
12. Miyake, E. T., et. Al. 1986. Caracterizacao Farmacognostica de Pata-de-Vaca (*Bauhinia forficata*), *Rev Bras Farmacogn.* **1**(1): 56-68.
13. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**: 55-63.
14. Peeper, D. S. and R. Bernards, 1997. Communication between the extracellular environment, cytoplasmic signaling cascades and the nuclear cell-cycle machinery. *FEBS Lett.* **410**: 11-16.
15. Raff, M. 1998. Cell suicide for beginners. *Nature.* **396**: 119-122.
16. Schwontkowski, Dr. Donna. 1993. HERBS OF THE AMAZON, Traditional and Common Uses, Science Student Brain Trust Publishing, Utah.

(Received Dec. 8, 2003/Accepted Mar. 10, 2004)