

HepG2 간암세포주기에 대한 附子 추출물의 효과

권강범 · 김은경 · 정은실 · 황인진 · 김우경 · 심정섭¹ · 김강산¹ · 신병철² · 송용선² · 류도곤*

원광대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 간계내과학교실, 2: 재활의학교실

Effect of Radix Aconiti Extract on Cell Cycle Progression in HepG2 Human Hepatoma Cells

Kang Beom Kwon, Eun Kyung Kim, Eun Sil Jeong, In Jin Hwang, Woo Kyung Kim, Jeong Sub Sim¹, Kang San Kim¹, Byung Cheul Shin², Yong Sun Song², Do Gon Ryu*

Department of Physiology, 1: Internal Medicine, 2: Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

This study was to investigate the cell cycle arrest effect and its mechanism of Radix Aconiti (RA) extract in HepG2 human hepatoma cells. We used the Flow Cytometer to investigate the effects on cell cycle arrest in RA extract-treated HepG2 cells. And protein levels involved in cell cycle progression such as p53, p21, and p27 are detected by Western blotting method. RA extract induced cell cycle arrest as confirmed by increase of G0/G1 cell population, and the mechanisms were related with up-regulation of p53, p21, p27 protein expressin in HepG2 cells. These results suggest that RA may be a valuable agent for the therapeutic intervention of human hepatomas

Key words : Radix Aconiti, HepG2 human hepatoma cells, Cell cycle, p53, p21, p27

서론

附子(Radix Aconiti)는 毛茛科(미나리아재비과:Ranunculaceae)에 속한 다년생초목인 재배종 바꽃의 괴근에 부착하여 자라는 자근¹⁻⁵⁾으로 回陽救逆, 補命門火, 溫中止痛, 逐風寒濕邪 등^{2,4,6)}의 효능이 있으며 陽微欲絕, 陰毒寒疝, 大汗亡陽, 吐利厥逆, 心腹冷痛, 四肢厥冷, 脾泄冷利, 命門火衰, 下元虛冷, 陰寒水腫, 風寒濕痺, 久病嘔噦, 痿躄拘攣, 陰疽冷癩及一切沈寒痼冷之疾 등^{1,3,6,7)}을 치료하는 것으로 알려져 있다. 종양은 정상세포가 여러 가지 자극에 의해 유전자의 형질전환이 일어나 비정상적인 세포로 변화하여 생체 내 조절기능의 지배를 받지 않고 점점 과잉으로 증식되어 인체에 해를 끼치는 것을 말하는 것으로 양성종양과 흔히 암이라 부르는 악성종양으로 나누는데 최근 암에 의한 사망률이 선진국을 비롯한 우리나라에서 증가하고 있는 추세이다⁸⁻¹¹⁾. 한의학에서 암은 체내에 발현되는 腫塊, 質의 堅硬, 岩石과 같은 腫氣 등을 가리키는 것으로 원인은 氣血의 阻滯, 血瘀, 痰凝 등으로 알

려졌으며, 치료법은 초기에는 行氣活血 軟堅消積法을 중기에는 攻補兼施法을 말기에는 扶正培本法을 사용하고 있으며¹²⁻¹⁴⁾ 실험적으로 榆根皮, 全蝎 등은 肝癌에, 金銀花, 蘇葉 등은 口腔癌에 효과가 있다고 발표되었으나¹⁵⁻¹⁸⁾ 아직 附子の 항암효과는 접하지 못하였다.

이에 저자는 인간 간암세포종인 HepG2 세포를 이용하여 附子 추출물의 세포주기 억제효과를 조사하였으며, 또한 그 기전을 규명하고자 p53, p21, p27 단백질 발현에 대한 附子 추출물의 효과를 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 연구에 사용한 약재는 원광대학교 익산한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다.

2) 시약

세포배양에 사용한 세포배양 용기는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로부터 구입하였으며, p53, p21,

* 교신저자 : 류도곤, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학

· E-mail : tkryu@wonkwang.ac.kr, Tel : 063-850-6846

· 접수 : 2004/01/12 · 수정 : 2004/02/16 · 채택 : 2004/03/22

p27 항체는 Santa Cruz사(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, Alkaline phosphatase-conjugated mouse IgG secondary antibody 등은 Sigma사(Saint Louis, Missouri, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 세포배양액 RPMI, Fetal bovine serum(우태아 혈청), 항생제 등은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 약제의 조제

附子(Radix Aconiti) 200g에 3차 증류수 1.8L를 환저플라스크에 넣고, 냉각기를 부착하여 3시간 동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고, 회전 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 건조하여 27.0g의 분말 시료를 얻었다.

2) 세포배양

사람 간암으로부터 유래된 암세포주인 HepG2(ATCC, USA)는 CO₂ 세포배양기(37°C, 5% CO₂)에서 10% fetal bovine serum이 포함된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다.

3) 세포생존율 측정

HepG2 세포를 96 well 세포배양 용기에 1×10⁴ cells/ml씩 분주하여 24시간 세포배양 용기에 부착시키고, 안정화된 HepG2 세포에 附子 추출물을 48시간 처리하여 MTT(0.5mg/ml)와 3시간 반응시켰다. 생존 세포가 MTT로부터 생성한 보라색 불용성 formazan은 DMSO로 용해하여 570nm 파장에서 ELISA reader(Molecular Device, E-max, USA)로 흡광도를 측정하였다. 측정된 formazan 생성 정도는 대조군 세포에 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

4) Flow cytometer에 의한 세포주기 분석

附子 추출물을 처리한 HepG2 세포를 원심 분리한 후 0.5% tween-20이 첨가된 70% 에탄올로 30분간 고정시켰다. 세포를 다시 4°C에서 2,000 rpm으로 10분간 원심분리 후 PBS-B(phosphate-buffered saline with 1% BSA)로 세정하였다. 고정된 세포에 PI-RNase (50µg/ml of PI with 11 units/ml of RNase) 용액을 4°C에서 1시간 처리하여 DNA를 염색한 후 Facscan flow cytometer (Becton-Dickinson, NJ, USA)를 이용하여 분석하였다.

5) Western blotting

포집된 세포는 세포파쇄용액과 4°C에서 30분 반응시킨 후 30µg의 단백질을 두 배의 sample buffer(5mM EDTA, 4% sodium dodesyl sulfate(SDS), 20% glycerol, 200mM Tris, pH 6.8, 0.06% bromophenol blue)와 혼합 후 100°C에서 3분 가열하여 단백질 변성을 유도하고, 12%(for p53)와 15%(for p21, p27) gel에서 전기영동을 시행하였다. 전기영동을 마친 gel의 단백질은 semi-dry electrotransfer system(0.8mA/cm²)을 이용하여 nitrocellulose membrane으로 이동시킨 다음, 5% skim milk와 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적인 항체반응을 억제시켰다. 일차항체는 TBS-T에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 24시간 반응시키고, TBS-T로 10분 3번 세

척한 후 이차항체인 anti-mouse IgG conjugated alkaline phosphatase(TBS-T로 1:3,000으로 희석, Amersham Co., England)와 상온에서 1시간 반응시킨 후 NBT/BCIP 시약을 이용하여 노출시켰다.

6) 단백질 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin을 기준으로 이용한 Bradford의 방법¹⁹⁾에 의거하여 정량하였다.

7) 통계 처리

실험 결과는 mean±S.E.M으로 표시하였으며, 유의성은 ANOVA 검정 후에 Turkey-Kramer multiple comparison test에 의하였으며, p값이 0.05이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. 附子 추출물이 HepG2 세포독성에 미치는 영향

HepG2 세포에 附子 추출물을 0.2-5mg/ml의 농도로 48시간 동안 처리한 후 MTT assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였다. 附子 추출물을 0.2mg/ml, 0.5mg/ml의 농도로 처리한 군의 세포생존율은 대조군(100%)에 비하여 각각 87.4%, 81.7%로 감소하였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다. 그러나 附子 추출물을 1, 2, 5mg/ml의 농도로 처리한 군의 세포생존율은 대조군(100%)에 비하여 각각 71.4%(p<0.05), 56.2%(p<0.01), 40.7%(p<0.01)로 유의한 감소를 나타냈으며, IC50 값은 2.0mg/ml 이하인 것으로 나타났다.

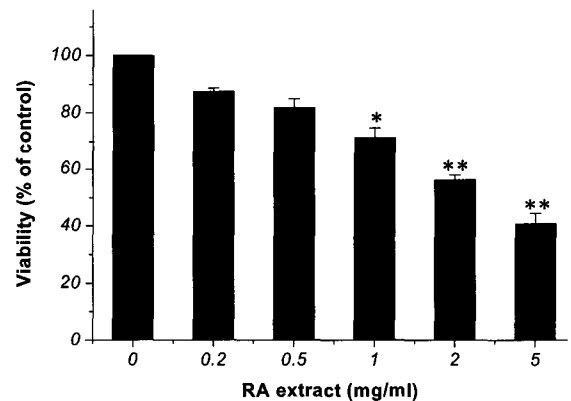


Fig. 1. Effects of Radix Aconiti (RA) extract on cell viability in HepG2 cells. Cells were treated with various concentrations of RA extract for 48 hr. Cell viability was measured by MTT assay. The percentage of viable cells was calculated as a ratio of A570 of treated- to control cells (treated with 0.05% DMSO vehicle). Each value is the mean ± SEM of four independent experiments. *p<0.05, **p<0.01 vs control.

2. 附子 추출물이 세포주기에 미치는 영향

附子 추출물이 HepG2 세포의 주기에 미치는 효과를 조사하기 위하여 IC50값에 가장 근접한 2.0mg/ml 附子 추출물을 6, 12, 24, 48시간동안 세포에 노출시킨 후 G0/G1, S, G2/M phase의 세포양을 측정하였다. 그 결과 附子 추출물을 처리한 후 12시간부터 G0/G1 phase의 세포양이 증가하여 48시간까지 지속되었으며, 이와 상응하여 S, G2/M phase의 세포양이 감소하였다(Table 1).

Table 1. Effects of Radix Aconiti (RA) extract on DNA cell cycle progression in HepG2 cells

2.0mg/ml RA extract incubation time(h)	Cell Population		
	G0/G1	S	G2/M
0	56.2	30.0	13.8
6	57.2	29.4	13.6
12	66.6	23.7	9.7
24	67.4	23.3	9.3
48	69.5	21.5	9.0

HepG2 cells were treated with 2.0mg/ml RA extract for indicated time intervals and analyzed by flow cytometry. Other details are described under Material and Methods. The data shown here are from a representative experiment repeated three times with similar results.

3. 附子 추출물이 p53 단백질 발현에 미치는 영향

附子 추출물에 의한 HepG2 세포주기 억제에 p53 단백질의 발현이 관여하는지를 확인하고자 附子 추출물을 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mg/ml의 농도로 24시간 동안 처리하고, 또한 2.0mg/ml 附子 추출물을 0, 3, 6, 12, 18, 24시간 동안 세포에 노출시킨 후 p53 발현 정도를 Western blotting을 시행하여 조사하였다. 그 결과 1.0mg/ml 附子 추출물을 처리한 군에서 p53의 발현이 나타나기 시작하여 처리한 농도에 의존적으로 증가하였다(Fig. 2A). 그리고 2.0mg/ml의 농도로 처리한 HepG2 세포는 18시간 노출된 군에서 p53의 발현이 나타나기 시작하여 24시간까지 그 효과가 지속되었다(Fig. 2B).

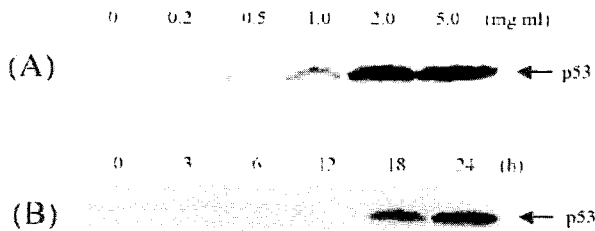


Fig. 2. Effects of Radix Aconiti (RA) extract on p53 protein expression in HepG2 cells. (A) Cells were incubated with various concentrations of RA extract for 24 h. (B) Cells were treated with 2.0mg/ml RA extract for indicated periods. Lysate from cells was separated on 12.0% SDS-PAGE. p53 protein on the nitrocellulose membrane was proved with anti-p53 antibody and the immunoreactive band was visualized by NBT/BCIP solution.

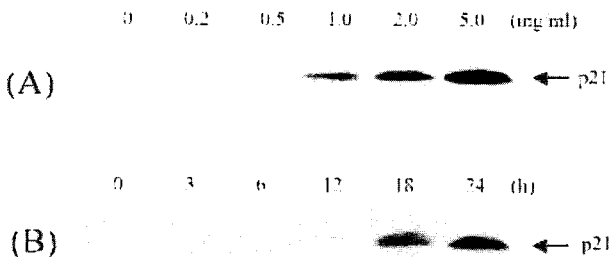


Fig. 3. Effects of Radix Aconiti (RA) extract on p21 protein expression in HepG2 cells. (A) Cells were incubated with various concentrations of RA extract for 24 h. (B) Cells were treated with 2.0mg/ml RA extract for indicated periods. Lysate from cells was separated on 15.0% SDS-PAGE. p21 protein on the nitrocellulose membrane was proved with anti-p21 antibody and the immunoreactive band was visualized by NBT/BCIP solution.

4. 附子 추출물이 p21 단백질 발현에 미치는 영향

附子 추출물에 의한 HepG2 세포의 세포주기 변화에 p21 단

백질의 발현이 관여하는지를 확인하고자 附子 추출물을 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0mg/ml의 농도로 24시간 동안 처리하고, 또한 2.0mg/ml 附子 추출물을 0, 3, 6, 12, 18, 24시간 동안 세포에 노출시킨 후 p21 발현 정도를 Western blotting을 시행하여 조사하였다. 그 결과 1.0mg/ml 附子 추출물을 처리한 군에서 p21의 발현이 나타나기 시작하여 처리한 농도에 의존적으로 증가하였다(Fig. 3A). 그리고 2.0mg/ml의 농도로 처리한 HepG2 세포는 18시간 노출된 군에서 p21의 발현이 나타나기 시작하여 24시간까지 그 효과가 지속되었다(Fig. 3B).

5. 附子 추출물이 p27 단백질 발현에 미치는 영향

附子 추출물에 의한 HepG2 세포의 세포주기 변화에 p27 단백질 발현이 관여하는지를 확인하고자 附子 추출물을 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0mg/ml의 농도로 24시간 동안 처리하고, 또한 2.0mg/ml 附子 추출물을 0, 3, 6, 12, 18, 24시간 동안 세포에 노출시킨 후 p27 발현 정도를 Western blotting을 시행하여 조사하였다. 그 결과 p27의 발현은 처리한 附子 추출물의 농도와 시간에 의존적으로 증가하였다(Fig. 4).

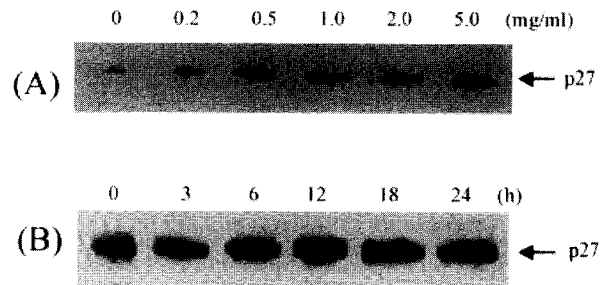


Fig. 4. Effects of Radix Aconiti(RA) extract on p27 protein expression in HepG2 cells. (A) Cells were incubated with various concentrations of RA extract for 24 h. (B) Cells were treated with 2.0mg/ml RA extract for indicated periods. Lysate from cells was separated on 15.0% SDS-PAGE. p27 on the nitrocellulose membrane was proved with anti-p27 antibody and the immunoreactive band was visualized by NBT/BCIP solution.

고찰 및 결론

附子는 陽微欲絶, 陰毒寒疝, 大汗亡陽, 吐利厥逆, 心腹冷痛, 四肢厥冷 등^{1-3,6-7)}을 치료하는 것으로 알려져 있으며 실험적으로 이 등²⁰⁾은 附子 추출물의 경구투여 및 족삼리 약침이 백서의 체중을 감소시킨다고 보고하였으며, 류 등²¹⁾은 附子 추출물이 신장 기능 개선에 대하여 효과가 있음을 보고하였다.

본 연구에서 附子 추출물은 인간 간암세포인 HepG2 세포의 생존율을 처리한 농도에 의존적으로 감소시켰으며 IC50 값은 약 2.0mg/ml인 것으로 나타났다(Fig. 1). 최근의 연구^{22,23)}에서 세포주기 진행(cell cycle progression)의 억제는 불가역적인 반응으로서 최종적으로 세포의 증식을 억제하므로 새로운 항암제 개발에 실험적인 방법으로서 많이 이용되고 있다. Table 1에서와 같이 附子 추출물을 2.0mg/ml의 농도로 HepG2 세포에 처리한 경우 G0/G1 단계의 세포가 시간 의존적으로 증가하였으며, 이와 상응하여 S 단계와 G2/M 단계의 세포는 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 부자 추출물의 HepG2 세포에 대한 증식 억제

효과(Fig. 1)는 세포주기 억제(cell cycle arrest)에 기인한다는 것을 나타낸다. 세포주기 진행과 관련된 유전자 중 p53 유전자는 세포주기에 작용하는 종양억제 유전자의 하나로서 53kDa의 크기를 가지는 단백질이라 하여 명명되었으며, 인체 종양의 50~60%의 높은 빈도로 발견되고 있다²⁴⁻²⁶. 이들 p53 단백질은 세포 내의 기능도 매우 다양하여 세포의 주기조절, 세포고사 기전에 관여하고, 다양한 유전자들의 전사 조절 등의 역할을 수행하면서 세포 내 보호자 또는 감시인(guardian)의 기능을 수행하고 있다. 또한 p53은 세포주기 억제 단백질인 WAF1/CIP1/p21(이하 p21)과 KIP1/p27(이하 p27)과 같은 유전자의 발현을 증가시켜 세포주기를 G0/G1 단계에서 멈추게 하여 조절을 하거나 또는 세포고사를 유도하는 것으로 알려져 있다²⁷⁻³⁰. Fig. 3-4에서 나타났듯이 附子 추출물은 p53, p21, p27 단백질 발현을 농도와 시간에 의존적으로 증가시켰다. 이러한 결과로 附子 추출물은 HepG2 세포에서 종양억제 유전자인 p53의 발현을 증가시켰으며, 이러한 p53 발현의 증가는 세포주기 억제 단백질인 p21과 p27의 발현을 증가시켜 세포주기를 G0/G1 단계에서 억제하는 것으로 사료된다.

앞으로 附子 추출물의 항암제로의 개발을 위해서는 세포주기 진행의 억제에 대하여 보다 정확한 신호전달 기전 연구와 in vivo 연구가 필요하리라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업(03-PJ9-PG3-20800-0006)에 의해 지원되었음.

참고문헌

1. 申佶求 : 申氏本草學名論, 서울, 壽文社, p.23-29, 1982.
2. 辛民教 : 原色臨床本草學, 서울, 南山堂, pp.263-265, 1986.
3. 許浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, p.384,446,732, 1980.
4. 高本劉 : 新編中藥大辭典, 台北, 新文豐出版公司, (上冊) pp.270-274,322,545, (中冊)pp.1166-1169, 1984.
5. 中華人民共和國衛生部藥典委員會 : 中華人民共和國藥典(一部), 北京, 人民衛生出版社, p.157,158, 1985.
6. 陳存仁 : 圖說漢方醫藥大辭典(第3卷), 東京, 講談社, pp.268-271, 1982.
7. 繆希雍 : 神農本草經疏, 中國醫學大系(43卷), 서울, 驪江出版社, pp.579-582, 1986.
8. 최정신, 김정혜 : 최신병리학, 서울, 도서출판 정담, p.117, 1996.
9. 대한병리학회 : 병리학, 서울, 高文社, pp.201-202, 1997.
10. 송계용 외 : 핵심 병리학, 서울, 고려의학, p.147, 1998.
11. 趙鍾寬 : 한방임상종양학, 대전, 周珉出版社, pp.725-758, 2001.
12. 문구 외 : 암 동서의 결합치료(1권), 익산, 원광대학교 출판국, pp.1-22, 255-258,381-386,413-419, 477,488, 1999.
13. 하지용 외 : 大七氣湯이 항암, 면역조절작용 및 apoptosis에 미치는 영향, 동의생리병리학회지, 15(1):111-124, 2001.
14. 진선두 · 신상우 · 양재하 · 권영규 · 김광중 : 녹차의 주성분인 epigallocatechin gallate의 항암활성과 apoptosis기전에 관한 분자생물학적 연구, 동의생리병리학회지, 15(4):611-620, 2001.
15. 한상일 : 유근피 추출액이 HepG2 간암세포에 미치는 항암효과 및 기전에 대한 연구, 원광대학교 대학원, 1999.
16. 전영세 : 간암세포에 미치는 전갈 전탕액의 사멸효과 및 기전에 대한 연구, 원광대학교 대학원, 2003.
17. 백경현 : 금은화 Ethyl acetate분획이 인체 구강유상피암세포에 미치는 항암효과, 원광대학교 대학원, 1998.
18. 박명오 : 소엽의 가용성 부탄올 분획이 인체 구강유상피암종 세포에 미치는 항암효과, 원광대학교 대학원, 1998.
19. Bradford MM : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal Biochem. 72,248-254, 1976.
20. 이건목, 김경식, 장종덕, 김기영 : 附子 경구투여 및 족삼리 약침이 정상 백서의 체중, 혈청 변화에 관한 연구, 침구과학회지, 16(1):269-282, 1999.
21. 류도곤, 강순수 : 附子 전탕액이 가토의 부신피질 및 신장기능과 혈장 Renin 활성도에 미치는 영향, 대한동의생리학회지, 3(2):25-48, 1989.
22. McDonald ER 3rd, El-Deiry WS : Cell cycle control as a basis for cancer drug development (Review), Int. J. Oncol. 16:871-886, 2000.
23. Owa T, Yoshino H, Yoshimatsu K, Nagasu T : Cell cycle regulation in the G1 phase: a promising target for the development of new chemotherapeutic anticancer agents, Curr. Med. Chem. 8:1487-1503, 2001.
24. Pruschy M, Rocha S : Key targets for the execution of radiation-induced tumor cell apoptosis: the role of p53 and caspases, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 49(2):561-567, 2001.
25. Zeimet AG, Riha K : New insights into p53 regulation and gene therapy for cancer, Biochem. Pharmacol. 60(8):1153-1163, 2000.
26. Weller M : Caspase-dependent chemotherapy-induced death of glioma cells requires mitochondrial cytochrome c release, Biochem. Biophys. Res. Commun. 281(2):3242-3247, 2001.
27. Gartel AL, Serfas MS, Tyner AL : p21--negative regulator of the cell cycle, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 213:138-149, 1996.
28. Macri, E, Loda M : Role of p27 in prostate carcinogenesis, Cancer Metastasis Rev. 17:337-344, 1998.
29. Pavletich N.P. : Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors, J. Mol. Biol. 287:821-828, 1999.
30. Ortega S, Malumbres M, Barbacid M : Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer, Biochim. Biophys. Acta. 1602:73-87, 2002.