

폐암세포주에서 黃精의 주요 성분인 Kaempferol의 항암 효능

정영석 · 정지천*

동국대학교 한의과대학 내과학교실

Anti-tumor Effect of Kaempferol, a Component of Polygonati Rhizoma, in Lung Cancer Cells

Young Seok Jeong, Ji Cheon Jeong*

Department Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dongguk University

Kaempferol, a component of Polygonati rhizoma, is one of the herbal flavonoids, which is used in therapeutic agent for anti-hypercholesterol, anti-hypertension and anti-diabetes. And it is also known to be effective in anti-cancer therapy for breast, prostate and other type of cancers. However, the anti-cancer therapeutic mechanisms are poorly understood. To address molecular mechanism underlying kaempferol-induced anti-cancer effects, we determined the effect of kaempferol on cell growth of the lung cancer cell lines, A549, H1299 and H460. From the FACS analysis, measurement of caspase activity, DAPI and tryptophan blue staining, and DNA fragmentation assay, we found that kaempferol induces apoptosis and H460 cells are most sensitive among the tested cell lines. In addition, we performed microarray to identify the genome-wide expression profiling regulated by kaempferol. Lots of cell cycle-related genes were under-expressed, whereas the genes related to TGF-beta/SMAD pathway were over-expressed in kaempferol-treated H460 cells. Additionally, kaempferol also increased expression levels of apoptosis related genes such as death receptors, FAS, TRAIL-R and TNF-R, and casepase-8 and caspase-10. Overall, our results suggest that kaempferol promotes anti-lung cancer therapeutic effects by inducing G1 arrest and apoptosis through TGF-beta/SMAD pathway and death receptors/caspase pathway, respectively.

Key words : polygonati rhizoma, kaempferol, anti-lung cancer effects, TGF/SMAD pathway, death receptors/caspase pathway

서 론

암은 증식과 역제를 조절할 수 있는 정상세포와 달리, 필요 이상의 무제한 증식을 통하여 주위의 정상 조직 또는 기관을 침윤하여 파괴시키고 원발 병소로부터 개체의 여러 기관으로 전이하여 새로운 성장 장소를 만듦으로서 개체의 생명을 빼앗아갈 수 있는 질환군을 총칭한다. 서양에서는 폐암·대장암·유방암 등이, 한국을 비롯한 동남아시아 지역에서는 위암·간암·자궁경부암 등의 발생빈도가 높은 것으로 알려져 있다¹⁾.

폐암은 환자의 반수 이상에서 전신 전이가 있어 절제술이 불가능하며 항암요법, 방사선요법을 병행하더라도 생존 기간을

효과적으로 연장시키지 못하며 혈액학적 독성이 심하여 부작용을 유발하기에 암세포의 분자생물학적 특성을 이용한 생물학적 치료법 등의 연구 필요성이 대두되고 있다²⁾.

한의학에서 폐암은 肺積, 肺癰, 肺脹, 肺疽, 胸痛, 咳嗽, 喘證, 咯血 등에 해당되며, 치법으로는 潤肺化痰, 滋陰清熱 등의 攻補兼施法과 清肺化痰軟堅, 清熱解毒, 化痰消積 등의 祛邪法 등이 주로 활용되고 있다³⁾. 최근 한약재 및 한약 처방의 항암 효과에 대한 실험 연구로는 牡丹皮(Paeonia suffruticosa의 뿌리껍질)에서 추출한 methyl gallate의 효과⁴⁾, 가미계격탕의 암세포 증식 억제 등이 있다^{5,6)}. 또한 폐암세포주에서 瓜蒌仁, 黃芩, 桑白皮, 葶藶大棗瀉肺湯 및 葶藶湯 등의 효과가 보고되었다^{3,7,8)}.

黃精(Polygonati Rhizoma)은 등글레의 根莖을 건조한 것으로 脾, 肺, 腎經에 歸經하여 補中益氣, 安五臟, 益脾胃, 潤心肺, 填精髓, 助筋骨 등의 효능으로 肺虛乾咳, 病後虛羸, 體倦乏力, 消渴

* 교신저자 : 정지천, 성남시 분당구 수내3동 87-2, 동국대학교 분당한방병원

· E-mail : jjch@paran.com, · Tel : 031-710-3727

· 접수 : 2011/08/29 · 수정 : 2011/09/26 · 채택 : 2011/10/07

등의 치료에 활용되어 왔다⁹⁾. 黃精의 주요 성분인 kaempferol은 자연에서 발견되는 flavonoid 중의 하나로서 항산화, 항염증, 항균 효과 등이 밝혀져 있으며¹⁰⁻¹³⁾, 암세포의 사멸(apoptosis)을 유도하여 항암작용에 관여하는 것으로 보고되었다¹⁴⁻¹⁷⁾.

저자들은 黃精의 潤肺 효능이 폐암에도 효과를 나타낼 것으로 기대하여 주요 성분인 kaempferol의 항폐암 효과와 그 작용 기전을 밝히고자 분자생물학 및 유전자 수준에서 비교 분석한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약제

黃精을 시중(태원당약업사, 대구, 대한민국)에서 구입하고 정선하여 사용하였다.

2) 시약

kaempferol, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), propodium iodide (PI), hoechst (1 μ g/ml), 7-amino-actinomycin D(7-AAD), DAPI, tryphan blue, Dimethylsulfoxide (DMSO)는 Sigma (ST. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Cell cultured media (RPMI 1640)와 FBS (Fetal bovine serum)는 Invitrogen(Carlsband, CA) 제품을 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

黃精 300 g을 잘게 분쇄하여 3배량의 95% methanol을 가하여 60 $^{\circ}$ C에서 중탕으로 24시간씩 3회 반복 추출하여 추출액을 얻었다. 이 추출액을 실온으로 냉각시키고 여지로 여과한 다음 여액을 회전 감압농축기를 사용하여 건조시켜 추출물 110.12 g (수율 36.71%)을 얻어 DMSO로 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 세포 배양 및 약물 처리

비소세포 폐암 세포주(non-small lung cancer cell line)인 A549, H1299 및 H460 세포는 heat inactivation한 10% (v/v) FBS, antibiotics/antimycotics (Invitrogen)를 포함한 RPMI 1640 medium을 이용하여 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 조건에서 배양하였다. 黃精 추출물, kaempferol 및 DMSO는 실험에 필요한 농도로 처리하여 일정 기간 배양하였다.

3) MTT assay

A549, H1299, H460 세포 각각을 500 cells/well의 농도로 96 well plate에 분주한 후 黃精 추출물 또는 kaempferol을 농도별로 처리하여 72시간 동안 배양하였다. PBS에 녹인 MTT를 0.5 mg/ml이 되게 처리하여 4시간 후 배양 후 배지를 제거하고, 150 ml의 DMSO를 well에 넣어준 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한, 세포 성장률을 측정하기 위하여, 25 μ M의 kaempferol을 각각의 세포에 시간별로 처리 후 배양하여 MTT assay를 수행하였다.

4) FACS를 이용한 subG1 및 사멸세포 측정

1 \times 10⁶개의 세포에 DMSO 또는 25 μ M의 kaempferol을 처리한 후 1, 2, 4일 동안 배양하였다. 배양 후 각각의 세포들은 80% 에탄올로 고정시킨 다음, propodium iodide(PI)을 이용하여 염색시킨 후, FACSCaliburTM Flowcytometer와 CellQuest software (BD Biosciences)를 이용하여 분석하였다. 또한, 살아있는 세포와 사멸되고 있는 세포를 분석하기 위해서 1 \times 10⁶개의 세포에 DMSO 또는 25 μ M kaempferol을 처리한 후 2일 동안 배양한 다음, hoechst(1 μ g/ml)와 7-AAD(sigma ; 1 μ g/ml)를 이용하여 세포를 염색한 후 FACS를 통하여 분석하였다.

5) Western blot, DAPI 염색법, tryphan blue 염색법 및 DNA fragmentation 법을 이용한 세포 사멸 분석

세포들은 DMSO 또는 25 μ M kaempferol을 처리한 후 2일 동안 배양한 다음, 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질들은 6-12% SDS-polyacrylamide gel을 이용한 전기영동법으로 분리한 다음, nitrocellulose membrane에 옮긴 후 caspase-3, -8, poly ADP-ribose polymerase(PARP) 및 actin(대조군) 항체를 이용하여 검출하였다.

DAPI 및 tryphan blue 염색을 위해서, H460 세포를 위와 동일하게 처리한 다음, 세포를 에탄올로 고정시킨 후, DAPI 염색액(1 μ g/ml)으로 5분간 염색한 다음 현미경을 이용하여 분석하였다. 또한, 동일한 처리가 된 세포를 0.4% truphan blue 용액으로 염색한 다음 현미경을 이용하여 1,000개의 세포를 측정하여 그 중 염색된 살아있는 세포의 수를 분석하였다.

Kaempferol에 의한 DNA의 분절(fragmentation) 정도를 분석하기 위해, 위와 동일하게 처리된 H460 세포에서 DNA를 검출한 다음, 0.8% agarose gel을 이용하여 DNA의 분절(fragmentation) 형태를 비교 분석하였다.

6) Microarray 및 결과 분석

세포에서 분리한 total RNA는 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 이용하여 정성 및 정량 분석을 수행하였다. RNA integrity number (RIN) 값이 9 이상의 시료를 사용하여 시료제작사의 실험 방법을 기준으로 하여 증폭하여 Cy3와 Cy5 두 탐침으로 표지한 후 Agilent's human oligo microarray 상에서 분석하였다. The Lowess (locally weighted linear regression curve fit) and dye-swap normalization 방식을 이용해 microarray 상에서 나타난 신호 세기의 비율 (Cy5/Cy3)을 적용하여 분석 결과를 확보하였다. 확보된 결과는 각 탐침의 신호 세기에 대한 보정을 통해 일정 수준의 유의성 (p<0.05)을 가진 경우만을 선별하였고, 다음과 같은 database를 이용하여 genome-wide 수준에서 유전자의 발현 양상을 비교 분석하였다.

Gene Ontology (GO)-based functional categories(<http://www.geneontology.org>)

KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>)

DAVID Bioinformatics Resources(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)

7) RNA 추출 및 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응법 (quantitative real time reverse-transcription PCR; real-time qRT-PCR)

RNA는 TRIzol reagent (Invitrogen)을 사용하여 분리한 후, 2 ug의 RNA를 MMLV reverse transcriptase와 random oligo (dT) primers (Invitrogen)를 이용하여 역전사 반응을 진행함으로써 상호보완적인 DNA(complementary DNA ; cDNA)를 준비하였다. 준비된 cDNA는 아래의 primer set를 사용(Table 1)하여 SYBR green reaction system과 CFX96TM real-time system (Bio-Rad)으로 real-time qRT-PCR 방법을 통해 유전자의 발현 정도를 확인하였다.

8) 통계 처리

각 실험 결과의 평균값과 평균 오차를 이용하여 표시하였고, Student's t-test를 통하여 유의성을 검정하였다.

Table 1. The lists of primer set for real-time qRT-PCR

Name	Forward primer(5'→3')	Reverse primer(5'→3')
FAS	GGAATCATCAAGGAATGCAC	GTGGAATTGGCAAAGAAGA
TRAIL-R	GCACAGAGGGTGTGGATTAC	TGGTCGTGGTACAGGAAGCTT
TNF-R	GCCATGCAGGTTTCTTTCTA	ATTCTCAATCTGGGGTAGGC
CASP10	GGTAACAGAGCCAAATGG	CTGTACACAGCTGCCCTCTT
CASP8	GCCTACAGGGTCATGCTCTA	ATCCAGTTTGCATTTGGAGA
IkBa	CAGCAGACTCCACTCCACTT	GGGGTATTTCTCGAAAGTC
NFkB	GAGATTTTTCCCCACAGAT	AAGCTGGACAACACAGAGG
BAX	GTAACATGGAGCTGCAGAGG	AGTTGAAGTTGCCGTCAGAA
SMAD3	AAACCAAGTACCACAGATG	TAGGTAAGTGGTGCAGGTC
P57	AGCTGCACTCGGGGATTT	GAAGAAATCGGAGATCAGAGG
P21	CTGGAGACTCTCAGGGTCGAA	TTAGGGCTTCTCTTTGGAGA
GADD45	ACTGTCTGGGGTGTACGAAG	AGAGCCACATCTCTGTCTGC
GAPDH	CTGCACCACCAACTGCTTAGC	GGGCCATCCACAGTCTTCTGG

결 과

1. 黄精 추출물의 세포 독성 측정

폐암 세포주인 A549, H1299, H460 세포에 黄精 추출물을 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 mg/ml 되게 처리하여 3일 동안 배양한 후 세포의 생존능력을 MTT 분석법을 이용하여 측정하였다. DMSO를 처리한 세포를 대조군으로 사용하여 비교한 결과, 세포의 성장을 50% 수준으로 억제하는 농도(IC50)는 각각 A549(■)세포는 1.25 mg/ml, H1299 세포(●)는 1.13 mg/ml, 그리고 H460 세포(○)는 0.70 mg/ml로 나타났다(Fig. 1A). 동일한 방법으로 kaempferol의 세포 독성을 분석한 결과, 세포의 성장을 50% 수준으로 억제하는 농도는 A549 세포에서 96.1, H1299 세포에서 137.5, 그리고 H460 세포에서 78.9 uM로 각각 나타났다(Fig. 1B).

Kaempferol이 세포 성장에 미치는 영향을 조사하기 위해, 세포들의 생존에 큰 영향을 미치지 않는 농도인 50 uM 농도로 처리(-)하여 5일간의 성장률을 DMSO를 처리한 대조군(···)과 비교 분석하였다. 그 결과, 대조군의 세포들은 배양일이 증가함에 따라 세포의 수가 점차 증가하는 반면, kaempferol을 처리한 세포들은 배양일이 증가하여도 세포의 수가 증가하지 않는 것으로 나타났다(Fig. 1C). 이상의 실험을 통하여, kaempferol은 세포의 성장을 억제하며, 세포 성장의 억제 효과는 세 가지 세포군 모두에서 공통적으로 나타났으며, 특히 H460 세포의 경우 다른 세포들에 낮은 농도에서도 효과적으로 억제됨을 확인하였다.

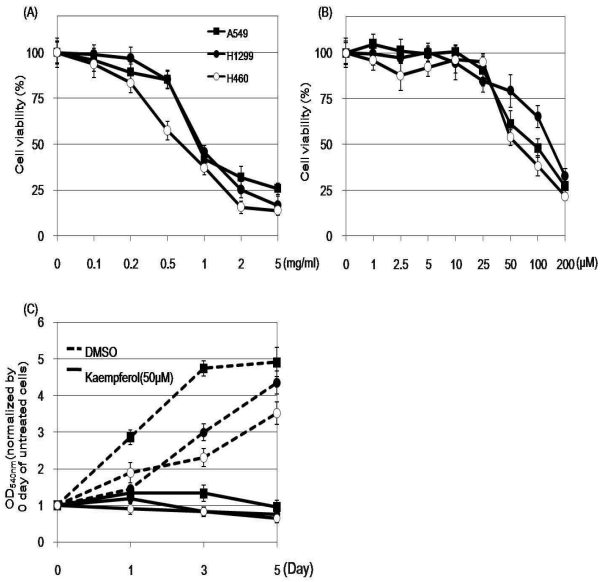


Fig. 1. Polygonati rhizoma and kaempferol inhibited the growth rate of lung cancer cells, A549, H1299 and H460. (A-B) Effects of Polygonati rhizoma (A) and kaempferol (B) on the cell viability. To determine the IC50 values, A549(■), H1299(●) and H460(○) cells were analyzed by the MTT assay in the presence of various amounts of Polygonati rhizoma (0 - 5 mg) and kaempferol (1 - 200 uM). (C) Effects of kaempferol on the cellular proliferation. Each cells incubated in 50 uM of kaempferol (-) or DMSO (···) for time-dependent manner (0 - 5 days) were estimated by MTT assay. Data shown represent the means±S.D. from three independent experiments(P<0.05).

2. Kaempferol의 세포 사멸에 미치는 영향

Kaempferol의 처리에 의한 세포의 성장률 억제(Fig.1C)가 세포 사멸(apoptosis)에 의한 것인지 세포주기 저지(cell cycle arrest)에 의한 것인지를 조사하기 위하여, 세포에 각각 25 uM 농도로 kaempferol을 처리하여 4일간 배양한 다음 유동세포 분석법(FACS analysis)을 통하여 분석하였다(Fig. 2). DMSO를 처리한 A549 세포들(대조군)에서 G1기에 들어가지 못한 subG1의 세포수가 1, 2, 4일에 9, 14, 12%였으나 kaempferol 처리 후, 21, 28, 29%로 증가하였으며, H1299 세포의 경우 6, 10, 15%에서 24, 32, 38%로, H460 세포의 경우는 12, 10, 18%에서 26, 30, 77%로 증가되었다(Fig. 2A).

세포내의 사멸기에 들어선 세포(apoptotic cell)를 분석하기 위해서, 세포막이 존재할 경우도 DNA를 염색할 수 있는 hoechst(live cell)와 세포막이 없이 노출되어 있는 DNA와 결합하여 형광을 내는 7-AAD의 탐지 파장이 다름을 이용하여 세포를 hoechst와 7-AAD로 염색한 후, 유동세포 분석법으로 분석하였다(Fig. 2B). 대조군(DMSO 처리)의 경우에 비해, 처리 시간이 길수록 late-apoptotic cell의 수가 증가되는 것을 확인함으로써 kaempferol은 폐암세포주에서 세포 사멸을 유도하는 것으로 확인되었다(Fig. 2B).

Kaempferol에 의한 세포 사멸 유도 효과는 세포내 caspase 및 PARP의 활성 분석을 통해서도 확인하였다(Fig. 2C). 각 세포에 25 uM의 kaempferol이나 DMSO(대조군)를 처리한 다음 2일간 배양한 다음, 좌측에 표기된 항체를 이용하여 western blot 분석법을 통해 검출하였다. 각각의 효소 활성을 통해 나타나는

band(회색 화살표)는 kaempferol이 처리된 H1299나 H460에서만 관찰됨을 확인하였다. 이러한 kaempferol의 세포내 효과는 H460 세포의 경우 H1299나 A549 세포에 비해 좀 더 효과적인 것으로 확인되었다(Fig. 1 and 2A-2C).

Kaempferol에 의한 세포 사멸 유도 효과는 추가적으로 확인하기 위하여, DAPI 염색법, trypan blue 염색법 및 DNA 분절법(DNA fragmentation analysis)을 수행하였다(Fig. 2D-2F). H460 세포에 25 μ M kaempferol을 처리한 후 2일간 배양한 다음 각각의 실험을 수행하였다. DAPI 염색법을 통해 확인한 결과, 10 μ M의 kaempferol 처리시 분절된 형태의 DNA가 관찰되었고, 50 μ M 이상 처리시에 사멸된 형태가 관찰되었다(Fig. 2D). 이러한 DNA의 분절 현상을 DNA 분절법을 통해서도 확인할 수 있었다(Fig. 2F). 또한, 각 농도별로 처리된 세포 1000개 중 살아있는 세포(푸른색으로 염색)의 수를 측정할 경우, 50 μ M 처리된 경우 세포수가 확실히 감소되는 것(836개에서 236개)을 확인하였다(Fig. 2E). 이상의 결과로, kaempferol은 폐암 세포의 사멸을 유도하는 것을 확인하였다.

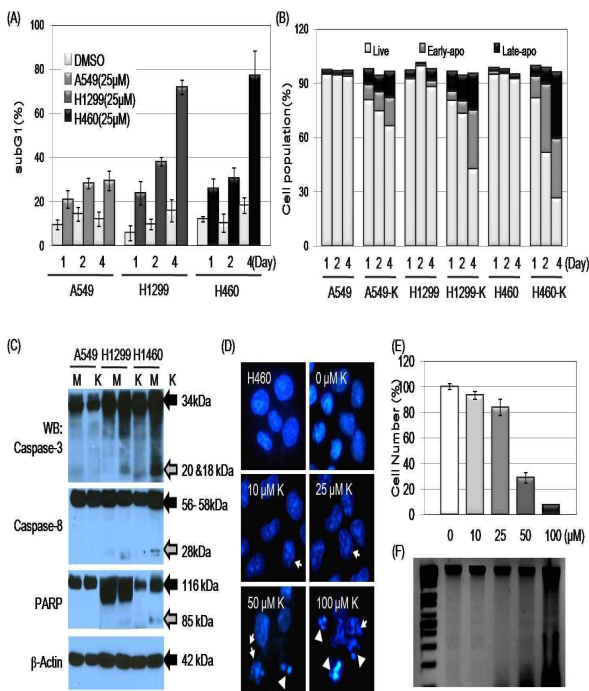


Fig. 2. Kaempferol induced apoptosis in lung cancer cells. (A-B) Effects of kaempferol on the cell cycle regulation. Cells incubated in the presence of 25 μ M kaempferol for 2 days were subjected to FACS analysis. The sub-G1 fraction (apoptotic cell fraction) (A) and population entering cell cycle(B) were calculated using the CellQuest software (BD Biosciences)($P < 0.05$). (C) Effects of kaempferol on the caspase activity. Each cells incubated in 25 μ M of kaempferol (K) or DMSO (M) for 2 days were analyzed by western blot used indicated antibodies. (D-F) Effects of kaempferol on the cellular apoptosis on the H460 cells. The cells incubated in presence of various amounts of kaempferol(1 - 100 μ M) for 2 days and then subsequently stained with DAPI(D) or trypan blue solution(E) and analyzed DNA fragmentation(F). Fragmented DNA(\downarrow) and apoptotic DNA(Δ) observed on the cells which is treated with more than 10 μ M of kaempferol(D). The trypan blue stained cells were observed under light microscope, and percentages of apoptotic cells were estimated from 1000 trypan blue-stained cells per each samples(E). (F) DNA were extracted from parallel samples as above (D-E) and subsequently electrophoresis on the agarose gel.

3. Kaempferol에 의해 유도되는 유전자 발현 분석

Kaempferol에 의해 유도되는 유전자의 발현 형태를 분석하기 위해, H460 세포에 25 μ M의 kaempferol이나 DMSO(대조군)을 처리한 후 2일간 배양하여 RNA를 추출한 다음, 상기한 방법에 따라 microarray를 수행, 분석하였다(Fig. 3). Kaempferol 처리 시료를 대조군과의 유전자 발현 양상을 비교해 보았을 때, 2배 이상의 발현 증가를 보이는 유전자가 4093개로 나타났고, 2배 이상 감소하는 유전자가 4605개로 분석되었다. 그 중 세포 사멸(apoptosis)과 연관되어있는 유전자는 471개로 255개 유전자는 대조군에 비해 2배 이상 증가되었고, 216개의 유전자는 대조군에 비해 2배 이상 감소하는 것으로 분석되었다(Fig. 3A). 또한 세포 주기(cell cycle)와 관련된 유전자의 변화는 462개중 203개가 증가하는데 비해 259개가 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 3B).

세포의 사멸 및 세포주기를 유도하는 여러 생체 내 경로 중 kaempferol에 의해 영향을 받는 경로를 분석하기 위해서, microarray 결과를 분석하여 얻은 1.5배 이상 증감되는 유전자군을 활용, KEGG database를 통해 분석하였다(Fig. 3C and 3D). 분석 결과, kaempferol은 “죽음의 수용체(death receptor)”라 불리는 FAS, TRAIL receptor, TNF receptor 등을 증가시켜 caspase-10과 caspase-8을 통한 세포사멸을 유도할 뿐만 아니라, NF κ B에 의한 세포사멸의 유도에도 영향을 미치는 것으로 분석되었다(Fig. 3C). 즉, 전사 인자(transcription factor)인 NF κ B는 I κ B α 와 결합하여 비활성 상태를 유지함으로써 비정상적인 전사를 억제하는 것으로 알려져 있으며, NF κ B의 결핍은 세포 사멸을 유도하는 중요 경로의 하나인 것으로 알려져 있다.

또한, kaempferol은 세포의 사멸을 유도하는 것 이외에도, 세포주기를 저지(cell cycle arrest)하는 것으로 확인되었는데, 이러한 세포주기 저지는 smad2, smad3, smad4의 증가를 통한 G1기에 머무르게 하는 G1 arrest를 유도하는 TGF β 경로를 통한 것으로 분석되었다(Fig. 3D). Kaempferol의 처리는 세포주기를 진행하는데 필요한 여러 유전자들의 발현을 억제하는 반면, 세포주기를 저지를 위한 경로 중 TGF β 의 경로를 통한 유전자들의 발현을 특이적으로 증가시킴으로써 G1 arrest를 유도하는 것으로 확인되었다.

이상의 microarray와 KEGG database 분석을 통해 얻어진 유전자 중 12개의 유전자를 선별하여 발현 양상의 변화를 RT-PCR 및 real-time qRT-PCR을 통하여 확인하였다(Fig. 4). Microarray에 이용한 동일한 RNA를 이용하여 상호 보완적인 cDNA를 합성한 다음 역전사 효소를 이용, 실시간으로 합성되는 DNA 양을 정량하여 비교하였다(Fig. 4A). 그 결과, microarray에서 각각 1.50배 이상 증가된 유전자들은 real-time qRT-PCR에서도 1.42 이상 증가되는 것을 확인하였으며(Fig. 4B), 0.26배 감소된 유전자인 NF κ B는 real-time qRT-PCR에서 0.27배 감소하는 것으로 확인하였다.

Microarray를 통해 유전자 발현 양상을 비교한 결과 kaempferol은 “죽음의 수용체(death receptor)”들의 증가를 통한 caspase 신호 전달을 통한 세포 사멸 유도 및 TGF β /SMAD 경로를 통한 G1 arrest를 유도하는 것으로 확인되었다(Fig. 3 and Fig. 4)

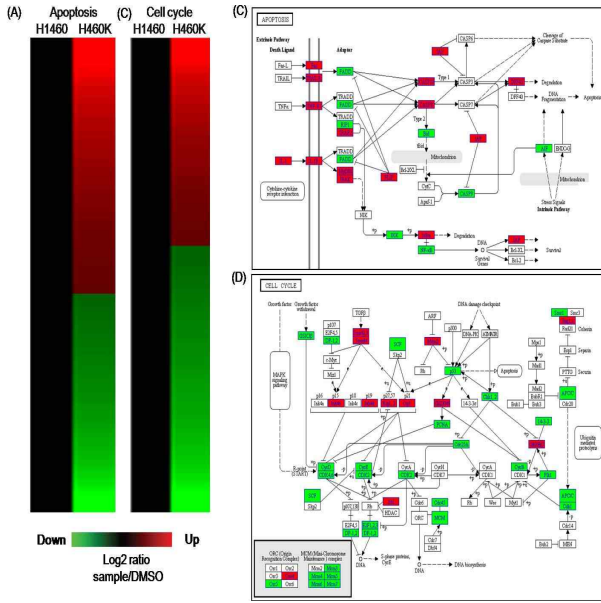
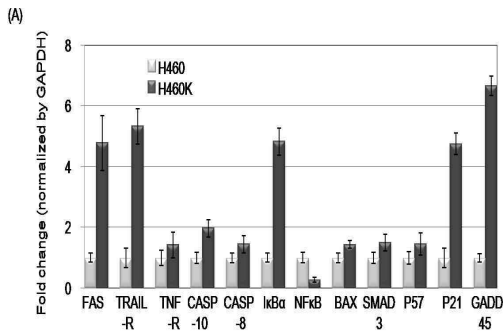


Fig. 3. Genome-wide RNA expression profiling revealed kaempferol induced apoptosis and G1 arrest. The experimental conditions were the same as those described in Figure 2, were used. (A-B) Gene clustering file for apoptosis (A) or cell cycle related genes(B). Gene clustering files revealed 2-fold up- (red color) or down-regulated genes (green color) in kaempferol-treated H460 cells(H460K) compared with DMSO-treated H460 cells (H460). (C-D) Apoptosis (C) and cell cycle pathway(D) from KEGG. Genes up- (red color) or down- regulated (green color) by kaempferol were based on the microarray results.



(B)

Gene	Gene bank ID	Micro array	qRT-PCR	Gene	Gene bank ID	Micro array	qRT-PCR
FAS	NM_000043	4.27	4.78	NFκB	NM_003998	0.26	0.27
TRAIL-R	NM_003840	5.66	5.33	BAX	NM_004324	1.56	1.44
TNF-R	NM_001065	1.68	1.42	SMAD3	NM_005902	3.34	1.50
Caspase10	NM_032974	3.47	1.94	P57	NM_000076	8.14	1.45
Castase 8	NM_033355	1.59	1.45	P21	NM_078467	3.53	4.76
Ikbα	NM_020529	3.50	4.83	GADD45	NM_001924	5.21	6.67

Fig. 4. Real-time qRT-PCR revealed kaempferol induced apoptosis and G1 arrest. Parallel total RNA with microarray was used to generate reverse-transcribed and amplified by real-time qPCR using indicated primers(Table 1). The fold-increases in mRNA expression by real-time qPCR are normalized to the mRNA level of GAPDH. Data shown represent the means±S.D. from three independent experiments(P<0.05).

고찰

채소, 과일, 곡물 등에서 발견되는 폴리페놀 화합물인 flavonoid는 항산화, 항염증, 항암 등의 작용을 나타내는 것으로

알려져 있다^{18,19}. 특히 flavonoid를 포함하고 있는 한약재는 암을 치료하는 목적으로 사용되어져 왔으며, 최근 들어 항암 효과에 대한 연구가 동양에서 뿐만 아니라 서양에서도 활발히 진행되고 있다.

黃精은 임상에서 脾胃虛弱으로 인한 小食, 肺가 허약해서 생긴 마른기침, 질병 후의 쇠약, 피로, 消渴 등의 치료에 활용되고 있다⁹. 실험 연구에 의하면 고혈당 및 고지혈증 감소, 지방세포 분화 억제 등의 효과가 입증되었다²⁰⁻²⁴.

黃精의 주요 성분인 kaempferol은 flavonoid 중의 하나로서 항산화, 항염증, 항균 효과 등을 비롯하여¹⁰⁻¹³ 혈당의 감소, 동맥 경화 수준의 감소, 허혈성심질환과 같은 관상동맥 질환에 대한 치료 효과가 있다는 동물실험 결과들이 보고되어 있다²⁵⁻²⁷. Kaempferol은 호박, 당근, 무, 가지 등의 채소와 녹차, 홍차 그리고 은행나무잎 (白果葉, Ginkgo biloba), 솔잎 (松葉, Pinus densiflora Sieb. et Zucc), 바다나물 (前胡, Angelicaedecursiva) 등의 한약재에도 함유되어 있다²⁸⁻³⁰.

본 연구에서 黃精과 kaempferol은 폐암 세포주인 A549, H1299, H460 세포에서 세포의 1.25 mg/ml 이하와 137.5 uM/ml의 농도에서 50% 수준으로 세포 성장을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 이러한 세포 성장 억제 효과는 kaempferol에 의한 세포 사멸 유도에 의해 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 2). 세포 사멸 및 세포 성장 저해는 유전자 발현 양상의 분석 실험을 통해, “죽음의 수용체(death receptor)”라 불리는 FAS, TRAIL receptor, TNF receptor 등과 caspase-10, caspase-8을 통한 경로를 통해 세포가 사멸에 이르도록 유도하는 것으로 분석되었다(Fig. 3C와 Fig. 4). 또한, 세포의 생존과 사멸을 결정하는데 관여하는 중요 인자인 NFκB의 발현은 감소하는 반면, NFκB에 의한 비정상적인 전사를 억제하는 Ikbα의 발현은 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 3C와 Fig. 4). 이는 궁극적으로 NFκB의 결핍에 의한 세포 사멸을 유도할 것으로 생각되어진다(Fig. 3C와 Fig. 4).

Microarray 결과 분석을 통하여, kaempferol의 효과는 세포의 사멸을 유도하는 것 이외에도, 세포주기 조절에 영향을 미치는 것으로 확인되었다. Kaempferol의 처리는 세포주기를 진행시키는데 필요한 유전자들의 발현을 억제하는 반면, 세포주기 저지(cell cycle arrest)에 필요한 유전자들의 발현은 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 3B). 특히하게도 증가된 유전자들은 TGFβ 경로를 통해 증가되는 smad2, smad3, smad4와 smad에 의해 발현이 조절되는 P21, P57, P19, P15 등의 유전자 발현이 증가되어 있음을 확인하였다(Fig. 3D와 Fig. 4).

이전 보고에 따르면, 폐암 세포주인 A549 세포에서 kaempferol은 MEK-MAPK 경로를 통하여 세포 사멸을 유도한다고 보고¹⁵된 바 있으나, 본 연구에서는 MEK-MAPK 경로 이외에 “죽음의 수용체(death receptor)”라 불리는 FAS, TRAIL receptor, TNF receptor 등의 증가를 통한 caspase-10, caspase-8에 의한 세포 사멸 및 TGFβ/SMAD 경로를 통한 세포 주기 저지를 통한 세포의 성장 억제를 유도함을 밝혔다. 본 연구를 바탕으로 한 kaempferol의 효과는 항폐암 기전 확립과 항암 치료 및 치료제 개발을 위해 기여할 것으로 사료된다.

결 론

黃精 및 그 주요 성분인 kaempferol의 항폐암 효과를 규명하기 위하여 폐암 세포주에서 세포 사멸에 미치는 영향을 검토하고 microarray를 통해 유전자 발현 양상을 분석하였다. kaempferol은 TGFβ 경로를 통해 세포주기 저지(cell cycle arrest)를 유도할 뿐만 아니라, “죽음의 수용체(death receptor)”라 불리는 FAS, TRAIL receptor, TNF receptor 등과 caspase signaling에 의한 세포의 사멸을 유도하는 것으로 나타났다. 이로써 항폐암 기전 확립에 기여하고 이를 기초로 항암 치료 및 치료제 개발에 기여할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Preetha Anand, Ajaikumar B. Kunnumakara, Chitra Sundaram, Kuzhuvilil B. Harikumar, Sheeja T. Tharakan, Oiki S. Lai, Bokyung Sung and Bharat B. Aggarwal: Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical Research*. 25(9):2097-2116, 2008.
2. Cho, G.J. Current therapy of lung cancer. *Korean Journal of Medicine* 62(2):600-607, 2002.
3. Seo, W.G., Jeong, J.C. Effects of *Trichosanthes kirilowii* Maxim and *Scutellaria baicalensis* Georgi on IL-1β-induced G_nT-III and V in Melanoma B-16. *J. of Kor. Oriental Oncology*. 5(1):103-118, 1999.
4. Lee, H., Kwon, Y., Lee, J.H., Kim, J., Shin, M.K., Kim, S.H. and Bae, H. Methyl gallate exhibits potent antitumor activities by inhibiting tumor infiltration of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol*. 185: 6698-6705, 2010.
5. Lee, H.J., Lee, E.O., Rhee, Y.H., Ahn, K.S., Li, G.X., Jiang, C., Lu, J. and Kim, S.H. An oriental herbal cocktail, ka-mi-kae-kyuk-tang, exerts anti-cancer activities by targeting angiogenesis, apoptosis and metastasis. *Carcinogenesis*. 27: 2455-2463, 2006.
6. Seo, I., Kim, S.H., Lee, J.E., Jeong, S.J., Kim, Y.C., Ahn, K.S. and Lu, J. Kamikaekyuktang oriental herbal cocktail attenuates cyclophosphamide-induced leukopenia side effects in mouse. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1-9, 2011.
7. Bae, O.S., Yoo, Y.M., Lee, S.G. Pro-apoptotic effect of *Mori Cortex Radicis* in A459 lung cancer cells. *Kor. J. Oriental Physiology and Pathology*. 19(6):1563-1567, 2005.
8. Yu, B.G., Kim, M.D., Hwang, T.J., Yoo, Y.M., Lee, S.G. Apoptotic effect of *Junglyeokdaejosape-tang* and *Junglyeok-tang* on A459 lung cancer cells. *Kor. J. Oriental Physiology and Pathology*. 19(5):1204-1212, 2005.
9. Lee, S.I. *Herbs*. Seoul, Medical Herbal Co, pp 128-129, 1983.
10. Park, J.S., Rho, H.S., Kim, D.H., Chang, I.S. Enzymatic preparation of kaempferol from green tea seed and its antioxidant activity. *J Agric Food Chem*. 54(8):2951-2956, 2006.
11. Singh, R., Singh, B., Singh, S., Kumar, N., Kumar, S., Arora, S. Anti-free radical activities of kaempferol isolated from *Acacia nilotica* (L.) Willd. Ex. Del. *Toxicol In Vitro*. 22(8):1965-1970, 2008.
12. Gabrielska J, Soczynska-Kordala M, Przystalski S. Antioxidative effect of kaempferol and its equimolar mixture with phenyltin compounds on UV-irradiated liposome membranes. *J Agric Food Chem*. 53(1):76-83, 2005.
13. Parveen, Z., Deng, Y., Saeed, M.K., Dai, R., Ahamad, W, Yu Y.H. Antiinflammatory and analgesic activities of *Thesium chinense* Turcz extracts and its major flavonoids, kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside. *Yakugaku Zasshi*. 127(8):1275-1279, 2007.
14. Li, W., Du, B., Wang, T., Wang, S., Zhang, J. Kaempferol induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells via the Ataxia-Telangiectasia Mutated-p53 pathway with the involvement of p53 Upregulated Modulator of Apoptosis. *Chem Biol Interact*. 177(2):121-127, 2009.
15. Nguyen, T.T., Tran, E., Ong, C.K., Lee, S.K., Do, P.T., Huynh, T.T., Nguyen, T.H., Lee, J.J., Tan, Y., Ong, C.S., et al. Kaempferol-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells is mediated by activation of MEK-MAPK. *J Cell Physiol*. 197: 110-121, 2003.
16. Luo, H., Rankin, G.O., Li, Z., Depriest, L., and Chen, Y.C. Kaempferol induces apoptosis in ovarian cancer cells through activating p53 in the intrinsic pathway. *Food Chem*. 128: 513-519, 2011.
17. Jeong, J.C., Kim, M.S., Kim, T.H., Kim, Y.K. Kaempferol induces cell death through ERK and Akt-dependent down-regulation of XIAP and survivin in human glioma cells. *Neurochem Res*. 34: 991-1001, 2009.
18. Spencer, J.P. Flavonoids: modulators of brain function? *Br J Nutr*. 99: ES60-77, 2008.
19. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. Polyphenols. food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 79(5):727-747, 2004.
20. Miura, T., Kato, A., Usami, M., Kadowaki, S., Seino, Y. Effect of polygonati rhizoma on blood glucose and facilitative glucose transporter isoform 2 (GLUT2) mRNA expression in Wistar fatty rats. *Biol Pharm Bull*. 18(4):624-625, 1995.
21. Kato, A., Miura, T. Hypoglycemic activity of polygonati rhizoma in normal and diabetic mice. *Biol Pharm Bull*.

- 16(11):1118-1120, 1993.
22. Roh, S.W., Kim, J.B. Effects of Polygonati Rhizoma on the Diet-induced Hyperlipidemia in Rats. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*. 22(5):1147-1151, 2008.
 23. Kato, A., Miura, T., Yano, H., Masuda, K., Ishida, H., Seino, Y. Suppressive effects of polygonati rhizoma on hepatic glucose output, GLUT2 mRNA expression and its protein content in rat liver. *Endocr J*. 41(2):139-144, 1994.
 24. Jang, J.S., Jeong, J.C. Anti-adipogenic effect of Kaempferol, a component of polygonati rhizoma. *J Korean Oriental Med*. 31(2):158-166, 2010.
 25. Lopez-Sanchez, C., Martin-Romero, F.J., Sun, F., Luis, L., Samhan-Arias, A.K., Garcia-Martinez, V., et al. Blood micromolar concentrations of kaempferol afford protection against ischemia/reperfusion-induced damage in rat brain. *Brain Res*. 1182: 123-137, 2007.
 26. Middleton, E. Jr., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*. 52(4):673-751, 2000.
 27. Fang, X.K., Gao, J., Zhu, D.N. Kaempferol and quercetin isolated from *Euonymus alatus* improve glucose uptake of 3T3-L1 cells without adipogenesis activity. *Life Sci*. 82(11-12):615-622, 2008.
 28. Lee, C.J., Lee, J.H., Seok, J.H., Hur, G.M., Park, J.J., Bae, S., Lim, J.H., Park, Y.C. Effects of betaine, coumarin and flavonoids on mucin release from cultured hamster tracheal surface epithelial cells. *Phytother Res*. 18(4):301-305, 2004.
 29. Miean, K.H., Mohamed, S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *J Agric Food Chem*. 49(6):3106-3112, 2001.
 30. Park JS, Rho HS, Kim DH, Chang IS. Enzymatic preparation of kaempferol from green tea seed and its antioxidant activity. *J Agric Food Chem*. 54(8):2951-2956, 2006.