

槲寄生의 항염증 효능 및 암세포 이주저해에 미치는 영향

김현영, 장수영, 정지천¹, 신현철

대구한의대학교 한의과대학 내과학교실, ¹동국대학교 한의과대학 내과학교실

The Effects of *Gokgisaeng* on Anti-inflammation and Rat C6 Glioma Cell Migration

Hyun-young Kim, Soo-young Jang, Ji-cheon Jeong¹, Hyeon-cheol Shin

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dae-gu Haany University

¹Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dong-Guk University

ABSTRACT

Objectives : *Gokgisaeng* (Korean mistletoe) is used for the treatment of inflammatory and cancer diseases in traditional Korean medicine and its major component lectins have been reported to induce nitric oxide (NO) in RAW 264.7 macrophages, and also induce apoptosis of various types of cancer cells, although its modulatory effects on cancer cell migration and macrophage activation is poorly understood. The aim of this study is to clarify molecular mechanisms of action responsible for the anti-inflammatory and antitumor migration potentials of Korean mistletoe extract (KME).

Methods : We investigated the anti-inflammatory activity of KME on NO production and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by lipopolysaccharide (LPS) in both RAW 264.7 macrophages and rat C6 glioma cells, and also evaluated inhibitory efficacy on glioma cell growth and migration. For assessment, XTT assay, nitrite assay, RT-PCR, scratch-wound and Boyden chamber assay, and western blot analysis were performed.

Results : Previously reported, unlike the efficacy of *Gokgisaeng* lectin, KME inhibited NO production and iNOS expression, and suppressed pro-inflammatory mediators including IL-1 β , IL-6, COX-2, iNOS in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Furthermore, KME suppressed tumor cell growth and migration, and it also inhibited LPS-induced NO release and iNOS activation by down-regulating expression of protein kinase C (PKC) and phosphorylation of ERK in C6 glioma cells.

Conclusions : Our research findings provide evidence that KME can play a significant role in blocking pro-inflammatory reaction and malignant progression of tumors through the suppression of NO/iNOS by down-regulating of inflammatory signaling pathways, PKC/ERK.

Key words : *Gokgisaeng* (Korean mistletoe), cell migration, glioma cell, inducible nitric oxide synthase, protein kinase C

1. 서론

신경교종(glioma)은 여타 악성 종양과 달리 다

른 장기로의 전이(metastasis)는 거의 일어나지 않으며 정상조직으로의 이주(migration)와 침윤(invasion), 신속한 성장(growth)이 특징적이며, 수술, 방사선 및 화학요법에 대해 내성을 가져 재발률이 높고, 아직까지 뚜렷한 치료법이 없는 실정이다¹⁻⁵. 또한 악성 신경교종 세포는 고형암(solid tumor)과는 달리 이동과 분산을 잘 일으키므로, 세포사멸 자극(apoptotic stimulation)을 유도하는 기존의 암치료법에 대해 저항성을 나타내는 특징이

· 교신저자: 신현철 경북 포항시 남구 대잠동 907-8
대구한의대학교 포항한방병원 3내과
TEL: 054-281-0055 FAX: 054-281-7464
E-mail: ungaeshin@naver.com

· 이 논문은 2013년도 대구한의대학교 대학원 한의학 박사학위 논문임.

있다^{6,7}. 따라서 신경교종의 악성진행을 막기 위해서는 세포사멸의 유도 보다는 암세포의 이주를 저해하는 방향으로 접근하는 것이 보다 효과적인 전략이라고 할 수 있을 것이다.

신경교종을 포함한 사람의 뇌종양 조직에서 inducible nitric oxide synthase(iNOS)가 높은 수준으로 발현되는 것으로 밝혀졌으며, 항염증 효능을 지닌 물질은 iNOS의 발현을 저해해 신경교종 세포의 성장과 이주를 억제함으로써 암세포의 악성진행을 차단할 수 있다고 보고된 바 있다^{8,9}. iNOS에 의해 생성되는 nitric oxide(NO)는 잘 알려진 염증매개물질로 정상 생리적 조건하에서는 혈관확장, 신경전달 등 생체에 유리한 기능을 매개하지만¹⁰, 비정상적으로 과다 생성될 경우 산화적 스트레스 및 세포괴사를 야기할 수 있다¹¹⁻¹³. 특히 암과 관련해 NO는 발암(carcinogenesis), 종양의 진행(tumour progression), 침윤에 관여할 뿐만 아니라, 암의 성장과 전이에 필요한 결정적 단계인 신생혈관형성(angiogenesis)을 유발하여 종양의 악화를 초래할 수 있는 중요한 원인 인자로 알려져 있다¹⁴⁻¹⁶. 따라서 염증매개물질인 NO의 생성 및 iNOS의 발현을 적절한 수준으로 조절하는 것은 암의 악성진행을 억제함에 있어서도 중요한 과제이다.

Protein kinase C(PKC)는 세포의 이동, 성장, 분화, 증식 등의 기능을 매개함으로써 종양 형성을 촉진하며, 암세포의 이주에 관여하는 결정적 인자로 알려져 있다¹⁷⁻¹⁹. 특히 혈청으로 유도된 C6 신경교종 세포의 이주는 PKC 단백질이 매개하는 signaling pathway를 통해 일어나며²⁰, C6 신경교종 세포를 lipopolysaccharide(LPS)로 자극할 경우 NO 생성과 iNOS의 발현이 증가하는데, 이 또한 PKC의 활성 증가에 의한 것으로 보고되었다²¹⁻²³. 따라서 신경교종 세포에서 PKC 단백질 발현을 효과적으로 저해할 수 있는 약물은 iNOS의 과발현 및 NO의 과다 생성을 억제함으로써 암세포의 이주와 침윤을 차단해 결국 종양의 진행과 악화를 방지할 수 있으며, 이는 신경교종 질환의 치료에 대한 새로운

접근 방법이 될 수 있을 것이다.

槲寄生(*Viscum album* L. var. *coloratum* Ohwi)은 겨우살이과(Loranthaceae)에 속한 常綠 寄生 小 灌木인 겨우살이의 帶葉莖枝이다²⁴. 性味는 平苦하고, 肝·腎經으로 歸經하며, 祛風濕, 補肝腎, 強筋骨 등의 효능으로 風濕痺痛, 腰膝痠痛 등을 다스리고, 폐암, 방광암 등의 癰腫 치료에도 사용되고 있다²⁵⁻²⁸. 이러한 한국산 겨우살이와 관련해 암치료제로서의 임상외학적 중요성과 적용에 관한 문헌적 보고²⁹와 간암³⁰⁻³³, 피부암³⁴, 폐암³⁵ 등에 대한 실험 보고는 접할 수 있었으나, 뇌종양 세포의 이주와 관련한 실험연구는 접할 수 없는 실정이다.

이에 본 연구에서는 槲寄生(한국산 겨우살이)의 신경교종 질환에 대한 새로운 항암제로서의 개발 가능성을 알아보고자 RAW 264.7 대식세포를 이용하여 항염증 효능을 확인하고, 흰쥐 C6 신경교종 세포를 대상으로 세포 성장 및 증식에 대한 영향과 이주저해 활성을 검토하였다. 더불어 LPS로 유도된 NO의 과다 생성과 iNOS 및 PKC 단백질 발현에 대한 억제효과를 분석한 결과, 본 약물이 암세포 사멸보다는 PKC 발현 억제를 통한 이주저해 기능이 있었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

세포배양에 사용된 DMEM, RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS) 및 penicillin-streptomycin은 모두 Gibco사(Carlsbad, California, USA), 세포생존을 측정용 XTT(2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) assay kit은 WelGENE 사(Seoul, Korea), LPS(lipopolysaccharide from *E. coli*)는 Sigma사(St Louis, MO, USA), TRI-reagent는 Molecular Research Center(Cincinnati, OH, USA), ImProm-II Reverse Transcription System은 Promega 사(Madison, WI, USA)에서 구입하였다. 기타 시약과 항체들은 Bio-Rad Laboratories(Hercules, CA,

USA), Invitrogen Life Technologies(Carlsbad, CA, USA) 및 Santa Cruz(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 세포배양

Mouse leukaemic monocyte macrophage(RAW 264.7) 및 흰쥐의 신경교종 세포주인 rat C6 glioma cell line은 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받았다. RAW 264.7 세포는 RPMI 1640 배지에, C6 glioma 세포는 DMEM 배지에 각각 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 5% CO₂, 37 °C 환경의 incubator에서 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

3. 약재 및 추출

본 실험에 사용된 槲寄生(Korean mistletoe ; *Viscum album* L. var. *coloratum* Ohwi)은 강원도 양구 지방의 재래시장에서 참나무에 기생하는 겨우살이를 구입한 다음, 정선하여 사용하였다. 약재의 추출을 위하여 겨우살이 600 g에 2 L의 증류수를 가하여 3 시간 동안 전탕하였다. 전탕액을 3000 rpm에서 원심 분리하여 상등액을 취한 다음, 거름종이(Whatman NO.2)로 여과한 뒤, 감압농축하였다. 농축액에 absolute ethanol을 가하여 단계별로 75%, 85% 및 95% 에탄올 용액으로 만든 다음, 각각의 농도단계에서 4 °C 에서 12시간 침전시킨 후 상등액만을 수거하는 과정을 반복하였다. 그 후, 최종 상등액을 감압 농축하고 다시 동결건조하여 한국산 겨우살이 추출물(Korean mistletoe extract : KME) 10.92 g(회수율 1.82%)을 회수하여 실험에 사용하였다.

4. 세포생존율 측정

본 실험에서 세포생존율을 측정하기 위해 XTT assay법을 사용하였다. 즉, 96-well microtiter plate 에 RAW 264.7 혹은 C6 glioma 세포를 0.5×10^5 cells/well이 되도록 분주하여 배양하고, 다양한 농도의 KME를 처리하였다. 24시간 배양한 다음,

XTT 용액을 처리하고 2시간 배양 후, ELISA reader (VERSAmax; Molecular Devices Crop., USA)를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 실험결과는 흡광도를 세포생존율(%)로 환산하여 표기하였다.

5. Nitrite assay

RAW 264.7 혹은 C6 glioma 세포를 24-well plate 에 5×10^5 cells/well의 농도로 분주하고, 12시간 동안 무혈청 배지를 사용하여 배양하였다. 농도별 KME를 전처리하고 30분간 배양한 다음, NO 생성을 유도하기 위해 LPS를 100 ng/ml 농도로 처리한 후, 18시간 동안 배양하였다. 세포 배양액을 수거하여 원심분리한 다음, 상층액에 동량의 Griess 시약(0.1% naphthylethylene diamine in water and 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid)과 혼합하여 실온에서 10분간 반응시켰다. 반응 종료 후, ELISA reader를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 세포로부터 생성된 NO의 양은 sodium nitrate 표준액의 농도를 기준(standard curve)으로 하여 계산하였다.

6. RT-PCR

RAW 264.7 세포에서 염증매개물질의 mRNA 발현량 변화를 측정하기 위해 60 mm dish에 세포를 분주하여 배양하고, 농도별 KME와 LPS(100 ng/ml)를 처리한 다음, 6시간 추가 배양한 후, Trizol-reagent를 첨가하여 total RNA를 준비하였으며, ImProm-II Reverse Transcription System을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 primer(Table 1).와 함께 thermal cycle을 반복하여 증폭 반응을 유도하였으며, 생성물을 1% agarose gel 상에서 전기영동으로 분리한 다음, ethidium bromide 염색을 통해 발현된 밴드를 분석하였다.

Table 1. Primer Sequences Used for RT-PCR.

Primer	Sequence
IL-1 β	Forward CGTCAGGCAGAAGTTTGTCA
	Reverse TTAGAGTCGTCTCCTCCCGA
IL-6	Forward CCGGAGAGGAGACTTCACAG
	Reverse CAGAATTGCCATTGCACAAC
iNOS	Forward GGAGCGAGTTGTGGATTGTC
	Reverse GTGAGGGCTTGCTGAGTGAG
COX-2	Forward TCCATTGACCAGAGCAGAGA
	Reverse TCTGGACGAGGTTTTTCCAC
GAPDH	Forward GGCATTGCTCTCAATGACAA
	Reverse TGTGAGGGAGATGCTCAGTG

7. Scratch-wound assay

C6 신경교종 세포를 6-well plate에 1×10^5 cells/well의 농도로 분주한 다음, 24시간 동안 5% CO₂, 37 °C incubator에서 배양하였다. 세포가 조밀하게 배양된 것을 현미경으로 확인한 다음, 무혈청 배지로 교환한 후, 12시간 동안 배양하고 PBS로 세척하였다. 다시 FBS가 첨가된 배지를 이용하여 농도별 KME(0, 10, 200, 500 μ g/ml)를 처리하였다. 멸균 피펫 팁을 사용하여 plate에 scratching을 가해 세포를 제거한 시점을 0시간으로 하고, 24시간 동안 진행된 세포이주의 변화를 현미경(Nikon TMS-F; Nikon, Tokyo, Japan)으로 관찰한 후, 세포를 제거하였던 wound scratch 지역으로 이주되어온 세포 간의 간격을 측정해 이주율(%)로 환산하여 표기하였다.

8. Boyden chamber assay

C6 신경교종 세포의 이주에 대한 KME의 효능을 Boyden chamber assay로 평가하기 위하여 상하 2개로 구성된 48-well chemotaxis chamber(Neuro-Probe, Gaithersburg, Maryland, USA)를 사용하였다. 상하 각각의 chamber는 서로 1% gelatin을 도포한 8 μ m pore 크기의 polycarbonate membrane을 사이에 두고 분리되는 구조이다. 먼저 무혈청 배지에 신경교종 세포를 5×10^5 cells/ml의 농도로 조절한 다음,

상단 chamber의 각 well에 분주하였다. 하단 chamber에는 FBS와 농도별 KME(0, 10, 100, 200, 500 μ g/ml)를 주입한 다음, 5% CO₂, 37 °C incubator에서 3시간 동안 배양하여 세포의 이주를 유도하였다. 그 후 membrane 상단 부위의 세포는 면봉으로 제거하고, migration이 진행된 하단 부위의 세포만을 메탄올로 고정해 Giemsa stain(Sigma, St. Luis, MO, USA)으로 염색한 다음, 현미경하에서 관찰하였다.

9. Western blot analysis

KME가 iNOS, PKC, MAP kinase 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 western blotting을 수행하였다. C6 glioma 세포에 KME를 1시간 동안 전처리한 후 LPS를 처리하고, lysis buffer(PRO-PREP Protein Extraction Solution, iNtRON)를 첨가해 4 °C, 13,000 rpm에서 5분간 원심분리한 다음 상층액을 수거해 BCA assay로 단백질을 정량하였다. 단백질 30 μ g을 98 °C에서 5분간 변성시킨 후, sample buffer를 가한 다음, 총 16 μ L를 loading해 10% polyacrylamide gel에서 80 V, 2시간 동안 전기영동하였다. 그 후, 4 °C에서 PVDF membrane에 80 V로 2시간 동안 transfer하였다. Membrane 상의 비특이적 반응을 차단하기 위하여 5%의 skim milk가 함유된 TBST(20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.05% Tween 20)로 1시간 blocking시키고 TBST로 잠시 washing한 후, 1차 항체(iNOS, PKC, ERK1/2, p-ERK1/2, JNK, p-JNK, p38, p-p38, β -actin)를 3%의 skim milk가 들어있는 TBST에 희석(1:1000)하여 membrane을 4 °C에서 overnight하였다. 실온에서 15분씩 4번 TBST로 membrane을 washing한 후, 2차 항체(goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz)를 2%의 skim milk가 들어있는 TBST에 희석(1:2000)하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 실온에서 10분씩 3번 TBST로 washing한 후 ECL 용액을 이용해 X-ray film에 감광시킨 후, 단백질의 발현 정도를 분석하였다.

10. 통계처리

실험결과는 평균과 표준편차(mean±SD)로 표기하였으며, Student's *t*-test 방법을 실시하여 분석하였고, *p*<0.05일 경우에 유의성을 인정하였다.

III. 결과

1. Raw 264.7 세포의 생존율에 미치는 영향

Raw 264.7 세포에서 KME의 세포독성을 검토하고자 농도별 KME를 처리한 다음, XTT assay로 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과, KME는 10 µg/ml에서 500 µg/ml의 농도범위에서는 아무런 세포독성을 나타내지 않았으나, 1000 µg/ml 및 2000 µg/ml의 고농도 처리군에서는 세포생존율이 각각 74.32±4.08% 및 45.13±2.44%로 현저하게 감소하였다(Fig. 1). 따라서 500 µg/ml 이하의 농도로 KME를 처리할 경우, Raw 264.7 세포에 독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다.

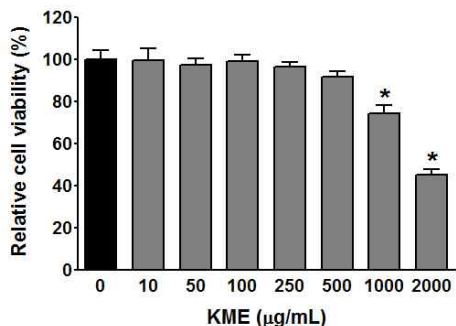


Fig. 1. Effect of KME on cell viability of RAW 264.7 macrophages.

RAW 264.7 cells were incubated with 0, 10, 50, 100, 250, 500, 1000 and 2000 µg/ml of KME for 24 h and their viability assessed by XTT assay. Data represented are means±SD of three independent experiments. * : *p*<0.05 compared with control, respectively.

2. Raw 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO의 생성에 미치는 영향

Raw 264.7 세포에서 KME의 항염증 효능을 검

토하기 위하여 LPS(100 ng/ml)로 유도된 NO 생성량에 대한 효능을 관찰하였다. 그 결과, 아무런 처리도 하지 않은 대조군(3.81±0.72 µM)에 비해 LPS 단독 처리군(40.60±0.69 µM)에서는 NO의 생성이 현저하게 증가하였다. 반면, KME를 100 µg/ml (22.58±1.54 µM), 250 µg/ml(13.62±0.94 µM), 500 µg/ml (8.39±0.29 µM) 및 1000 µg/ml(5.72±0.75 µM)의 농도로 처리한 실험군에서는 LPS 단독 처리군에 비해 유의성 있는 NO 생성 억제효과를 나타내었다. 이 결과에서 KME는 LPS의 자극에 의한 NO 생성을 농도의존적으로 감소시켰으며, 특히 세포독성을 나타내지 않는 500 µg/ml의 농도로 처리한 실험군에서는 거의 정상군과 유사한 수준을 나타내었다(Fig. 2). 따라서 KME는 LPS의 자극을 받은 Raw 264.7 세포로부터 분비되는 NO를 효과적으로 저해함을 알 수 있었다.

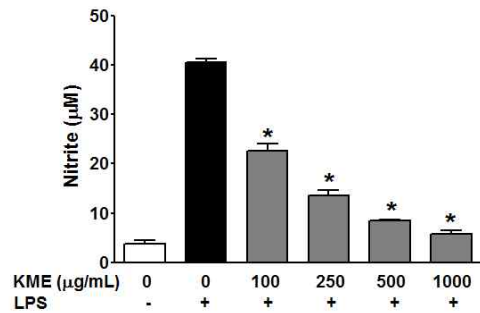


Fig. 2. Inhibition effects of KME on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were incubated with 0, 100, 250, 500 and 1000 µg/ml KME with 100 ng/ml of LPS for 24 h and their NO production levels were assessed by nitrite assay. The values are means±SD of at least three independent experiments. * : *p*<0.05 compared with LPS-treated alone, respectively.

3. Raw 264.7 세포에서 염증매개물질의 mRNA 발현에 대한 효능

KME의 항염증 효능을 보다 구체적으로 검토하기 위하여 RAW 264.7 세포를 LPS(100 ng/ml)로 자극한 다음, IL-1β, IL-6, COX-2 및 iNOS와 같

은 염증반응 매개물질들의 mRNA 발현에 대한 KME의 저해효과를 RT-PCR법으로 검토하였다. 그 결과, LPS의 자극에 의해 IL-1 β , IL-6, COX-2 및 iNOS의 mRNA 발현이 증가되었으며, 이러한 발현 증가는 KME(500 μ g/ml)의 처리로 인해 감소되었다. 특히, KME는 LPS로 유도된 iNOS의 mRNA 발현을 거의 정상군 수준으로 회복시킴을 알 수 있었다. 따라서 KME는 RAW 264.7 세포에서 IL-1 β , IL-6 및 COX-2와 같은 염증매개물질의 발현 저해를 통해 항염증 효능을 나타내며, 특히 iNOS의 발현을 강하게 억제함으로써 LPS의 자극에 의한 NO의 생성을 효과적으로 억제함을 알 수 있었다(Fig. 3).

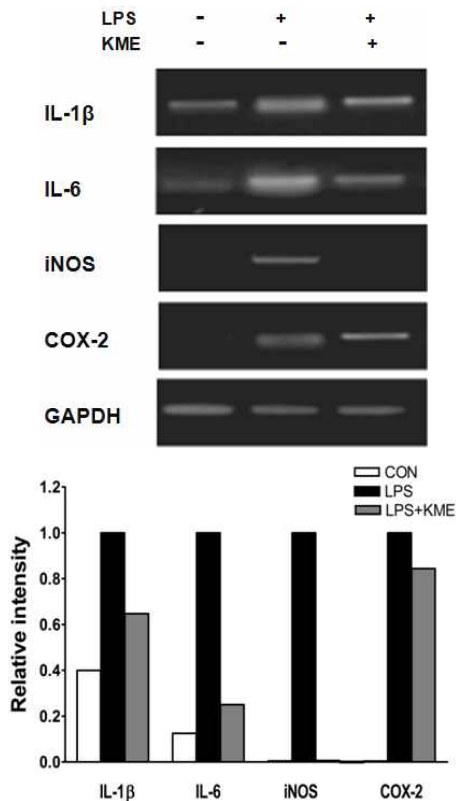


Fig. 3. Effect of KME on LPS-induced mRNA expression of pro-inflammatory mediators in Raw 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were stimulated with LPS(100 ng/ml) and with or without KME(500 μ g/ml). To determine of LPS-induced IL-1 β , IL-6,

COX-2 and iNOS expression, total RNA were harvested for cDNA synthesis. The synthesized cDNA was amplified by polymerase chain reaction with the special primers.

4. C6 신경교종 세포에 대한 세포독성 검토

C6 신경교종 세포에 대한 농도별 KME의 세포독성을 검토하기 위하여 XTT assay로 세포생존율을 측정하였다. 그 결과, KME를 처리하지 않은 대조군에서는 100.0 \pm 3.14%의 세포생존율을 보였으나, KME를 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 150 μ g/ml, 200 μ g/ml, 250 μ g/ml, 300 μ g/ml, 350 μ g/ml, 400 μ g/ml, 450 μ g/ml 및 500 μ g/ml의 농도로 처리한 실험군에서는 각각 117.5 \pm 13.40%, 123.0 \pm 14.95%, 121.0 \pm 12.83%, 116.7 \pm 11.93%, 112.8 \pm 9.74%, 109.6 \pm 5.66%, 109.3 \pm 11.86%, 105.4 \pm 5.65%, 106.2 \pm 2.91% 및 98.79 \pm 4.14%의 세포생존율을 나타내었다. 이상의 결과에서 KME를 50 μ g/ml에서 500 μ g/ml의 농도범위로 처리한 실험군 모두에서 정상군과 유사한 수준의 세포생존율을 보여 유의할 만한 세포독성을 관찰할 수 없었다(Fig. 4). 따라서 KME를 500 μ g/ml 이하로 처리할 경우 C6 신경교종 세포에 대해 직접적으로 세포사멸을 유도하지 않음을 알 수 있었다.

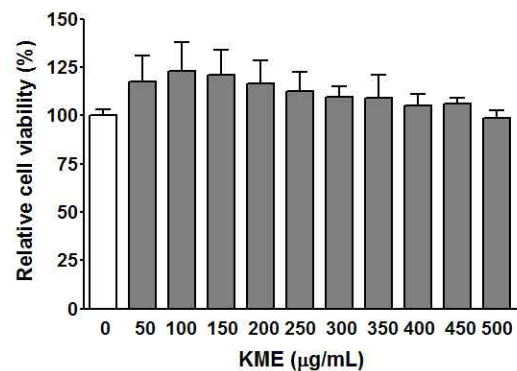


Fig. 4. Effect of KME on cell viability of C6 glioma cells.

C6 cells were incubated with 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 μ g/ml of KME for 24 h and their viability assessed by XTT assay. Data represented are means \pm SD of three independent experiments.

5. 혈청으로 유도된 C6 신경교종 세포의 증식에 미치는 영향

FBS로 유도된 C6 신경교종 세포의 증식에 미치는 KME의 영향을 검토하기 위하여 혈청 무첨가군(FBS-), 혈청 단독 첨가군(FBS+)에 대한 세포 생존율을 XTT assay로 비교 관찰하였다. 그 결과, 혈청 무첨가군에서는 세포생존율이 100.00±13.84%로 나타났으나, 혈청 단독 첨가군에서는 167.90±9.80%로 현저하게 증가하였다. 반면, KME를 10 µg/ml, 100 µg/ml, 1000 µg/ml 및 4000 µg/ml의 농도로 처리한 실험군에서는 세포생존율이 각각 152.90±10.58%, 145.6±13.71%, 141.0±4.83% 및 115.7±3.67%로 나타나, 혈청 첨가에 의해 증가된 세포증식이 농도 의존적으로 감소되는 경향을 보였다. 특히, KME를 1000 µg/ml 및 4000 µg/ml의 농도로 처리한 실험군에서 혈청 단독 첨가군에 비해 유의성 있는 세포증식 억제효과를 나타내었다(Fig. 5).

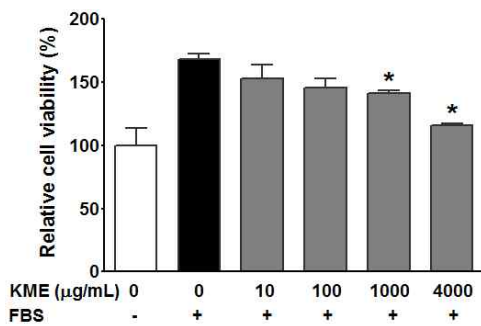


Fig. 5. Effect of KME on FBS-induced cell proliferation of C6 glioma cells.

C6 cells were incubated with 0, 10, 100, 1000 and 4000 µg/ml of KME for 24 h and their viability assessed by XTT assay. Data represented are means±SD of three independent experiments. * : $p < 0.05$ compared with FBS-treated alone, respectively.

6. Scratch-wound assay를 이용한 C6 신경교종 세포 이주억제 활성

C6 신경교종 세포의 이주에 미치는 KME의 영향을 규명하기 위하여 scratch-wound assay를 이용해 24시간 동안 wound healing의 정도를 관찰하였

다. 현미경 사진에서 조밀하게 단층으로 배양된 점선 외부의 세포들은 24시간 동안 피펫 팁으로 scratch를 가해 세포를 제거한 점선 내부로 점차적인 이주 현상을 보인다(Fig. 6A). 그 결과, 혈청만을 처리한 실험군에서는 24시간 후에 세포의 이주가 현저하게 증가(100±4.88%)하였으나, KME를 200 µg/ml (76.60±3.20%) 및 500 µg/ml(62.77±3.69%)의 농도로 처리한 실험군에서는 혈청으로 유도된 C6 신경교종 세포의 이주가 현저하게 억제되었다(Fig. 6B).

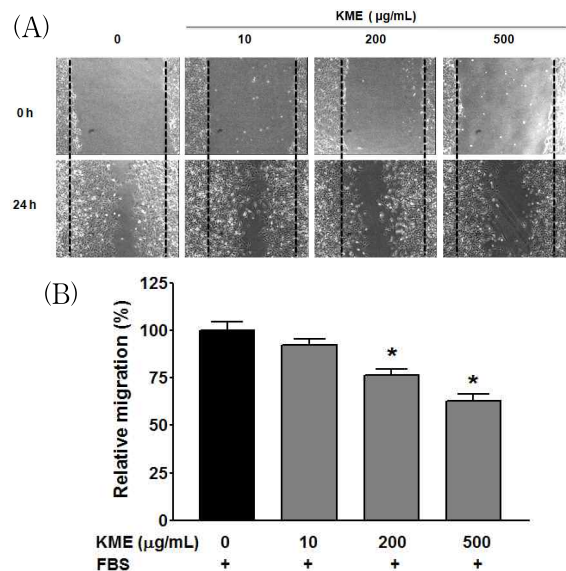


Fig. 6. Inhibition effect of KME on serum-induced C6 migration using the scratch-wound assay.

(A) Photographs of scratch-wound assay showed that serum-induced C6 cell migration could be inhibited by treatment with KME. (B) The graph indicated the relative migration ratio, it was obtained by analyzing scratch-wound healing distance. Data represented are means±SD. * : $p < 0.05$ compared with FBS-treated alone, respectively.

7. Boyden chamber assay를 이용한 C6 신경교종 세포 이주억제 활성

KME가 혈청으로 유도된 C6 신경교종 세포의 이주에 대하여 억제 활성을 나타내는지보다 명확히 규명하고자 Boyden chamber에 세포를 주입하고, 3시간 동안 배양한 다음, polycarbonate membrane을

통과하여 이주가 일어난 세포만을 염색한 후 현미경으로 관찰하였다. 혈청 무처리군(FBS-)에서 일어난 세포의 이주를 100%로 보았을 때, 혈청 단독 처리군(FBS+)에서는 이주된 세포가 현저하게 증가(293.90±4.29%)하였다. 반면, 혈청으로 유도된 C6 신경교종 세포의 이주는 농도별 KME 처리에 의해 억제되었다(Fig. 7A). 특히 KME를 200 µg/ml(93.94±21.43%) 및 500 µg/ml(57.58±12.86%)의 농도로 처리한 실험군에서 유의성 있는 세포 이주억제 효과를 나타내었다(Fig. 7B). Boyden chamber assay에서 나타난 KME의 신경교종 세포에 대한 이주억제 활성은 scratch-wound assay(Fig. 6)의 결과와 동일한 경향성을 보여주었다.

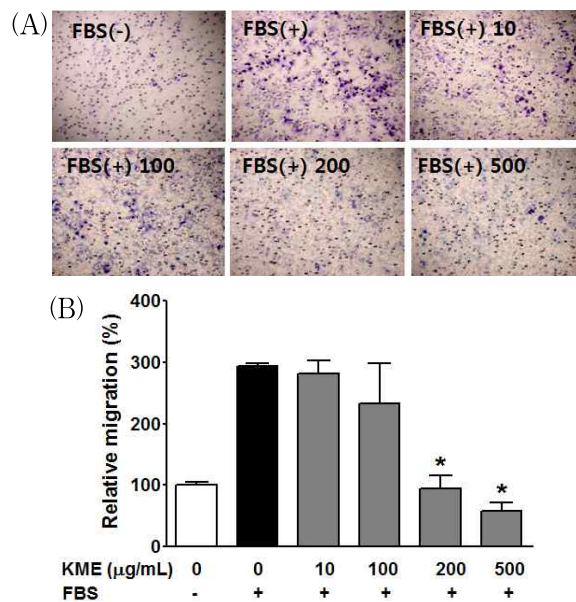


Fig. 7. KME inhibits serum-induced C6 glioma cell migration.

(A) Representative photographs of Boyden chamber assay showed that KME inhibited serum-induced migration of C6 cells. (B) The graph showed that relative migration ratio could be inhibited by treatment with KME. Data represented are means±SD of three independent experiments. * : $p < 0.05$ compared with FBS-treated alone, respectively.

8. C6 신경교종 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성에 대한 저해 활성

C6 신경교종 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성량에 미치는 KME의 영향을 nitrite assay로 관찰하였다. C6 신경교종 세포에 농도별 KME를 전처리하고, NO의 생성을 유도하기 위해 LPS(100 ng/ml)를 처리하였다. 그 결과, 아무런 처리도 하지 않은 대조군(10.02±2.15 µM)에 비해 LPS 단독 처리군(21.39±4.16 µM)에서 NO의 생성이 현저하게 증가하였다. 반면, KME를 10 µg/ml(13.94±0.24 µM), 100 µg/ml(12.04±0.25 µM), 200 µg/ml(11.43±0.01 µM) 및 500 µg/ml(10.82±0.11 µM)의 농도로 처리한 실험군에서는 LPS 단독 처리군에 비해 NO 생성량이 유의성 있게 감소하였다. 따라서 LPS의 자극을 받은 C6 신경교종 세포는 NO를 과다 생성하였으며, KME 처리는 LPS로 유도된 NO 과다 생성을 억제함을 알 수 있었다(Fig. 8).

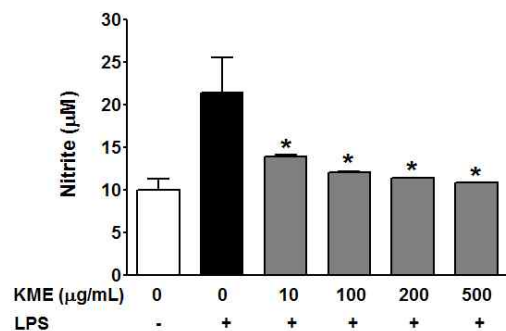


Fig. 8. Inhibition effects of KME on NO production in LPS-stimulated C6 glioma cells.

C6 cells were incubated with 0, 10, 100, 200 and 500 µg/ml of KME with 100 ng/ml of LPS for 24 h and their NO production levels were assessed by nitrite assay. The values are means±SD of at least three independent experiments. * : $p < 0.05$ compared with LPS-treated alone, respectively.

9. C6 신경교종 세포에서 iNOS 및 PKC 단백질 발현에 미치는 영향

Fig. 8에서 KME는 LPS의 자극을 받은 C6 신경교종 세포로부터 생성된 NO를 현저하게 억제하였

으므로, 이러한 결과가 iNOS의 발현을 저해함에 기인했을 것으로 판단되어 본 실험에서는 단백질 수준에서 확인해 보았다. 그 결과, 아무런 처리도 하지 않은 대조군에 비해 LPS 단독 처리군에서 iNOS의 발현이 강하게 증가하였다. 반면, KME 처리군에서는 LPS로 유도된 iNOS의 발현 정도가 감

소하였다. 이 결과로부터 KME가 PKC 경로를 통해 iNOS를 저해하는지를 확인하기 위하여, LPS로 C6 신경교종 세포를 자극한 다음, 단백질을 회수하여 발현분석을 하였다. 그 결과, LPS의 처리로 인해 PKC의 발현이 증가하였으나, KME 처리로 인해 PKC 발현이 저해됨을 확인할 수 있었다(Fig. 9).

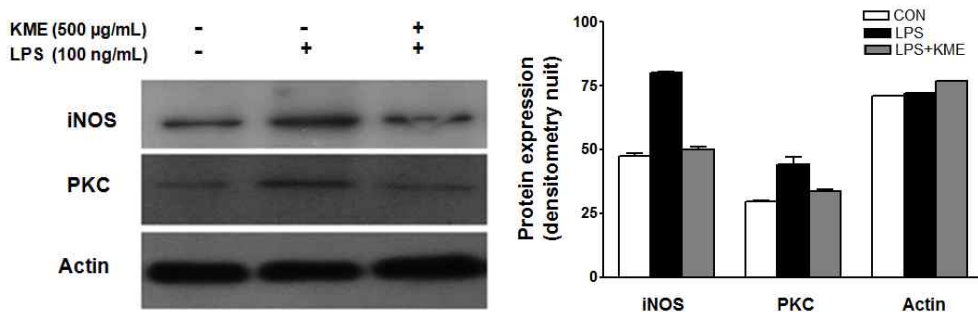


Fig. 9. Effects of KME on LPS-induced iNOS and PKC protein expression.

C6 glioma cells were stimulated by 100 ng/ml of LPS, and each conditions(control, LPS alone, LPS with 500 µg/ml of KME) were incubated for 24 h. Western blot analysis showed that the protein expression of iNOS and PKC.

10. C6 신경교종 세포에서 MAP kinase 발현에 미치는 영향

이전의 결과에서 LPS로 유도된 C6 신경교종 세포로부터 분비된 NO의 생성 증가는 KME 처리로 감소하였으며, 이는 PKC 활성화저해를 통해 iNOS의 발현을 억제함에 기인함을 알 수 있었다. 이와 같은 작용 경로에 대한 보다 구체적인 검토를 위해 C6 신경교종 세포에 LPS를 처리한 다음, ERK, JNK 및 p38을 포함한 MAP kinase의 인산화(phosphorylation)에

미치는 KME의 영향을 관찰하였다. 그 결과, KME는 JNK와 p38 단백질 인산화에는 크게 영향을 미치지 않았으나, LPS의 처리로 인해 ERK의 인산화는 크게 증가시켰으며, KME는 이러한 발현 증가를 강하게 억제하였다(Fig. 10).

이상의 결과를 통해 C6 신경교종 세포에서 LPS로 유도된 iNOS 발현을 KME가 저해한 것은 PKC와 p-ERK를 통한 염증성 신호전달경로를 억제하기 때문임을 확인할 수 있었다.

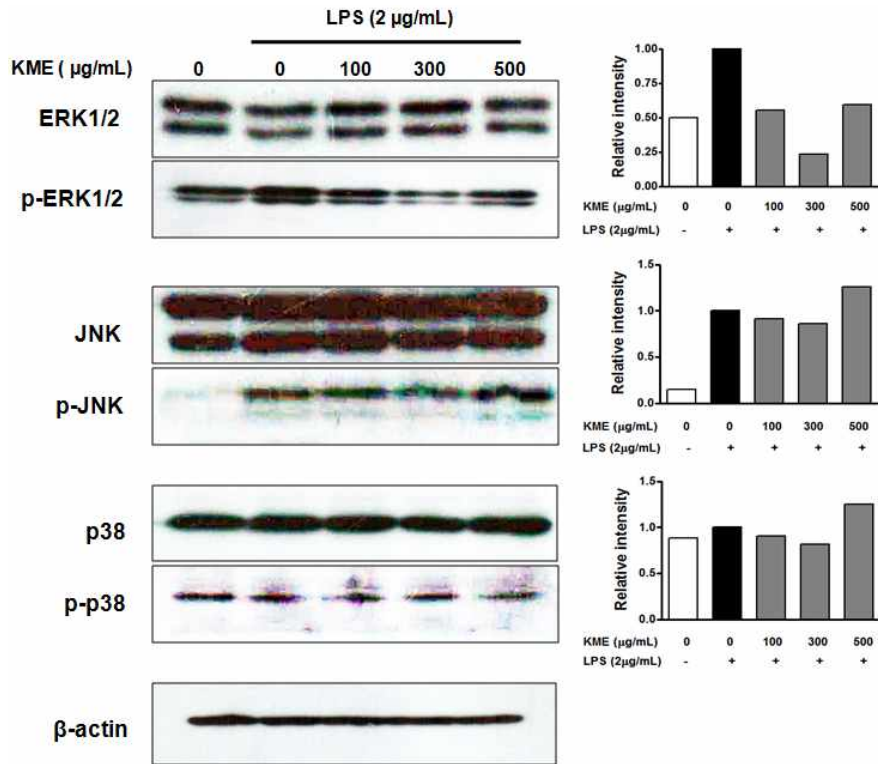


Fig. 10. Effects of KME on LPS-induced MAPK activation in C6 glioma cells.

C6 cells were stimulated by 2 μg/ml of LPS, and each conditions(control, LPS alone, LPS with 100, 300 and 500 μg/ml of KME) were incubated. Western blot analysis showed that the protein expression of ERK, JNK and p38.

IV. 고찰

겨우살이는 겨우살이과(Loranthaceae)에 속한 常綠 寄生 小灌木인 겨우살이의 帶葉莖枝로 桑寄生(뽕나무겨우살이, *Loranthus parasiticus* Merr.)과 槲寄生(겨우살이, *Viscum album* L. var. *coloratum* Ohwi)으로 구분하며, 우리나라에 자생하는 겨우살이는 대부분 槲寄生으로 참나무, 팽나무, 물오리나무, 밤나무, 자작나무 등에 기생한다^{24,26,36}. 두 약물간의 효능은 유사하나, 한의학 고전에서는 주로 桑寄生에 대하여 기술하고 있으며, 최초 기재로 神農本草經³⁷에서는 “桑上寄生 味苦平 主腰痛 小兒背強 癰腫 安胎 充肌膚 堅髮齒 長鬚眉”라고 하였다. 肝·腎經으로 歸經하며, 임상에서는 주로 祛風濕 舒筋

活絡의 효능으로 風濕痺痛을 다스리고, 補肝腎 強筋骨하여 肝腎不足으로 인한 腰膝痠痛 등에 응용한다. 또한 筋骨, 血脈, 皮膚를 충실하게 하며, 방광암, 자궁경부암, 폐암, 임파육종, 횡문근육종, 골육종 등의 癰腫 치료에도 활용되고 있다²⁴⁻²⁸.

이러한 겨우살이의 항암요법에 대하여 서양에서는 1920년대 독일 의학자 Rudolf Steimer에 의해 개발되어 유럽지역을 중심으로 임상에 활용되고 있으며, 항암과 관련한 약리학적 활성 연구와 유효 성분 분리를 통해 주사제 형태로 개발되어 단독으로 종양의 임상치료에 사용되거나 방사선 요법 및 항암제와 병용되고 있다²⁹. 국내에서도 한국산 겨우살이에 대한 관심이 높아지면서 본 약물의 약리적 활성 규명에 관한 연구가 활발히 이루어져 항산화

효과³⁸, DNA 손상방어³⁹, 항돌연변이⁴⁰, 면역증강⁴¹, 신경세포보호⁴², 혈압강하 및 혈청지질 개선효능⁴³ 등이 규명되었다. 특히 항종양 작용과 관련해서는 한국산 겨우살이로부터 분리 정제된 렉틴의 항암 활성에 대한 실험적 연구를 통해 암세포 증식억제⁴⁴, 종양전이 억제⁴⁵, 암세포 사멸유도⁴⁶ 및 신생혈관 억제 활성⁴⁷ 등이 규명되었으며, 실험적 동물 종양 모델에서는 간암³⁰, 피부암³⁴ 및 폐암³⁵ 등에 유효하다는 보고를 접할 수 있었다. 또한 한국산 겨우살이를 원료로 약침제제가 개발될 경우 유럽산 겨우살이 제제에 비해 우수하고도 경제적인 암치료제로 활용될 가능성을 제시한 연구보고²⁹와, 한방에서의 간암 세포주에 대한 항암효과³¹, 세포분열과 관련유전자 발현³² 및 신생혈관인자 발현에 미치는 영향³³ 등에 대한 실험보고는 확인할 수 있었으나, 뇌종양세포에 대해 이주저해 활성을 통한 암의 진행 억제 방지를 목적으로 접근한 실험적 연구는 이루어진 바 없다.

이에 본 연구에서는 槲寄生(한국산 겨우살이)을 증류수로 전탕한 다음 알콜 침전법을 이용해 추출물을 조제해, 신경교종 치료제 혹은 종양의 악화 방지제로서의 개발 가능성을 검토하였다. 먼저 RAW 264.7 세포를 이용해 항염증 효능을 확인한 바, KME는 LPS의 자극에 의한 IL-1 β , IL-6 및 COX-2와 같은 염증매개물질의 mRNA 발현을 저해하였으며, 특히 iNOS의 발현을 현저하게 억제함으로써 LPS의 자극에 의한 NO의 생성을 효과적으로 감소시켜 본 약물이 우수한 항염증 효능을 지녔음을 알 수 있었다.

이 결과를 바탕으로 C6 신경교종 세포의 증식에 대한 억제능과 암세포 이주에 대한 저해능을 관찰하고, 그 기전을 이해하기 위하여 NO 생성 억제효과와 iNOS 및 PKC 단백질 발현에 대한 효능을 분석하였다.

먼저 C6 신경교종 세포 증식에 대한 혈청과 KME의 영향을 XTT assay로 측정한 결과, 혈청 무첨가군에 비해 혈청 첨가군에서 세포의 증식이 현저하게 증

가하였으나, KME의 처리로 인해 현저한 감소를 나타내었다. 이 결과에서 고농도의 KME(4000 μ g/ml)를 처리하더라도 세포 생존율이 100%에 근접하여 본 약물이 세포독성 보다는 암세포 증식억제 효능에 대한 가능성을 확인할 수 있었다.

XTT assay의 결과를 바탕으로 KME의 암세포 이주 저해능을 평가하기 위하여 scratch-wound assay와 Boyden chamber assay를 통해 검토하였다. 그 결과, 혈청 첨가로 인해 신경교종 세포의 이주가 현저하게 증가하였고, KME는 혈청으로 유도된 세포 이주를 강하게 억제하였다. 따라서 다른 장기로의 전이는 거의 일어나지 않으면서, 주변 뇌조직으로의 이주와 침윤, 그리고 신속한 성장이 문제시되는 신경교종의 특징¹⁻⁵상, 본 약물이 암세포의 이주를 저해함으로써 종양의 악성 진행 과정을 차단할 수 있음을 시사하였다.

이에 KME의 암세포 이주 저해 활성을 보다 구체적으로 규명하기 위하여, C6 신경교종 세포를 LPS로 자극함으로써 NO 과다 생성과 iNOS의 과발현을 유도한 다음, 본 약물의 효능을 검토하였다. 과다 발현된 iNOS와 이로 인해 과다 생성된 NO는 발암, 세포이주 및 침윤을 야기하고¹⁴⁻¹⁶, 정상세포의 변형과 신생혈관 형성을 통해 뇌종양, 유방암 및 폐암 등의 악성 진행에 관여하며, 특히 뇌종양에서 iNOS의 높은 발현이 관찰되어지는 것으로 알려져 있다^{21,48}. 본 연구 결과, LPS의 자극을 받은 신경교종 세포에서 iNOS의 발현과 NO의 생성이 크게 증가하였으며, KME는 LPS로 유도된 iNOS 단백질 발현 및 NO 생성을 현저하게 억제하였다. 따라서 다양한 종류의 암세포, 특히 뇌종양에서 iNOS가 높게 발현된다는 점을 감안할 때, KME는 iNOS의 과발현을 억제함으로써 NO 과다 생성을 차단해 뇌종양 세포가 주변 정상 조직으로 이주되는 과정을 억제하고, 이로 인해 결국 뇌종양의 악성 진행을 방지할 수 있을 것으로 판단된다.

한편, PKC는 암세포의 이주에 결정적 인자로 작용하며¹⁷⁻¹⁹, 특히 LPS의 자극으로 유도된 C6 신

경교종 세포에서의 iNOS 과발현 및 NO 생성 증가는 PKC 단백질이 매개하는 신호 전달 과정을 통해 일어나는 것으로 알려져 있다²¹⁻²³. 따라서 본 연구에서는 PKC 단백질 발현에 대한 KME의 영향을 검토함으로써 암세포 이주억제 기전을 보다 심도있게 규명하고자 하였다. 그 결과, LPS의 자극을 받은 신경교종 세포에서 PKC 단백질 발현이 증가하였고, KME는 LPS로 유도된 PKC 단백질 발현을 억제하였다.

KME의 작용 경로를 구체적으로 검토하고자 C6 신경교종 세포에 LPS를 처리한 다음, ERK, JNK 및 p38을 포함한 MAP kinase의 인산화에 미치는 영향을 관찰한 결과, KME는 주로 LPS로 유도된 ERK의 인산화를 강하게 저해함을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합하면 KME는 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성 및 iNOS 발현을 억제함으로써 강한 항염증 효능을 나타내었으며, C6 신경교종 세포에서는 혈청으로 유도된 암세포 이주를 현저하게 저해하였다. 또한 KME는 C6 신경교종 세포에서도 염증매개물질인 NO 생성 및 iNOS 발현을 저해하였으며, 이는 PKC와 p-ERK의 염증성 신호전달경로의 발현증가를 저해함에 기인한 작용임을 확인할 수 있었다. 따라서 KME는 신경교종 세포에 대하여 직접적인 세포사멸을 유도하기 보다는, 신경교종의 특징인 인근 주위 조직으로의 이주 과정을 차단할 가능성이 높으며, 향후 암환자의 생존율과 삶의 질 향상에 기여할 새로운 암치료제로서의 개발 가능성이 시사되었다.

V. 결론

槲寄生(한국산 겨우살이)의 항암효과를 알아보기 위하여 RAW 264.7 대식세포를 이용해 항염증 효능을 확인하고, 흰쥐 C6 신경교종 세포를 대상으로 세포성장 및 증식에 대한 영향과 세포 이주 저해 활성을 검토하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

槲寄生 추출물은 RAW 264.7 세포에서 LPS로

유도된 iNOS의 과발현과 NO의 과다 생성을 억제함으로써 강한 항염증 효능을 나타내었다. 또한 혈청으로 유도된 C6 신경교종 세포의 증식과 암세포 이주를 저해하였으며, LPS로 유도된 PKC 및 p-ERK 단백질 발현을 억제함으로써 iNOS의 과발현과 NO의 과다 생성을 억제하였다. 따라서 槲寄生은 신경교종 세포에 대하여 직접적인 세포사멸을 유도하기 보다는 주위 정상조직으로의 암세포 이주를 저해함으로써 신경교종의 악성 진행을 방지할 수 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Aoki H, Kakinuma K, Morita K, Kato M, Uzuka T, Igor G, et al. Therapeutic efficacy of targeting chemotherapy using local hyperthermia and thermosensitive liposome: evaluation of drug distribution in a rat glioma model. *Int J Hyperthermia* 2004;20(6):595-605.
2. An YL, Nie F, Wang ZY, Zhang DS. Preparation and characterization of realgar nanoparticles and their inhibitory effect on rat glioma cells. *Int J Nanomedicine* 2011;6:3187-94.
3. Amberger VR, Hensel T, Ogata N, Schwab ME. Spreading and migration of human glioma and rat C6 cells on central nervous system myelin in vitro is correlated with tumor malignancy and involves a metalloproteolytic activity. *Cancer Res* 1998;58(1):149-58.
4. Bello L, Giussani C, Carrabba G, Pluderi M, Costa F, Bikfalvi A. Angiogenesis and invasion in gliomas. *Cancer Treat Res* 2004;117:263-84.
5. Yoo CH, Lee U, Kim YB, Kang DS, Park CW, Yoo YM. Effect of tamoxifen in C6 glioma cells. *J Korean Neurosurg Soc* 1997;26:5-10.
6. Agudelo-Garcia PA, De Jesus JK, Williams SP, Nowicki MO, Chiocca EA, Liyanarachchi S, et

- al. Glioma cell migration on three-dimensional nanofiber scaffolds is regulated by substrate topography and abolished by inhibition of STAT3 signaling. *Neoplasia* 2011;13(9):831-40.
7. Lamszus K, Kunkel P, Westphal M. Invasion as limitation to anti-angiogenic glioma therapy. *Acta Neurochir Suppl* 2003;88:169-77.
 8. Deininger MH, Weller M, Streffer J, Mittelbronn M, Meyermann R. Patterns of cyclooxygenase-1 and -2 expression in human gliomas in vivo. *Acta Neuropathol* 1999;98(3):240-4.
 9. Kato S, Esumi H, Hirano A, Kato M, Asayama K, Ohama E. Immunohistochemical expression of inducible nitric oxide synthase(iNOS) in human brain tumors: relationships of iNOS to superoxide dismutase(SOD) proteins(SOD1 and SOD2), Ki-67 antigen(MIB-1) and p53 protein. *Acta Neuropathol* 2003;105(4):333-40.
 10. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994;120:227-37.
 11. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:7162-6.
 12. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Bátkai S, Kashiwaya Y, Haskó G, Liaudet L, et al. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;296:466-83.
 13. Enukidze MG, Machavariani MG, Intskirveli NA, Bezhitashvili ND, Sanikidze TV. Cell death in Jurkat cells induced by oxygen/nitrogen stress. *Georgian Med News* 2009;167:109-13.
 14. Singh S, Gupta AK. Nitric oxide: role in tumour biology and iNOS/NO-based anticancer therapies. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011;67:1211-24.
 15. Pratheeshkumar P, Kuttan G. Nomilin inhibits tumor-specific angiogenesis by downregulating VEGF, NO and proinflammatory cytokine profile and also by inhibiting the activation of MMP-2 and MMP-9. *Eur J Pharmacol* 2011;668:450-8.
 16. Kostourou V, Cartwright JE, Johnstone AP, Boulton JK, Cullis ER, Whitley G, et al. The role of tumour-derived iNOS in tumour progression and angiogenesis. *Br J Cancer* 2011;104:83-90.
 17. Lin WL, Liang WH, Lee YJ, Chuang SK, Tseng TH. Antitumor progression potential of caffeic acid phenethyl ester involving p75(NTR) in C6 glioma cells. *Chem Biol Interact* 2010;188:607-15.
 18. Liu SG, Wang BS, Jiang YY, Zhang TT, Shi ZZ, Yang Y, et al. Atypical protein kinase C ϵ (PKC ϵ) promotes metastasis of esophageal squamous cell carcinoma by enhancing resistance to Anoikis via PKC ϵ -SKP2-AKT pathway. *Mol Cancer Res* 2011;9:390-402.
 19. Wang J, Wu J, Hong J, Chen R, Xu K, Niu W, et al. PKC promotes the migration of colon cancer cells by regulating the internalization and recycling of integrin α v β 6. *Cancer Lett* 2011;311:38-47.
 20. Hu JG, Wang XF, Zhou JS, Wang FC., Li XW, Lü HZ. Activation of PKC- α is required for migration of C6 glioma cells. *Acta Neurobiol Exp* 2010;70:239-45.
 21. Lee KG, Cho HJ, Bae YS, Park KK, Choe JY, Chung IK, et al. Bee venom suppresses LPS-mediated NO/iNOS induction through inhibition of PKC- α expression. *J Ethnopharmacol* 2009;123:15-21.
 22. Lin TH, Kuo HC, Chou FP, Lu FJ. Berberine

- enhances inhibition of glioma tumor cell migration and invasiveness mediated by arsenic trioxide. *BMC Cancer* 2008;8:58.
23. Wen J, Ribeiro R, Zhang Y. Specific PKC isoforms regulate LPS-stimulated iNOS induction in murine microglial cells. *J Neuroinflammation* 2011;8:38.
24. Lee YN. New Flora of Korea. Seoul: Kyo-Hak Publishing Co., Ltd.; 2006, p. 261.
25. Heo J. Dong-eui-bo-gam. Seoul: Bupin Publishing Co., Ltd.; 2007, p. 2010.
26. The Herbal medicine compilation committee of Oriental medicine college. Herbal medicine. Seoul: Younglim Publishing; 2006, p. 331-3.
27. Dae SM. Hang-am-joong-cho-yak. Taipei: Kye-up-seogook-youhan-gongsa; 1983, p. 222-4.
28. State Administration of Traditional Chinese medicine. Joong-hwa-bon-cho. Shanghai: Sang-hae science technique Publishing; 2005, p. 605-10.
29. Choi OB. The importance of clinical mistletoe cancer therapy and korean mistletoe pharmacopuncture preparation development and application possibility for oriental medicine. *J of Korean Pharmacopuncture Institute* 2009;12(1):77-89.
30. Kim MJ, Lee MS, Kim JH. Effect of Korean mistletoe extract and lectin on the preneoplastic hepatic lesion and apoptosis in experimental hepatocarcinogenesis. *J of Korean Society Food Science and Nutrition* 2002;31(5):782-7.
31. Kim SU, Kim BR, Heo K, Lim SW. Comparative Study of Korean *Mistletoe Lectin* and Bee Venom on the Anti-Cancer Effect and Its Mechanisms of Action in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Korean J Orient Int Med* 2009;30(4):845-57.
32. Rhew KY, Kim YC, Lee JH, Woo HJ. The Effects of *Loranthus parasiticus Merr.* on Cell Cycle and Expression of Related Genes in HepG2 Cell. *Korean J Orient Int Med* 2005; 26(1):60-73.
33. Kim JK, Kim YC, Lee JH, Woo HJ. The Effects of *Artemisiae Capillaris Herba, Curcumae Rhizoma, Loranthi Ramulus, and Orostachys Herba* on Expression of Angiogenic Factors in HepG2 Cells. *Korean J Orient Int Med* 2007;28(1):149-65.
34. Yang EY, Yeo JH, Jin JY, Kim HS, Park WB, Suh JJ, et al. Anti-tumor effect of Korean mistletoe extract intensified with mistletoe lectin against melanoma cells in vitro and in vivo. *Korean J of Pharmacognosy* 2003;34(3):218-22.
35. Yoon TJ, Park SM, Yang SH, Jung HY, Lee AN, Yoo YC, et al. In Vivo toxicity and anti-tumor activity of Korean mistletoe extracts. *Korean J of Pharmacognosy* 2009;40(3):205-12.
36. Korea Food & Drug Administration. Korean Herbal medicine Standards exclusive of Pharmacopoeia. Seoul: Shinilbooks Publishing; 2007, p. 46.
37. Uisung-Dang editorial department. Shin-nong-bon-cho-kyeong. Seoul: Uisung-Dang Publishing; 2012, p. 210.
38. Kim BK, Choi MJ, Park KY, Cho EJ. Protective effects of Korean mistletoe lectin on radical-induced oxidative stress. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2010;33(7):1152-8.
39. Lee SJ, Lee MK, Choi GP, Kim NY, Roh SK, Heo MY, et al. Inhibitory effect of Korean mistletoes on the oxidative DNA damage. *Korean J of Medicinal Crop Science* 2003;11(2):89-96.
40. Ham SS, Kang ST, Choi KP, Park WB, Lee DS. Antimutagenic effect of Korean mistletoe extracts. *J of Korean Society Food Science and Nutrition* 1998;27(2):359-65.
41. Lee CH, Kim JK, Kim HY, Park SM, Lee SM. Immunomodulating effects of Korean mistletoe

- lectin in vitro and in vivo. *International Immunopharmacology* 2009;9:1555-61.
42. Lee JH, Cho SO, Ban JY, Song KS, Seong YH. Neuroprotective effect of Korean mistletoe extract against damage induced by hydrogen peroxide in cultured rat cortical neurons. *Korean J of medicinal crop science* 2007;15(2):105-11.
 43. Kim HS. Effects of the Korean mistletoe hot-water extract on the lipid components and blood pressure level in spontaneously hypertensive rats. *Korean J of Pharmacognosy* 2006;37(3):169-76.
 44. Seo JH, Choi YH, Kim JS, Kim SK, Choi SU, Kim YS, et al. Active principles of the methanol extract of Korean mistletoe responsible for the inhibitory effect on the proliferation of human tumor cell lines. *Korean J of Pharmacognosy* 2004;35(2):134-8.
 45. Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Lee KH, Kwak JH, Baek YJ, et al. Fermented extracts of Korean mistletoe with lactobacillus(FKM-110) stimulate macrophage and inhibit tumor metastasis. *Korean J of Food Science and Technology* 1999;31(3):838-47.
 46. Choi SH, Lyu SY, Park WB. Mistletoe lectin induces apoptosis and telomerase inhibition in human A253 cancer cells through dephosphorylation of Ark. *Archives of Pharmacal Reasearch* 2004; 27(1):68-76.
 47. Park WB, Lyu SY, Kim JH, Choi SH, Chung HK, Ahn SH, et al. Inhibition of tumor growth and metastasis by Korean mistletoe lectin is associated with apoptosis and antiangiogenesis. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 2001;16:439-47.
 48. Muntané J, la Mata MD. Nitric oxide and cancer. *World J Hepatol* 2010;2(9):337-44.