大韓韓方內科學會誌:第18卷 第1號
K.I.M.S. Vol.18, No.1, 1997.

皂角刺의 간암세포주(Hep G2)에 대한 세포독성, Apoptosis 및 NO에 대한 실험

東新大學校 韓醫科大學, 圓光大學校 韓醫科大學*
康城溶 · 趙卿花 · 韓宗鉉* · 趙南根*

Ⅰ. 緖 論

韓醫學에서의 癌은 腫瘤라 表現하며 良性과 惡性으로 分類하고 發病部位에 따라서 病名 또한 瘤, 腫瘍, 癌, 癭瘤, 巖, 癥瘕, 積聚, 瘡 등의 이름을 使用하였으며, 이것이 現代的인 病名인 癌과 類似한 症狀을 나타내었다. 이러한 多樣한 種類의 病名과 함께 나타난 症狀들을 治療하는 方法으로는 多樣한 病因에 따른 治法을 提示하고 있다. 그 중에서 藥은 一般的으로 使用되어온 治療方法이며, 治法은 活血化瘀, 去腐生新, 止痛散結, 氣血雙補 등의 方法을 使用하였다[45,48].

皂角刺는 理氣藥物중 活血化瘀에 속한 豆科植物로서 落葉喬木인 조각자나무 및 주엽나무의 莖枝上의 가시를 乾燥한 것이다. 皂角刺의 性味는 辛, 溫, 無毒하며, 肝과 胃에 歸經하고, 消腫排膿과 治風殺蟲의 效能으로 瘡疽腫毒의 症狀을 治療하는 外科의 常用藥物이다[46].

現代醫學에서 癌의 治療法은 外科的인 手術, 放射線療法, 化學療法 및 免疫療法등 여러가지 方法들이 開發되어 왔지만, 癌種에 따른 感受性, 治療 後의 豫後 및 不作用들이 각기 多樣하게 나타나 治療하기 어려운 疾患으로 알려져 있다[1].

現在 使用되고있는 抗癌劑들은 生體에 대한 毒性이 심하여 正常的인 細胞의 代謝를 크게 抑制하거나, 細胞의 突然變異 및 癌化를 促進할 수 있기 때문에 抗癌劑의 使用에 커다란 障碍로 지적되고 있어, 이러한 問題點을 解決하기 위하여 不作用이 적은 새로운 抗癌劑의 開發에 重點을 두고 硏究가 進行되고 있지만 아직까지 旣存의 抗癌劑를 能駕하고 不作用이 極小化된 癌治療劑는 開發되지 않았다[2].

그동안 進行되어 왔던 抗癌劑의 開發 方法들은 주로 細胞毒性이 强力한 物質을 찾는 것이었지만 最近에는 細胞毒性은 弱하지만 旣存抗癌劑와 併用 投與하여 抗癌性을 增加시키고 不作用을 줄일 수 있는 物質을 찾기위한 努力들을 進行하고 있으며[3,4], 특히 數千年동안 사용되어온 韓方 製劑들중 癌의 治療에 利用되거나 免疫機能을 上昇시키는 藥物들을 골라서 旣存의 抗癌劑와 併用投與 하여 抗癌效果를 增進시키고 不作用을 減少시킬 수 있는 硏究結果들이 많이 報告되고 있다[5-7].

天然物에서 抗癌作用을 얻기 위한 物質을 檢索하는 方法으로는 癌細胞에 直接的인 細胞毒性을 나타내는 天然物을 찾아 溶媒分劃을 통하여 抗癌作用을 나타내는 物質을 分離하여 化學構造를 糾明하는 方法들이 使用되고 있으나 이렇게 分離된 많은 抗癌物質들은 正常細胞에도 細胞毒性을 나타내는 경우가 대부분이기 때문에 抗癌劑로의 開發에 어려움이 많았다. 또한 癌에 效果가 있다고 알려진 天然物들을 癌을 移植한 動物에 直接 投與하여 腫瘍의 크기 및 死亡率을 觀察하는 方法들이 使用되어 많은 天然物들이 癌에 效果가 있다고 알려져 있지만 그 作用機轉은 糾明되지 않았다.

오랫동안 韓醫學에서 癌에 使用되어 왔던

韓藥材들은 直接的인 細胞毒性을 나타내는 경우도 있지만, 대부분의 韓藥材들이 直接的인 細胞毒性 보다는 生體에 대한 多樣한 作用에 의해 그 作用이 發顯될 수 있을 것이라 推定할 수 있다.

따라서 本 實驗에서는 皂角刺의 抗癌作用機轉을 糾明하여 보고자 多樣한 接近 方法을 시도하여 보았으며, 여러가지 癌중에서도 肝癌細胞主(Hep G2)를 選擇하여 實驗하였다.

癌細胞의 增殖이 抑制되는 樣式은 necrosis 및 apoptosis를 생각할 수 있다. Apoptosis는 세포자멸을 뜻하는 用語로서 necrosis(세포괴사)와 對照를 이루는 cell death(세포사)의 樣式으로 알려져 있다. 이러한 apoptosis의 特徵으로서 초기에 핵의 응축, 세포질의 응축, 수포상의 세포돌기 형성등이 관찰되며, 절단된 핵 DNA는 貪食細胞에 의해 除去된다. 이에 반하여 necrosis는 毒性物質이나 산소부족에 의하여 세포막투과성이 亢進되어 細胞內로 물이 들어가서 팽윤되며 mitochodria 내로 Ca^{2+} 유입이 일어나 ATP 生成이 低下되어 에너지 不足의 結果에 의해 細胞死가 일어나는 것으로 알려져 있다. Apoptosis 세포의 핵 chromatin 농축은 DNA의 절단에 起因되는데 각종 細胞로 부터 핵을 단리해서 nuclease를 작용시키면 대략 180-200 base pair의 간격으로 DNA가 切斷된다. 이러한 DNA의 단편화(fragmentation)는 전기영동을 실시하면 계단상(ladder)으로 보이며 이 현상이 apoptosis의 생화학적 특징이다[8-11].

最近 抗癌劑인 camptothecin, etoposide, cisplatin, methotrexate, vincristin 및 doxorubicin등과 放射線 照射에 의해 apoptosis가 誘導되며[12,13], 小柴胡湯이 肝癌細胞의 apoptosis를 促進하고 있음이 報告되었다[14]. 抗癌劑 處理에 의해 일어나는 DNA의 단편화는 핵내 전사 활성화 인자로 알려진 c-myc이 增幅되어 있는 細胞에서는 誘導되지만 c-myc이 增幅되어 있지 않은 細胞에서는 DNA 단편화가 誘導되지 않는 것으로 알려져[15], 癌細胞의 種類에 따라 多樣한 作用이 나타날 수 있음을 示唆하고 있다. In vitro계에서 tumor necrosis factor α가 癌細胞의 apoptosis를 促進하고 있다는 報告는[16], 生體內 腫瘍에서 發見되는 apoptosis는 macrophage에서 分泌되는 각종 cytokine에 의해 일어나거나, cytotoxic T-lymphocyte에 의해 일어나는 것으로 推定할 수 있다[17]. 多樣한 種類의 抗癌劑들은 急速히 增加하는 正常細胞, lymphoid tissues 및 tumor에서 强力한 apoptosis를 일으키며, 이러한 apoptosis는 抗癌劑들의 不作用 및 tumor regression과 關系가 있는 것으로 알려져 있으며[18,19], apoptosis에 의해 抗癌劑의 治療效果가 mediate될 수 있다는 硏究들이 많이 報告되고 있지만[20-21], 抗癌劑의 apoptosis 機轉은 아직 正確히 밝혀지지 않았다.

그러나 cancer chemotherapeutic agents에 의해 癌細胞의 apoptosis가 促進되며[22,23], proto-oncogene 및 p53 gene에 의해 apoptosis가 調節되고 있다는 事實이 밝혀짐으로서[24-26] apoptosis와 癌과의 關系에 대한 關心이 增加하고 있다.

한편 nitric oxide(NO)는 L-arginine에 NO-synthetase (NOS)가 作用하여 生成된다. NOS는 constitutive NOS (cNOS)와 inducible NOS(iNOS) 2 種類가 있으며 cNOS는 vascular endothelium 및 brain에서 iNOS는 活性化된 macrophage 및 여러 細胞에서 發見되었다[27]. 1987년 Hibbs등[28]은 마우스에 BCG 接種 後, macrophage를 分離하여 LPS를 添加하여 培養時 腫瘍細胞의 增殖이 抑制되고, 여기에 N-MMA를 加하면 抗癌作用이 없어진다고 하였다. 이것은 macrophage가 産生하는 NO가 抗癌作用이 있다는 最初의 報告였으며, 여러 刺戟劑에 의해 活性化된 macrophage는 正常細胞보다는 tumor cell을 選擇的으로 破壞할 수 있기 때문에 macrophage-mediated tumor cytotoxicity는 重要한 意味가 있다[29]. 이러한 NO는 生體內에서 癌細胞를 攻擊하여 傷害시키는 癌免疫의 effector로서 역활을 가

지고 있지만, 이 攻擊을 피하는 癌細胞들은 惡性化될 可能性도 示唆되고 있기 때문에 NO의 이면성이라고 불리고 있다[30].

Thomsen등[31]은 BCG 처리 마우스 복강 macrophage는 in vitro에서 抗癌劑인 flavo-8-acetic acid를 添加하여 培養하면 NO를 生成하고, in vivo 實驗에서도 colon38 고형암의 增殖을 抑制한다고 報告하였으며, Kondo등[32]은 GZ를 복강 macrophage에 處理하면 NO를 生成한다고 報告하였다. Albina등[33]은 복강 macrophage에서 生成되는 NO에 의해 apoptosis가 일어나고 있음을 報告하였다. 이러한 報告들은 복강 macrophage에서 分泌되는 NO에 의해 癌細胞의 增殖이 抑制될 수 있음을 示唆하는 것이다.

따라서 本 實驗에서는 조각자의 作用機轉을 糾明하여 보고자 人體 肝癌細胞主인 Hep G2 細胞에 대한 細胞毒性 및 apoptosis 實驗, 마우스 복강 macrophage에서의 nitric oxide의 生成에 대한 影響을 觀察한 結果 약간의 知見을 얻었기에 이에 報告하고자 한다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材 療

1) 實驗 動物

本 實驗에 使用한 마우스는 6~8주령 BALB/c 수컷을 대한 實驗動物에서 購入하여 實驗室에서 2 週日 以上 適應시킨 後 實驗에 使用하였으며, 固形飼料와 물을 자유롭게 攝取게 하였다.

2) 試藥 및 器具

實驗에 使用한 試藥은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DME, Sigma), RPMI 1640(Gibco), fetal bovine serum (FBS, Gibco), trypsin(Gibco), penicillinstreptomycin(Sigma), Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS-A, Sigma), lipopolysaccharide (LPS, Sigma 026: B6), 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphe-nyltetrazoliumbromide(MTT, Sigma), Ficoll-Hypaque(Sigma), thioglycollate (Difco), interferon γ(γ-IFN, Sigma Huv-IFN), sulfanilamide(Sigma), agarose(Katayama), propidium iodide (Sigma), proteinase K (Sigma), ribonuclease A(Sigma), mitomycin C(MMC, Sigma), cisplatin(CPT, Sigma), bromophenol blue (Yakuri pure chemical Co.), lamda DNA Ecor I Hind III digest(Sigma), N-Naphthylethylenediamine 2HCl(Sigma), SYBR™ Green I(FMC Bioproducts) zymosan (Sigma), lucigenin (Sigma)등이며 其他 試藥은 細胞培養用 및 1급 試藥을 使用하였다. 使用器具는 culture flask(Nunc), multi-well plate (96-well, 24-well, Costar), microplate reader(Dynatech MR5000), CO_2 incubator(Vision scientific Co.), DNA electrophoresis kit (Mupid-2), luminometer(Berthold 96LP), flow cytometer (Coulter EPICS-XL), centrifuge(VS-6000 CF), inverted microscope(Nikon Co.), freeze dry apparatus(Labconco), Imagemaster VDS (Pharmacia Biotech)등을 使用하였다.

3) 檢液의 調製

實驗에 使用한 韓藥은 東新大學校 韓方病院에서 使用하는 것을 購入하여 嚴選하여 使用하였다.

* 實驗材料 및 엑스 收得率

Samples	Scientific name	Yield(%)
皂角刺	Gleditsiae Spina	7.0

皂角刺 50g을 蒸溜水 500 ml로 2회 加熱 抽出한 後, 濾過하여 濾液을 rotary evaporator로 濃縮한 다음, freeze dryer로 凍結乾燥하여 粉末을 얻었으며, 動物 實驗時에는 生理食鹽水에

溶解시켜 使用하였고, 細胞實驗時에는 3次 蒸溜水에 溶解시킨 뒤, membrane filter(d 0.45 μm)로 濾過 滅菌하여 使用하였다.

2. 實驗 方法

A. 細胞毒性 實驗

(1) 細胞主 및 培養條件

人體 肝癌 細胞主인 Hep G2 細胞 및 마우스 섬유아 細胞主인 Balb/c 3T3 細胞는 DME 배지를 마우스 흉선, 비장세포 및 macrophage는 RPMI 1640 배지를 使用하였으며, 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100 μg/ml)을 添加하여 使用하였다. Hep G2 細胞 및 Balb/c 3T3 細胞主의 계대배양은 1:10~1:20 비율로 3일 間隔으로 하였으며, 細胞 增殖에 미치는 각 韓藥의 影響을 觀察하기 위한 實驗은 계대배양 2일째의 細胞를 使用하였다.

(2) Hep G2 細胞主의 增殖에 미치는 影響

Hep G2 細胞主의 增殖에 미치는 각 韓藥의 影響을 알아보기 위해 Mosmann[34]이 開發하여 Kotnik등[35]이 變形시킨 MTT방법을 使用하였다.

(3) Hep G2 細胞主의 增殖에 미치는 mitomycin C 및 cisplatin 併用處理 影響

Hep G2 細胞主의 增殖을 50% 抑制할 수 있는 mitomycin C 및 cisplatin 의 濃度(IC_{50})를 구하기 위해 각 well에 細胞를 $2x10^5$ cells/ml로 接種하고 24시간 培養하여 細胞를 附着시킨 後 各 抗癌劑를 多樣한 濃度로 癌細胞主에 處理하여 (2)와 同一한 方法으로 測定하여 IC_{50} 을 計算하였다. Hep G2 細胞主에 미치는 각 韓藥엑스와 抗癌劑의 併用處理 影響을 알아보기 위해 각 well에 細胞를 $2x10^5$ cells/ml 濃度로 接種하고 24시간 培養하여 細胞를 附着시킨 後 각 韓藥 엑스를 1, 10 및 100 μg/ml와 抗癌劑의 IC_{50} 濃度를 附着된 細胞에 處理하여 (2)과 同一한 方法으로 測定하였다.

(4) 섬유아세포의 增殖에 미치는 影響

섬유아세포(BALB/c 3T3)의 增殖에 미치는 各 韓藥의 影響을 알아보기 위해, 96 well plate의 각 well에 細胞 부유액 100 μl($2x10^5$ cells/ml)를 분주하고 37 ℃의 CO_2 incubator에서 24시간 培養하여 細胞를 附着시킨 後 各 韓藥 엑스를 1, 10 및 100 μg/ml로 處理하여 37 ℃의 CO_2 incubator에서 48時間 培養하였다. 培養 終了 4時間 前에 5 mg/ml 濃度로 DPBS-A에 稀釋된 MTT용액 20 μl를 각 well에 添加하고 培養 終了時까지 은박지로 빛을 遮斷하였다. 培養 終了時 培養液을 除去한 後 生成된 formazan crystal을 DMSO 100 μl로 용출시킨 다음 發色된 各 well의 吸光度를 microplate-reader를 利用하여 570 nm에서 測定하고 對照群의 吸光度와 比較하여 細胞 增殖率을 百分率로 換算하였다.

(5) 흉선과 비장세포의 分離 및 增殖에 미치는 影響

마우스의 흉선 및 비장세포 分離는 Wysocki[36] 및 Mizel등[37]의 方法을 利用하였다. 흉선 및 비장세포 부유액을 RPMI 1640 배지로 稀釋하고 96 well plate에 $1.2x10^6$ cells/ml 濃度로 분주하여 흉선세포 實驗時에는 concanavalin A(Con A) 1 μg/ml 및 各 韓藥 엑스 1, 10 및 100 μg/ml를 비장세포 實驗時에는 lipopolysaccharide(LPS) 10 μg/ml 및 各 韓藥 엑스 1, 10 및 100 μg/ml를 添加한 後 37 ℃의 CO_2 incubator에서 48時間 培養한 다음 培養 終了 4時間 前에 MTT시약을 加하였다. 培養 終了時 0.1N HCl에 溶解시킨 10% SDS 100 μl를 各 well에 添加하고 遮光狀態에서 18時間 더 培養한 後 發色된 各 well의 吸光度를 microplate-reader로 570 nm에서 測定하여 對照群의 吸光度에 대한 實驗群의 吸光度를 百分率로 換算하여 計算하였다.

B. Apoptosis 實驗

(1) Hep G2 細胞主의 DNA fragmentation에 미치는 影響

96 well plate에 well당 Hep G2 細胞 1 x 10^5 cells을 분주하여, 37 ℃의 CO_2 incubator에서 24 時間 培養하여 細胞를 附着시킨 後 各 韓藥 10 μg/ml를 處理하여 12 時間 培養하였다. 培養 後 細胞를 收去하여 eppendrof tube에 넣어 5分間 遠心分離(4 ℃, 2,500 rpm)한 後 細胞를 모아 nuclear lysis buffer(Tris 10 mM, EDTA 1 mM, SDS 0.5%, pH 7.5) 50 μl, proteinase K(20 mg/ml) 3 μl와 ribonuclease A(10 mg/ml) 3 μl를 混合하여 55 ℃ water bath에서 2時間 incubation하고, 5分間 遠心分離(4 ℃, 3,000 rpm)한 다음 上層液을 취해, 上層液 15 μl와 0.25% bromophenol blue 3 μl를 混合한 뒤 10 μl씩 취하여 3% agarose gel에 loading하고 전기영동(100 volt, 90분)하였다. 이때 marker로는 lamda DNA Eco RI Hind III digest를 使用하였다. 전기영동 후 gel을 SYBR™ Green I(1:10,000 dilution)로 30分 染色하고 Imagemaster VDS로 寫眞 撮影을 하여 DNA laddering을 觀察하였다[38].

(2) Hep G2 細胞主의 apoptosis(Sub-G1 peak)에 미치는 影響

96 well plate에 well당 Hep G2 細胞 1 x 10^5 cells을 분주하여, 37 ℃의 CO_2 incubator에서 24時間 培養하여 細胞를 附着시킨 後 各 韓藥 10 μg/ml를 處理하여 12時間 培養하였다. 培養 後 細胞를 收去하여 eppendorf tube에 넣어 5分間 遠心分離(4 ℃, 2,500 rpm)한 後, 細胞를 모아 PI buffer(0.1% Na-Citrate + 0.2% Triton X-100)에 溶解시킨 propidium iodide(10 μg/ml) 20 μl를 넣어 氷冷下에서 30分間 染色한 後 flow cytometer로 sub-G1 peak를 觀察하였다[39].

C. 腹腔 macrophage의 nitric oxide 生成 實驗

(1) 마우스 腹腔 macrophage의 分離 및 nitric oxide 生成에 미치는 影響

In vitro 實驗에서는 3% thioglycollate 2ml를 腹腔에 投與하고 3日 後에 마우스를 頸椎脫骨하여 屠殺시킨 後 腹腔에 cold PBS 10 ml를 注入하여 腹腔細胞를 收集하였다. 收集한 細胞를 4 ^{0}C에서 1,300 rpm으로 10分間 遠心分離하고 RPMI 培地로 2회 洗滌한 後 直徑 120 mm petri dish에 분주하여 CO_2-incubator에서 培養시키고 2時間 後에 附着되지 않은 細胞를 除去한 다음 附着한 macrophage를 cell scraper로 分離하여 macrophage를 24 well plate에 well당 1 x 10^6 cells을 분주한 後 各 well에 각 韓藥 엑스 50 μg/ml, LPS 1 μg/ml와 γ-IFN 25 units/ml를 添加하지 않은 群과 添加한 群으로 分類하여, 37 ℃ CO_2-incubator에서 24時間 培養한 後에 生成된 nitric oxide (NO)量을 Griess法[40]으로 測定하였다.

培地 100 μl와 Griess reagent(1% sulfanilamide + 0.2% N-naphthylethylenediamine 2HCl + 2.5% H_3PO_4) 100 μl를 混合하여 96 well plate에 넣고 570 nm에서 microplate-reader로 吸光度를 測定하여 미리 作成한 $NaNO_2$의 檢量線에 의해 NO 量을 測定하였다.

In vivo 實驗에서는 각 韓藥 엑스 300 mg/kg을 마우스에 1日 1回씩 7日間 經口投與하고 8日째 3% thioglycollate 2ml를 腹腔에 投與하였다. 3日 後에 마우스를 頸椎脫骨하여 屠殺시킨 後 腹腔에 cold PBS 10 ml를 注入하여 腹腔細胞를 收集하여 同一한 方法으로 實驗하여 NO量을 測定하였다.

(2) 統計處理

모든 實驗 結果들은 평균치±표준오차로 나타내었고 統計處理는 student t-test를 實施하여 細胞 實驗時에는 $p<0.01$을, 動物 實驗時에는 $p<0.05$를 基準으로하여 有意性 與否를 判定하였다.

Ⅲ. 實驗成績

A. 細胞毒性 實驗

(1) Hep G2 細胞主의 細胞毒性

조각자 100 μg/ml를 處理時 Hep G2 細胞의 增殖을 촉진하였다.

對照群의 細胞生存率을 100%로 하였을 때, 細胞增殖을 50%이상 촉진하였다(Table I).

(2) Mitomycin C 및 cisplatin 併用處理時 Hep G2 細胞主의 細胞毒性

조각자 100 μg/ml와 mitomycin C IC_{50}과 併用處理時 mitomycin C 單獨 處理群에 비해 Hep G2 細胞의 增殖을 抑制하지 못했다(Table II).

조각자 100 μg/ml와 cisplatin IC_{50}을 併用處理時 cisplatin 單獨處理群에 비해 Hep G2 細胞의 增殖을 오히려 촉진하였다(Table III).

(3) 섬유아세포, 흉선 및 비장세포의 細胞毒性

BALB/c 3T3 細胞에서 조각자 100 μg/ml 處理時 BALB/c 3T3 細胞의 增殖은 변화가없었다(Table IV).

흉선세포에서 concanavalin A 1 μg/ml를 處理한 對照群의 細胞生存率을 100%로 하였을 때 concanavalin A를 處理하지 않은群의 細胞生存率은 79.8±1.7%로 현저히 減少하였으며, 조각자 100 μg/ml를 處理時 thymocytes의 增殖을 促進하였다(Table V).

비장세포에서 lipopolysaccharide 10 μg/ml를 處理한 對照群의 細胞生存率을 100%로 하였을 때 lipopolysacchride를 處理하지 않은群의 細胞生存率은 89.3±1.9%로 減少하였으며, 조각자 100 μg/ml를 處理時 slpenocytes의 增殖을 促進하였다(Table VI).

B. Apoptosis 實驗

(1) Hep G2 細胞主의 DNA fragmentation 및 apoptosis

조각자를 Hep G2 細胞에 處理하였을 때 apoptosis 發生率은 LPS와 γ-IFN을 添加하였을 때의 對照群은 11.4±0.6%이었으며 조각자는 Hep G2 細胞의 apoptosis는 나타나지 않았으며, DNA electrophoresis의 DNA laddering과, flow cytometer로 測定한 sub-G1 peak의 pattern에서 確認할 수 있었다(Fig.1).

C. 腹腔 Macrophage의 nitric oxide 生成 實驗

(1) 腹腔 macrophage의 nitric oxide 生成量

In vitro 實驗에서 마우스 腹腔 macrophage에 lipo- polysaccharide와 γ-interferone을 處理하였을 때, 對照群의 nitric oxide 生成量은 11.4±1.0 μM이었으며 對照群에 비해 조각자는 nitric oxide(NO) 生成에 유의한 변화를 나타내지 못했다(Table VIII).

In vivo 實驗에서 各 韓藥을 經口投與하고 分離한 macrophage에 lipopolysaccharide와 γ-interferone을 處理 하였을 때, 對照群의 NO 生成量은 10.4±1.2 μM 이었으며 對照群에 비해 조각자는 nitric oxide 生成을 促進하였다(Table IX).

Table I. Effect of Gleditsiae Spina on the proliferation of Hep G2 cells

Samples	Concentration(μg/ml)			
	Control	1	10	100
Gleditsiae Spina	100±1.7	100.6±5.5	118.9±2.6*	157.5±3.0**

The cells(2 x 10^5 cells/ml) were cultured in 5% CO_2-incubator at 37 °C for 1 day, and then the extracts of Gleditsiae Spina were added for 2 days.

The OD of each well was measured at 570 nm with Microplate Reader.
Each bar represents the mean±SE from 4 experiments.
; Significantly different from control group (; P<0.01, **; P<0.001).

Table II. The combined effect of Gleditsiae Spina and mitomycin C on the proliferation of Hep G2 cells

Samples	Concentration(μg/ml)			
	Control	1	10	100
Gleditsiae Spina	100±2.3	103.4±4.6	102.2±1.6	98.7±3.9

The cells(2 x 10^5 cells/ml) were cultured in 5% CO_2-incubator at 37 ℃ for 1 day, and then the extracts of Gleditsiae Spina and mitomycin C were added for 2 days.
The OD of each well was measured at 570 nm with Microplate Reader.
Each bar represents the mean±SE from 4 experiments.
; Significantly different from control group (; P<0.01, **; P<0.001).
Control; Mitomycin C IC_{50}(8.1 μg/ml) treated group

Table III. The combined effect of Gleditsiae Spina and cisplatin on the proliferation of Hep G2 cells

Samples	Concentration(μg/ml)			
	Control	1	10	100
Gleditsiae Spina	100±2.0	99.5±2.5	99.2±1.4	126.8±2.4**

The cells(2 x 10^5 cells/ml)were cultured in 5% CO_2-incubator at 37 ℃ for 1 day, and then the extracts of Gleditsiae Spina and cisplatin were added for 2 days.
The OD of each well was measured at 570 nm with Microplate Reader.
Each bar represents the mean±SE from 4 experiments.
; Significantly different from control group (; P<0.01, **; P<0.001).
Control; Cisplatin IC_{50}(6.0 μg/ml) treated group

Table IV. Effect of Gleditsiae Spina on the proliferation of BALB/c 3T3 cells

Samples	Concentration(μg/ml)			
	Control	1	10	100
Gleditsiae Spina	100±0.8	97.1±1.4	100.8±2.6	100.1±1.5

The cells(2 x 10^5 cells/ml) were cultured in 5% CO_2-incubator at 37 ℃ for 1 day, and then the extracts of Gleditsiae Spina were added for 2 days.
The OD of each well was measured at 570 nm with Microplate Reader.
Each bar represents the mean±SE from 4 experiments.
; Significantly different from control group(; P<0.01, **; P<0.001).

Table V. Effect of Gleditsiae Spina on the proliferation of thymocytes

Samples	Concentration(μg/ml)			
	Control	1	10	100
Gleditsiae Spina	100±2.4	115.3±1.0**	140.5±1.5**	148.4±1.4*

Thymocytes(2 x 10^5 cells/ml) obtained from BALB/c mice were cultured in RPMI1640 medium containing 10% FBS. The extracts of Gleditsiae Spina were added with concanavalin A(1 μg/ml) in 96 well plate at the begining of the culture. The cells were cultured with the extracts of herb drugs in 5% CO_2-incubator at 37 ℃ for 44 hours. MTT was mixed, and cultured for 4 hours.

At the termination of the culture, added 100 μl of 10% SDS and then the cells were cultured for 18 hours. The OD of each well was measured at 570 nm with Microplate Reader. Each bar represents the mean±SE from 4 experiments.

; Significantly different from control group (; P<0.01, **; P<0.001).

The cell viability(%) of concanavalin A non-treated group was 79.8±1.7%

Control; Concanavalin A treated group

Table VI. Effect of Gleditsiae Spina on the proliferation of splenocytes

Samples	Concentration(μg/ml)			
	Control	1	10	100
Gleditsiae Spina	100±2.3	107.9±1.9**	122.3±2.3**	142.4±4.2**

Splenocytes(2 x 10^5 cells/ml) obtained from BALB/c mice were cultured in RPMI1640 medium containing 10% FBS. The extracts of herb drugs were added with lipopolysaccharide (10 μg/ml) in 96 well plate at the begining of the culture. The cells were cultured with the extracts of Gleditsiae Spina in 5% CO_2-incubator at 37 °C for 44 hours. MTT was mixed, and cultured for 4 hours. At the termination of the culture, added 100 μl of 10% SDS and then the cells were cultured for 18 hours. The OD of each well was measured at 570 nm with Microplate Reader. Each bar represents the mean±SE from 4 experiments.

; Significantly different from control group (; P<0.01, **; P<0.001).

The cell viability(%) of lipopolysaccharide non-treated group was 89.2±1.9%

Control; Lipopolysaccharide treated group

Table VII. Effect ofGleditsiae Spina on apoptosis of Hep G2 cells

Samples	Apoptosis(%)
Control	11.4±0.6
Gleditsiae Spina	8.6±1.1

Apoptosis(DNA content of sub-G1 peak) was measured with flow cytometer.

The Data represents the mean±SE from 3 experiments.

; Significantly different from control group (; P<0.05, **; P<0.01, ***; P<0.001).

Table VIII. Effect of Gleditsiae Spina on nitric oxide production from mouse macrophages in vitro

Samples	Nitrite(μM)
Control	11.4±1.0
Gleditsiae Spina	9.7±0.5

3% thioglycollate was injected i.p. Peritoneal macrophages obtained after 2 hours adherence period were cultured in RPMI1640 medium with lipopolysaccharide(LPS, 1μg/ml) and γ-interferone(γIFN, 25 units/ml).

Each bar represents the mean±SE from 4 experiments.

; Significantly different from control group (; P<0.05).

Table IX. Nitric oxide production of macrophages obtained from Gleditsiae Spina-treated mice

Samples	Nitrite(μM)
Control	10.4±1.2
Gleditsiae Spina	40.4±2.1***

Gleditsiae Spina was administered orally for 7 days, and 3% thioglycollate was injected

i.p. Peritoneal macrophages obtained after 2 hours adherence period were cultured in RPMI 1640 medium with lipopolysaccharide (LPS, 1μg/ml) and γ-interferone(γIFN, 25 units/ml).
Each bar represents the mean±SE from 4 experiments.
; Significantly different from control group (; P<0.05, **; P<0.01, ***; P<0.001).

IV. 考 察

韓醫學에 있어서 免疫에 대한 槪念은 素問 上古天眞論의 "眞氣從之 精神內守 病安從來", 四氣調氣大論의 "不治已病 治未病"에서 찾아볼 수 있으며 刺法論에서도 "五疫之至 皆相梁易 無問大小 病狀相似" "正氣在內 邪不可干"이라고 記述 되었는데 이는 正氣가 存在하고 있는 한 邪氣가 있더라도 侵入하지 못한다는 뜻으로 病邪에 대한 精氣의 恒常性에 대한 것이며, 靈樞 百病始生編에서 "風雨寒熱 不得虛 邪不得獨傷人 卒然逢疾風暴雨而不病者 皆無虛故 邪不能獨傷人"이라하여 正氣虛弱이 疾病 發生의 根本的인 要因임을 나타내고 있다[41-43].

正氣란 各種 人體 組織 器官의 機能 活動面에서 부터 外部 環境에 대한 適應力과 病因에 대한 抵抗力을 말하며, 邪氣란 人體 外部를 破壞하는 各種 有害 因子로 六淫, 痰飮, 瘀血, 食積 등의 發病因子를 말한다. 正氣는 免疫機能과 類似하며 邪氣는 非自己的 抗原要素라 할 수 있다[44].

本 實驗에 使用한 皂角刺는 S-180 腹水癌에 대해 抗癌作用이 있다고 알려져 있다[45-47]. 그러나 이러한 皂角刺의 抗癌作用 機轉들은 아직 正確하게 糾明되지 않았다.

따라서 本 實驗에서는 皂角刺의 抗癌作用 機轉을 糾明하여 보고자 多樣한 接近 方法을 試圖하여 보았으며 여러가지 癌 중에서도 우리나라 國民에게 많은 發生을 보이고 있는 肝癌 細胞主(Hep G2)를 選擇하여 實驗하였다.

人體 肝癌 細胞主인 Hep G2 細胞主에 대해 直接 細胞毒性을 觀察한 結果, 조각자는 57.5% Hep G2 細胞의 增殖을 오히려 促進하였다.

旣存 抗癌劑와 併用處理時의 效果를 알아보기 위해, 抗癌劑 mitomycin C가 Hep G2 細胞의 增殖을 50% 抑制하는 濃度를 구한 다음 mitomycin C IC_{50} 濃度와 皂角刺를 併用 處理한 結果, 抗癌劑 單獨 處理時에 비해 유의한 변화가없었으며, 抗癌劑 cisplatin이 Hep G2 細胞의 增殖을 50% 抑制하는 濃度를 구한 다음 cisplatin IC_{50} 濃度와 皂角刺를 併用處理한 結果, 抗癌劑 單獨 處理時에 비해 오히려 26.8%로 증식을 촉진하였다.

Hep G2 細胞에 대해서 皂角刺가 오히려 증식을 촉진하는 실험이지만 일반적으로 癌細胞에 대해 細胞毒性을 나타내는 韓藥들은 正常細胞 및 免疫細胞에 대해서도 毒性을 나타낼 수 있기 때문에, 이러한 作用을 살펴 보기 위해 正常細胞 model로 주로 使用되는 마우스 섬유아세포인 BALB/c 3T3 細胞 및 免疫細胞인 마우스 흉선 및 비장세포에 대한 細胞毒性을 觀察하였다.

섬유아세포에 대해 皂角刺는 細胞毒性이 나타나지않았으며, 흉선세포에 대해 48.4%의 활성화를 나타냈고, 비장세포에 대해 42.2%의 활성화를 나타냈다.

이 結果는 癌細胞에 細胞毒性은 없으나, 정상세포 및 면역세포를 활성화시키는 결과를 알 수 있었다. Apoptosis의 실험에서 皂角刺는 Hep G2 細胞의 apoptosis를 促進하지는 못하였으며, 이는 DNA electrophoresis를 實施한 DNA laddering으로 確認 할 수있었다. 癌細胞의 apoptosis를 促進하는 것에 대한 內容은 韓藥이 癌細胞에 대해 이제까지 硏究되지 않았던 새로운 作用을 가질 수 있음을 강력히 示唆하는 것이지만, 細胞의 apoptosis는 韓藥의 濃度 및 處理 時間에 따라 多樣한 變化를 나타내기 때문에 各 韓藥에 대한 dose 및 time에 대한 條件을 追後 硏究하여야 할 課題

이다.

皂角刺의 macrophage에 대한 作用을 알아보기 위해 in vitro계에서 마우스 腹腔 macrophage에 直接 處理하고 生成되는 nitric oxide(NO)量을 測定한 結果 皂角刺는 NO 生成에 유의한 변화를 나타내지못하였다. In vivo 實驗에서 皂角刺를 經口投與하고 分離한 macrophage로 부터 生成되는 NO量을 測定한 結果 皂角刺는 NO 生成을 促進하였다. 活性化된 macrophage는 NO 生成을 促進하며 生成된 NO는 癌細胞의 增殖을 抑制할 수 있는 可能性이 있다고 할 수 있다[28]. NO의 生成을 促進한 皂角刺의 抗癌作用은 生成된 NO에 일부 起因된다고 思料되지만, 追後 NO synthetase inhibitor(L-NMMA)[49] 및 NO scavenger (PTIO)[50]등을 使用하여 作用機轉을 糾明하여야 할 것이며, 이는 韓藥들의 抗癌作用 機轉이 각기 多樣하게 나타날 수 있음을 示唆하는 것이다.

V. 結 論

1. Hep G2 細胞의 증식을 촉진하였다.
2. Hep G2 細胞에 대해 mitomycin C와 併用處理時 유의한 변화를 나타내지 않았다.
3. Hep G2 細胞에 대해 cisplatin과 併用處理時 細胞의 증식을 촉진하였다.
4. BALB/c 3T3 細胞에 대해 細胞毒性을 나타내지않했으며, mouse thymocytes에 대해 증식을 촉진하였고, mouse splenocytes에 대해도 증식을 촉진하였다.
5. Hep G2 細胞에 대해 apoptosis는 나타내지 못하였다.
6. In vitro에서 mouse 腹腔 macrophage에 處理時 nitric oxide 生成에 유의한 변화가 없었다.
7. 皂角刺를 經口投與하고 分離한 mouse 腹腔 macrophage에서 nitric oxide 生成을 促進하였다.

參考文獻

1. Hersh, E.M. and Ereish, E.J.: Host defence mechanism and their modification by cancer chemotherapy. In methods in Cancer Research, New York Academic Press. p.335, (1986).
2. Komiya, K., Hirokawa, Y. and Yang, Z.B.: Potentiation of chemotherapeutic activity by a Chines herb medicine Juzen-Tai- Ho-Toh. J. Cancer Chemother., 15, 1715 (1988).
3. J.S. Eun and W.Y. Song: The combined effect of n-BuOH fraction of Ulmi cortex and anticancer drugs on cancer cell lines. Kor. J. Pharmacogn., 25(2), 144 (1994).
4. Iwao, U. and Kanki, K.: Potentiation of the chemotherapeutic activity of antineoplastic agents by Juzen-Taiho-To. Recent Advances in the Pharmacology of Kampo Medicine. p.320 (1988).
5. Ahn M.S., Kim S.G., Eun J.S., Lim J.P., Yum J.Y., Suh E.S. Oh C.H. and So J.N.: Studies on the combined effect of several combined preparation of crude drugs and mitomycin C. Kor. J. Pharmcogn., 23(3), 158-170 (1992).
6. Oldham, R.K.: Biological Response Modifiers. J. Natl. Cancer Inst., 70, 789 (1983).
7. Masaki Aburada: Protective effects of Juzen-Tai-Ho-Toh against adverse reactions associated with mitomycin C. Recent Advances in the Pharmacology of Kampo Medicin. p.275 (1988).
8. Smith, C.A., Williams, G.T., Kingston, E., Jenkinson, J. and Owen, J.J.T.:

Antibodies to CD/T- cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. Nature, 337, 181-184 (1989)

9. Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C. Vayssiere, J.L., Petit, P.X. and Kroemer, G.: Reduction in mitochodrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. J. Exp. Med., 181, 1661-1672 (1995)
10. Zhou, T., Edwards, C.K. and Mounts, J.D.: Prevention of age-related T cell apoptosis defect in CD2-fas-transgenic mice. J. Exp. Med., 182, 129-137 (1995)
11. McConkey, D.J. et al: Cellular signaling in programmed cell death(apoptosis). Immunol. Today., 11, 120-121 (1990)
12. Stephens LC, Ang KK, Schulthesis TE, Milas L and Meyn RE: Apoptosis in irradiated murine tumors. Radiat Res., 127, 308-316 (1991).
13. Marklis RM, Lin JY, Beresford B, Atcher RW, Hines JJ and Humm JL: Celluar kinetics, dosimetry, and radiobiology of α -paticle radioimmunotherapy: indution of apoptosis. Radiat Res., 130, 220-226 (1992).
14. Bellomo G, Perotti M, Taddei F, Mirabelli F, Finardi G, Nicotera P et al: Tumor necrosis factor alpha induces apoptosis in mammary adenocarcinoma cells by an increase in intracellular free Ca^{2+} concentration and DNA fragmentation. Cancer Res., 52, 1342-1346 (1992).
15. Bissonnette RP, Echeverri F, Mahbouri A and Green DR: Apoptosic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. Nature, 359, 552-554 (1992).
16. Wright SC, Kumar P, Tam AW, Shen N, Varma M and Larrick JW: Apoptosis and DNA fragmentation precede TNF-induced cytolysis in U937 cells. J. Cell Biochem., 48, 344-355 (1992).
17. Roy C, Brown DL, Little JE, Valentine BK, Walker PR, Sikorska M, et al: The topoisomerase II inhibitor teniposide (VM-26) induces apoptosis in unstimulated mature murine lymphocytes. Exp. Cell Res., 200, 416-424 (1992).
18. Hickman JA: Apoptosis induced by anticancer drugs. Cancer Metastasis Rev., 11, 121-139 (1992).
19. Collins MKL, Marvel J, Malde P and Lopez-Rivas A: Interleukin 3 protects murine bone marrow cells from apoptosis induced by DNA damaging agents. J. Exp. Med., 17, 1043-1051 (1992).
20. Fisher TC, Milner AE, Gregory CD, Jackman AL, Aherne GW, Hartley JA, et al: Bcl-2 modulation of apoptosis induced by anticancer drugs: resistance to thymidylate stress is independent of classical resistance pathways. Cancer Res., 53, 3321-3326 (1993).
21. Okamoto, A., Okabe, M. and Gomi, K.: Analysis of DNA Fragmentation in Human Uterine Cervix Carcinoma HeLa Cells treated with Duocarmycins or other Antitumor agents by Pulse Field Gel Electrophoresis. Jpn. J. Cancer Res., 84, 93-98 (1993)
22. Barry MA, Behnke CA and Eastman A: Activation of programmed cell death(apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. Biochem. Pharmacol., 40, 2353-2362 (1990).

23. Cotter TG, Glynn JM, Echeverri F and Green DR: The induction of apoptosis by chemotherapeutic agents occurs in all phases of the cell cycle. Anticancer Res., 12, 773-780 (1992).
24. Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B and Costa J: Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 89, 4495-4499 (1992).
25. Korsmeyer SJ: Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. Blood, 80, 879-886 (1992).
26. Colotta F, Polentarutti N, Sironi M and Mantovani A: Expression and involvement of c-fos and c-jun protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines. J. Biol. Chem., 267, 18278-18283 (1992).
27. Nathan, C.: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J., 6, 3051-3064 (1992).
28. Hibbs, J.B., Taintor, R.R. and Vavrin, Z.: Macrophage cytotoxicity role for L-arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. Science, 235, 473 (1987).
29. Nakabo, Y., Harakawa, N., Yamamoto, K., Okuma, M., Uno, K. and Sasada, M.: Leukemic cell lysis by activated human macrophages. Jpn. J. Cancer Res., 84, 1174-1180 (1993).
30. Grisham, M.B., Ware, K., Gilleland, H.E.Jr., Gilleland L.B., Abell, C.L. and Yamada, T.: Neutrophilmediated nitrosamine formation: Role of nitric oxide in rats. Gastroenterology, 103(4), 1260-1266 (1992).
31. Thomsen, L.L., Ching, L.M. and Baguley, B.C.: Evidence for the production of nitric oxide by activated macrophages treated with the antitumor agents flavone-8-acetic acid and xantherone-4-acetic acid. Cancer Res., 51, 6073-6078 (1991).
32. Kondo, Y. and Takano, F.: Nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages enhanced with Glycyrrhizin. Biol. Pharm. Bull., 17(5), 759-761 (1994).
33. Albina, J.E., Cui,S., Mateo, R.B. and Reichner,J.S.: Nitric oxide-mediated Apoptosis in murine peritoneal macrophages. J. Immunology, 150, 5080-5085 (1993).
34. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. methods, 65, 55-63 (1983).
35. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr.: A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. J. Immunol. methods, 129, 23 (1990).
36. Wysocki, L.J. and Sato, V.L.: Planning for lymphocytes: A method for cell selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 2844 (1978).
37. Mizel, S.B., Openheim, J.J. and Rosensteich, D.L.: Characterization of lymphocyte-activating factor(LAF) produced by the macrophage cell line P388D1. J. Immunol., 120, 1497 (1979).
38. Kaufmann, S.H.: Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, campothecin and other cytotoxic anticancer drugs. Cancer Res., 49, 5870 (1989).
39. Tomei, L.D., Cauter, P. and Wenner,

C.E.: Inhibition of radiation induced apoptosis in vitro by tumor promoters. Biochem. Biophys. Res. Commun., 155, 324 (1988).

40. Rockett, K.A., Awburn, M.M., Cowden, W.B. and Clark, I.A.: Killing of Plasmodium faciparum in vitro by nitric oxide derivatives. Infec. Immunity, 59(9), 3280 (1991).
41. 楊維傑: 黃帝內經素問靈樞譯解, 서울, p.3, 19, 成輔社 (1980).
42. 王琦: 素問今釋, 서울, p.412, 成輔社 (1983).
43. 洪元植: 精校黃帝內經, 서울, p.286, 東洋醫學硏究院出版部 (1981).
44. 安圭錫外: 東醫病理學, 서울, 高文社, pp. 110-112, 118-122, 165-169 (1990).
45. 申天浩 : 癌瘤防治硏究, 성보사, 서울, pp.25-29 (1984).
46. 姜秉洙外: 本草學, 永林社, 서울, pp. 440-441 (1994).
47. 高本釗 : 中藥大辭典, 新文豊出版公司, 臺北, p. 933 (1982).
48. 福島淸吾 : 抗癌中藥의 臨床應用, 醫齒藥出版株式會社, 東京, pp.135-136 (1988).
49. Olken, N,M, and Marletta, M.A.: N^G-methyl-L-arginine functions as an alternate substrate and mechanism-based inhibitor of nitric oxide synthetase. Biochemistry, 32, 9677-9685 (1993).
50. Akaike, T., Yoshida, M., Miyamoto, Y., Sato, K., Kohno, M., Sasamoto, K., Miyazaki, K., Ueda, S. and Maeda, H.: Antagonistic action of imidazolineoxyl N-oxide against endothelium-derived relaxing factor/ NO through a radical reaction. Biochemistry, 32, 827-832 (1993).

ABSTRACT

Effect of Gleditsiae Spina on Hep G2 cells cytotoxicity and Apoptosis and NO

Kang sung-youg, Cho kyoung-wha, Han jong-hyun*, Cho nam-geun*
College of Oriental Medicine, Dongshin University,
College of Oriental Medicine, Wonkwang University*

In this study, antineoplastic activity against human hepatocellular carcinoma cell line(Hep G2) was tested in *Gleditsiae Spina*. *Gleditsiae Spina* was extracted with water, and the cytotoxic activity was tested using a calorimetric tetrazolium assay(MTT assay), the apoptosis was tested using a DNA electrophoresis and flow cytometry.

The nitric oxide production from mouse peritoneal macrophage was tested using a Griess method.

Gleditsiae Spina extracts against the proliferation of Hep G2 cells not showed cytotoxicity at the concentration of less than 100ug/ml, and

Gleditsiae Spina extracts not showed the cytotoxicity of mitomycin C and the cytotoxicity of cisplatin on Hep G2 cells.

Gleditsiae Spina extracts aginist the proliperation of BALB/c 3T3 cells not showed cytotoxicity, the proliperation of mouse thymocytes and splenocytes not showed cytotoxicity at the concentration of less than 100ug/ml.

Gleditsiae Spina extracts not showed nitric oxide production from mouse peritoneal macrophage in vitro. *Gleditsiae Spina* was administered orally for 7 days at 300mg/kg increased nitric oxide production from mouse peritoneal macrophage.