

백화사설초 메탄올 추출물에 의한 HL-60 세포고사과정에 있어서의 transcriptional factors 활성변화 연구

박상구 · 이지현 · 문 구 · 문석재 · 원진희* · 박래길**

Study on Transcriptional Factors Activation Change of HL-60 cell Apoptosis by Hedyotis Diffusa's Methanol Extract

Sang-Goo Pak, Ji-Hyun Lee, Gu Moon, Suk-Jae Moon, Jin-Hee Won*, Lae-Gil Pak**

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine Wonkwang University, Iksan, Korea.

Objectives : *Hedyotis diffusa* has been used as an anticancer agent for several decades in oriental medicine. We test whether the methanol extract of the herb affects transcriptional activation factors including NF- κ B and AP-1.

Methods :

1. HL-60 cells were treated with various concentrations(from 200 to 50 μ g/ml) of methanol extract and H₂O extract(200 μ g/ml) of *hedyotis diffusa*. After 48h later, the cells were tested for viability by MTT assay.
2. The HL-60 cells were treated with 200 μ g/ml of methanol extract for the indicated periods. First. Nuclear extracts were isolated and incubated with oligonucleotide probe of NF- κ B and AP-1. Second. Nuclear extracts were isolated and reacted with p50, p65, c-rel pan-Jun, c-Jun, JunB, JunD antibody on ice for 30min. Finally The cell lysates were prepared and analyzed by western blotting using anti-Fas, anti-FasL and anti-p53 antibody.

* 원광대학교 한의과대학 비계내과학교실

** 원광대학교 의과대학 미생물학교실

*** 원광대학교 한의과대학 진단방사선과교실

Results :

1. The methanol extract decreases the viability of human lymphoid origin leukemia HL-60 cells in a dose-dependent manner.
2. NF- κ B is rapidly activated by the addition of the methanol extract, reaches a peak at 30min and gradually returns to resting level. We confirm that NF- κ B is a heterodimer mainly composed of p65 subunit with c-Rel.
3. Transcriptional activation of AP-1 is detected at 30min and reaches a maximum at 1hr after stimulation of the cells with the methanol extract. AP-1 is mainly composed with Jun-D and partially Jun-B proteins.
4. the methanol extract of *Hedyotis diffusa* induces the expression of Fas, Fas ligand and p53 proteins of HL-60 cells in a time dependent fashion.

Conclusions : These results suggest that the methanol extract of *Hedyotis diffusa* exerts anticancer effects to induce the death of human leukemic HL-60 cells via activation of transcriptional factors such as NF- κ B and AP-1, increase in expression of Fas mediated signalling proteins, and induction of tumor suppressor gene, p53.

Key words : *Hedyotis diffusa*, NF- κ B, AP-1, Fas, FasL, p53.

I. 緒 論

細胞의 分裂과 기능은 다양한 종류의 외부 자극에 의하여 조절되거나 변화된다. 생물학적 반응 조절제(biological response modifier, BRM)로 알려진 많은 天然產物은 일련의 細胞生理를 변화시키는 외부자극 중의 하나이다. 현재까지 다양한 종류의 天然產物(natural products)이 추출되었으며¹⁻²⁾, 이들 天然產物 중 세포의 분열 및 기능의 변화와 관련된 일부 天然產物은 중요한 BRM으로 취급되어 그 특성은 물론 작용 과정에 대하여 자세히 연구되고 있다³⁻⁵⁾.

天然產物이 연구자들의 관심의 대상이 되고 있는 이유는 일부의 天然產物에 抗腫瘍 效果와 이들의 抗腫瘍 效果가 腫瘍細胞의 분열을 직접적으로 抑制하거나 또는 癌을 가진 동물의 免

疫能을 增加시켜 나타난 것으로 밝혀지고 있기 때문이다. 현재 癌치료를 위해 사용되고 있는 수술요법, 방사선요법, 화학요법 및 면역요법은 癌腫에 따른 감수성, 치료 후의 경과와 부작용이 다르므로 이에 대한 대안으로 부작용이 적고 抗腫瘍 效果가 우수한 새로운 天然產物의 개발에 관심이 집중되고 있다⁶⁻⁷⁾.

따라서 실제 임상에서 증양치료에 응용되고 있는 白花蛇舌草에 대한 체계적인 검토가 필요하고 사료되며 白花蛇舌草의 약용성분의 화학적 특성을 밝히기 앞서 세포의 증식 및 AP-1 및 NF- κ B와 같은 Nuclear oncogene들의 活性化에 미치는 영향을 알아볼 필요가 있다고 생각된다.

白花蛇舌草는 꼭두서니과(서초과, Rubiaceae)에 속한 1년생 초본인 쌍낙시들풀(백운풀)의 帶根全草로 그 性은 寒, 平, 無毒하며,

清熱解毒, 利濕, 通淋, 消癰 등의 효과가 있어, 肺熱喘嗽, 扁桃腺炎, 咽喉炎, 黃疸, 痢疾, 骨盤炎, 癰腫疔瘡 등을 치료하며 또한 急性黃疸型 혹은 無疸型 肝炎이나 惡性腫瘍인 腸癌, 子宮癌 및 各種 癌症을 치료하는 抗癌劑 등에 응용되고 있다⁸⁻¹⁴⁾.

이에 저자는 白花蛇舌草의 추출물이 사람의 백혈병에서 유래된 HL-60 細胞에 어떠한 영향을 미치는지를 규명하기 위하여, 전사활성인자(transcriptional activator)인 NF- κ B와 AP-1의 활성변화, Fas, FasL 및 p53 등의 발현변화 등을 관찰하였던 바 유의한 結果를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材 料

(1) 藥 材

이 실험에 사용한 白花蛇舌草(*Hedyotis Diffusa*)는 원광대학교 전주한방병원에서 購入한 후 精選하여 사용하였다.

(2) 檢液調製

實驗에 使用된 藥材는 먼저 두가지 용매를 사용한 추출방법을 사용하여 본 실험에 이용하였다. 먼저 물 추출물(H_2O extract)은 음건된 白花蛇舌草 100g을 물 1 l와 함께 冷却器를 부착한 환저플라스크에서 3시간 끓인 다음 거즈로 濾過하고 3,200rpm으로 20분간 遠心分離 후 濃縮器(Rotary evaporater)로 濃縮한 다음 -70℃(Deep Freezer)에서 12시간 이상 凍結시키고 Freeze Dryer로 凍結乾燥시킨 것을 試料로 使用하였다. 한편, 메탄올추출물은 음건된 白花蛇舌草 100g을 세절한 후 메탄올 1 l와 함께 플라스크넣어

하루동안 우리나라오도록 방치한 다음 거즈로 濾過하고 3,200rpm으로 20분간 遠心分離 후 濃縮器(Rotary evaporater)로 濃縮한 다음 -70℃(Deep Freezer)에서 12시간 이상 凍結시키고 Freeze Dryer로 凍結乾燥시킨 것을 試料로 使用하였다.

2. 方 法

(1) HL-60 백혈병유래 癌細胞柱 培養

사람 백혈병으로부터 유래된 癌細胞柱인 HL-60(ATCC)는 CO_2 세포배양기에서(37℃, 5% CO_2) 10% fetal bovine serum(Hyclones)이 포함된 RPMI-1640 (Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD) 배지에서 배양하였다. 약 48시간 주기로 RPMI-1640 배양액을 교체하여 주며 log phase에 있는 세포에 한약재를 처리한 뒤 세포의 죽음을 관찰하고, 이에 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

(2) 細胞 viability 測定

세포의 생존율은 MTT assay 방법을 이용하였다¹⁵⁾. 簡記하면 세포배양판(24-well plate)에 세포를 1×10^5 씩 1ml의 배양액에 넣어 분주한 후, 실험에 필요한 각 조건의 한약재 등을 처리한 다음, MTT를 최종농도가 100 μ g/ml이 되도록 넣어주었다. 생존율의 판정은 MTT 처리후 4시간 후에 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 불용성의 formazan을 100 μ l의 10% SDS가 포함된 0.01 N HCl 용액으로 24시간 동안 37℃ 5% CO_2 세포배양기에서 방치하여 녹인다음, ELISA reader로 540nm의 파장하에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

(3) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

전사인자들의 활성을 측정키 위해 먼저 약재

가 처리된 HL-60 세포에서 Jeong 등의 방법^{16,17)}에 따라 핵 추출물만을 모았다. 요약하면, HL-60 세포는 200 μ M PMSF, 10 μ g/ml aprotinin, 20 μ M pepstatin A, 100 μ M leupeptin 및 100 μ M antipain이 들어 있는 자삼투압 용해용액과 10분간 얼음에서 팽창시킨 후 NP-40를 0.1% 되게 반응시킨 후 2,500rpm에서 원심분리하여 세포 질액만을 버린 후 핵에서 핵단백질을 모았다. NF- κ B의 활성측정은 NF- κ B의 consensus binding site을 가진 oligonucleotide probe¹⁸⁾는 5'-ccg gCC GGT TAA CAG AGG GGG CTT TCC GAG; 5'-ccg gCT CGG AAA GCC CCC TCT GTT AAC CGG를 합성하여 10mM Tris-HCl 용액(pH 8.0, 50mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT 함유)에 희석한 후 85 $^{\circ}$ C에서 5분 annealing한 후 100ng을 Rediprime kit (Amersham, England)을 이용하여 ³²P를 부착시켰다. 5 μ g의 핵단백질과 방사선 동위원소에 표지된 probe는 실온에서 30분 반응시킨 후 냉온실에서 4% polyacrylamide gel에 걸쳐 0.5 \times TBE buffer로 전기영동하였다. 이 gel은 말린 후 autoradiography 방법으로 X-ray 필름에 현상하여 NF- κ B 활성을 측정하였다.

AP-1의 활성도 측정은 Santa Cruz사로부터 구입한 probe를 이용하여 유사한 방법으로 방사선 동위원소 labeling 후 사용하였다.

Supershift assay를 위해서는 p50, p65, c-rel, pan-Jun and pan-fosproteins에 대한 rabbit polyclonal IgG antibodies 1 μ g을 방사선 동위원소가 labeling된 probes와 반응시키기 전에 30분 동안 반응시킨 후 위에 서술한 방법으로 EMSA를 실행하였다.

(4) Western blotting

배양된 HL-60 세포에 약제를 처리한 일정 시간 후에 세포를 채취하여, cold Hank's balanced

salt solution(HBSS)로 2회 세척하였다. 얻은 세포는 RIPA 용액(50mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1mM EDTA, 1mM PMSH, 1 μ g/ml aprotinin)으로 얼음에서 용해하였다. 용해 세포 부유액에 2 \times sample buffer와 섞어 98 $^{\circ}$ C에서 5분간 끓인 후, 12.5% dodesyl sulfate- polyAcrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 4 $^{\circ}$ C, 30V에서 16시간 동안 transfer한 후 blocking(5% skim milk)으로 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. p53, Fas, Fas Ligand에 대한 항체를 Tri-buffered sample saline에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 4시간 반응시켰다. 2차항체인 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxydase(TBS로 1:3,000으로 희석)와 상온에서 2시간 동안 반응시킨 후, enhanced chemiluminescence kit(ECL kit)를 사용하여 필름에 노출시켰다.

III. 實驗成績

1. 白花蛇舌草 抽出物이 白血病由來 癌細胞 HL-60의 細胞生存率에 미치는 影響

본 실험에서는 먼저 白花蛇舌草 메탄을 추출물이 세포의 생존율에 어떤 영향을 미치는가 알아보기 위해 먼저 白花蛇舌草 메탄을 추출물의 농도를 변화시키며 치사도를 MTT방법으로 측정하였다. 한약재가 12.5 μ g/ml이하의 농도에서는 HL-60 세포의 생존율에는 유의한 변화가 없었으나 50 μ g/ml의 한약재를 처리한 후 48시간 뒤 생존율이 20% 감소하였고, 100 μ g/ml 처리시에는 34%, 200 μ g/ml 처리시에는 90% 이상

생존율이 감소하였다(Fig. 1).

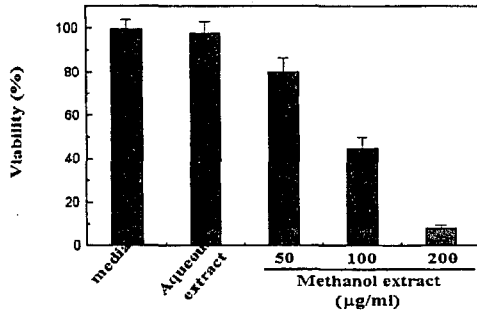


Fig. 1. The Effects of *hedyotis diffusa* extracts on the viability of HL-60 cells in a dose dependent manner. HL-60 cells were treated with various concentrations(from 200 to 50µg/ml) of methanol extract and H₂O extract(200µg/ml) of *hedyotis diffusa*. After 48h later, the cells were tested for viability by MTT assay. The data represented mean

2. 白花蛇舌草 抽出물이 白血病由來 癌細胞 HL-60의 전사활성인자 (transcriptional activator) NF-κB 활성화에 미치는 影響

NF-κB는 면역조절 인자와 pro-inflammatory 인자를 포함한 다양한 유전인자의 발현에 의해서 조절되어지며, 이는 유사분열촉진인자 (mitogens), TNF-α와 IL-1α같은 cytokines, 박테리아의 lipopolysaccharide, 바이러스, 방사선 등에 의해서도 활성화(activation)됨이 보고되고 있다.

白花蛇舌草 메탄올 추출물에 의한 HL-60 암세포의 세포죽음이 NF-κB 전사인자의 활성변화와 관계가 있는지를 확인하기 위하여 추출물의 다양한 처리시간 후에 처리된 세포들을 모아 nuclear extract만을 얻은 후 electrophoretic mobility shift assay(EMSA) 방법으로 NF-κB 활성을 조사하였다(Fig. 2). NF-κB 전사인자의 활

성은 메탄올추출물 처리 후 10분에 이미 활성화가 진행되었으며 30분에 최고활성을 보여 주었으며 이후 약물처리 3시간 후까지 활성이 유지되다가 6시간 후부터는 급격히 전사인자의 활성을 보이지 않았다(Fig. 2).

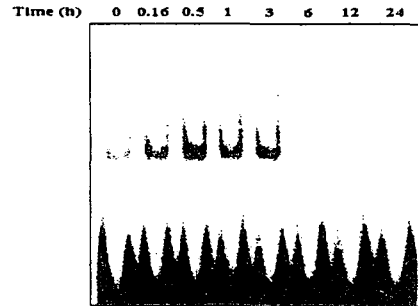


Fig. 2. Methanol extract of *Hedyotis diffusa* induced the transcriptional activation of NF-κB in HL-60 in a time dependent manner. The HL-60 cells were treated with 200µg/ml of methanol extract for the indicated periods. Nuclear extracts were isolated and incubated with oligonucleotide probe of NF-κB. Transcriptional activation of NF-κB was assessed by using electrophoretic mobility shift assay and visualized by PhosphorImage analyzer(Fuji Co, Japan).

3. 白花蛇舌草 抽出물에 의한 白血病由來 癌細胞 HL-60의 전사활성인자 (transcriptional activator) NF-κB의 구성 protein 조사

NF-κB는 c-Rel, p65(Rel A), Rel B, P50(NFκB1), p52(NFκB2)의 단백질로 구성되어 있다는 사실은 이미 잘 알려진 사실이다. 이에 따라 白花蛇舌草 메탄올 추출물에 의해 활성화된 NF-κB의 구성 protein을 분명하게 확인하기 위하여 한약재를 30분 처리한 후에 세포들을 모아 nuclear extract만을 얻은 후 electrophoretic mobility shift assay(EMSA) 방법

으로 NF- κ B의 구성 protein을 조사하였다(Fig. 3). 그 결과 anti-p50은 NF- κ B밴드의 변화에 영향을 주지 못하고, anti-p65와 anti-c-rel에 의해서만 NF- κ B 밴드의 현저한 변화가 관찰되었다. 이를 통하여 白花蛇舌草 메탄올 추출물에 의해 활성화되어지는 NF- κ B는 p65와 c-rel의 heterodimer로 이루어졌음을 알 수 있었다.

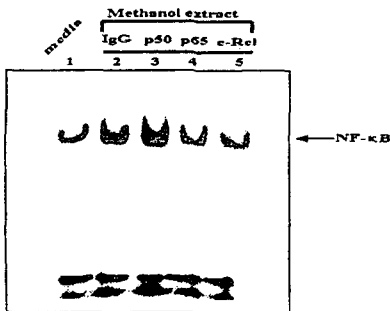


Fig. 3. Methanol extract of *Hedyotis diffusa* were also examined for NF- κ B binding activity in the absence or presence of polyclonal antisera against the NF- κ B subunits p50, p65, and c-rel. Normal IgG was used a control. The arrows indicate the protein-DNA complexes. The HL-60 cells were treated with 200 μ g/ml of methanol extract for the indicated periods. Nuclear extracts were isolated and reacted with p50, p65, c-rel antibody on ice for 30min. Then, samples were incubated with oligonucleotide probe of NF- κ B. Transcriptional activation of NF- κ B was assessed by using electrophoretic mobility shift assay and visualized by PhosphorImage analyzer(Fuji Co, Japan).

4. 白花蛇舌草 抽出物이 白血病由來 癌細胞 HL-60의 전사활성인자 (transcriptional activator) AP-1 활성화에 미치는 影響

Transcriptional activating인 AP-1은 세포의 증식(proliferation), 분화(differentiation), 변형

(transformation)과 같은 세포생리 조절에 연관되어 있다. 따라서 HL-60 암세포의 세포죽음에도 관련성이 있을 것이라는 예상하에 활성여부를 조사하였다. AP-1 전사인자의 활성여부를 확인하기 위하여 白花蛇舌草의 메탄올 추출물의 다양한 처리시간 후에 처리된 세포들을 모아 nuclear extract만을 얻은 후 electrophoretic mobility shift assay(EMSA) 방법으로 AP-1 활성을 조사하였다(Fig. 4). AP-1 전사인자의 활성은 추출물 처리 후 30분에 이미 활성화가 진행되었으며 1시간에 최고 활성을 보여주었고 이후 3시간 후까지 활성이 유지되다가 6시간 후부터는 서서히 감소하다가 12시간 후에는 급격히 전사인자의 활성을 보이지 않았다(Fig 4).

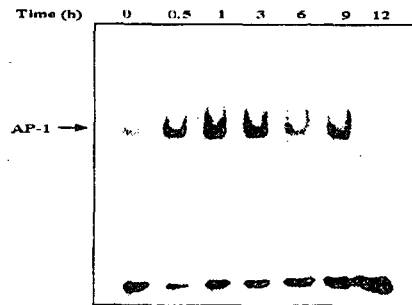


Fig. 4. Methanol extract of *Hedyotis diffusa* induced the transcriptional activation of AP-1 in HL-60 in a time dependent manner. The HL-60 cells were treated with 200 μ g/ml of methanol extract for the indicated periods. Nuclear extracts were isolated and incubated with oligonucleotide probe of AP-1. Transcriptional activation of AP-1 was assessed by using electrophoretic mobility shift assay and visualized by PhosphorImage analyzer(Fuji Co, Japan).

5. 白花蛇舌草 抽出物에 의한 白血病由來 癌細胞 HL-60의 전사활성인자 (transcriptional activator) AP-1의 구성 Protein 조사

전사활성인자인 AP-1은 세포의 일반적인 기능에 연관되어 있다¹⁸⁾. AP-1은 Jun family(JunB, c-Jun, JunD)의 homodimer 혹은 Jun 및 Fos family(c-fos Fra-1, Fra-2, and fosB)의 heterodimer에 의해서 구성되어 있다. 이에 따라 白花蛇舌草 메탄을 추출물에 의해 활성화된 AP-1의 구성 protein을 분명하게 확인하기 위하여 한약재를 30분 처리한 후에 세포들을 모아 nuclear extract만을 얻은 후 electrophoretic mobility shift assay(EMSA) 방법으로 AP-1의 구성 protein을 조사하였다(Fig. 5). 그 결과 JunD가 major form으로 존재하며 약간의 JunB가 활성화된 AP-1을 구성하고 있다는 것을 확인하였다.

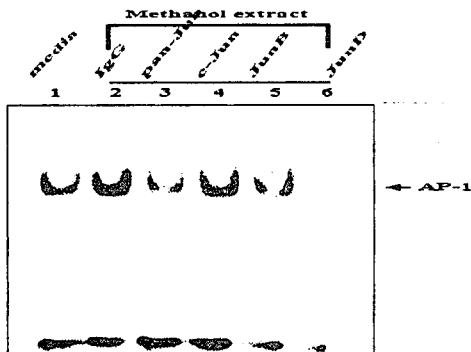


Fig. 5. Methanol extract of *Hedyotis diffusa* were also examined for AP-1 binding activity in the absence or presence of polyclonal antisera against the AP-1 subunits such as pan-Jun, c-Jun, JunB and JunD. Normal IgG was used a control. The arrows indicate the protein-DNA complexes. The HL-60 cells were treated with 200 μ g/ml of methanol extract for the indicated periods. Nuclear extracts were isolated and reacted with pan-Jun, c-Jun, JunB, and JunD antibody on ice for 30min. Then, samples were incubated with oligonucleotide probe of AP-1. Transcriptional activation of AP-1 was assessed by using electrophoretic mobility shift assay and visualized by PhosphorImage analyzer(Fuji Co, Japan).

6. 白花蛇舌草 抽出物에 의한 白血病由來 癌細胞 HL-60 암세포고사시 Fas 단백질의 발현 변화에 미치는 影響

Fas는 FasL에 결합함으로써 세포의 고사를 유발시킨다고 알려진 세포막의 단백질이며, Fas는 UV irradiation, 바이러스 감염, wild-type p53, 저산소증(hypoxia)에 의해서 발현되어 진다고 알려져 있다¹⁹⁻²¹⁾. 따라서 본 실험에서는 白花蛇舌草 메탄을 추출물에 의한 HL-60 암세포의 세포죽음시 이러한 Fas의 발현은 어떤 영향을 받는지 확인하였다. 이를 위해 배양된 HL-60 세포에 메탄을 추출물을 다양한 시간 동안 처리 후 세포를 포집한 후 세포파괴액(cell lysate)을 얻었다. 이 후 전기영동 및 nitrocellulose membrane상으로의 흡착등을 거친 후 Fas 및 FasL에 대한 항체를 사용하여 western blotting을 시행하였다. Fas 단백질은 약제 처리 12시간부터 서서히 증가됨이 확인되었으며 30시간째에는 대략 대조군에 비하여 2.5배정도 증가되어 나타났다(Fig. 6). 그리고 FasL 단백질은 약제 처리 6시간부터 이미 서서히 증가됨이 확인되었으며 12시간째에는 대략 대조군에 비

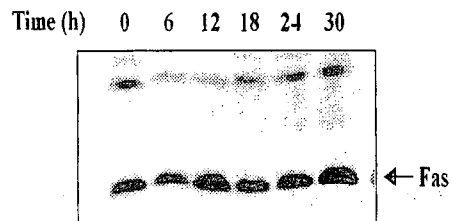


Fig. 6. Methanol extract of *Hedyotis diffusa* induced the expression of Fas in a time dependent manner. The HL-60 cells were treated with 200 μ g/ml of methanol extract for the indicated periods. The cell lysates were prepared and analyzed by western blotting using anti-Fas antibody.

하여 3배정도 증가되어 나타났다. (Fig. 7) 따라서, 이러한 Fas와 FasL 단백질의 발현변화는白花蛇舌草 메탄올 추출물 유도성 HL-60 세포고사 사이에 밀접하게 연관되어 있음을 알 수 있다.

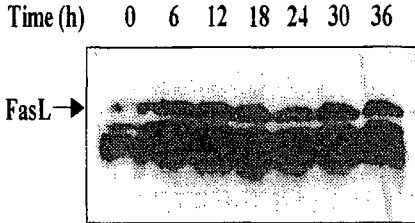


Fig. 7. Methanol extract of *Hedyotis diffusa* induced the expression of FasL in a time dependent manner. The HL-60 cells were treated with 200 μ g/ml of methanol extract for the indicated periods. The cell lysates were prepared and analyzed by western blotting using anti-FasL antibody.

7. 白花蛇舌草 抽出物에 의한 白血病由來 癌細胞 HL-60 암세포고사시 p53 단백질의 발현 변화에 미치는 影響

p53은 53-kDa의 단백질로 SV40 transformed cell에서 분리되었으며, 17번 염색체의 단완에 위치하는 종양억제 유전자로서 wild type과 mutant type이 존재한다. Wild type p53은 세포 증식 과정중 G1에서 S phase로의 전환시 check point로 작용하여 apoptosis로의 진행여부를 결정한다²²⁻²⁴). 따라서, 본 실험에서는白花蛇舌草 메탄올 추출물에 의한 HL-60 암세포의 세포죽음시 이러한 p53의 발현은 어떤 영향을 받는지 확인하였다. 메탄올 추출물을 다양한 시간동안 처리 후 세포를 포집하여 세포파괴액(cell lysate)을 얻었다. 이 후 전기영동 및 nitrocellulose membrane 상으로의 흡착등을 거

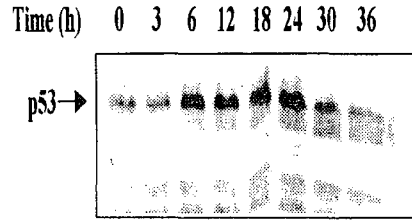


Fig. 8. Methanol extract of *Hedyotis diffusa* induced the expression of p53 in a time dependent manner. The HL-60 cells were treated with 200 μ g/ml of methanol extract for the indicated periods. The cell lysates were prepared and analyzed by western blotting using anti-p53 antibody.

친 후 p53에 대한 항체를 사용하여 western blotting을 시행하였다. p53 단백질은 약제 처리 6시간부터 서서히 증가되기 시작하며 이 증가됨은 24시간까지 유지되다가 약제처리 30시간 부터는 서서히 감소하기 시작한다.(Fig. 8)

IV. 考 察

腫瘍은 發生原因과 기전이 아직까지 명백히 밝혀지지 않는고 있으며, 生物學的 性狀이 복잡하기 때문에 적절한 定義를 내리기는 어렵다. 그러나 일반적으로 정의하자면, 腫瘍이란 조직의 자율적인 과잉성 성장이며, 이것은 個體에 대하여 意義가 없거나 이롭지 않을뿐더러 正常組織에 破壞적인 것을 意味한다^{13,25}).

한의학에서 腫瘍의 記載는 宋의 《衛濟寶書》²⁶)에서 '畚' 자를 사용하여 癰疽의 一種을 설명한 것이 최초이다. 그러나 현대의학에서 의미하는 腫瘍의 증과 유사한 병증을 기재한 곳은 殷墟 胛骨文에서의 '瘤' 字이며 《靈樞·刺節眞邪論》²⁷)에는 '筋瘤', 腸瘤, 石瘤, 骨疽, 肉疽 등의 기록이 있고, 《難經》²⁸)에서는 五臟積에 대하여 자세히 言及하였다.

일찍이 韓醫學에서는 腫瘍의 原因에 대해서 各家의 學說이 紛紛하였는데 《黃帝內經》²⁹⁾에서 虛와 寒氣 熱로, 李梴³⁰⁾은 外感內傷으로, 張介賓³¹⁾은 內虛 등으로 보았으며, 現在에 이르러는 正氣가 不足한 상태에서 外邪가 停滯하여 氣滯血瘀하고 痰飲濁聚하여 서로 交結하고 蘊鬱하여 發生한다고 보고 있다³²⁾.

따라서 韓醫學的인 치료면에 있어서는 保養 正氣하는 藥劑를 爲主로 活用하고 있으며, 初期의 積塊不大·正氣未虛한 경우에는 行氣活血·軟堅消積法을, 中期의 積塊漸大·正氣漸傷하여 邪盛正虛한 경우에는 攻補兼施法을, 末期의 積塊堅硬·正氣損傷이 甚할 경우에는 扶正配本法을 使用하여 왔다³³⁾.

한편 西洋醫學에서는 手術療法, 放射線療法, 化學療法 및 免疫療法 등을 사용하고 있는데 手術療法와 放射線療법은 局限的인 치료법이기에 때문에 限界性이 있고, 全身療法인 免疫療法도 現在로는 治療方法이 定立되어 있지 않은 상태이다³⁴⁾. 그러므로 현재의 상황하에서는 化學療法の 重要性이 강조되고 있는데 化學藥劑의 毒性문제 및 各種 副作用 때문에 완전한 治療效果를 기대하기는 어려운 실정이다. 이에 抗癌劑 사용으로 나타나는 各種 副作用을 防止하고 感受性이 높은 藥物의 개발 및 효과적인 치료법의 개발이 요구되고 있다.

본 연구에서는 白花蛇舌草가 암세포의 억제와 괴사작용이 탁월하다고 인정되어 임상에 많이 사용하고 있으면서도 이에 대한 과학적인 자료가 부족하다고 사료되어 실험을 통해 이의 抗腫瘍 작용과 免疫調節 작용을 평가하여 생물학적 반응 조절제로서의 증거를 제시하고자 하였다.

최근 연구에 의하면 gms히 사용되는 많은 항암제들, 특히 ara-c, cis-platinum, cyclophosphamide, adriamycin, etoposide,

teniposide, vincristine, mitoxantrone, taxol, hydroxyurea 및 bleomycin 등이 작용기전에 관계없이 다양한 세포주에서 아포토시스를 유도함이 밝혀져 있고 그 작용기전으로는 Fas/Fas ligand system, sphingomyelin/ceramide 경로, 즉 초기유전자(early immediate gene)발현 등이 관여하는 것으로 보고되고 있다³⁵⁾. 따라서 白花蛇舌草의 항암 효과를 사람의 백혈병에서 유래된 HL-60 세포주를 사용하여 白花蛇舌草 추출물들이 직접적으로 암 세포주의 초기 유전자발현과 Fas/Fas ligand system을 경유해서 세포 죽음을 초래할 수 있는지를 밝히고자 하였다.

먼저 이러한 白花蛇舌草 추출물들이 HL-60 세포에 직접적으로 살상작용을 일으키는지를 알아보기 위하여 각각의 추출물을 농도별로 처리한 결과 메탄올 추출물 및 이 메탄올 추출물로부터 유래된 subfraction의 일부가 강한 암세포의 죽음을 초래하는 세포독성 효과를 나타냄을 확인하였다(Fig. 1). NF- κ B는 p50, p65, C-Rel, B-rel 및 p52 등의 subunit으로 이루어진 단백질로, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF, M-CSF 등 염증반응에 관련된 유전자의 전사적 활성을 조절하는 역할을 한다^{36,37)}. NF- κ B는 자극이 없을 때에는 inhibitory 단백질인 I κ B- α 나 또는 I κ B- β 와 결합하고 있어, 핵안으로 이동하지 못하지만, 적절한 신호가 전달되면 I κ B- α 나 또는 I κ B- β 가 파괴되어 NF- κ B가 활성화된다. NF- κ B의 부적절한 활성화는 급성염증반응, 급성기반응(acute phase response), 방사선손상, 죽상경화증(atherosclerosis) 및 악성종양과 같은 여러 가지 질병의 유발과 밀접한 관련이 있다고 보고되고 있다³⁸⁾. 본 연구에서도 白花蛇舌草 메탄올추출물 처리 10분 후부터 NF- κ B의 활성화 증가가 관찰되었으며 30분에 최고활성에도달했다가 3시간까지 활성이 유지된 후 이후 급격히 감소하였다. 아마도 이러한 전사인자의

초기활성은 항암제에 의해서 세포가 죽어갈 때 요구되는 단백질들의 발현(예로써, Fas, Fas ligand 및 Bax 등)에 필요한 유전자들의 전사를 통한 발현을 증진시키기 위한 것으로 사료된다. 또한, 白花蛇舌草 메탄을 추출물에 의해 활성화되어지는 NF- κ B는 p65/c-rel의 heterodimer로 이루어졌음을 알 수 있었다(Fig. 3).

Interleukin-2는 활성화된 cytotoxic T 세포를 증폭시켜 종양세포를 살해·제거하게 되며, 분비된 IL-2는 자연살해세포(natural killer cells)도 활성화시키게 되며 활성화된 자연살해세포는 종양세포를 파괴하게 하는데 이때, Fas Ligand(FasL, CD95 ligand) 발현과 그것의 receptor, Fas(CD95)의 결합에 의존한다. 이에 따라 白花蛇舌草 메탄을 추출물에 의한 HL-60 암세포의 사멸시 Fas와 Fas Ligand의 발현이 어떻게 관여하는지 조사한 결과 Fas 단백질은 약재 처리 12시간부터 서서히 증가됨이 확인되었으며 30시간째에는 대략 대조군에 비하여 2.5배 정도의 발현이 증가되어 나타났다(Fig. 6). 그리고 FasL 단백질은 약재 처리 6시간부터 이미 서서히 증가됨이 확인되었으며 12시간째에는 대략 대조군에 비하여 3배 정도의 발현이 증가되어 나타났다(Fig. 7). 따라서, 이러한 Fas와 FasL 단백질의 발현 변화는 白花蛇舌草 메탄을 추출물 유도성 HL-60 세포고사에 밀접하게 연관되어 있음을 알 수 있었다. Chan 등³⁹⁾은 Human Jurkat cell line의 활성화에 의한 Fas 발현시 NF- κ B의 subunit인 p50, p65의 heterodimer의 활성화가 필요하며 이들은 Fas promoter 부분에 존재하는 NF- κ B binding site에 결합하여 Fas 발현을 유발시킨다고 보고하였다. 또한 Kashibhatla 등⁴⁰⁾은 T세포의 활성화유도 세포사멸(activation-induced cell death)시 NF- κ B의 활성화가 일어나며 이때 이 활성화된 NF- κ B는 Fas Ligand의 promoter에 존재하는 NF- κ B

binding site에 결합하여 Fas L의 발현을 증가시키며, 이로써 Fas 및 Fas Ligand의 상호작용에 의한 apoptosis를 촉진시킨다고 보고하였다⁴⁰⁾. 본 실험에서도 HL-60세포에 白花蛇舌草 메탄을 추출물 처리시 Fas 및 Fas ligand가 동시에 발현이 증가되며 이러한 동시 발현은 Fas와 Fas ligand의 상호작용에 의한 apoptosis 유도에 중요역할을 수행하리라 사료된다.

이상의 결과로 보아 白花蛇舌草 메탄을 추출물에 의한 HL-60 암세포의 사멸은 이 추출물에 의한 암세포의 사멸시 transcription factor인 NF- κ B를 활성화시키며, 활성화된 NF- κ B는 p65/c-rel의 heterodimers로 이루어졌음을 알 수 있었으며 또한 활성화된 NF- κ B에 의해서 Fas의 promoter에 결합하여 Fas의 발현을 유발시키는데 작용하는 중요한 면역조절제임을 알 수 있어, 그 유효성분은 물론 구체적인 작용기전이 추후에 밝혀진다면 앞으로 종양임상에도 그 기여하는 바가 크리라 생각된다.

V. 結 論

白花蛇舌草의 메탄을 추출물이 사람의 백혈병에서 유래된 HL-60 癌細胞에 어떠한 영향을 미치는지를 규명하기 위하여 전사활성인자(transcriptional activator)인 NF- κ B와 AP-1의 활성변화, Fas, FasL 및 p53 등의 발현변화들을 관찰한 결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 白花蛇舌草 메탄을추출물은 농도 의존적으로 암세포 HL-60의 죽음을 유발시켰다.
2. 白花蛇舌草 메탄을추출물을 HL-60 세포에 투여 후 EMSA방법을 통해 NF- κ B 활성을 관찰한 결과 10분부터 활성이 증가

하였으며 30분에 최고 활성을 보이고 이후 3시간까지 유지되다가 활성이 사라졌다.

3. 白花蛇舌草 메탄올추출물을 HL-60 세포에 투여 후 Supershift방법을 통해 관찰한 결과 NF- κ B 활성시 관여하는 protein은 p65/c-rel의 heterodimers로 이루어졌음을 알 수 있었다.
4. 白花蛇舌草 메탄올추출물을 HL-60 세포에 투여 후 EMSA방법을 통해 AP-1 활성을 관찰한 결과 30분부터 활성이 증가하였으며 1시간에 최고 활성을 보이고 이후 6시간까지 유지되다가 활성이 사라졌다.
5. 白花蛇舌草 메탄올추출물을 HL-60 세포에 투여 후 Supershift방법을 통해 관찰한 결과 AP-1 활성시 JunD는 주된 protein이고 JunB는 partially 관여하는 단백질임을 알 수 있었다.
6. 白花蛇舌草 메탄올추출물을 HL-60 세포에 투여 후 Fas 및 Fas ligand의 발현양상 변화를 관찰한 결과, Fas는 약재처리 후 12시간부터 발현이 증가되어 유지되었으며, Fas ligand의 경우는 약재처리 후 6시간부터 시간 의존적으로 그 발현이 증가되는 것이 관찰되었다.
7. 白花蛇舌草 메탄올추출물을 HL-60 세포에 투여 후 p53의 발현양상 변화를 관찰한 결과 약재 처리 후 6시간부터 발현되기 시작하며, 24시간까지 유지되다가 약재처리 후 30시간 후부터 서서히 p53 발현이 사라지기 시작하는 것을 관찰하였다.

이상의 결과로 보아 白花蛇舌草 메탄올 추출물에 의한 HL-60 암세포의 사멸은 전사활성 인자(transcriptional activating factor)인 NF- κ B를

활성화시키며, 이에 따라 세포의 apoptosis를 유발시킨다고 알려진 세포 표면 단백질인 Fas(CD95) 및 Fas ligand의 발현이 증가하고 이들의 상호작용에 의한 세포사멸이 촉진되는 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. Lee JH, Chung YS and Ha TY : Immunological studies on natural killer cells. J. Kor, Immunol 6:15, 1984.
2. Kikumoto S, Miyazima T and Kimura K : Study on the polysaccharide produces by schizophyllan commune Fnes. Jap. J. Agr, Chem 162:256, 1971.
3. Dressor DR and Phillips JM : The orientation of the adjuvant activity of Salmonella typhosa lipopolysaccharide and lentinan, Immunology 27:895, 1974.
4. Neale ML and Matthews S : Antimicrobial effects of a macrophage derived cytotoxin from the serum of BCG-primed rabbits(tumor necrosis serum). Med, Microbiol 17:211, 1984.
5. MacEwan EG : Immunotherapy. Current Veterinary Thery. vol. 8, ed. by RW Kirk, Saunders Philadelphia, p.45, 1983.
6. Stajerward JM and Vanky F : Lymphocytopenia and change in distribution of human B and T lymphocytes in peripheral blood induced by irradiation for mammary carcinoma. Lancet 1:1352, 1982.
7. Mavlight GM, Hersh EM and McBride CM : Lymphocyte blastogenesis induced by autochthonous human solid tumor cells;

- Relationship to stage of disease and serum factor. *Cancer* 34:1712, 1982.
8. 李尙仁, 安德均, 辛民教 : 漢藥臨床應用, 서울, 成輔社, pp.152-153, 1982.
 9. 李昌福 : 大韓植物圖鑑, 서울, 鄉文社, p.6, 93, 1982.
 10. 辛民教 : 臨床本草學, 서울, 永林社, p.569-570, 1997.
 11. 常敏毅 : 抗癌本草, 湖南, 湖南科學技術出版社, pp.126-128, 1987.
 12. 高學敏 : 中藥學, 北京, 中醫古籍出版社, pp.120-121, 1986.
 13. 貴州省中醫研究所 : 貴州中草藥名錄, 貴州, 貴州人民出版社, p.549, 1988.
 14. 문 구, 정병학, 김병주 : 암 동서의결합치료, 원광대출판국, p.258, 1999.
 15. Kim Y. M., Talanian, R. V., and Billiar, T. R. : Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increase in caspase 3-like activity via two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* 272:31138, 1997.
 16. Jeong JY, Jue DM : Chloroquine inhibits processing of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J Immunol* 158 : 4901-4907, 1997.
 17. Sen R, Baltimore D : Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47, 921-928, 1986.
 18. Im, S. Y., Han, S. J., Ko, H. M., Choi, J. H., Chun, S. B., Lee, D. G., Ha, T. Y., and Lee, H. K. : Involvement of nuclear factor-kappa B in platelet-activating factor-mediated tumor necrosis factor-alpha expression. *Eur J Immunol* 27, 2800-2804, 1997.
 19. Angel P., Karin M., : The role of jun, fos, and AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochem. Biophys. Acta.* 1072 : 129-157, 1991.
 20. Aries, S., Scgaaf, B., Muller, C., Dennin R., and Dalhoff, K. : Fas(CD95) expression of CD4+ T cells from HIV-infected patients increases with disease progression, *J. Mol. Med.* 73:591-593, 1995.
 21. Leverkus, M., Yaar, M., and Gilchrist, B.A. : Fas/Fas ligand interaction contributes to UV-induced apoptosis in human keratinocytes. *Exp. Cell Res.* 232 : 255-262, 1997.
 22. Lane DP, Crawford LV. : T antigen is bound to a host protein in SV40 transformed cells. *Nature* 278:261-263, 1979.
 23. Coles C., Condie A., Chetty U., Steel CM, Evans HJ, Prosser J. : p53 mutations in breast cancer. *Cancer Res* 52 : 5291-5298, 1992.
 24. Elledge RM, Fuqua SAW, Clark GM, Pujol P, Allred DC. : The role and prognostic significance of p53 gene alterations in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 27 : 95-102, 1993.
 25. 박재갑 엮음 : 인간생명과학, 서울, 서울대학교출판부, pp, 15-17, 1993.
 26. 東軒居士 : 衛劑寶書, 中國醫學大系, 도서출판 정담, 9권, p.817, 1987.
 27. 洪元植 : 正校黃帝內經靈樞, 서울, 東洋醫學研究院, p.38, 249, 294, 317, 1984.
 28. 上海中醫學院 : 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp.621-635, 1986.
 29. 王琦外 : 黃帝內經素問今釋, 서울, 成輔社, pp.60-61, 182, 223, 1979.

30. 李 挺：醫學入門, 서울, 한성사, pp.484-485, 1984.
31. 張介賓：景岳全書, 서울, 大星文化社, p479, 1988.
32. 鬱仁存：中醫腫瘤學(上冊), 北京, 北京科學出版社, pp.1-25, 65-74, 1991.
33. 李 岩 編：腫瘤臨症秘要, 人民衛生出版社, pp.11-26, 1983.
34. 劉正村, 尤煥文：中醫免疫, 重慶出版社, p57, 1983.
35. Mesner P, Budihardjo I, Kaufmann SH. : Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv. Pharmacol.* 1997; 41 : 461, 1995.
36. Daniel J. Van Antwerp, Inder M. Verma. : Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF- κ B. *Science* 274(1) : 787-789, 1996.
37. Amer A. Beg and David Baltimore. : An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science.* 274(1) : 782-784, 1996.
38. Cun-Yu Wang, Marty W.Mayo, Alber S. Baldwin Jr. : TNF and cancer therapy-induced apoptosis : Potentiation by inhibition of NF- κ B. *Science.* 274(1) : 784-787, 1996.
39. Chan, H., Bartos, D. P., and Owen-Scaub, L. B. : Activation-dependent transcriptional regulation of the human fas promoter requires NF- κ B p50-p65 recruitment. *Mol. Cell. Biol.* 19 : 2098-2108, 1999.
40. Kasibhatla, S., Genestier, L., and Green, D. R. : Regulation of Fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor- κ B. *J. Biol. Chem.* 274 : 987-992, 1999.