

Structural Changes on the HL-60 Cells of TPA-induced Adherence by Asadisulphide

Byung-Zun Ahn, Seon-Hee Kim, Mi-A Park[†] and Kwan-Hee You^{1*}

Department of Pharmacy, [†]Department of Biology Chungnam National University, Daejeon, 305-764

Asadisulphide were purified from *Ferrula assafoetida* by organic solvent extraction and chromatography. Since ethyl acetate extracts of *F. assafoetida* has the strongest inhibitory effects on adherence of HL-60 cells, it was reextracted with ethyl acetate, hexane, and ethyl ether and chromatographed three times to isolate asadisulphide. HL-60 cells were grouped into untreated control, TPA-treated, asadisulphide-treated and TPA+asadisulphide-treated groups, and structural changes of these cells were observed using light microscope, scanning electron microscope and transmission electron microscope to examine the inhibitory effects of asadisulphide on the TPA-induced adherence of HL-60 cells. Light microscopic observations showed that asadisulphide has inhibitory effects on the cell aggregation, extension of cytoplasmic processes and inhibition of substrate adhesion of HL-60 cells. Using scanning and transmission electron microscope, it was observed that cell surfaces and several ultrastructures of TPA-treated HL-60 cell were different from control group, while there were no remarkable differences between asadisulphide-treated and TPA+asadisulphide-treated group. These results could suggest that asadisulphide has the inhibitory effects on the TPA-induced structural changes of HL-60 cells

Key Words: Asadisulphide, *Ferrula assafoetida*, HL-60 cells, Structural changes, Substrate adhesion, TPA

서 론

아위 (*Ferrula assafoetida*)는 다년생 초본으로 주생산지는 아프가니스탄과 이란 등이며, 강한 마늘 냄새가 나는 것이 특징이다. 아위의 약리 작용으로는 sedative effect, 거담, anti-bacterial effect, anticoagulant effect 등이 보고되어 있고, 성분으로는 정유가 10~17%로 이중 sec-butyl-propenyl disulfide가 반을 차지하고 있다. 아위의 강한 냄새를 일으키는 성분으로는 주로 disulfide류 ($C_8H_{16}S_2$, $C_{10}H_{18}S_2$, $C_{11}H_{20}S_2$)를 들 수 있으며 그 외에도 ferulic acid와 그 ester 및 farnesiferol A, B, C 등이 포함되어 있다.

강력한 발암 촉진물질인 phorbol ester는 세포분열을 활성화시키는 동시에 여러가지 세포대사의 다양한 변화를 유발시킨다는 사실이 알려져 있다. 즉 phorbol ester는 세포의 형태를 변화시키고²⁾, ornithine decarboxylase의 활성화¹²⁾, polyamin 생합성의 유도⁴⁾, prostaglandin과 arachidonic acid 생성의 촉진⁶⁾,

T 세포에서의 interleukin-2 생성유도⁹⁾, myeloid leukemia 세포의 분화유도³⁾, lymphocyte의 응집과 기질표면에 대한 부착을 유도하고 있다⁷⁾. Phorbol ester의 일종인 TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate)는 강력한 발암 촉진제로서 phorbol과 acetic acid, myristic acid와 diester 물질로 과두유에서 처음 분리된 cocarcinogen이다. 한편 G. Rovera 등⁸⁾은 사람의 백혈병 세포인 HL-60 세포에 TPA를 처리했을 경우 많은 세포 돌기들이 형성되고 이로 인해 세포배양 용기의 바닥에 부착되는 기질부착 현상을 관찰하였다.

본 연구에서는 이러한 TPA로 인해 야기된 돌기형성과 부착 현상을 억제하는 물질이 TPA의 발암 촉진기능의 억제와 관련이 있으리라는 가정 하에 중앙치료에 사용되어 온 생약제 중 아위로부터 asadisulphide를 순수분리한 후 HL-60 세포를 대조군, TPA 처리군, asadisulphide 처리군, TPA와 asadisulphide 병행처리군으로 나누어 광학현미경과 주사 및 투과전자현미경을 사용하여 미세구조의 변화를 관찰하여 기질부착 억제효과를 분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 생약 및 용매와 silicagel

시료로 사용된 아위는 건재상 (광명건재, 대전)에서 구입하

*는 문 접수: 2002년 2월 14일

수정재접수: 2002년 2월 28일

[†]별책 요청 저자: 유관희, (우) 305-764 대전광역시 유성구 궁동 220, 충남대학교 자연과학대학 생물학과

Tel: 042-821-5498, Fax: 042-822-9690

e-mail: khyou@cnu.ac.kr

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구 (2001-1-20700-001-2) 지원으로 수행되었음.

여 확인 후 사용하였다. 추출에 쓰인 용매류는 국내외의 EP급을 2차 증류하여 사용하였고, 분리에 사용한 silicagel은 Sigma사의 230-400 mesh를 사용하였다.

2) HL-60 세포와 배양액

사람의 백혈병 세포인 HL-60 세포주는 화학연구소 (대전)에서 분양 받아 사용하였고 24시간에 한 번씩 계대배양 하였다. 배양액은 증류수에 L-glutamine이 포함된 RPMI 1640배지를 용해시키고 56°C 수조에서 30분간 가온하여 불활성화 시킨 fetal bovine serum (FBS, Flow laboratories Inc, Mclean, VA)을 100 ml, 2 g의 NaHCO₃, antibiotics로 100,000 units의 penicilline G와 100 mg의 streptomycin을 넣어 용해시켰다. 0.1 N HCl로 pH를 7.2로 조절하여 전체량을 1 ℓ로 한 뒤 멸균여과하여 제조하였고, 냉장고 (4~6°C)에서 보관하면서 사용하였다. HL-60 세포는 tissue culture flask를 사용하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

세포독성 및 부착억제 관찰에 사용했던 well plate는 Corning사의 25810제품을 사용하였고, 부착된 세포의 정량화에 사용된 trypsin은 Sigma의 제품을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 아위의 추출과정 및 asadisulfide의 분리

아위를 극성이 낮은 hexane (HEX)부터 ethyl ether (EE), ethyl acetate (EA) 순으로 점차 극성을 높여 가며 추출하고 각 분획을 얻어 TPA로 처리된 HL-60 세포에 대한 이들의 부착억제 작용에 사용하였다. 이에 가장 강한 부착억제 효과가 있는 용매층을 다량의 엑기스를 얻기 위하여 다시 용매층, 1.8 kg 과 EA를 삼각플라스크에 넣고 25°C에서 24시간 이상 흔들면서 2회 추출한 뒤 여과하여 감압농축하였다. 추출액에 HEX을 넣고 흔들어 HEX에 용해되는 부분을 제거한 뒤 다시 EE를 가해 용해분을 여과하여 여액을 시료로 사용하였다. 이 시료를 TPA로 처리된 HL-60 세포에 있어서의 기질부착 억제 실험을 수행하여 가장 부착억제 효과가 강한 시료를 얻고, 이 시료 (0.9)를 다시 silicagel column (230-400 mesh)에서 전개용매 HEX:EA:MeOH=6.0:2.5:1.5를 사용하여 11개의 분획을 얻고 분리축적에 따른 작용강화 여부를 관찰하였다. 이 중 부착억제 효과가 가장 강한 분획을 다시 silicagel column (230-400 mesh)에서 전개용매 Benzene:Acetone=9.2:0.8을 사용하여 2차 분획을 얻고 분리축적에 따른 작용강화 여부를 관찰하였다. 같은 방법으로 부착억제 효과가 가장 강한 분획을 다시 silicagel column (230-400 mesh)에서 (전개용매 CHCl₃:EA:MeOH=945:50:5)를 사용하여 3차 분획을 얻고 분리축적에 따른 작용강화 여부를 관찰한 뒤, 부착억제 효과가 가장 강한 분획을 정제하여 유사의 순수 단일활성물질인 asadisulphide를 분리하였다.

2) TPA로 처리된 HL-60 세포에 대한 asadisulfide의 처리
HL-60 세포의 현탁액은 1×10⁵ cells/ml가 되게 조제하여 24-well plate 4개에 각각 1 ml씩 가했다. 제 1 well에는 현탁액만을 가했고 (대조군), 제 2 well에는 TPA용액 50 μl을 가했다 (TPA 처리군). 제 3 well에는 asadisulphide 용액 20 μl을 가했고 (asadisulphide 처리군), 제 4 well에는 TPA 50 μl와 asadisulphide 20 μl를 가한 (TPA와 asadisulphide 병행처리군) 후, 37°C 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 약 20시간 동안 배양한 후 광학현미경과 주사전자현미경 그리고 투과전자현미경을 사용하여 관찰하였다.

3. 전자현미경 관찰방법

1) 주사전자현미경 관찰방법

TPA 처리군은 HL-60 세포의 현탁액은 1×10⁵ cells/ml가 되도록 조제하여 cover glass를 넣은 6-well plate의 well에 3 ml씩 넣고 TPA를 150 μl를 가한 후, CO₂ incubator에서 약 20시간 경과한 다음 2.5% glutaraldehyde로 4°C에서 30분 동안 고정시켰다. 그 다음 cover glass만을 꺼내 탈수시켰는데 탈수는 30, 50, 60, 90, 95%의 ethanol로써 20분 간격으로 행하였으며 100%에서는 2번 시행하였다. 탈수가 끝난 후 isoamylacetate에 30분 동안 방치하고 liquid CO₂를 이용하여 critical point dryer로 건조하였다. 건조 후 시료는 stub에 올려 400Å 두께로 gold coating하여 Akashi SX-40 주사전자현미경으로 20 KV에서 관찰하였다. 대조군, asadisulfide 처리군, TPA와 asadisulfide 병행처리군은 HL-60 세포는 1×10⁵ cells/ml가 되도록 조제하여 50 ml culture flask 3개에 각각 10 ml씩 넣고, 제 1 culture flask에는 현탁액만 (대조군), 제 2 culture flask에는 asadisulphide 200 μl (asadisulphide 처리군), 제 3 culture flask에는 TPA용액 500 μl와 asadisulphide 200 μl (TPA와 asadisulphide 병행처리군)을 넣고 20시간 배양한 후 2.5% glutaraldehyde로 4°C에서 30분 고정하고 0.2 μm pore size nitrocellulose filter paper를 이용하여 여과시켜 여과지와 함께 탈수, isoamylacetate 처리, critical point drying, gold coating한 후, 위의 TPA 처리군과 동일한 방법을 사용하여 관찰하였다.

2) 투과전자현미경 관찰방법

투과전자현미경 관찰을 위하여 위의 대조군, TPA 처리군, asadisulfide 처리군 그리고 TPA와 asadisulfide 병행처리군의 HL-60 세포를 0.1 M 인산 완충용액 (pH 7.4)으로 조정된 4% glutaraldehyde에 4°C에서 30분 고정한 후, 0.1 M 인산 완충용액 (pH 7.4)으로 2회 이상 세척하고 0.1 M 인산 완충용액으로 조정된 1% osmic 산으로 다시 2시간 고정하였다⁷⁾. 위의 주사현미경에서와 같은 방법으로 탈수를 시행하고 propylene oxide로써 치환한 후 epon 812 혼합액으로 포매하였다. Sorvall MT-2B형 초박절편기로 유리칼을 사용하여 500-600Å 두께 (silver color)의 초박절편을 만들어 포화 uranyl acetate과 lead citrate

으로 이중 전자염색을 시행한 후⁹⁾ Philips CM-10형 전자현미경으로 관찰하였다.

결 과

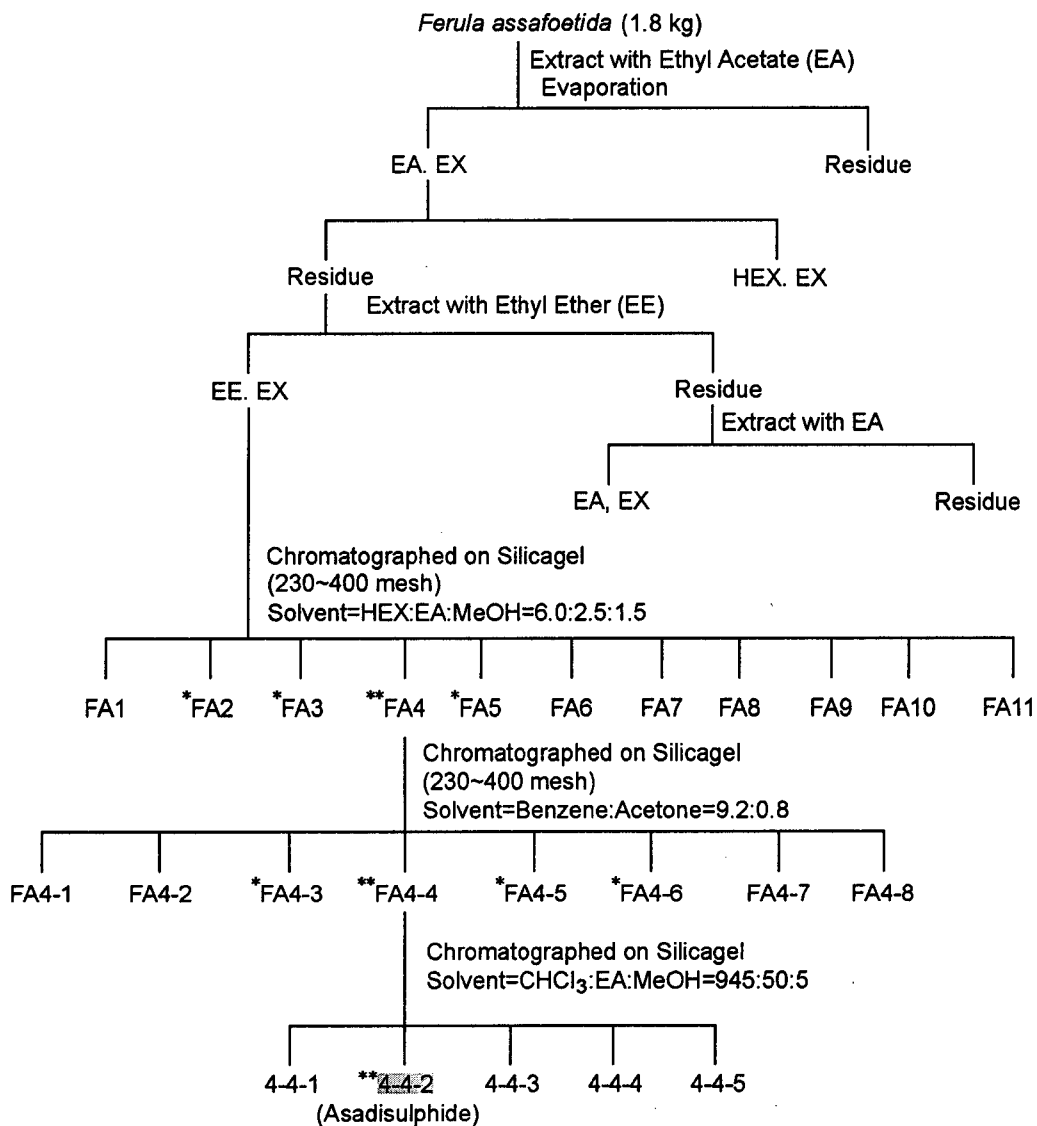
1. Asadisulfide의 순수분리

Asadisulfide 분리를 위하여 Table 1에서와 같이 아위를 각각 HEX, EE, EA 순으로 극성을 높여가며 추출하고 각 분획을 얻어 TPA로 처리된 HL-60 세포에 대한 이들의 부착억제 작용을 측정된 결과, EA층에서 가장 강한 부착억제 효과가 있음을 알아내었다. 이에 다량의 추출물을 얻기 위하여 다시

아위 1.8 kg과 EA를 삼각플라스크에 넣 25℃에서 24시간 이상 흔들면서 2회 추출한 후 여과, 감압농축하여 EA층을 얻었다. 여기에 HEX을 넣고 흔들어 HEX에 용해되는 부분을 제거한 후 다시 EE를 가해 용해분을 여과하여 여액을 시료로 하였다.

시료 0.9 g을 silicagel column (230~400 mesh)에서 전개용매 HEX:EA:MeOH=6.0:2.5:1.5를 사용하여 chromatography한 뒤 11개의 1차 분획을 얻었다. 이 1차 분획을 가지고 다시 TPA 처리된 HL-60 세포들에 있어서의 부착억제 실험을 한 결과, 분획 2, 3, 4, 5에서 비교적 강한 부착억제 효과를 보였는데, 이중에 가장 강한 부착억제 효과를 보인 분획 4를 가지고 전

Table 1. Fractionation of exudate of *Ferula assafoetida*



*: the fraction of antiadhesive effect (**>*)

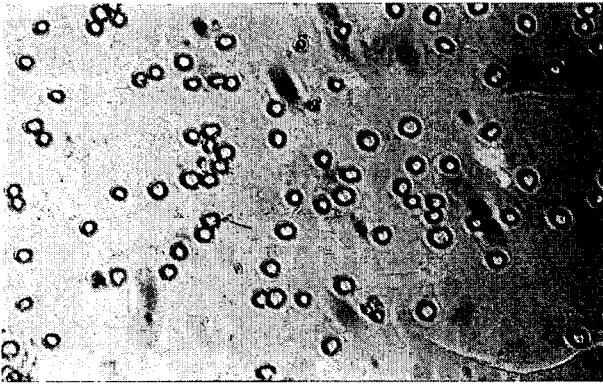


Fig. 1. Light micrograph of HL-60 cells ($\times 100$).

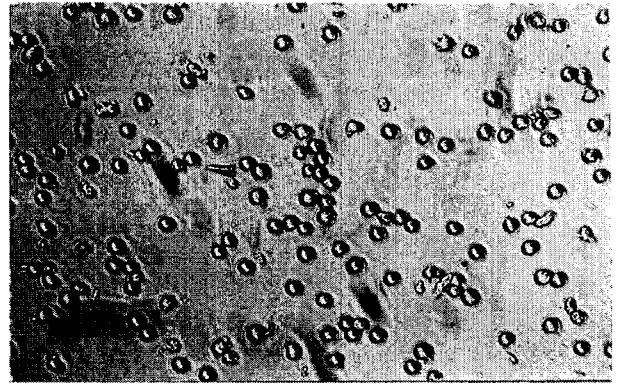


Fig. 3. Light micrograph of asadisulphide-treated HL-60 cells ($\times 100$).



Fig. 2. Light micrograph of TPA-treated HL-60 cells ($\times 100$). Note the clumped HL-60 cells and the cytoplasmic processes.

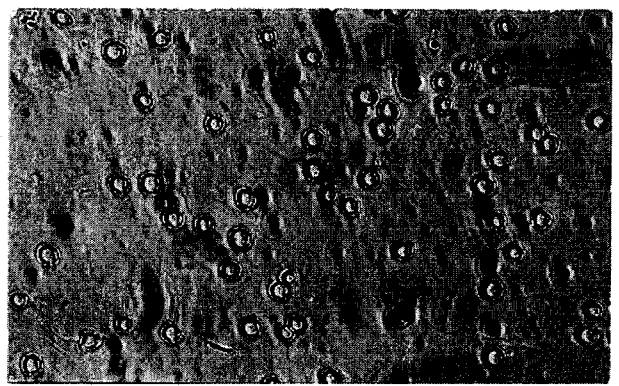


Fig. 4. Light micrograph of TPA + asadisulphide-treated HL-60 cells ($\times 100$). The cell surface (no cytoplasmic processes) resembles that of the untreated cells.

개용매 benzene:acetone=9.2:0.8을 사용하여 chromatography한 뒤 8개의 2차 분획을 얻었다. 1차 분획에서와 같은 방법으로 부착억제 실험을 한 결과 가장 효과 있는 분획 4-4를 얻었고, 이 분획 4-4를 다시 전개용매 CHCl_3 :EA:MeOH=945:50:5를 사용하여 chromatography한 뒤, 유상의 순수활성물질 (분획 4-4-2)인 asadisulphide를 분리하였다.

2. 광학현미경 관찰 결과

1) 대조군

대조군의 HL-60 세포들은 관찰된 모든 세포가 원형의 구조를 보였으며, 각각의 세포들은 독립적으로 분리된 상태로 배양액에 suspension되어 있었다 (Fig. 1).

2) TPA 처리군

TPA가 처리된 HL-60 세포의 경우 대부분의 세포들이 well plate의 바닥에 부착된 상태로 관찰되었으며, 형태에 있어서도 대조군과 매우 상이한 모습을 보였다. 한 개의 well plate 당 약 40% 정도의 HL-60 세포가 한 개 또는 2~3개씩 응집되어 매우 긴 세포질성 돌기를 형성하는 경우가 관찰되었고, 나머지 약 60% 정도의 HL-60 세포들은 많은 수의 세포들이 서로 심하

게 응집되어 세포 덩어리를 형성하였으며, 이들은 위의 경우보다 짧은 세포질성 돌기를 가지고 한 방향으로 길게 뻗은 형태와 여러 방향으로 길게 또는 짧게 뻗은 형태가 관찰되었다 (Fig. 2).

3) Asadisulfide 처리군과 TPA와 asadisulfide 병행처리군

TPA와 asadisulfide를 병행처리한 HL-60 세포나 asadisulfide만을 처리한 HL-60 세포들은 대조군의 HL-60 세포와 매우 유사하게 관찰되었다. 이 두 실험군에서 관찰된 대부분의 HL-60 세포들은 원형의 구조로, 각각의 세포들은 서로 독립적으로 분리된 상태에서 배양액을 suspension되어 관찰되었다 (Fig. 3, 4). TPA 처리된 HL-60 세포에서와 같이 부착현상, 세포질성 돌기형성, 세포들끼리 응집되는 현상은 관찰할 수 없었다.

3. 주사전자현미경 관찰 결과

1) 대조군과 asadisulfide 처리군

주사전자현미경으로 관찰된 대조군과 asadisulfide 처리군에서의 HL-60 세포는 약간 납작했고 세포들이 매끄러운 형태를

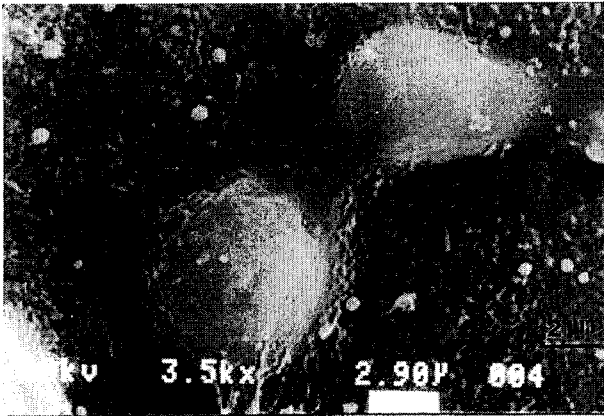


Fig. 5. Scanning electron micrograph of untreated HL-60 cells. The cell surface is smooth.

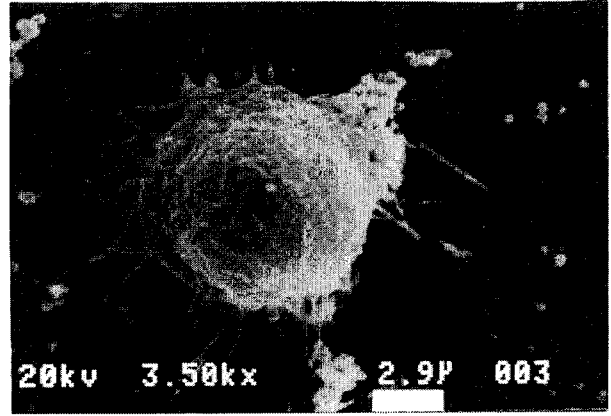


Fig. 7. Scanning electron micrograph of TPA-treated HL-60 cells. Irregular cell surface and many cytoplasmic processes are observed.

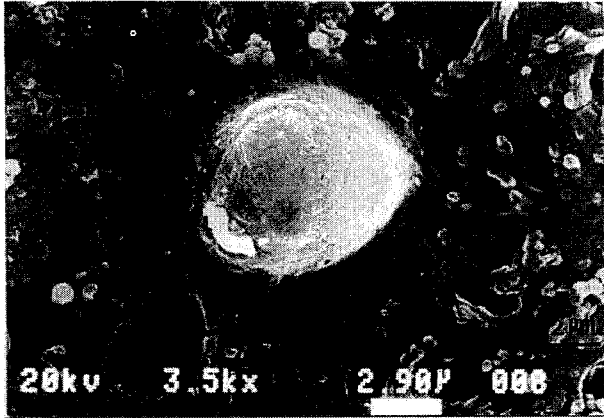


Fig. 6. Scanning electron micrograph of asadisulphide-treated HL-60 cells. The cell surface shows similar to that of untreated HL-60 cells.

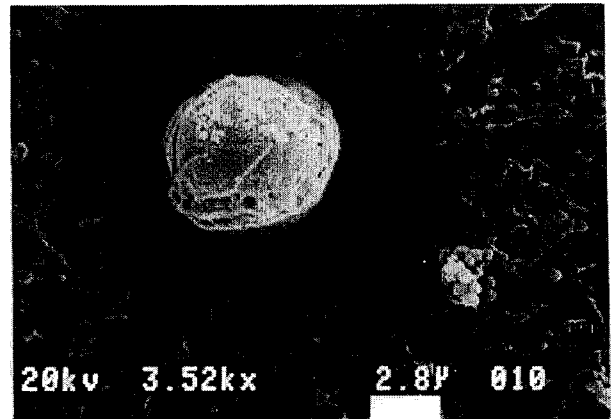


Fig. 8. Scanning electron micrograph of TPA + asadisulphide-treated HL-60 cells. This cell is similar with untreated cells but shows some irregular cell surface.

보였으며 가끔은 세포표면에 작은 구조물들이 부착되어 있었다 (Fig. 5, 6).

2) TPA 처리군

TPA 처리된 HL-60 세포는 주사전자현미경 상에서 두 가지 형태로 관찰되었는데, 한 종류는 구형의 세포에서 길고 가는 모양의 세포질성 돌기들이 여러 방향으로 뻗어나와 이 돌기들로부터 바닥에 부착된 형태였으며, 이들의 세포표면은 대조군과 달리 많은 주름이 존재하여 울퉁불퉁한 모습으로 매우 불규칙한 구조가 관찰되었다 (Fig. 7). 또 다른 HL-60 세포들은 매우 납작하게 한 방향으로 길게 뻗어져 있었는데, 세포질성 돌기들은 매우 굵고 납작하게 퍼져 바닥에 강하게 부착된 형태를 하고 있었고 또한 가늘고 짧은 세포질성 돌기들이 여러 방향으로 뻗어 있었다. 이러한 세포에서도 세포표면은 불규칙하게 거친 형태를 보인 경우도 있었다.

3) TPA와 asadisulfide 병행처리군

TPA와 asadisulfide 병행투여한 HL-60 세포는 구형으로 대

조군과 유사하게 세포질성 돌기는 전혀 관찰할 수 없었다. 그러나 세포표면은 대조군과 차이가 있었는데, TPA 처리군에서 볼 수 있었던 거친 주름진 모양이 관찰되긴 했으나 그 보다는 경미한 정도를 나타내었다 (Fig. 8).

4. 투과전자현미경 관찰 결과

1) 대조군과 asadisulfide 처리군

대조군에서 HL-60 세포의 전체적인 형태는 둥근 모양을 보였으며, 세포막을 따라 가끔 몇 개의 매우 짧은 미세융모가 관찰되기도 하지만 세포막의 대부분 부위는 고른 형태를 나타내었다. 핵의 이중막 내면을 따라 이질염색질이 작은 cluster를 이루며 골고루 분포함과 동시에 핵의 중앙부에도 분산되어 존재하였다. 세포질에는 큰 vacuole들이 상당히 많이 존재하였으며, 대부분의 vacuole 내부에는 비교적 전자밀도가 낮은 물질들이 골고루 차지하고 있었다. 특히 어떤 vacuole들이 내

부에는 전자밀도가 매우 높은 물질들이 분포하고 있는 경우도 있었다 (Fig. 9). 한편, asadisulfide 처리군에서는 핵 주변의 세포질에는 미토콘드리아와 골지체들이 다수 관찰된 바 미토콘드리아는 작고 원형 내지 타원형의 구조를 보였고, 관찰된 골지체는 모두 여러 개의 dictyosome으로 구성된 층판구조를 가지고 있었으며 이들 근처에는 다양한 크기의 vesicle들이 밀집되어 있음이 관찰되었다 (Fig. 10). 또한 세포질 전반에 걸쳐 한 개의 층판으로 구성된 조면소포체가 산재하고 있었다 (Fig. 9, 10).

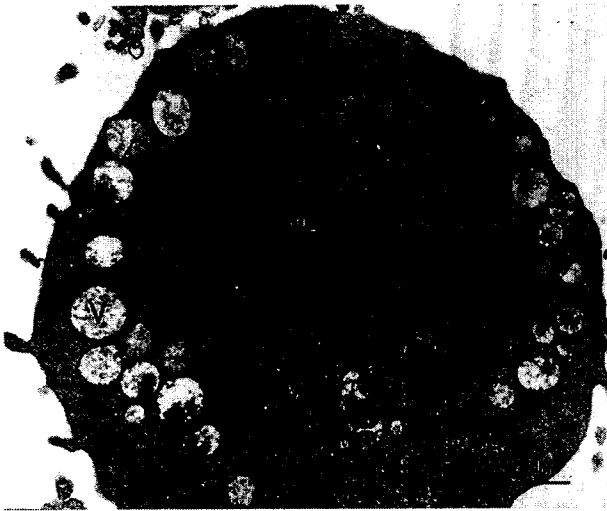


Fig. 9. Transmission electron micrograph of untreated HL-60 cells. The cell shows round shape and rough endoplasmic reticulum (RER), mitochondria (M), and vacuoles (V) are observed in the cytoplasm.



Fig. 10. Transmission electron micrograph of asadisulfide-treated HL-60 cells. The round mitochondria (M) and well developed Golgi complex (G) are observed.

2) TPA 처리군

TPA가 처리된 HL-60세포의 가장 주목할만한 구조변화는 관찰된 대부분의 세포에서 전체적인 세포형태가 매우 불규칙한 모양을 보인다는 사실인데, 세포막은 굴곡이 매우 심하며 다양한 형태의 세포질성 돌기들이 내부에는 잘 발달된 형태의 조면소포체가 평행한 배열구조를 나타내기도 하였으며, 다수의 원형구조의 미토콘드리아와 몇 개의 지방적들이 관찰되었다. 세포질 전반에 걸쳐 원형의 vacuole들이 많이 존재하고 있으며 대부분의 vacuole 내부에는 대조군과 다른 전자밀도가

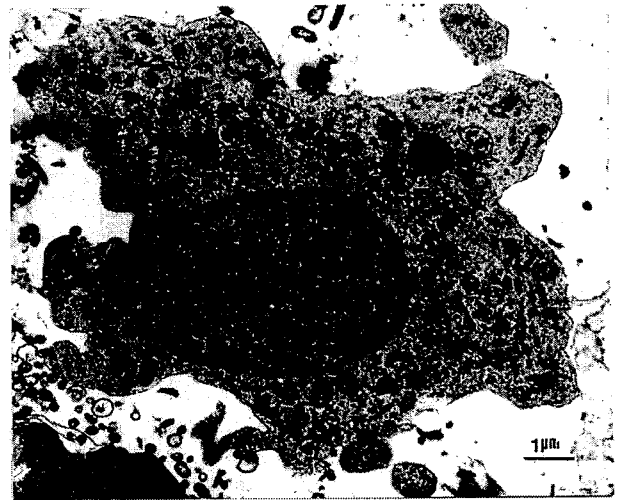


Fig. 11. Transmission electron micrograph of TPA-treated HL-60 cells. Note the irregular cell membrane and cytoplasmic processes. More abundant mitochondria (M) and rough endoplasmic reticulum (RER) are observed.

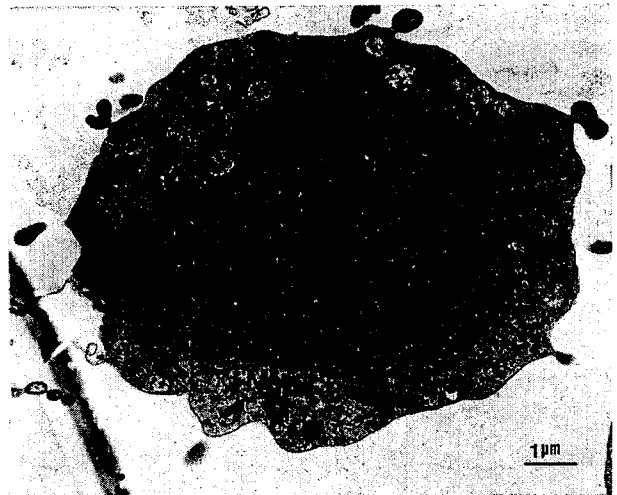


Fig. 12. Transmission electron micrograph of TPA + asadisulfide-treated HL-60 cells. This HL-60 cell containing mitochondria (M), rough endoplasmic reticulum (RER), and Golgi complex (G) is similar with untreated or asadisulfide treated cell but shows some irregular cell membrane.

높은 다양한 크기와 구조를 보이는 물질들이 관찰되었다. 또한 원형구조의 미토콘드리아가 세포질에 골고루 산재하고 있었으며, 여러 개의 지방적들이 관찰되었다. 또한 조면소포체는 대조군에 비해 훨씬 증가 되었으며 전체 세포질에 고루 분포하고 있었다 (Fig. 11).

3) TPA와 asadisulfide 병행처리군

본 실험군의 세포는 세포막이 약간씩 굴곡된 세포도 가끔 관찰되었지만 대부분의 세포들은 대조군과 유사하게 완만한 구조를 보였으며, 몇 개의 매우 작은 미세용모들이 존재하였다. 세포질에는 대조군과 유사한 구조의 vacuole들이 관찰된 반면 대조군에서 관찰된 vacuole보다 작은 크기의 구조들도 다수 관찰되었다. 이들 내부에는 전자밀도가 낮은 물질이 균등하게 분포하는 vacuole과 전자밀도가 높은 물질을 포함하는 vacuole의 두 가지 형태가 관찰되었으며, 이들은 대조군과 흡사한 양상이다. 또한 조면소포체도 대조군과 유사한 한 개의 층판구조로 구성된 핵의 주변부 세포질에 분포하고 있었으며, 골지체와 미토콘드리아가 세포질에 산재하고 있었다. 이 실험군 HL-60 세포의 핵에서는 뚜렷한 구조의 인이 관찰되었으며 이 경우 이질염색질들은 매우 적은 양이 주로 세포막 내면에 결합되어 있었고 진정염색질들이 대부분 차지하고 있었다. 또한 핵막이 심하게 굴곡된 경우도 관찰되었는데 이 경우는 풍부한 이질염색질들이 대조군의 경우와 유사한 분포를 보였다 (Fig. 12). 한편 관찰된 많은 세포에서 핵막의 분리현상이 관찰되기도 하였는데 핵막의 내막과 외막이 핵공이 존재하는 부위를 제외하고 모든 핵막 부위에서 분리되어 있었다.

고 찰

암을 정복하기 위한 인간의 노력이 수십년 동안 계속되어 왔음에도 불구하고 각종 암은 여전히 현대 의학의 난제 중 하나로 남아 있다. 중공의 항암 처방집에는 암이나 기타 종양 치료에 쓰이는 많은 천연물들이 소개되고 있고¹⁾, 우리나라에서도 옛부터 한방과 민간에서 암의 치료에 한약제가 사용되어 왔다. 따라서 천연물은 항종양성 생리활성물질을 찾기 위한 귀중한 자원이라 할 수 있다. 우리나라를 비롯한 동양권에서는 옛부터 암 또는 기타 종양치료에 사용되어 온 한약제들의 세포독성 스크리닝 및 활성물질 탐구가 진행되어 왔다.

한방과 민간에서 항암의 목적으로 자주 사용되어 온 아위를 구입하여 극성에 따른 용매추출 분획을 얻고 TPA로 처리된 HL-60 세포에 있어서의 기질부착억제 실험을 수행한 결과, EA층에서 가장 강한 부착억제 효과가 있음을 밝혔으며, 이에 EA층을 다시 EA, HEX, EE 순으로 추출한 후, 3회 chromatography하여 아위 순수활성물질인 asadisulfide를 분리해 내었다. 이 순수활성물질을 가지고 HL-60 암세포를 대조군, TPA 처리군, asadisulfide 처리군, TPA와 asadisulfide 병행처리군으

로 나누어 광학현미경과 주사 및 투과전자현미경적 방법으로 구조를 관찰하였다.

아위에서 분리된 순수 단일 기질부착억제물질은 sec, butyl-3-(2-hydroxymethyl-2-propenelyloxy) propenyldisulfide이다. 이는 이미 Kajimoto T 등¹²⁾에 의해 분리되어 asadisulfide (2-hydroxymethyl-2-butenic acid-3-((1-methylpropyl)dithio)-2-propenylester)라고 명명된 바 있다.

광학현미경 관찰 결과, TPA 처리군이 대조군과 상이한 점은 유 등²⁾이 TPA 처리 세포에서 비부착/부착 세포수비가 9/82로 99% 이상이 well plate 바닥에 부착된다고 보고하였는데 이는 세포질성 돌기를 이용한 것으로 보인다. Asadisulfide를 처리한 목적은 이로 인해 세포 자체에 어느 정도 독성이 가해져 대조군과 차이를 보이는지 비교하기 위함이었었는데, 유 등²⁾에 의한 세포부착 실험에서도 알 수 있듯이 세포 수가 90개/ml로 대조군의 94개/ml과 별 차이가 없었고 광학현미경적 구조 또한 대조군과 거의 흡사하여 asadisulfide의 HL-60 세포에 대한 세포독성은 없는 것으로 생각된다. 한편 TPA만을 처리했을 경우 응집현상, 세포질성 돌기형성, 기질부착의 현상을 보였는데 TPA와 asadisulfide를 병행처리했을 경우에는 우선 세포질성 돌기가 사라져 원형의 상태로 되었고, well plate 바닥에 부착되었던 것이 각각 독립적으로 분리된 상태에서 배양액에 suspension되어 있었다.

이와 같이 광학현미경 관찰 결과 asadisulfide가 TPA 처리된 HL-60 세포에 대하여 응집현상, 세포질성 돌기형성, 기질부착 현상을 억제한다는 사실을 알 수 있었다.

주사전자현미경 관찰 결과 대조군, asadisulfide 처리군, TPA와 asadisulfide 병행처리군에서 공통적으로 매끄러운 표면구조가 관찰되었는데 형태적으로 세포질성 돌기가 없이 구형이었고, 단지 TPA와 asadisulfide 병행처리군에서만 TPA 처리군보다 경미하게 주름진 비교적 매끄러운 표면구조가 관찰되었다. 반면 TPA 처리군의 경우 세포표면에 거친 주름이 있고 세포질성 돌기들 역시 불규칙하게 주름진 모양으로 여러 방향 또는 방향으로 길게 뻗어나와 바닥에 부착되어 있었다.

투과전자현미경 관찰 결과, 대조군, asadisulfide 처리군, TPA와 asadisulfide 병행처리군에서 공통적인 미세구조가 관찰되었는데, 세포막은 전체적으로 완만한 구조를 나타냈고, 세포질에는 단층의 조면소포체, 전자밀도가 낮은 물질이 차지하고 있는 vacuole과 vesicle, 잘 발달된 골지체, 미토콘드리아가 산재하였다. 반면 TPA 처리군에서는 세포막의 굴곡이 심하며 세포질성 돌기를 포함한 세포질 내부에 조면소포체와 지방적들이 훨씬 증가하였다. 그리고 vacuole과 vesicle 내부에는 전자밀도가 높은 물질이 차지하고 있었다.

이와 같이 주사 및 투과전자현미경 관찰 결과를 종합하여 볼 때, 세포표면 및 미세구조에 있어서 TPA 처리군의 HL-60 세포는 대조군에 비해 많은 차이가 있으나, asadisulfide 처리

군과 TPA와 asadisulfide 병행처리군의 HL-60 세포는 대조군과 커다란 차이가 없었다. 이것으로 보아 아위 순수활성물질인 asadisulfide는 TPA에 의하여 야기되는 HL-60 세포의 구조 변화 현상을 억제하는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) 홍원식 편저 (1980): 現代中共의 癌治療, 영문사.
- 2) 유관희, 박미아, 김선희, 안병준 (2000): TPA로 야기된 HL-60 세포의 기질부착에 대한 asadisulphide의 억제 효과. 대한의생명과학회지, **6(3)**: 181-186.
- 3) Driedger PE and Blumberg PM (1977): The effect of phorbol esters on chicken embryo fibroblast. *Cancer Res*, **37**: 3257-3265.
- 4) Huberman E and Callahan FM (1979): Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor-promoting agents. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**: 1293-1297.
- 5) Huberman E, Weeks C, Herrman A, Callahan M and Slaga T (1981): Alteration in polyamine levels induced by phorbol diesters and other agents that promote differentiation in human promyelocytic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **78**: 1062-1066.
- 6) Ohuchi K and Levine L (1978): Stimulation of prostaglandin synthesis by tumor-promoting phorbol-12,13-diesters in canine kidney (MDCK) cells. *J Biol Chem*, **253**: 4783-4790.
- 7) Palade GE (1965): *The Scientific endeavor*. New York, Rockefeller Institute press.
- 8) Reynolds ES (1963): The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*, **17**: 208-212.
- 9) Rovera G, O'Brien GT and Diamond L (1979): Induction of differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor promoters. *Science*, **204**: 868-8870.
- 10) Rovera G, Santoli D and Damsky C (1979): Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76(6)**: 2779-2783.
- 11) Stoeck M, Lees R, Pantaleo G and McDonald MR (1989): Comparison of phorbol-myristate-13 acetate and dioctanoyl-sn-glycerol in the activation of EL4161 thymoma cell. *J Cell Physiol*, **138**: 545-547.
- 12) Kajimoto T (1989): Sesquiterpenoid and disulphid derivative from *Ferula assafoetida*. *Phytochemistry*, **28**: 1761-1763.
- 13) Yuspa SH, Lichi U, Ben T, Patterson T, Hennings H, Slaga TJ, Colburn N and Kelsey W (1976): Phorbol esters stimulate DNA synthesis and ornithin decarboxylase activity in mouse epidermal cell cultures. *Nature*, **262**: 402-404.