

매죽나무의 부위별 면역 및 항암활성 비교

권오웅* · 김철희** · 김호성** · 권민철** · 안주희** · 이학주* · 강하영* · 이현용***

*국립산림과학원, **강원대학교 BT특성화학부대학, ***강원대학교 생명공학연구소

Comparison of Immuno modulatory and Anticancer Activities according to the Parts of the *Styrax japonica* Sieb. et Zucc.

Oh Woung Kwon*, Cheol Hee Kim**, Hyo Sung Kim**, Min Chul Kwon**, Ju Hee Ahn**, Hak Ju Lee*, Ha Young Kang*, and Hyeon Yong Lee***

*Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea.

**College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

***Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

ABSTRACT : This study was performed to anticancer activities and immuno modulatory activities according to the parts of the *S. japonica* Sieb. et Zucc. The cytotoxicity on human kidney cell (HEK 293) was showed below 27.4% in adding the methanol extracts. The anticancer activity were increased in over 60% by barks extracts in AGS and MCF-7 cells. The immune cell growth using human immune B and T cells was improved by the barks extracts of *S. japonica* Sieb. et Zucc. in adding 1.0 mg/ml concentration. The secretion of the IL-6 and TNF- α from human immune B and T cells was showed secretion for the amount of cytokines by bark extracts of *S. japonica* Sieb. et Zucc. NK cell growth was increased against control all of the extracts of *S. japonica* Sieb. et Zucc. Densitometric analysis of Bcl-2 revealed that possible to decrease potentialities of taking cancer in adding of extracts from *S. japonica* Sieb. et Zucc. From the results, the roots and barks extracts of *S. japonica* Sieb. et Zucc. were showed useful biological activities.

Key Words : *Styrax japonica*, Anticancer activities, Bcl-2, Immune activity, Cytokine, NK cell

서 론

매죽나무는 우리나라 중부 이남의 산야에 분포되어 자라는 낙엽성의 소교목류로서 5~6월에 백색의 많은 꽃이 아래쪽을 향하여 피는데 꽃받침의 모양이 종을 닮았다 (Lee, 1996)고 하여 일부지방에서는 흔히 종꽃이라고 부르기도 한다. 매죽나무는 양지성 식물이지만 반음지 조건에서도 비교적 잘 자라고 추위와 건조에도 잘 견디며 토양을 가리지 않고 잘 자랄 뿐만 아니라 공해에도 강한 식물이다.

매죽나무는 꽃이 아름답고 일시에 많은 꽃을 피우기 때문에 관상가치가 높아 가로수, 공원수 및 조경수로서 자생수종의 가치가 재평가되고 이들의 이용성 및 대량번식 등에 관한 연구가 활발해지고 있다 (김, 1989).

매죽나무에는 egonol 계 화합물인 egonol acetate, egonol-2-methylbutanoate, demethoxyegonol, 그리고 demethoxyegonol-2-methylbutanoate을 포함하고 있는 것으로 보고되어 있다

(Takanashi & Tajizawa, 1998). 생리활성에 대한 보고는 많은 연구는 되어 있지는 않지만, human leukemic HL-60 cells 에 대한 억제 활성을 나타낸다는 보고가 있다 (Hirano *et al.*, 1994).

종양 발생 기전 중 세포 증식속도의 증가에 관한 연구는 비교적 많이 이루어진 반면 생리학적 세포사망 (physiological cell death)의 조절에 관한 연구는 최근에 들어서야 활발해지고 있다. 이런 생리학적 세포사망, 즉 cell suicide는 다양한 생물학적 환경에서 일어나며, 이때 나타나는 세포 내의 구조적 변화는 괴사현상 (necrotic process)과는 차이가 있다. Apoptosis로 불리는 이 기전 (Kerr *et al.*, 1972)은 체내 여러 기관에서 일정한 수준으로 세포수를 유지하는 데 중요한 역할을 담당하고 있다.

Bcl-2는 18번 염색체에 위치하는 원형 발암 유전자 (proto-oncogene)로 apoptosis를 방해하여 세포의 생존을 연장시키는 기능을 하는 것으로 알려져 있고 (Korsmeyer, 1992) 이 유전

[†]Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6455 (E-mail) hyeonl@kangwon.ac.kr
Received January 31, 2007 / Accepted May 30, 2007

자의 산물인 bcl-2 단백질은 분자량이 26 kDa으로 미토콘드리아의 내막에 위치한다고 하는데 (Hockenbery *et al.*, 1990) 최근 연구에서 bcl-2 단백질의 발현은 여러 종양 발생에 억제적 특성과 자극적 특성을 함께 가지는 것으로 나타나고 있다 (Castle *et al.*, 1993; Colombel *et al.*, 1993; Leek *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1998). 즉 bcl-2는 c-myc 유전자와 공조하여 세포의 형질전환을 일으킬 수 있고 (Vaux *et al.*, 1998) 그 발현이 임파종, 백혈병, 신경아세포종, 전립선 암 등에서는 환자의 생존에 나쁜 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 (Yunis *et al.*, 1989; McDonnell *et al.*, 1992; Campos *et al.*, 1993) 반면, bcl-2 양성인 폐암 및 유방암 환자의 생존율이 음성 환자의 생존율보다 높다고 보고된 바 있다 (Pezzelia *et al.*, 1993; silvestrini *et al.*, 1994). 따라서 이 유전자의 과발현은 정상적인 apoptosis를 억제하여 세포수명을 연장시키며 이런 비정상적인 수명연장은 종양발생에 필수적인 여러 가지 유전적 또는 환경적인 영향들을 축적시켜 암 발생에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Clark WH, 1991; Lee *et al.*, 1999).

따라서 본 연구에서는 종양발생과 관련된 bcl-2 단백질 정량 및 면역세포의 생육도 측정, cytokine, NK cell 등의 면역활성 측정을 통하여 때죽나무가 가지는 기능성 식품소재로서의 가능성을 평가하기 위해, 때죽나무 부위별로 항암 및 면역 활성 탐색을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

때죽나무 수피, 목부, 잎을 2006년 5월에 채취하였으며, 이것을 이용하여 MeOH (methanol)로 사용하였다. 재료를 실온에서 읍진 시킨 후 분쇄기로 분말화하여 MeOH를 이용하여 실온에서 72시간 동안 침적시켜 추출하였으며, 이 조작을 3회 반복하여 얻어진 추출물을 실험에 이용하였다. 때죽나무 수피, 목부, 잎의 조추출물을 약자로 표시하였다. 때죽나무의 학명인 *Styrax japonica* Sieb. et Zucc.의 S를 가장 앞에 표시하고, 그 뒤에 수피 (bark)는 B, 목부 (wood)는 W, 잎 (leaf)은 L을 붙여 그 부위별로 표시하였다. 즉, 때죽나무 수피는 SB, 목부는 SW, 잎은 SL의 약자로 나타냈었다.

2. 시약

세포배양에 필요한 배지로 RPMI 1640과 Alpha minimum essential medium (α -MEM)은 Gibco (USA)로부터 구입하였고, Hepes buffer는 Sigma (USA)에서 구입하였다. 혈청은 Gibco (USA)사의 fetal bovine serum과 horse serum을 이용하였고 gentamycin sulfate, trysin-EDTA는 Sigma사의 것을 사용하였다.

3. 세포주 및 세포 생육 배지

실험에 이용된 세포주는 암세포로 인간 폐암세포인 AGS (stomach adenocarcinoma, human, ATTC, USA), 인간 유방암세포인 MCF-7 (breast adenocarcinoma, human, ATTC, USA)를 사용하였고, 시료 자체의 세포 독성과 bcl-2의 단백질 발현량을 알아보기 위한 정상세포로는 인간 정상 신장세포인 HEK 293 (Human Embryonic Kidney, ATTC, USA)를 사용하였다. 면역세포 생육 증진 효과에 이용된 면역세포로는 T cell (Jurkat, ATTC, USA)와 B cell (Raji, ATTC, USA)을 실험에 사용하였고, NK cell 활성 측정에 이용된 세포는 NK-cell (NK-92MI cell, ATTC, USA)을 사용하였다. 실험에 사용된 암세포와 정상세포, 면역세포는 RPMI 1640 배지에 10% heating-inactivated FBS를 첨가시켜 배양하였고, NK-cell은 α -MEM배지에 2mM L-glutamine, 0.2mM myoinositol, 20mM folic acid, 2-mercaptoethanol, 12.5% fetal bovine serum (FBS)와 12.5% horse serum (Myelocult)을 첨가시켜 배양하였다.

4. 면역세포 생육 증진 효과 및 cytokine 분비량 측정

면역 기능 증강 효과는 면역 세포인 T cell (Jurkat)과 B cell (Raji)을 이용하여 검증하였다. 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 5% CO₂, 37°C에서 배양하였으며, 면역 기능 증강 효과는 24 well plate에 세포를 1.0×10⁴ cells/ml의 농도로 조절한 후 시료를 투여하여 8일 동안 배양하면서 매일매일 각 well의 cell을 hemacytometer로 세포 수를 측정하여 생육 증강도를 측정하는 방법을 사용하였다 (Lee *et al.*, 2002).

Cytokine은 IL-6와 TNF- α 의 정량을 Chemicon (USA)사의 IL-6와 TNF- α 정량 kit를 사용하여 측정하였다. 세포의 농도를 1~2×10⁴ cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 900 μ l씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C, 5% CO₂)시킨 후 시료의 최종농도를 0.5 mg/ml로 100 μ l씩 첨가하여 다시 배양 (37°C, 5% CO₂)하였다. 배양배지를 원심분리기를 이용하여 상층액을 취한 다음 450 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정을 통해 얻어진 O.D값을 표준물질을 이용해 작성한 표준곡선과 비교하여 cytokine의 양을 측정하였다 (오, 1991; Han *et al.*, 1998).

5. NK cell의 면역증진 효과

NK-92MI cell을 α -MEM배지에 2mM L-glutamine, 0.2mM myoinositol, 20mM folic acid, 10⁻⁴M2-mercaptoethanol, 12.5% fetal bovine serum (FBS)와 12.5% horse serum (Myelocult)에 2×10⁷ cells/ml의 농도로 희석시켜 이용하였다.

인간 T세포와 B세포를 T-25 flask에 배양하면서 sample을 투여한 후 증식정도를 관찰하면서 3~4번의 계대 배양 후 세

포를 원심분리하여 상층액을 취하였다. NK-92MI cell을 24 well plate에 $4 \times 5 \times 10^4$ cell/ml로 900 μ l 씩 분주하고 24시간 후 T세포와 B세포의 상층액을 각 plate에 100 μ l 씩 투여하여 배양 48시간 후 6일 동안 NK-92MI cell의 활성도를 cell counter를 이용하여 생세포수를 측정하여 NK-92MI cell의 활성도를 측정한다(Yueran *et al.*, 2003; Limdbolum, 2002).

6. 정상세포 독성 및 항암활성 측정

SRB (sulforhodamine B) assay (Doll & Peto, 1981)는 세포 단백질을 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 실험에 사용된 세포주로는 인간 정상 신장 세포인 HEK293을 이용하여 세포독성을 측정하였고, 인간 폐암 세포인 A549와 인간 유방암 세포인 MCF-7을 이용하여 항암활성을 측정하였다. 실험 대상 세포의 농도를 $4 \times 5 \times 10^4$ cells/ml로 96 well plate의 각 well에 100 μ l 씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C 5% CO₂)한 후, 각각의 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 그리고 1.0 mg/ml로 100 μ l 씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상등액을 제거하고 차가운 10% (w/v) TCA (trichloroacetic acid) 100 μ l 를 가하여 4°C 에서 1시간 동안 방치한 후 증류수로 5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온에서 plate를 건조한 뒤 각 well에 1% (v/v) acetic acid에 녹인 0.4% (w/v) SRB용액을 100 μ l 씩 첨가하고 상온에서 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% acetic acid로 4-5회 정도 세척, 건조 시킨 후에 10 mM Tris buffer 100 μ l 를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm에서 microplate reader (Molecular Devices, THERMO max, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

Selectivity 측정은 SRB assay를 이용하여 정상세포 (HEK 293)에 대한 각 sample 농도에서 세포독성을 측정하고, SRB assay를 이용하여 각 암세포주의 생육 억제 활성을 측정한 후 각 농도에서의 세포 독성에 대한 암세포 생육 억제 활성의 비로 selectivity를 계산한다.

$$\text{Selectivity} = \frac{\text{암세포 생육 억제 활성}}{\text{정상 세포의 세포 독성}}$$

7. Bcl-2 단백질 정량

1×10^6 cells/ml 정도의 세포를 사용하여 cytochrome c의 western blotting을 위한 세포질성 단백질을 분리하였다. 일단 플라스크에 있는 배지를 제거하고 cold PBS를 첨가한 후 scraper로 세포를 수집하였다. 10초간 원침하여 상등액을 버린 후 400 μ l 의 cold buffer A (10 mM Hepes-KOH[pH7.9], 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 0.1% NP-40)에 잘 현탁하여 얼음에서 30분간 방치하였다. 30분 후 10초간 vortex한 후 원침하여 상등액을 취하고 단백질의 농도

를 측정 후 -70°C에서 보관하면서 사용하였다.

위에서 분리한 각 암세포주의 단백질 40 μ l 을 9% SDS-polyacrylamide gel에서 Tris-glycine buffer로 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel을 분리하여 western blotting 장치에 설치한 후 여기에 transfer buffer를 채우고, 50 V로 2시간 전이하고 membrane을 분리하여 30분간 blocking solution으로 blocking한 후 BclXL 혹은 Mcl-1에 대한 1차 항체를 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. Membrane을 blocking solution으로 잘 soaking 한 후 여기에 horseradish peroxidase 또는 alkaline phosphatase를 중합되어 있는 anti-mouse immunoglobulin G 항체 또는 anti-rabbit immunoglobulin G 항체를 첨가하여 30분간 반응시켰다. 위에서와 같이 PBS, PBST를 바꾸어 가면서 membrane을 세척한 다음 membrane에 ECL 발색 시약을 첨가하여 반응시킨 후 X선 필름에 적정 시간 동안 노출시켰다.

결과 및 고찰

1. 면역세포 생육 증진 효과

인간의 면역체계에서 중요한 역할을 하는 면역세포인 B세포와 T세포에 대하여 면역증진 효과를 확인하기 위하여 면역세포의 생육 촉진 효과를 생육도를 통하여 측정하였다. B-cell 생육도의 경우 시료 투여 후 전체적으로 6일까지 최고로 증가하였다. 그 중 가장 높은 활성을 나타낸 조추출물인 SB의 경우 6일에 4.2×10^4 cells/ml로 시료를 첨가하지 않은 대조구의 3.1×10^4 cells/ml 보다 대략 25% 정도 B-cell의 생육을 더 증가시키는 것으로 나타났다 (Fig. 1).

T-cell 생육도의 경우 B-cell 생육도와 유사한 모습을 보여주었다. 최대 생육도를 나타내는 6일째 수피의 생육도는 5.0×10^4 cells/ml로 대조구의 3.3×10^4 cells/ml 보다 34% 정도 T-cell의 생육을 더 증가시키는 것으로 나타났다. 그리고 대부

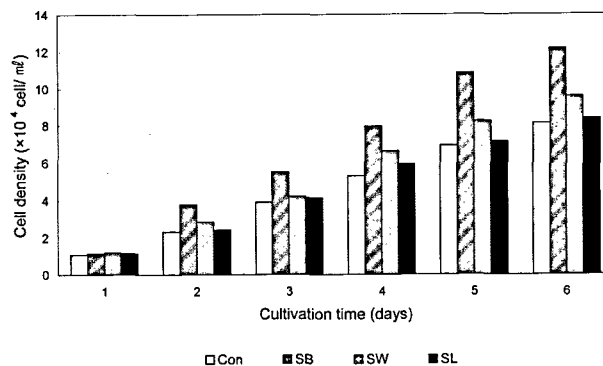


Fig. 1. The cell growth of B cells by adding *S. japonica* Sieb. et Zucc. extracts (0.5 mg/ml) and no adding sample *S. japonica* Sieb. et Zucc. (SB: bark methanol extract, SW: woods methanol extract, SL: leaf methanol extract).

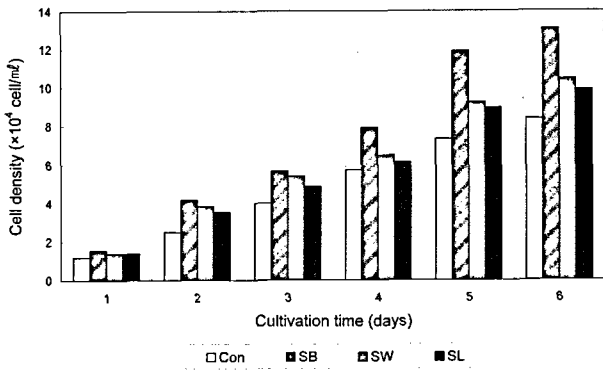


Fig. 2. The cell growth of T cells by adding *S. japonica* Sieb. et Zucc. extracts (0.5 mg/ml) and no adding sample (SB: bark methanol extract, SW: woods methanol extract, SL: leaf methanol extract).

분의 다른 부위 추출물에서 대조구에 비해 생육도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

2. Cytokine 분비 증진 효과

Table 1은 인간면역 세포의 생육 증강도를 뒷받침할 수 있는 자료로서 면역 세포들이 분비하는 cytokine (IL-6와 TNF- α)의 분비량을 B, T 세포에서 측정된 결과를 나타낸 것이다.

각 시료에 대한 세포 당 IL-6와 TNF- α 의 분비량을 살펴보면, 때죽나무의 수피에서 B cell이 각각 6일째 1.28×10^{-4} pg/cell, 1.38×10^{-4} pg/cell로 가장 많은 분비량을 나타내었다.

Table 1. The secretion of IL-6, TNF- α from human BT cells in adding the methanol extracts of *S. japonica* Sieb. et Zucc.

Sample	Time (day)	Cell line			
		B cell (10^{-4} pg/ml)		T cell (10^{-4} pg/ml)	
		IL-6	TNF- α	IL-6	TNF- α
SB	1	0.49	0.55	0.51	0.55
	2	0.75	0.77	0.78	0.81
	3	0.83	0.94	0.85	0.91
	4	0.95	1.08	1.02	1.10
	5	1.25	1.34	1.28	1.38
	6	1.28	1.38	1.32	1.40
SW	1	0.45	0.48	0.48	0.48
	2	0.70	0.75	0.66	0.77
	3	0.78	0.85	0.82	0.85
	4	0.90	1.08	0.93	0.97
	5	1.12	1.22	1.13	1.19
	6	1.19	1.26	1.20	1.23
SL	1	0.45	0.48	0.44	0.47
	2	0.64	0.70	0.59	0.72
	3	0.76	0.85	0.75	0.84
	4	0.83	0.99	0.87	0.89
	5	1.06	1.11	1.05	1.08
	6	1.11	1.12	1.09	1.10

각 시료에 대한 세포당 IL-6와 TNF- α 의 분비량을 살펴보면, 때죽나무의 수피에서 B cell과 마찬가지로 가장 많은 분비량을 나타내었다. IL-6와 TNF- α 의 분비량은 각각 6일째 1.32×10^{-4} pg/cell, 1.40×10^{-4} pg/cell로 가장 많은 분비량을 나타내었다.

때죽나무 추출물의 농도와 배양일에 따른 cell의 농도증가와 cytokine 분비량의 증가를 통하여 때죽나무 추출물이 면역 활성화와 관련하여 활용 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

3. NK-cell의 면역증진 효과

NK cell의 활성 측정은 B cell과 T cell 추출물을 첨가한 후 그의 배양액을 NK cell에 첨가함에 따른 생육도의 변화를 첨가하지 않은 control과 비교하여 활성을 측정하였다. Fig. 3은 B cell에 각 시료를 첨가하여 배양 후 그 배양액을 NK cell에 첨가하였을 때 NK cell의 활성도를 타나낸 그림이다. 6일 동안 생육도를 관찰하였는데 모든 시료에 대한 생육도가 증가하는 것을 확인하였고, 가장 좋은 활성을

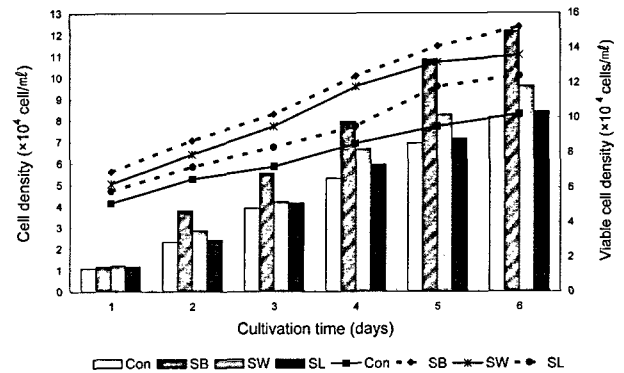


Fig. 3. The NK cell growth (bar chart) added the secretion of B cells in no adding and adding the extracts from *S. japonica* Sieb. et Zucc. (SB: bark methanol extract, SW: woods methanol extract, SL: leaf methanol extract).

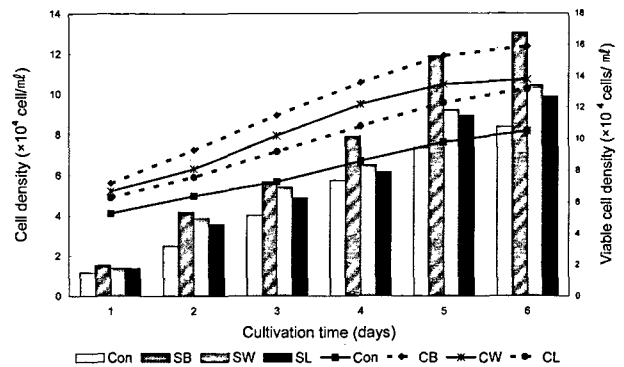


Fig. 4. The NK cell growth (bar chart) added the secretion of T cells in no adding and adding the extracts from *S. japonica* Sieb. et Zucc. (SB: bark methanol extract, SW: woods methanol extract, SL: leaf methanol extract).

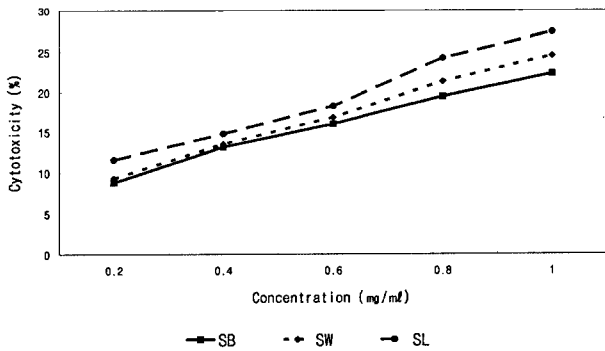


Fig. 5. Cytotoxicity of the crude extracts from *S. japonica* Sieb. et Zucc. on normal cell line, HEK293 (SB: bark methanol extract, SW: woods methanol extract, SL: leaf methanol extract).

나타낸 것은 수피로 5일째 14.1×10^4 cells/ml를 나타내어 9.5×10^4 cells/ml를 나타낸 대조군에 비해 1.67배 정도의 활성을 나타낸 것을 확인하였다. 그 외에도 목부가 13.2×10^4 cells/ml로 대조군과 비교하여 좋은 활성을 나타낸 것을 볼 수 있었다.

Fig. 5는 T cell에 각 시료를 첨가하여 배양 후 그 배양액을 NK cell에 첨가하였을 때 NK cell의 활성도를 나타낸 그림이다. 이것도 B cell과 같이 5일까지 모든 시료에 대하여 계속적으로 NK cell의 생육도가 증가하는 것은 확인할 수가 있었다. 그 중 가장 좋은 활성을 나타낸 것을 수피로서 15.3×10^4 cells/ml를 나타내어 9.8×10^4 cells/ml를 나타낸 대조군과 비교하여 1.67배 정도의 활성을 나타내었다. 이것은 앞에서 살펴본 면역세포의 증식에서의 마찬가지로 수피가 NK-cell의 생육활성에 가장 높은 활성을 나타내었기에 면역세포 생육활성에 영향을 미칠 수 있는 성분을 함유하고 있는 것으로 생각되어진다.

앞선 면역활성 실험을 통하여 때죽나무의 추출물이 면역활성의 증진에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었고, 면역요법은 면역반응의 특이성과 면역정찰 능력, 전이 방지를 이용하여 종양을 치료한다는 보고 (Andersen *et al.*, 2005)를 통해 면역활성의 증진은 항암활성점 증가에 영향을 미칠 것으로 보인다. 따라서 SRB assay와 Bcl-2 단백질 발현량 실험을 통하여 항암 활성 측정하였다.

4. 정상세포 독성 및 항암활성

실험에 사용된 sample 농도는 각각 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 그리고 1.0 mg/ml로 조절하여 정상세포에 대한 세포독성과 각 암세포에 대한 성장 효과를 검토하였다. Fig. 5는 인간 신장 세포 HEK293에 대한 세포 독성을 나타낸 것으로 sample과 표준물질 모두 최고 농도인 1.0 mg/ml에서 SL이 가장 높은 27.4%로 가장 높은 세포 독성을 나타내었고, SB가 가장 낮은

세포독성인 22.3%의 낮은 세포독성을 나타내었다.

Fig. 6는 인간간암세포인 AGS에 대한 생육억제 활성 및 선택적 사멸도를 나타낸 것이다. 억제활성의 경우 대부분의 시료에서 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났으며, 수피가 가장 높은 항암 효과를 나타내었다. 선택적 사멸도는 모든 추출물에서 1~3사이로 나타났고, SB의 1.0 mg/ml의 농도에서 2.86으로 암세포에 대한 가장 높은 선택적 사멸도를 나타내었다.

Fig. 7은 유방암 세포인 MCF-7에 대한 생육억제 활성 및 선택적 사멸도를 나타낸 것이다. 억제활성의 경우 대부분의 시료에서 농도 의존적으로 증가하였고, 수피에서 가장 높은 항암 효과를 나타내었다. 선택적 사멸도는 모든 추출물에서 1~3사이로 나타났고, SB의 1.0 mg/ml에서 2.95로 암세포에 대한 가장 높은 선택적 사멸도를 나타내었다.

선택적 사멸도는 보통 1.5이상일 때 암세포에 대한 선택성이 있어 암세포의 생육을 억제한다고 할 수 있다.

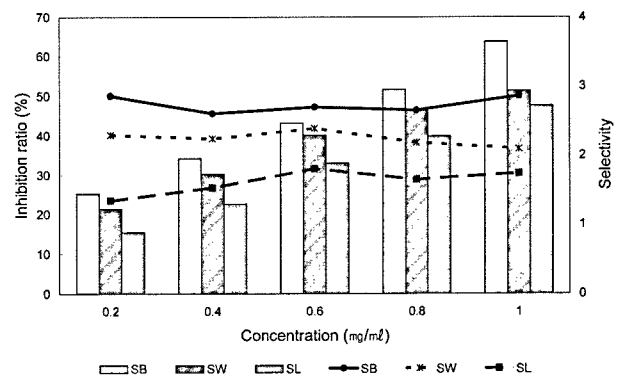


Fig. 6. Inhibition ratio of growth AGS (bar chart, %) and selectivity (line chart) in adding the crude extracts of *S. japonica* Sieb. et Zucc. (SB: bark methanol extract, SW: woods methanol extract, SL: leaf methanol extract).

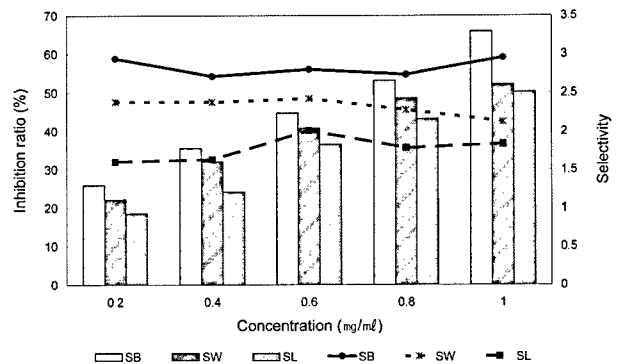


Fig. 7. Inhibition ratio of growth MCF-7 (bar chart, %) and selectivity (line chart) in adding the crude extracts from *S. japonica* Sieb. et Zucc. (SB: bark methanol extract, SW: woods methanol extract, SL: leaf methanol extract).

5. Bcl-2 단백질 정량을 통한 항암활성

때죽나무 추출물의 bcl-2 발현량을 살펴본 결과는 Fig. 7에서 나타내었다. Western blotting을 통해 얻은 (A) 그림에서는 육안으로 판단하기 어려워, densitometer를 이용하여 IOD 값을 측정하여 그 수치를 (B)의 그래프로 결과 값을 나타내었다.

정상 세포에서의 Bcl-2의 이상 혹은 과잉 발현을 막아 apoptosis를 유도함으로써, 비정상 세포로의 변이를 막음으로써 암 발생을 억제할 수 있을 것으로 생각된다.

따라서 결과를 통하여 각각의 IOD 값을 비교해보면, 수피, 목부, 잎 순으로 각각 72, 186, 200의 결과를 나타내었다. 이는 때죽나무의 수피 추출물에서 가장 낮은 bcl-2 발현은 인간 정상세포에서 암세포로의 변이의 확률은 낮추어 암 발생을 억제할 것으로 추정할 수 있다.

또한 실험을 통하여 얻어진 결과로 인하여 면역과 항암활성의 향상을 가져오는 부위를 탐색하여 그 부위에서 단리된 유용 성분에 대한 연구가 이루어져야 할 것이고, 생리활성에 대한 연구가 보다 다각적으로 이루어져야 할 것으로 사료되는 바이다.

적 요

B cell과 T cell을 이용한 면역세포의 생육 촉진 실험에서, B·T cell은 배양 6일째 수피 추출물이 각각 4.2×10^4 cells/ml, 5.0×10^4 cells/ml로 가장 높은 세포농도를 나타냈다.

면역세포를 이용한 cytokine의 분비량 측정실험에서는 수피 추출물이 배양 시간에 따른 cytokine의 분비가 가장 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 각 세포의 TNF- α 의 분비량은 6일째 최고의 분비량을 나타내었고, 수피 추출물의 경우 대조군에 비해 7-8배 가량 더 높은 분비량을 나타낸 것을 확인하였다. IL-6의 경우 6일째 최고의 분비량을 나타내었고, 수피 추출물에서 가장 높은 분비량을 나타내었다. 또한 때죽나무 추출물을 첨가한 배지에 의한 NK cell의 면역활성을 측정하였으며, 모든 추출물에서 배양 시간에 따라 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. 그 중 때죽나무 수피 추출물에서 B cell의 경우 14.1×10^4 cells/ml, T cell의 경우 15.3×10^4 cells/ml로 가장 높은 생육 활성을 나타내었다.

인간 정상 신장세포인 HEK293을 이용한 세포 독성을 살펴본 결과, 각 추출물은 1.0 mg/ml의 농도에서 최고 27.4%의 세포독성을 나타내었다. 또한 항암활성 효과를 살펴보기 위하여 2가지의 암세포를 이용하였는데, AGS와 MCF-7에서 뿌리 추출물의 경우 1.0 mg/ml의 농도에서 65%정도의 높은 억제활성을 나타내었고, 또한 암세포의 생육활성에 대한 정상 세포의 세포독성의 비로 나타낸 선택적 사멸도는 고농도에서는 모두 1.5이상으로 나타나 모두 암세포에 대한 선택성이 있는 것

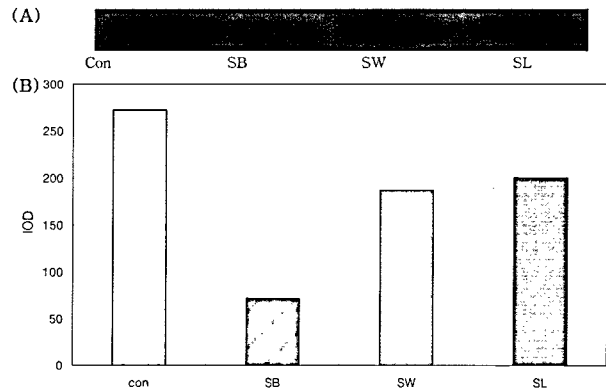


Fig. 8. The representative (A)western blotting and (B)Densitometric analysis of Bcl-2, through adding the ethanol extracts of *S. japonica* Sieb. et Zucc (SB: bark ethanol extract, SW: woods ethanol extract, SL: leaf ethanol extract, A: western blotting, B: western blotting IOD value).

으로 나타났다.

Bcl-2 단백질 정량을 통한 항암활성 실험에서는, IOD 값이 수피, 목부, 잎 순으로 각각 72, 186, 200의 결과를 나타내었다.

본 실험 결과를 통하여 때죽나무의 기능성 소재로서의 가능성을 엿볼 수 있었고, 유용성분 분리와 생리활성에 대한 연구가 보다 다각적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

감사의 말

본 연구는 국립산림과학원의 지원으로 수행된 것으로 이에 심심한 사의를 표합니다.

ITERATURE CITED

Andersen MH, Svane IM, Kvistborg P, Nielsen OJ, Balslev, Reker S, Becker JC, Straten PT (2005) Immunogenicity of Bcl-2 in patients with cancer. *Immunobiology* 105(2):728-734.

Campos L, Rouault JP, Sabido O, Oriol P, Roubi N, Vasselon C, Archimbaud E, Magaud JP, Guyotat D (1993) High expression bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood* 18:3091-3096.

Castle VP, Heidelberger KP, Bromberg J, Ou X, Dole M, Nuñez G (1993) Expression of the apoptosis-suppressing protein bcl-2, In neuroblastoma is associated with unfavorable histology and N-myc amplification. *The American journal of pathology* 143:1543-1550.

Clark WH (1991) Tumor progression and the nature of cancer. *British journal of cancer* 64:631-644.

Colombel M, Symmans F, Gil S, O'Toole KM, Chopin D, Benson M, Olsson CA, Korsmeyer S, Buttyan R (1993) Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bcl-2 in hormone refractory human prostate cancers. *The American*

- journal of pathology 143:390-400.
- Doll R, Peto R** (1981) The Causes of Cancer, Quantitative Estimates of Avoidable Risks of Cancer in the United States today. Journal of the National Cancer Institute 66(6):1192.
- Han BH, Park MH, Cho JY, Park JS, Yoo ES, Baik KU** (1998) Effect of Ginsenosides from *Panax ginseng* on TNF- α production and T cell proliferation. Pharmaceutical Society of Korea 42(3):296-301.
- Hirano T, Goto M, Oka K** (1994) Natural flavonoids and lignans are potent cytosolic agents against human leukemic HL-60 cells. Life Sciences 55:1061-1069.
- Hockenbery D, Nuñez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ** (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature 348:334-336.
- Kerr JF, Willie AH, Currie AR** (1972) Apoptosis; a basic biologic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. British journal of cancer 26:239-257.
- Korsmeyer** (1992) Bcl-2 indicates a new category of oncogenes; Regulations of cell death. Blood 80:879.
- Lee DH, Kim JH, Huh JR, Kim DJ, Kim YM, Kim YT, Nam JH, Mok JE** (1998) Expression and Prognostic Significance of bcl-2 in Epithelial Ovarian Tumors. Korean Journal of Obstetrics and Gynecology 41(5):1304-1314.
- Lee JM, Cho HI, Kang JS** (1999) The Studies for Usefulness of Overexpression of bcl-2, p53 Gene and Apoptosis as a Response Predictor to neoadjuvant Chemotherapy in Cervical Cancer. Korean Journal of Obstetrics and Gynecology 42(5): 1096-1101.
- Lee SH, Lee HS, Park YS, Hwang B, Kim JH, Lee HY** (2002) Screening of Immune Activation Activities in the Leaves of *Dendropanax moribifera* Lev. Korean Journal of Medicinal Crop Science 10:109-115.
- Lee YN** (1996) Flora of Korea. Kyohak Pub. Co., Seoul. p. 606.
- Leek RD, Kaklamanis L, Pezzela F, Gatter KC, Harris AL** (1994) Bcl-2 in normal human breast and carcinoma, association with estrogen receptor-positive, epidermal growth factor receptor-negative tumors and in situ cancer. British journal of cancer 69:135-139.
- Limdbolum CK** (2002) IL-2 receptor signaling through the Shb adapter protein in T and NK cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 296:929-936.
- McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, Nunez G, Jaeger U, McKearn JP, Korsmeyer SJ** (1989) Bcl-2 immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. Cell 57:79-88.
- Pezzela F, Turley H, Kuzu I et al.** (1994) Bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. The New England journal of medicine 329:690-694.
- Silvestrini R, Veneroni S, Daidone MG, Benini E, Boracchi P, Mezzetti M, Di Fronzo G, Rilke F, Veronesi U** (1994) The bcl-2 protein; a prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients. Journal of the National Cancer Institute 86:49-504.
- Takanashi M, Tajizawa Y.** (1998) New benzofurans related to egonol from immature seeds of *Styrax obassia*, Phytochemistry 27:1224-1226.
- Vaux DL, Cory S, Adams JM** (1988) Bcl-2 gene promotes hematopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalizepre-B cells. Nature 335:440-442.
- Yueran Z, Rui S, You L, Chunyi G, Zhigang T** (2003) Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. Biochemical and Biophysical Research Communications 300:247-252.
- Yunis JJ, Mayor MG, Arnesen MA, Aeppli DP, Oken MM, Frizzera G** (1989) Bcl-2 and other genomic alternations in the prognosis of large-cell lymphoma. The New England journal of medicine 320:1047-1054.
- 김갑태** (1989) 종자의 전처리 가 몇 수종의 포장 발아율에 미치는 영향, 한국임학회지, 78(1):26-29.
- 오오진** (1991) 쇠비름이 세포성 및 체액성 면역반응계에 끼치는 영향. 숙명여자대학교 대학원 석사학위논문.