

# 왕머루 포도에서 분리한 Vitisin A의 자궁암주에 대한 자멸사 효과

임정한<sup>1</sup> · 이효정<sup>2</sup> · 이은옥<sup>2</sup> · 이효정<sup>2</sup> · 권희영<sup>2</sup> · 심범상<sup>2</sup> · 안규석<sup>2</sup> · 김성훈<sup>1,2\*</sup>

1: 경희대학교 동서의학대학원, 2: 한의과대학

## Apoptotic Effect of Vitisin A from *Vitis Amurensis* against MES-SA Uterine Cancer Cells

Jeong Han Lim<sup>1</sup>, Hyo Jeong Lee<sup>2</sup>, Eun Ok Lee<sup>2</sup>, Hyo Jung Lee<sup>2</sup>, Hee Young Kwon<sup>2</sup>, Bum Sang Shim<sup>2</sup>, Kyoo Seok Ahn<sup>2</sup>, Sung Hoon Kim<sup>1,2\*</sup>

1: Graduate School of East-West Medical Science, 2: College of Oriental Medicine, Kyunghee University

The cytotoxic characteristics of Vitisin A isolated from *Vitis amurensis* L. were examined in human colorectal, breast, uterine and renal cancer cells. Vitisin A showed good cytotoxicity against various cancer cells with IC<sub>50</sub> of 1 ~ 30 μM. Among them, Vitisin A exhibited strongest cytotoxic effect against MES-SA cells with IC<sub>50</sub> of 1.11 μM by SRB assay. To verify whether the cytotoxicity of Vitisin A may be associated with apoptosis, TdT-mediated-dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) assay and cell cycle analysis were performed in MES-SA cells. Apoptotic bodies were observed in Vitisin A treated MES-SA cells by TUNEL assay. Also, Vitisin A effectively increased the portion of sub-G<sub>1</sub> DNA content by flow cytometric analysis. Taken together, these findings suggest that the cytotoxicity of Vitisin A against MES-SA cells is chiefly mediated by apoptosis.

Key words : Vitisin A, MES-SA, apoptosis, cytotoxicity, TUNEL, sub-G<sub>1</sub> DNA

### 서 론

최근 노년인구의 증가와 환경악화 등의 원인으로 세계 암발생률이 매년 7-8%씩 증가하고 있다. 1999년 암으로 인한 사망자가 750만명으로 사망원인의 12%를 차지하고 있다. 현재 외과수술, 방사선 요법, 광요법, 화학요법, 생물요법의 단독, 혹은 병용치료로 암치료를 시도하고 있으나 완벽한 치료법이 없는 상태이다. 이에 천연물약제의 항암효과탐색은 기존치료의 부작용을 최소화하면서 항암효과를 증대하는 최근 각광받는 치료법이다<sup>1,2)</sup>.

항암치료의 화학요법제로는 알킬화제, 대사길항제, 호르몬제 등이 사용되고 있으나, 부작용이 문제시 되면서, 천연물 신약은 오늘날 사용약물의 60%가 될 정도로 점차 그 비중이 증가하고 있다<sup>3,4)</sup>. 항암제 중 주로 종양의 자멸사 (apoptosis) 유도, 신생혈관형성 (angiogenesis)억제 및 전이억제효과가 있는 약물들이 탐색되고 있다. 그 중 세포자멸사(세포사멸) (apoptosis)는 세포막이나 세포소기관등이 정상적인 형태를 유지하면 핵내의 크로

마틴이 응집하여 세포전체가 위축, 단편화하여 세포사멸의 전형적인 특징인 apoptotic body를 형성함으로써, 세포사까지 이르는 경우를 말하는 것으로, 생명체의 기관에서 불필요한 세포들을 주위세포의 파괴없이 제거시키는 중요한 생리적 기전이며 이 능동적 과정은 유전자의 통제 하에 이루어지고 있다.<sup>5-8)</sup>

왕머루포도는 갈매나무속 포도과의 낙엽덩굴식물로 한국, 일본, 사할린 등지에 분포하며, 열매는 생식하기도 하며 주스, 잼, 젤리, 식초 또는 술 같은 가공된 형태로 만들어 먹기도 한다. 본 실험에서 사용한 Vitisin A는 숙성된 와인에 다량 함유되어있는 물질로서, 천연상태의 포도에 존재하던 안토시아닌이 와인이 숙성됨에 따라 피루브산과의 화학반응에서 생성되는 물질이다<sup>9-12)</sup>. 또한 Vitisin A는 활성산소종의 생성의 감소에 의한 항암활성을 보이고, 항혈소판 기능과 항산화 활성을 가지고 있음이 보고되었다<sup>13-16)</sup>.

따라서, 본 연구에서는 대장암, 유방암, 자궁암 및 신장암 세포주에 대한 왕머루포도에서 분리된 Vitisin A의 세포독성 특성을 분석하고, 그 중 가장 유효한 세포독성을 보였던 자궁암세포주인 MES-SA에 대한 항종양효과 기전을 자멸사와 관련하여 검토하였던바 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

\* 교신저자 : 김성훈, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 한의과대학

· E-mail : sungkim7@khu.ac.kr, · Tel : 02-961-9233

· 접수 : 2008/02/21 · 채택 : 2008/04/04

## 재료 및 방법

### 1. 시약

Vitisin A는 한국화학연구원에서 포도나무로부터 분리한 물질을 사용하였다(Fig. 1). 세포배양액인 DMEM, RPMI1640, Fetal bovine serum (FBS) 및 Trypsin-EDTA는 Gibco사 (Grand Island, N. Y., USA)로부터 구입하였으며, Sodium bicarbonate, amphotericin, gentamycin, sulforhodamine B (SRB), Trisma base, Trichloacetic acid (TCA), propidium iodide (PI) 및 RNAs A 등은 Sigma Chemical사 제품을 사용하였다. TdT-mediated-dUTP Nick-End Labeling (TUNEL)은 Promega사 제품을 사용하였다.

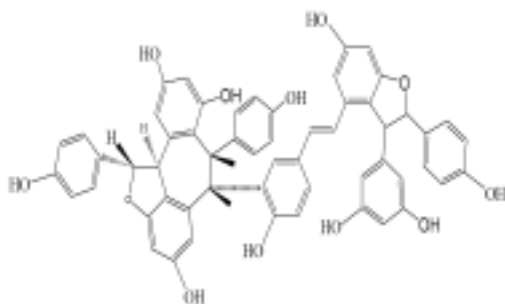


Fig. 1. Chemical structure of Vitisin A.

### 2. 기기

세포독성 측정을 위한 Microtiter plate reader는 Molecular Devices사 (Sunnyvale, CA)의 E-max기종을 사용하였으며, 세포의 형태 관찰을 위한 현미경은 Nikon사 (Tokyo, Japan)의 TE-300 기종 및 Carl Zeiss사의 도립형광현미경 (Axio vision 4.0)을 사용하였다. 또한 유세포 분석을 위하여 BD사의 유세포측정기 (FACSCalibur)를 사용하였다.

### 3. 세포배양

실험에 사용하는 암세포주는 모두 인체 기원 암세포주들로서, 대장암세포주인 DLD-1, HCT116, SW620, KM12 및 HCT15 세포, 유방암세포주인 MCF7, T47D, MDA-MB-231 및 435S 세포, 신장암세포주인 CAKI-1, RXF-393, RXF-631 및 786-O 세포, 자궁암세포주인 MES-SA 세포를 사용하였다. 유방암 세포주들의 세포배양액으로는 glutamine, sodium bicarbonate, gentamycin 및 amphotericin을 첨가한 DMEM 용액에 10% FBS로 보강한 배지를 사용하였으며, 다른 세포들은 위의 첨가물을 포함하는 RPMI1640 용액을 5% FBS로 보강한 배지를 사용하였다. 모든 세포들은 37 °C, 5% 이산화탄소 조건에서 배양하며, 3-5일마다 계대 유지하였다.

### 4. 세포독성 측정

세포를 96-well plates에 분주하고, 세포가 plate 바닥 면에 부착되도록 24 시간 동안 배양하였다. 세포가 plate 바닥 면에 부착한 후에 배양액을 제거하고, 각 약물을 농도별로 well당 100  $\mu$ l씩 넣어 incubator에서 72 시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난

후, 배양액을 제거하고 각 well에 10% TCA용액을 처리하고, TCA를 제거한 후 수돗물로 5회 세척하여 실온에서 건조시켰다. 세포 표면 단백질 염색 시약인 SRB는 1% acetic acid 용액에 0.4% SRB를 녹여 각 well에 분주하여 실온에서 30분 동안 방치하여 세포를 염색하였다. 1% acetic acid 용액으로 5회 세척 후 실온에서 건조시켰다. 염색된 세포들에 10 mM Trisma base (pH 10.5)용액을 가하여 SRB를 용출시켰다. 각 plate의 흡광도는 microplate reader를 이용하여 520 nm 파장에서 측정하였으며, 약물을 가하지 않은 well (CC)과 약물을 처음 가할 때 well (Tz) 및 약물을 가한 각 well (DT)를 비교하여,  $DT \geq Tz$ 인 경우에는  $[(DT-Tz)/(CC-Tz)] \times 100$ 의 수식으로,  $DT < Tz$ 인 경우에는  $[(DT-Tz)/(Tz)] \times 100$ 의 수식으로 약물의 세포독성을 계산하였다.

### 5. MES-SA 세포의 형태변화 관찰

세포를  $5 \times 10^5$  cells/well로 6-well plates에 분주하고, Vitisin A를 0.5, 1, 2, 4  $\mu$ M의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 세포를 현미경하에서  $\times 20$ 의 배율로 관찰한 후 사진을 촬영하였다.

### 6. 유세포 분석 (Flow cytometry analysis)

세포를  $5 \times 10^5$  cells/well로 6-well plate에 분주하고, Vitisin A를 0.5, 1, 2, 4  $\mu$ M의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 세포를 수거하였다. 수거한 세포는 차가운 PBS로 두 번 세척하고, 원침하여 상층액을 제거하였다. 세포가 서로 엉겨 붙지 않도록 주의하며, 차가운 75% 에탄올을 첨가하여 -20 °C에서 overnight하여 고정시켰다. 고정된 세포를 원침분리하여 에탄올을 제거하고 다시 PBS로 씻어준 후, 2 mg/ml RNase A를 첨가한 PBS 100  $\mu$ l를 넣고 37 °C에서 1시간 동안 배양하였다. PI (propidium iodide)를 PBS에 50  $\mu$ g/ml로 희석하여 첨가한 후 상온에서 30분간 반응시킨 후 각 처리군을 유세포측정분석기 (FACSCalibur, BD, USA)로 측정하였다.

### 7. TUNEL assay

세포 핵 내의 DNA 단편화(nuclear DNA fragmentation)를 측정함으로써 세포의 세포사멸 여부를 측정하기 위하여 TUNEL Assay를 실시하였다. 세포를 Chamber slide에 배양한 후, 대조군과 각각의 조건에 맞도록 약제 처리하였다. 24시간이 지난 후, 세포를 4% methanol-free formaldehyde solution에 4 °C에서 25분간 고정시키고, PBS에 5분간 담가 두었다. 고정이 끝난 후 100  $\mu$ l의 equilibration 용액에 담가 실온에서 5분간 equilibrate하였다. 세포내부의 DNA fragment를 라벨하기 위해서, fluorescein-12-dUTP가 함유되어있는 50  $\mu$ l의 terminal deoxy-nucleotidyltransferase를 첨가하고 플라스틱 coverslip을 덮어 37 °C에서 습기가 유지되는 암환경에서 1시간 동안 반응시켰다. Coverslip을 제거하고 SSC용액에 15분간 담가 반응을 종결시킨 후, PBS로 3회 세척하여 반응하고 남은 fluorescein 12-UTP를 제거하였다. 핵을 염색하기 위해 1  $\mu$ g/ml 농도의 PI에 15분간 염색하고, 형광현미경 (Axio Observer, Carl Zeiss)의 520  $\pm$  20 nm와 620 nm 이하의 파장에서 사진을 촬영하였다.

8. 통계분석

모든 실험 자료는 Microsoft Excel 프로그램을 이용하여 평균값과 표준오차를 계산하여 평균 ± 표준오차로 표시하였다. 유의성 검정은 Sigma Stat 프로그램의 Student-Newman Keuls test에 의한 one-way analysis of variance (ANOVA)를 이용하였다. 유의성 검정은 p값이 0.05 이하인 경우에는 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

1. 대장암세포에 대한 독성평가

대장암세포주인 DLD-1, HCT116, SW620, KM12 및 HCT15 세포에 대한 Vistin A의 세포독성을 평가하였다(Fig. 2).

대장암세포주 DLD-1 세포에 Vistin A의 농도를 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0 및 30.0 μM로 처리한 경우 각각 99.08 ± 0.61, 98.88 ± 0.31, 99.72 ± 2.32, 91.36 ± 1.15, 91.52 ± 0.18 및 68.06 ± 1.77%의 세포생존율을 보였으며, HCT116 세포는 99.58 ± 0.73, 90.18 ± 3.01, 41.07 ± 4.82, 30.96 ± 14.94, 32.85 ± 15.78 및 38.51 ± 14.95%, SW620 세포의 경우 101.14 ± 0.24, 102.04 ± 0.39, 102.48 ± 0.25, 94.13 ± 0.74, 97.41 ± 1.08 및 70.62 ± 1.80%, KM12 세포의 경우 97.99 ± 0.83, 98.58 ± 2.99, 97.18 ± 4.68, 26.61 ± 1.83, 18.82 ± 4.52 및 0.18 ± 4.87%, HCT15 세포의 경우는 각각 101.02 ± 2.50, 98.75 ± 0.50, 95.77 ± 0.62, 67.64 ± 4.36, 47.93 ± 4.08 및 27.19 ± 3.32%의 세포생존율을 보였다(Fig. 2, 5).

이상의 결과를 통해 대장암세포주인 DLD-1, HCT116, SW620 및 KM12 세포에 Vistin A를 처리하여 72시간동안 배양한 결과, DLD-1과 SW620 세포의 경우 독성을 거의 보이지 않았으며 HCT116, KM12과 HCT15 세포는 Vistin A에 대한 IC<sub>50</sub>값이 각각 0.84 ± 0.11 μM, 1.97 ± 0.14 μM, 8.57 ± 1.77 μM 를 보여 Vistin A의 농도에 의존적으로 독성을 보이고 있음을 알 수 있었다(Table 1).

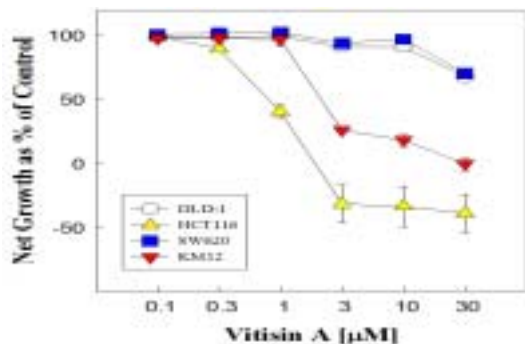


Fig. 2. Cytotoxicity of Vistin A against human colorectal cancer cells (DLD-1, HCT116, SW620 and KM12) in vitro. Cell survival fractions were assessed after continuous drug-exposure for 3 days by SRB assay. All data are presented as means ± SE of at least three experiment.

2. 유방암세포주에 대한 독성평가

유방암세포주인 MCF7, T47D, MDA-MB-231 및 435S 세포에 대한 Vistin A의 세포독성을 평가하였다(Fig. 3).

MCF7 세포의 경우, Vistin A의 농도를 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0 및 30.0 μM로 처리한 경우 각각 99.57 ± 0.73, 95.39 ± 2.13, 95.18 ± 0.62, 62.21 ± 4.58, 32.17 ± 2.94 및 28.67 ± 4.48%, T47D 세포의 경우, Vistin A의 각각의 처리 농도에 따라 98.22 ± 2.96, 98.88 ± 3.04, 70.51 ± 3.53, 12.81 ± 4.48, 1.31 ± 4.56 및 -5.30 ± 7.50%, MDA-MB-231 세포의 경우 95.41 ± 1.13, 98.65 ± 1.37, 97.33 ± 1.60, 49.10 ± 6.17, 21.26 ± 1.75 및 21.20 ± 2.56%, 435S 세포의 경우 97.38 ± 2.60, 90.93 ± 1.94, 53.72 ± 3.13, 32.75 ± 3.63, -2.01 ± 13.23 및 -20.20 ± 9.71%의 세포생존율을 보였다(Fig. 3).

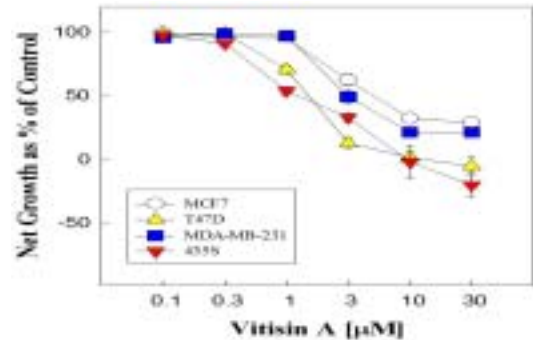


Fig. 3. Cytotoxicity of Vistin A against human breast cancer cells (MCF7, T47D, MDA-MB -231 and 435S) in vitro. Cell survival fractions were assessed after continuous drug-exposure for 3 days by SRB assay. All data are presented as means ± SE of at least three experiment.

위의 결과를 통해 유방암세포주인 MCF7, T47D, MDA-MB-231 및 435S 세포에 Vistin A를 처리하여 72시간동안 배양한 결과, Vistin A에 대한 IC<sub>50</sub>값이 각각 3.90 ± 0.46, 1.38 ± 0.07, 3.07 ± 0.44 및 1.56 ± 0.44 μM 를 보여, Vistin A가 MCF7, T47D, MDA-MB-231 및 435S 세포에 농도에 의존적으로 독성을 보이고 있음을 알 수 있었다(Table 1).

Table 1. Cytotoxicity of Vistin A against human cancer cells.

Cells	Compounds (IC <sub>50</sub> , μM) <sup>1)</sup>	
	Vistin A	
Colorectal Cancer	DLD-1	> 30.0
	HCT116	0.84 ± 0.11 <sup>2)</sup>
	SW620	> 30.0
	MK12	1.97 ± 0.14
	HCT15	8.57 ± 1.77
Breast Cancer	MCF7	3.90 ± 0.46
	T47D	1.38 ± 0.07
	MDA-MB-231	3.07 ± 0.44
	435S	1.56 ± 0.44
Uterine Cancer	MES-SA	1.11 ± 0.05
Renal Cancer	CAKI-1	18.21 ± 4.47
	RXF-393	2.23 ± 0.22
	RXF-631	2.86 ± 0.17
	786-O	11.66 ± 1.30

1) Concentration that cause 50% cell growth inhibition. 2) Mean ± SE (standard error) from distinct 3 experiments, at least.

3. 신장암세포주에 대한 독성평가

신장암세포주인 CAKI-1, RXF-393, RXF-631 및 786-O 세포에 대한 Vistin A의 세포독성을 평가하였다(Fig. 4).

CAKI-1 세포의 경우, Vitisin A의 농도를 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0 및 30.0  $\mu\text{M}$ 로 처리한 경우 각각  $99.40 \pm 1.83$ ,  $96.55 \pm 0.58$ ,  $95.89 \pm 3.36$ ,  $74.83 \pm 5.27$ ,  $62.34 \pm 6.68$  및  $37.06 \pm 4.65\%$ , RXF-393 세포의 경우  $95.83 \pm 1.18$ ,  $96.60 \pm 2.82$ ,  $95.99 \pm 3.10$ ,  $29.04 \pm 5.80$ ,  $9.02 \pm 0.72$  및  $-0.35 \pm 2.40\%$ , RXF-631 세포의 경우  $95.74 \pm 3.57$ ,  $98.24 \pm 4.30$ ,  $93.58 \pm 0.57$ ,  $43.30 \pm 3.48$ ,  $22.70 \pm 3.32$  및  $7.60 \pm 5.03\%$ , 786-O 세포의 경우  $98.73 \pm 1.67$ ,  $97.93 \pm 1.23$ ,  $96.37 \pm 0.31$ ,  $75.99 \pm 2.95$ ,  $55.04 \pm 4.70$  및  $12.80 \pm 8.44\%$ 의 세포 생존율을 보였다(Fig. 4).

위의 결과를 통해 신장암세포주인 CAKI-1, RXF-393, RXF-631 및 786-O 세포에 Vitisin A를 처리하여 72시간동안 배양한 결과, Vitisin A에 대한 IC50값이 각각  $18.21 \pm 4.47$ ,  $2.23 \pm 0.22$ ,  $2.86 \pm 0.17$  및  $11.66 \pm 1.30 \mu\text{M}$ 를 보여, Vitisin A가 CAKI-1, RXF-393, RXF-631 및 786-O 세포에 농도에 의존적으로 독성을 보이고 있음을 알 수 있었다(Table 1).

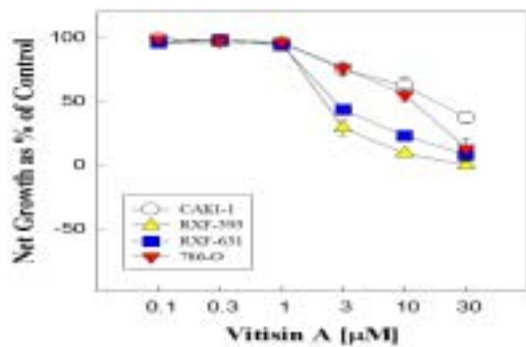


Fig. 4. Cytotoxicity of Vitisin A against human renal cancer cells (CAKI-1, RXF-393, RXF-631 and 786-O) in vitro. Cell survival fractions were assessed after continuous drug-exposure for 3 days by SRB assay. All data are presented as means  $\pm$  SE of at least three experiment.

4. 자궁암세포주인 MES-SA 세포에 대한 독성평가

자궁암세포주인 MES-SA 세포에 대한 Vitisin A의 세포독성을 평가하였다. Vitisin A의 농도를 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0 및 30.0  $\mu\text{M}$ 로 처리하였을 때, MES-SA 세포는, 각각의 농도에 대하여  $102.19 \pm 1.83$ ,  $91.55 \pm 1.46$ ,  $58.65 \pm 3.75$ ,  $2.99 \pm 2.16$ ,  $-8.38 \pm 3.62$  및  $-9.10 \pm 7.63\%$ 의 세포생존율을 보였다(Fig. 5).

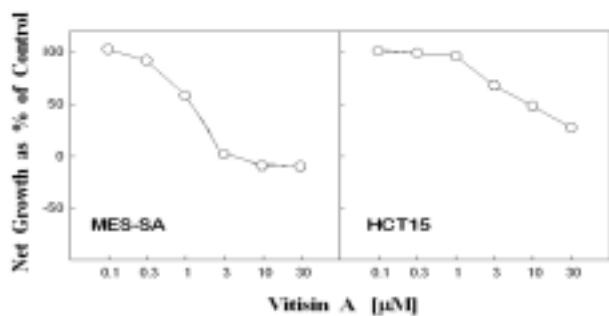


Fig. 5. Cytotoxicity of Vitisin A against MES-SA and HCT15 human cancer cells. Cell survival fractions were assessed after continuous drug-exposure for 3 days by SRB assay.

Vitisin A에 대한 IC50값은  $1.11 \pm 0.05 \mu\text{M}$ 로 가장 강한 독

성을 나타내었다(Table 1). 따라서 MES-SA 세포에 대한 Vitisin A의 세포사멸 양상을 관찰하였다.

5. MES-SA 세포에 Vitisin A를 처리하였을 때의 세포의 형태학적인 변화 관찰

Vitisin A의 처리 농도에 따른 MES-SA 세포의 사멸 양상을 관찰하기 위하여, Vitisin을 처리하여 24시간이 지난 후 현미경하에서 세포의 모양을 관찰하였다. MES-SA 세포는 Vitisin A의 농도가 증가함에 따라 세포의 성장이 억제되고 사멸되어가는 양상을 관찰할 수 있다(Fig. 6).

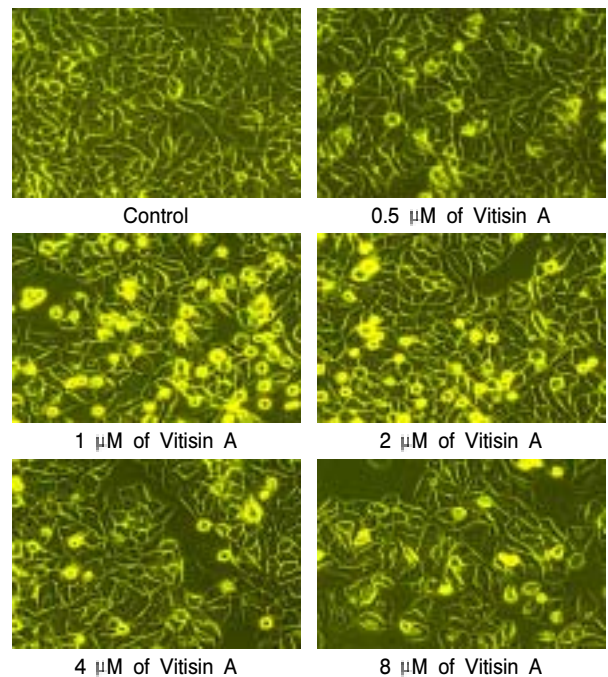


Fig. 6. Morphological feature of MES-SA cells treated with Vitisin A. MES-SA cells were treated with 0.5, 1, 2, 4 and 8  $\mu\text{M}$  of Vitisin A and incubated for 24 h. Morphological changes of MES-SA cells were observed under microscope ( $\times 200$ ).

6. MES-SA 세포에 Vitisin A를 처리하였을 때의 세포단편 관찰

아포토시스 (apoptosis)에 의한 세포사멸이 일어나면 핵내효소에 의해 DNA가 일정 크기의 절편으로 절단된다. TUNEL assay는 DNA의 염기서열 중에 가장 화학적으로 약한 부분인 AT 염기가 절단되면서 말단부위인 T가 cohesive-end 상태로 되는데, 이를 인지하는 probe부분에 FITC가 conjugated된 2차 항체를 통해 세포사의 현상을 파악할 수 있는 세포핵내의 DNA 분절을 분석하는 방법으로 형광현미경하에서 관찰하여 Vitisin A의 효과를 검증하였다. Fluorescein-12-dUTP가 표지된 세포를 PI로 염색하여 형광현미경하에서 관찰한 결과, 세포사멸의 특징적인 형태인 세포단편 (apoptotic body)이 Vitisin A 처리군에서 관찰되었다(화살표)(Fig. 7).

7. MES-SA 세포에 Vitisin A를 처리하였을 때의 DNA함량의 변화 분석

아포토시스(apoptosis)에 의한 세포 사멸사가 일어나게 되면

세포주기의 각 단계에서의 DNA 함량에서의 변화가 생기는데, 결과적으로 세포사멸에 따라 sub-G1기의 DNA 함량이 증가하게 된다. 이에 따라 Vitisin A가 MES-SA 세포의 세포사멸에 미치는 영향을 살펴보기 위해 Vitisin A를 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M과 4  $\mu$ M의 농도로 MES-SA 세포에 처리하여 24시간 동안 배양한 후 PI 로 염색하여, DNA의 함량을 유세포 분석기 (Flow cytometer)로 측정하였다. MES-SA 세포의 sub-G1기의 DNA의 함량은 대조군의 경우 2.84%를 보였으며, Vitisin A를 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M과 4  $\mu$ M 처리하였을 때는, apoptotic portion이 각각 16.66%, 16.46%, 8.50%로서 대조군에 비하여 세포 자멸사가 증가하는 결과를 보였다(Fig. 8).

## 결론

왕머루포도에서 추출 분리한 Vitisin A의 유방암, 신장암, 자궁암 및 대장암 세포주에 대한 세포독성 특성을 분석하고 그 중 유효한 세포독성을 보였던 자궁암세포주인 MES-SA에 대한 항종양효과 기전을 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

대장암세포주인 DLD-1, HCT116, SW620 및 KM12 세포에 대한 세포독성 평가에서는 HCT116과 KM12 암세포에 대해 보다 유효한 효과를 보였고, 유방암세포주인 MCF7, T47D, MDA-MB-231 및 435S 세포에 대해서는 T47D 및 435S에 대해 보다 유효한 효과를 보였으며, 신장암세포주인 CAKI-1, RXF-393, RXF-631 및 786-O 세포에 대한 세포독성에서는 RXF-393, RXF-631에 대해 유효한 세포독성을 보였고, 자궁암세포주인 MES-SA 세포는 대장암주인 HCT-15 세포보다 유효한 효과를 보였다. 특히 자궁암 세포주인 MES-SA 세포의 IC50값이  $1.11 \pm 0.05 \mu$ M 으로 가장 세포독성이 강한 것으로 나타났다. Vitisin A의 자궁암세포 MES-SA 세포주에 대한 항암효과의 특성연구에서 세포 자멸사의 특징적인 형태인 apoptotic body이 관찰되었고, cell cycle 분석에서 sub-G1기의 DNA의 함량이 증가되었다.

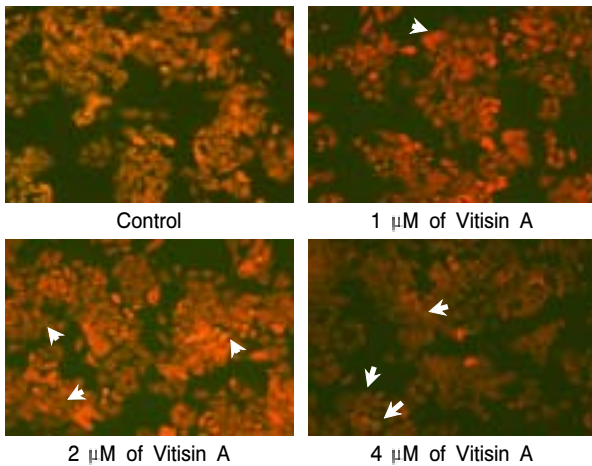
따라서 Vitisin A의 MES-SA 세포주에 대한 항종양효과는 세포 자멸사 과정을 통해 이루어지는 것으로 볼 수 있으며, 앞으로 더 자세한 기전 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

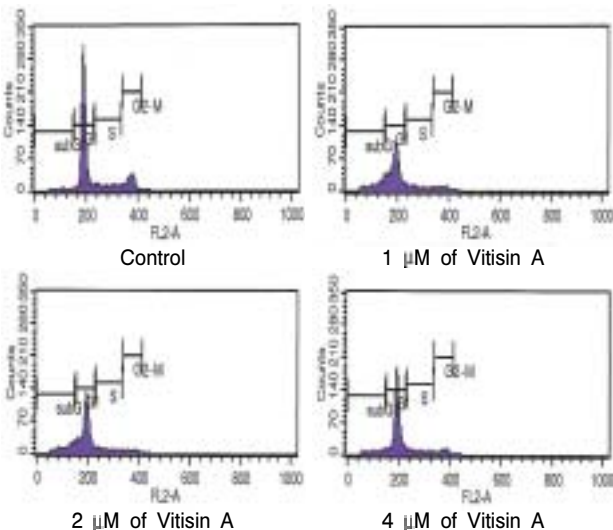
이 논문은 보건복지부 한방치료기술 연구비 (B050007) 및 MRC 연구비 지원에 의해 수행되었기에 감사드립니다(No. R13-2007-019-00000-0).

## 참고문헌

1. 박재갑. 암정보, 국립암센터 출판부, pp 10-37, 2004.
2. Chen, K.G., Wang, Y.C., Schaner, M.E., Francisco, B., Duran, G.E., Juric, D., Huff, L.M., Padilla-Nash, H, Ried, T., Fojo, T., Sikić, B.I. Genetic and epigenetic modeling of the origins of multidrug-resistant cells in a human sarcoma cell line. *Cancer Res.* 65(20):9388-9397, 2005.
3. Ozben, T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Letters* 580: 2903-2909, 2006.
4. Robert, J., Jarry, C. Multidrug resistance reversal agents. *J. Medicinal Chemistry* 46(23):4805-4817, 2003.
5. Kaufmann, S.H., Hengartner, M.O. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends in Cell Biology* 11: 526-534, 2001.
6. Kim, J.H., Kho, Y.H., Lee, H.J., Kim, M.R., Lee, S.M., Lee, H.Y. Regulation of apoptotic cell death in U937 leukemia cells by fatty acids. *Food Sci. Biotechnol.* 5: 539-542, 2001.
7. Kostakis, I.K., Tenta, R., Pouli, N., Marakos, P., Skaltsounis,



**Fig. 7. Apoptotic bodies were observed in MES-SA cells treated with Vitisin A.** MES-SA cells were treated with 1, 2 and 4  $\mu$ M of Vitisin A for 24 h and harvested. Morphological changes were investigated by TUNEL (TdT-mediated-dUTP Nick-End Labeling staining) assay. MES-SA cells were analyzed under a fluorescence microscope using standard fluorescein filter set to view the green fluorescence of fluorescein at  $520 \pm 20$  nm and view red fluorescence of propidium iodide at  $> 620$  nm ( $\times 200$ ). Arrows indicate apoptotic bodies.



**Fig. 8. Vitisin A increased sub-G<sub>1</sub> portion of MES-SA cells by flow cytometric assays.** MES-SA cells were treated various concentration (1, 2 and 4  $\mu$ M) of Vitisin A and incubated for 24 h. After fixing in 75 % ethanol, cells were stained with propidium iodide in the dark and sub-G<sub>1</sub> DNA contents were analyzed by flow cytometric system.

- A.L., Pratsinis, H., Kletsas, D. Design, synthesis, and antiproliferative activity of some novel aminosubstituted xanthenones, able to overcome multidrug resistance toward MES-SA/Dx5 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15(22):5057-5760, 2005.
8. Vaux, D.L. Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 786-789, 1993.
  9. Garcia-Alonso, M., Rimbach, G., Rivas-Gonzalo, J.C., De Pascual-Teresa, S. Antioxidant and cellular activities of anthocyanins and their corresponding vitisins A studies in platelets, monocytes, and human endothelial cells. *J. Agric. Food Chem.* 52(11):3378-3384, 2004.
  10. Huang, K.S., Lin, M., Cheng, G.F. Anti-inflammatory tetramers of resveratrol from the roots of *Vitis amurensis* and the conformations of the seven-membered ring in some oligostilbenes. *Phytochemistry* 58: 357-362, 2001.
  11. Romero, C., Bakker, J. Interactions between grape anthocyanins and pyruvic acid, with effect of pH and acid concentration on anthocyanin composition and color in model solutions. *J. Agric. Food Chem.* 47(8):3130-3139, 1999.
  12. Schwarz, M., Quast, P., von Baer, D., Winterhalter, P. Vitisin A content in Chilean wines from *Vitis vinifera* Cv. Cabernet Sauvignon and contribution to the color of aged red wines. *J. Agric. Food Chem.* 51(21):6261-6267, 2003.
  13. Huang, Y.L., Tsai, W.J., Shen, C.C., Chen, C.C. Resveratrol derivatives from the roots of *Vitis thunbergii*. *J. Nat. Prod.* 68(2):217-220, 2005.
  14. Jang, M.H., Piao, X.L., Kim, H.Y., Cho, E.J., Baek, S.H., Kwon, S.W., Park, J.H. Resveratrol oligomers from *Vitis amurensis* attenuate beta-amyloid-induced oxidative stress in PC12 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 30(6):1130-1134, 2007.
  15. Lee, E.O., Lee, H.J., Hwang, H.S., Ahn, K.S., Chae, C.H., Kang, K.S., Lu, J.X., Kim, S.H. Potent inhibition of Lewis lung cancer growth by heyneanol A from the roots of *Vitis amurensis* through apoptotic and anti-angiogenic activities. *Carcinogenesis* 27(10):2059-2069, 2006.
  16. Morata, A., Gomez-Cordoves, M.C., Colomo, B., Suarez, J.A. Pyruvic acid and acetaldehyde production by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*: relationship with Vitisin A and B formation in red wines. *J. Agric. Food Chem.* 51(25):7402-7409, 2003.