

梔角刺에서 PC-3 생장 억제 성분 정제

임세현¹, 이병호², 김영균³, 조수인⁴, 김용성⁵, 임지연⁶
¹극동대학교 간호학과, ²홍재한의원, ³동의대학교 한의학과
⁴부산대학교 한의학과, ⁵동신대학교 한의학과, ⁶동국대학교 의학과

Purification of Anti PC-3 Prostate Cancer Agents from Gleditsiae Spina

Se-hyun Lim¹, Byung-ho Lee², Young-gyun Kim³, Su-in Cho⁴, Yong-seong Kim⁵, Chi-yeon Lim⁶

¹Dept. of Nursing, Far East University, ²Hong Jae Korean Medical Clinic
³Dept. of Korean Medicine, Dong-Eui University, ⁴Dept. of Korean Medicine, Pu-San National University
⁵Dept. of Korean Medicine, Dong-Shin University, ⁶Dept. of Medicine, Dong-Guk University

ABSTRACT

Objectives : Gleditsiae Spina has the effects of expelling toxins, draining pus, invigorating blood and resolving abscesses. Some clinicians apply the herb for patients suffering from cancer. However, its anti-cancer activities are not well understood. In the present study, anti-tumor agents from Gleditsiae Spina were purified.

Methods : The viability of the PC-3 cell line was determined using MTT assay, and the induction of apoptosis by Gleditsiae Spina extract in PC-3 cells was measured by Annexin-V/propidium iodide double staining assay detected by flow cytometry. TLC and HPLC analysis were used to separate and identify the anti-cancer agents.

Results : Treatment of the extract resulted in significant decreased cell viability of PC-3 cells in a dose- and time-dependent manner. Dose-dependent apoptotic cell death was also measured by flow cytometry analysis. The anti-cancer agents were successfully separated and identified by using TLC and HPLC analysis and the most potential agent among them was separated from EtOAc fraction.

Conclusions : These results might be applied in developing new drugs from natural resources like Korean traditional medicine, and also support the clinical usefulness of herbal medicine.

Key words : Gleditsiae Spina, PC-3, apoptosis

1. 서론

식생활의 변화 등 우리나라의 생활 문화가 전반적으로 서구화 되고 있으며, 노령 인구의 증가로 인해 전립선암의 발생은 점차 증가하고 있는 추세이다¹. 전립선암은 남성에게만 발병하며 북미에서

는 가장 흔한 암으로, 미국 암 협회(American cancer society)의 발표에 의하면 2010년 기준으로 전체 암 환자 중에서 약 28%의 경우에서 전립선암이 유발되었으며, 전체 암환자 중 약 11%가 전립선암으로 인해 사망한 것으로 보고되어 암 관련 발병률 1위, 사망률 2위인 것으로 파악되고 있다². 우리나라에서도 전립선암의 발생은 점차 증가되고 있는 추세이며, 각종 암 중에서 발병률 5위, 증가율 1위인 것으로 보고되었다³.

전립선암은 전립선에의 염증 및 감염뿐만 아니

· 교신저자: 임지연 경기도 고양시 일산동구 식사동 814번지
동국대학교 의과대학 의학과
TEL: 031-961-8431 FAX: 031-961-8431
E-mail: rachun@hanmail.net

라 인종, 국가와 같은 문화적 및 지리적 특성도 반영되고 있으며, 유전적 특이성, 식이, 비만 등과 같은 환경적 요인도 작용하는 등 발병 원인은 다양하게 연구되고 있으나 정확한 발병 기전은 아직 명확하게 알려져 있지 않는데⁴, 발병 초기에는 안드로겐 호르몬 제거 등을 기초로 하며 기타 화학 요법, 방사선 요법 및 외과적 요법을 병행하기도 하지만 부작용을 감수해야 하며, 안드로겐 비의존성 전립선암 환자의 경우는 치료가 어렵기 때문에 향후 천연물과 같은 생물 의약을 이용한 치료와 이로 인한 암의 세포 사멸인 apoptosis 유도법 개발의 필요성이 대두되고 있다.^{5,6}

皂角刺는 豆科(콩과; Leguminosae)에 속한 落葉喬木인 조각자나무 (*Gleditsia sinensis* LAM.) 및 주엽나무 (*G. japonica* MIQUEL var. *korainensis* Nakai)의 가시를 건조한 것으로^{7,8}, 皂角刺의 명칭, 炮製, 主治 등에 대해서는 本草綱目에 자세히 기술되어 있는데, 조각자나무의 열매에 해당하는 皂莢의 항목 아래에 天丁이라는 異名을 가지고 있으며 氣味는 辛溫 無毒하여, 瘡癬 등과 같은 피부질환에 皂角刺 煎湯液을 바르면 효과가 아주 좋으며, 癰腫 惡瘡 등과 같은 외과 질환뿐만 아니라 胎衣不下에도 사용할 수 있으며, 殺蟲의 효과도 있는 것으로 나타나 있다⁹. 따라서 대체적으로 皂角刺는 消腫排膿 등의 효능이 있어 癰癤惡瘡 등과 같은 질환의 치료에 활용되어지고 있으므로^{7,9} 현대적 의미에서 염증, 종양 등과 같은 질환과의 연관성이 있음을 추측할 수 있다.

皂角刺를 재료로 한 기존 연구로는 항염증¹⁰, 항암^{11,12}, 항돌연변이 및 항산화 활성¹³, 독성¹⁴ 및 항응혈¹⁵에 대한 연구 등이 있었으며, 항암 활성에 대한 연구에서도 HepG2 및 S180 등과 같은 간암 및 복강암 세포주를 사용한 연구들만 보고^{11,12}되었으며, 전립선과 관련된 연구로는 비세균성 전립선염 모델을 이용한 연구 결과가 발표된 바는 있으나¹⁶ 전립선암과 관련된 연구 결과는 찾아볼 수 없었다.

Apoptosis는 세포 내에서 일어나는 프로그램된 세포 사멸 기전으로, 호르몬 또는 화학 물질과 같

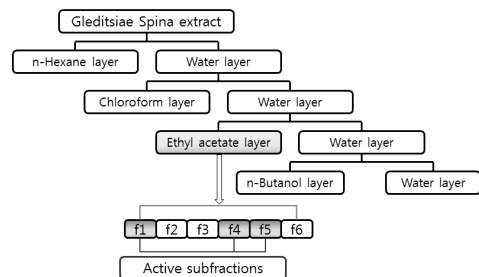
은 많은 apoptosis 관련 인자들에 의해 조절되는데^{17,18}, 본 연구에서는 消腫排膿의 효능을 가지고 있으며 癰癤惡瘡 등과 같은 증상이 적응증에 포함되어 있는 皂角刺가 인간 전립선암 세포주인 PC-3세포에 apoptosis를 유도하는지를 확인하고 다양한 분획을 대상으로 점진적으로 항암 활성을 나타내는 물질에 접근함으로써 임상 활용은 물론 새로운 처방 또는 물질의 개발 가능성을 확인하여 그 결과를 보고하는 바이다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 약재 및 추출

본 실험에 사용된 皂角刺는 광명당제약(울산, 한국)으로부터 구입·정선하여 사용하였으며, 관능 검사를 통해 기원이 조각자나무(*Gleditsia sinensis* LAM.)인 것을 확인하였다. 1,000 g의 皂角刺를 분쇄기를 이용해 잘게 부순 다음 충분한 양의 메탄올에 담가 24시간 동안 냉침하여 상등액을 수집하였으며, 이러한 과정을 3회 반복하여 42.16 g의 메탄올 추출물을 얻었다. 전립선암 세포주 생육 억제 활성 실험 도중 비교적 강한 활성을 보인 분획인 에틸아세테이트 분획의 경우 메탄올 추출물 44 g으로부터 에틸아세테이트(EtOAc) 분획 8 g을 얻을 수 있었으며, 실험 과정 중 순차적으로 세부 분획을 획득하였다(Scheme 1).



Scheme 1. Process of sample extraction. Biologically active subfractions were acquired after anti-proliferation assays on PC-3 cell line.

2) 시약 및 기기

본 실험에 사용한 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), propidium iodide(PI), 2',7'-dichlorodihydro fluorescein diacetate (DCFH-DA), 3,3-dihexyloxycarbocyanine(DiOC6), Fluo-3/AM 그리고 N-acetyl-L-cystein(NAC)은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA), 1,2-bis-(o-Aminophenoxy) ethane-tetraacetic acid tetra-(acetoxymethyl) ester (BAPTA/AM)는 Calbiochem (Merck, Darmstadt, Germany), FITC Annexin-V Apoptosis Detection kit는 BD Bioscience(San Jose, CA, USA) 등을 구입하여 사용하였다. 세포 배양을 위해서는 fetal bovine serum(FBS), streptomycin, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 및 RPMI 는 WelGene 제품(Daegu, Korea) 등을, 크로마토그래피 분리 및 분석용 제품들은 Merck(NJ, USA) 제품으로 모두 HPLC grade를 사용하였다.

본 연구에 사용된 분석용 기기는 ELISA reader (VERSAMAX microplate reader, Molecular Devices, Toronto, Canada), flow cytometry(FACS Calibur, BD Biosciences), fluorescence scanner(LAS-3000, Fuji Film, Tokyo, Japan), HPLC(Agilent 1200 series, Netherlands) 등 이었다.

2. 실험 방법

1) 세포의 배양

인간 전립선암세포주인 PC-3는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)로부터 분양 받아 10% FBS와 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 함유된 DMEM과 RPMI 배지에서, 5%의 CO₂ 가 포함된 37 °C 배양기에서 배양하였다.

2) 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay를 이용한 세포 독성의 측정
전립선암 세포주인 PC-3에 대한 梲角刺 추출물의 세포독성을 확인하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 전립선암 세포를 48-well cell culture plate

에서 1×10^4 cells/ml이 되도록 24시간 배양 하였고, 梲角刺 추출물을 50-400 µg/ml의 농도로 24 또는 48시간 동안 처리하였다. 이후 0.5 mg/ml MTT 시약을 처리하여 4시간 동안 37 °C 배양기에서 반응하였다. 살아있는 세포의 미토콘드리아에서 생성된 reductase와 MTT 시약과의 반응으로 생성된 보라색의 formazan을 dimethyl sulfoxide(DMSO)로 녹여내어 96-well plate로 옮기고 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Annexin V/propidium iodide(PI) assay를 이용한 apoptosis 유도 세포의 측정

PC-3 세포에서 梲角刺 추출물의 apoptosis 유도 정도를 확인하기 위하여 phosphatidylserine 의 세포막 노출과 PI 염색 정도를 FITC Annexin-V Apoptosis Detection kit를 이용하여 측정하였다. PC-3 세포를 1×10^5 cells/ml이 되도록 6 well plate에서 24시간 배양하였고, 梲角刺 추출물을 50-400 µM의 농도로 24시간 동안 처리한 후, 배양 상등과 세포를 flow cytometry 전용 tube로 옮겨 1,500 rpm으로 4분간 원심분리 하여 세포를 분리하였다. 분리된 세포를 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4) 으로 2회 세척하고, cell pellet을 Annexin-V/PI 시약과 1×binding buffer를 이용하여 조심스럽게 현탁 후 상온에서 15 분간 세포막과 핵을 각각 염색하였다. 염색된 세포는 flow cytometry를 이용하여 측정하였고, Cell Quest software(Becton Dickinson Co.)를 이용하여 apoptosis가 유도된 세포를 분석하였다.

4) 크로마토그래피 분석 조건

얇은 막 크로마토그래피(TLC)는 梲角刺 추출물 및 이의 세부 분획에서의 활성 분획을 얻기 위해 chloroform:methanol=10:1 등과 같은 다양한 이동상 조건에서 최적의 분석 및 분리 조건을 찾았으며 이는 각 연구 결과에 일부 명시하였고 발색을 위해서는 p-anisaldehyde 시약과 황산을 섞어 사용하였다. HPLC 분석 및 분취 조건은 아래와 같다 (Table 1).

Table 1. Analytical Condition for Measuring Natural Disposition in Gleditsiae Spina Extract.

Item	
Column	Xterra BP18
Column Temperature	Room Temperature
Mobile Phase	100% Methanol
Wave Length	254 nm
Injection Volume	10 μ l
Flow Rate	1.0 ml/min

3. 통계 처리

모든 실험의 표시된 결과는 3번 이상 반복 수행 하였으며, 통계분석은 mean \pm S.D.로 표시하였고, ANOVA에 의해 분석하였다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 로 판정하였다.

III. 결 과

1. PC-3 세포에 대한 皂角刺 추출물의 세포 독성 효과

皂角刺 추출물의 PC-3에 대한 세포독성의 경향을 확인한 결과, 메탄올 추출물과 이의 에틸아세테이트 분획에서 농도 및 시간 의존적으로 皂角刺 추출물에 의해 세포독성이 증가하는 경향을 보였으며 본 연구에서는 24시간 결과만 나타내었다 (Fig. 1).

또한 본 연구에 나타내지는 않았지만 예비 연구를 통해 호르몬 비의존성 PC-3 세포와 호르몬 의존성 LNCaP 세포의 생존율도 비교하였는데, 그 결과 호르몬 결핍 배지에서의 LNCaP 세포의 생존율이 더 낮은 것을 확인할 수 있어, PC-3 세포가 LNCaP 세포보다 皂角刺 추출물에 대한 저항성이 높음을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 호르몬 의존성 암세포보다 항암 치료가 힘들다고 알려진 호르몬 비의존성 세포인 PC-3 세포를 선택하여 皂角刺 추출물의 apoptosis 유도 기전에 대해 탐색하였다.

메탄올 추출물 처리에 의한 결과와 유사한 양상

을 보였고 농도의존적인 경향 또한 뚜렷하게 나타난 분획이 에틸아세테이트 분획이었으므로, 이후 연구는 에틸아세테이트 분획을 대상으로 하였으며 전립선암세포 성장 억제 효과가 보이는 분획을 순차적으로 분리하였다.

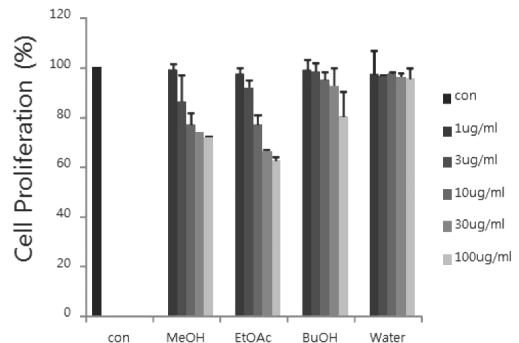


Fig. 1. Inhibition of Gleditsiae Spina extract fractions on proliferation in PC-3 prostate cancer cells.

Cell viability was determined using the MTT assay as described in Materials and Methods. Data are presented as mean \pm SD (n=3 in each group). con, naive cells; MeOH, methanol extract; EtOAc, ethylacetate fraction; BuOH, butanol fraction; Water, water fraction from methanol extract treated cells.

2. PC-3 세포에 대한 皂角刺 추출물의 apoptosis 유발

皂角刺 추출물 중 에틸아세테이트 분획의 PC-3 세포에 대한 세포 독성이 apoptosis 유도에 의한 것임을 확인하기 위해 Annexin-V/PI 염색과 flow cytometry 측정 등을 수행한 결과, annexin-V가 염색된 부분인 초기 apoptosis와 annexin-V와 PI가 함께 염색된 부분인 후기 apoptosis 양은 皂角刺 에틸아세테이트 분획을 200 μ g/ml 농도로 24시간 처리하였을 때 약 17%로 증가하였으며 (Fig. 2A), 농도를 더 증가시켰을 경우 세포의 괴사가 유도되었다.

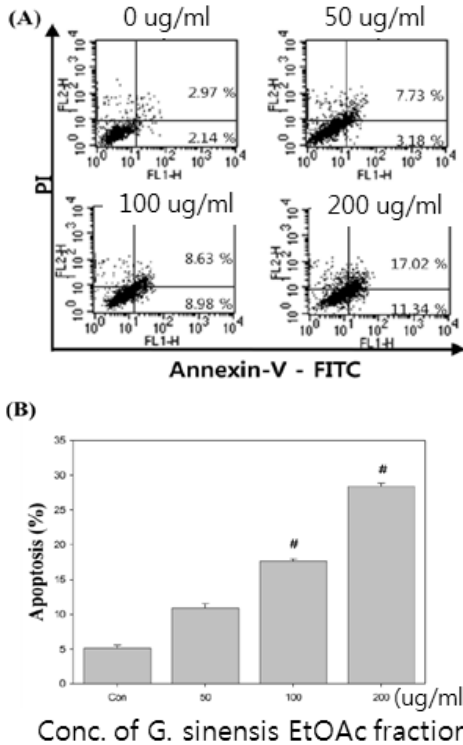


Fig. 2. Induction of apoptosis by Gleditsiae Spina EtOAc fraction in PC-3 cells.

A, Annexin-V/propidium iodide (PI) double staining assay detected by flow cytometry. B, The percentage of apoptotic cell for each treatment group. The dual parameter fluorescent dot plots showed the viable cell population in the lower left quadrant (Annexin V⁻/PI⁻), the cells at early apoptosis in the lower right quadrant (Annexin V⁺/PI⁻), and the ones at the late apoptosis in the upper right quadrant (Annexin V⁺/PI⁺).

3. 皂角刺 분획물의 구성 성분 패턴 확인을 위한 얇은 막 크로마토그래피법

皂角刺 분획 중 에틸아세테이트 분획에서 기타의 분획보다 강한 전립선암 세포주 성장 억제 활성을 보였으며, 이에 apoptosis 기전이 관여한다는 사실을 확인 했으므로 에틸아세테이트 분획이 기타의 분획과 추출 패턴에서 차이가 어떠한 양상으로 나타나는지를 확인하기 위해 TLC를 이용하여

분석하여 보았다(Fig. 3). 발색은 실험 방법에 기술된 바와 같이 p-anisaldehyde 시약과 황산을 사용하였으며, 발색이 명확하지 않은 경우에는 hot plate를 이용하여 열을 가하여 분명한 발색을 유도하였으며, 백열등 아래에서 촬영하였다.

그 결과 화살표로 표기된 바와 같이 클로로포름과 메탄올 10:1의 이동상 조건에서 Rf 값이 0.5에 해당하는 부위에서 다른 분획에서와 구별되는 구성 성분들이 검출되었으며, 기타의 이동상 조건에서는 C/M=10/1의 조건에서보다 Rf 값이 높은 부위에 여러 물질들이 검출되었으므로 이후 세부 분획을 다시 얻기 위한 방법인 분취용 TLC 이동상 조건은 클로로포름과 메탄올 10:1에서 수행하였다.

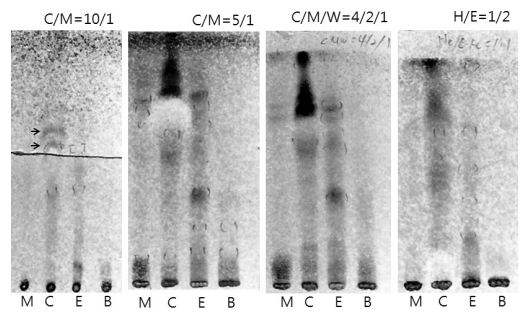


Fig. 3. Thin layer chromatography analysis for identification of composing material patterns.

Fraction, M, MeOH; C, Chloroform; E, EtOAc; B, Butanol. Mobile phase, M, MeOH; C, Chloroform; W, water; H, Hexane; E, Ethyl Acetate.

4. 皂角刺 에틸아세테이트 분획으로부터 하위 분획 분리

皂角刺 에틸아세테이트 분획에서 apoptosis를 통한 전립선암 세포주의 사멸을 확인하였고 이의 분리 조건이 클로로포름과 메탄올 10:1의 이동상 조건이 가장 적합함을 확인하였으므로, 이러한 이동상 조건을 적용하여 분취용 TLC법을 사용하여 에틸아세테이트 분획을 완전히 전개한 다음 UV illuminator의 254 및 365 nm 파장에서 분리 패턴을 확인을

통해 16개의 층으로 구분하였다(Fig. 4A).

TLC plate에 coating 되어 있는 silica gel을 분리 획득, 메탄올 추출 및 건조 과정을 거쳐 16개의 분획을 얻었는데, 분취용 TLC가 넓고 흡착제인 silica gel이 두꺼움으로 인해 皂角刺 에틸아세테이트 분획을 이동상으로 전개했을 경우 밴드가 휘어지는 현상이 나타났으나 밴드 사이의 경계를 명확히 구분하여 시료를 흡착한 실리카겔을 각각 수집하였고, 이를 다시 메탄올에 녹여 동일한 이동상에서 분석용 TLC법으로 확인하여 각각의 밴드들이 잘 분리됨을 확인하였다(Fig. 4B).

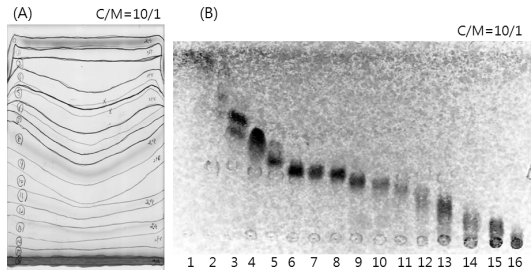


Fig. 4. TLC separation using preparative TLC method from Gleditsiae Spina EtOAc fraction.

Bands in (A) were identified by using UV illuminator with wavelengths of 254 and 365 nm. Coated silica gels on preparative TLC plate were separated from the plate by scraping each of the identified bands. The scraped each of the silica gel bands were dissolved in methanol and dried. C, Chloroform; M, Methanol. Numbers below TLC plate represents identified spots using coloration reagents.

5. 皂角刺 에틸아세테이트 하위 분획 항암 활성 탐색

분취용 TLC법을 이용해 얻은 16종의 皂角刺 에틸아세테이트 하위 분획을 이용하여 전립선암 세포주인 PC-3를 대상으로 농도별로(10, 30 µg/ml) 분획물을 처리하여 MTT 방법으로 전립선암 세포 사멸 활성을 확인하였다. 그 결과 1번에서 16번까지의 하위 분획 중 3번과 16번 분획에서 비교적 강

력한 농도 의존적인 세포 사멸의 경향을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

본 연구에 나타내지는 않았지만 3번과 16번 분획을 이용하여 다시 10 µg/ml에서부터 200 µg/ml까지의 농도에서 세포 사멸 활성의 경향을 확인하여 보았는데 역시 모두 농도 의존적인 활성을 보였으며 그러한 경향은 3번 분획에서 더 명확하게 나타났으며, 3번 분획의 경우 PC-3 뿐만 아니라 대장암 세포주 등 비교적 다양한 암세포주에 사멸 효과를 보여주었다. 16번 분획에서도 비교적 강력한 세포 사멸을 보였으나, 여기에 포함된 물질들은 TLC와의 결합력이 강한 물질로 추측되며 이후 연구에서는 제외하기로 하였다.

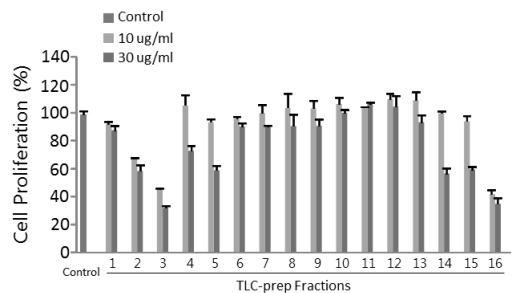


Fig. 5. Inhibition of Gleditsiae Spina EtOAc subfractions on proliferation PC-3 cells.

Cell viability was determined using the MTT assay as described in Materials and Methods. Data are presented as mean±SD(n=3 in each group).

6. 皂角刺 에틸아세테이트 하위 3번 분획의 세부 분획 분리 및 항암 활성

皂角刺 에틸아세테이트 분획으로부터 하위 분획의 분리와 항암 활성 탐색을 통해 3번 분획의 전립선암 세포주에 대한 항암 활성이 확인되었으므로 여기서 다시 순차적으로 세부 분획을 분리하고 다시 항암 활성을 확인하고자 하였다.

활성이 강한 3번 분획만으로 확인하는 것 보다는 인접한 분획과 비교 분석하는 것이 이동상의 조건 등을 확립하기 편리하므로 클로로포름 분획,

에틸아세테이트분획과 함께 하위 2번, 3번 및 4번 분획의 분리를 위해 다양한 이동상을 이용하여 분리 조건을 찾았으며 그 결과 헥산과 에틸아세테이트 2:1의 이동상 조건이 가장 적합한 것으로 확인되었으며 전체적인 분리 패턴을 역상 TLC를 이용해서도 확인하였다(Fig. 6). 역상 TLC에서의 이동상 조건은 100% 메탄올에서 가장 분리가 잘 되는 것으로 나타났다.

헥산과 에틸아세테이트 2:1의 이동상 조건에서 다시 분취용 TLC법을 이용하여 다시 11개의 하위 세부 분획을 얻었다. UV illuminator 등을 이용해 밴드 사이의 경계를 명확히 구분하여 시료를 흡착한 실리카겔을 각각 수집하였고, 이를 다시 메탄올에 녹여 동일한 이동상에서 분석용 TLC법으로 확인하여 각각의 밴드들이 잘 분리됨을 확인하였다(Fig. 7). 3번 분획에서 분리된 구성 성분들과 2번 및 4번 분획에서와의 성분 패턴을 비교하기 위해 밴드들을 다시 동일한 조건에서 확인해보았으며, 그 결과 3번 분획에서 다른 분획에 비해 다량 존재하는 구성 성분이 있음도 관찰되었는데 이에 해당 하는 물질은 화살표로 나타내었다.

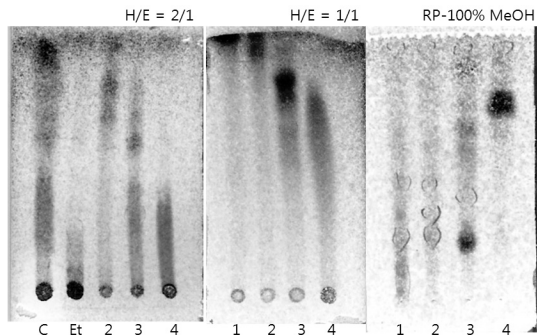


Fig. 6. Thin layer chromatography analysis for identification of composing material patterns of EtOAc subfractions especially number 3.

Fraction, C, Chloroform; Et, EtOAc. Mobile phase, H, Hexane; E, Ethyl Acetate, MeOH, Methanol. RP, Reverse phase.

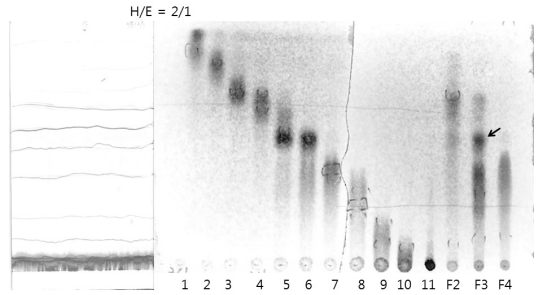


Fig. 7. TLC separation using preparative TLC method from Gleditsiae Spina EtOAc number 3 subfraction.

H, Hexane; E, Ethyl acetate. Numbers below TLC plate represents identified spots using coloration reagents.

7. 皂角刺 에틸아세테이트 하위 3번 세부 분획의 항암 활성

에틸아세테이트 분획의 하위 분획 중 3번 하위 분획을 다시 세부 분획으로 나누어 획득한 11개의 세부 분획을 이용하여 다시 전립선암 세포주인 PC-3를 대상으로 분획물을 처리하여 MTT 방법으로 암 세포 사멸 활성을 확인하였다. 그 결과 1번에서 11번까지의 하위 분획 중 4번, 5번, 6번 및 11번 분획에서 비교적 강력한 농도 의존적인 세포 사멸을 확인할 수 있었다(Fig. 8).

앞서 수행한 분취용 TLC 결과와 비교해보면 Rf 값 0.5 부근에서 5번과 6번 세부 분획에서 동일한 밴드가 확인되고 있으며, 4번 분획의 경우 미약하나마 비슷한 밴드가 관찰되었다. 에틸아세테이트 3번 분획과 이의 세부 분획들과의 구성 성분 발현 패턴을 한번 더 확인하기 위해 역상 TLC를 이용하여 다시 확인한 결과 역시 에틸아세테이트 3번 분획과 이의 세부 분획 중 5번 및 6번에서 Rf 값 0.2 근처에서 동일하게 발색되는 물질이 확인되었다(Fig. 9).

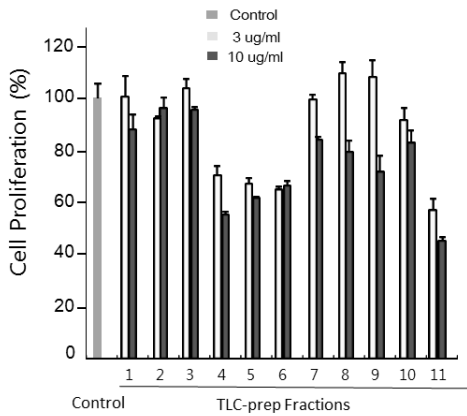


Fig. 8. Inhibition of Gleditsiae Spina EtOAc number 3 subfraction on proliferation in PC-3 Cells.

Cell viability was determined using the MTT assay as described in Materials and Methods. Data are presented as mean±SD (n=3 in each group).

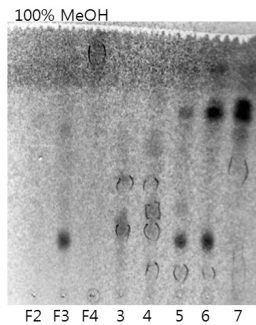


Fig. 9. TLC identification using analytical reverse phase TLC Method from Gleditsiae Spina EtOAc number 3 and its subfractions.

100% methanol was used for mobile phase. Numbers below TLC plate represents identified spots using coloration reagents.

8. 흰角刺 에틸아세테이트 하위 3번 세부 5번 분획 주요 성분의 분리

위의 실험에서 인체 유래 전립선암 세포주인 PC-3의 사멸에 가장 효과적으로 작용한 분획이 확인되었으므로 이를 바탕으로 향후 대량 분리 정제 및 최적 추출 조건을 확립하기 위해 HPLC를 이용해 분석 및 분취한 후 항암 활성을 보였던 성분인

지 확인하기 위해 분석용 TLC를 이용하여 다시 한번 Rf 값을 확인하여 보았다.

그 결과 HPLC 상에서 UV/Visible detector를 사용한 분석 조건에서 검출 시작 2분에서 6분 사이에 약 4개 정도의 피크가 확인되었고 (b, c, d 및 e 영역에서) 나타난 피크가 5번 세부분획 특이적으로 검출된 물질인지 확인하기 위해 a 영역에서부터 f 영역에 이르기까지의 6개 영역에서 시료를 분취하였으며, 이를 분석용 TLC를 이용해 에틸아세테이트 하위 3번 세부 5번 분획과의 구성 성분을 확인한 결과 분취액 e에 해당하는 부분에서 동일한 성분임이 확인되었다(Fig. 10).

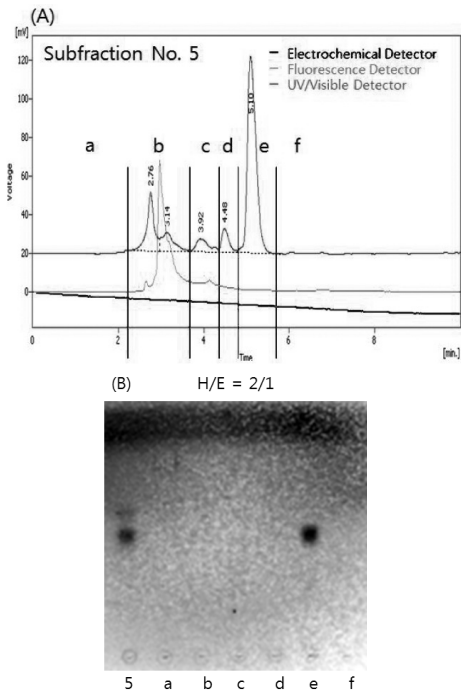


Fig. 10. HPLC (A) and TLC (B) identification using analytical reverse phase HPLC column and TLC plate from Gleditsiae Spina EtOAc number 3 and its subfraction number 5. 100% methanol was used for mobile phase.

Alphabets in above figure represents the same subfractions and spots in TLC plate were obtained by using coloration reagents.

IV. 고찰

皂角刺는 조각자나무(*Gleditsia sinensis*) 또는 주엽나무(*G. japonica* var. *korainensis*)의 가시를 건조한 것에 해당하는 약재로^{7,8} 表面은 紫褐色 또는 紅褐色으로 가시는 가뿍우나 단단하며 절단하기가 어렵다⁷. 우리나라와 중국의 경우 조각자의 기원식물을 각기 달리 규정하고 있는데⁸, 시중에서 유통되는 제품을 확인한 결과 대부분이 중국산이었으며, 본 연구에서의 재료 또한 조각자나무에서 기원한 약재를 사용하였다.

皂角刺의 性은 溫 하고 味는 辛하며, 肝 및 胃로 歸經하여 消腫排膿, 祛風殺蟲 등의 효능이 있으며, 癰疽腫毒, 瘰癧, 山後缺乳, 胎衣不下 등에 활용될 뿐만 아니라 外用으로 疥癬麻風 등의 병증 치료에도 활용 된다⁷.

皂角刺의 활성에 관한 연구는 활발히 행해지지 않았던 것으로 생각되며, 물추출물 만으로도 항염증 작용이 보고되었을 뿐만 아니라¹⁰ 최근에는 물추출이 염증을 유도하는 cytokine의 유전자 발현과 분비를 억제하는 과정을 통해 항염 작용을 나타내며 이러한 결과를 미루어 향후 알려지 질환을 치료하는 후보 약재가 될 수 있음이 보고된 바 있다¹⁹. 복강암 세포가 접종된 생쥐에 皂角刺 물 추출물을 투여하였을 경우에는 세포성 면역 체계를 자극하여 항암 작용을 하는 것으로 나타났다¹².

본 연구와 비교적 연관성이 있는 전립선에 관한 연구 결과에서는 물 추출물을 이용하여 흰쥐에 투여한 결과 전립선의 선포세포 및 도관상피세포의 형태를 정상에 가깝게 유지시켰으며, 임파구 및 단핵구의 침윤뿐만 아니라 섬유화 변성도 감소시키는 것으로 나타났다¹⁶. 또한 전립선 분비선의 손상 억제 및 결합조직 증식 억제를 통해 전립선의 증상을 완화시키는 결과를 보였으므로¹⁶ 증상의 표현이 유사한 전립선암에도 유효하게 작용할 수 있을 것으로 추측할 수 있다.

전립선은 분비선 조직과 이를 둘러싸고 있는 심

유근 조직으로 구성되어 있으며, 선체는 요도를 중심으로 동심원 형태로 배열되어 있다²⁰. 또한 전립선은 칼슘, citrate 이온 등을 함유한 묽고 우윳빛의 약알칼리 성질을 가진 액을 분비하며, 이 용액은 사정하는 동안 나머지 정낭액의 산성을 중성화하는 역할을 하기 때문에 정자의 활동과 생식력을 증진시키는 것으로 알려져 있다²¹.

전립선암은 소변이 가늘어지고 개운하지 않으며, 야간에 소변을 자주 보게되며 정액에 혈액이 섞여 나오는 등의 증상을 보이는 질환으로, 현재 미국에서 발병률 1위, 암 관련 사망률 2위일 뿐만 아니라 국내에서도 암 발병률 5위를 차지할 정도로 선진국에서 빠르게 증가하고 있는 암 중의 하나이다²⁻⁴. 특히 나이, 인종, 국가, 가족력, 유전자, 식이, 비만 그리고 전립선에의 염증 및 감염 등으로 인해 발병할 수 있는데 안드로겐 호르몬의 제거로 초기에 쉽게 제거할 수 있다. 하지만 호르몬 비의존성 전립선암의 경우 치료가 힘들기 때문에 천연물을 이용한 생물학적 치료에 대한 연구가 많이 진행되고 있다^{5,6}. 또한 중국에서는 皂角刺를 전립선 질환에 자주 사용하고 있는 것으로 보고하고 있으나²²⁻²⁴ 아직까지 전립선암에 대한 치료 사례는 찾아보기 힘들며 물 추출물 이외에 다양한 분획을 이용한 연구는 거의 전무하다시피 한 실정이다.

조각자나무로부터 분리된 물질의 구조 동정 및 활성에 관한 연구가 일부 보고되기는 했으나²⁵⁻²⁷ 전립선암과는 연관성이 없는 연구들이 주류를 이룬다.

본 연구에서는 皂角刺 추출물을 이용하여 전립선암 세포주의 apoptosis를 유도에 대한 실험을 수행하였으며, 가능한 다양한 분획물을 얻어 활성 물질 분리와 관련된 기초 연구 및 향후 천연물에 기반한 전립선암 치료 물질 개발 모델을 수립하고자 하였다.

인체 유래 전립선암 세포주이면서 호르몬 의존성 암세포보다 항암 치료가 힘들며 치료 기전에 대해서도 잘 밝혀지지 않은 안드로겐 효소에 비의

존적 세포인 PC-3 세포에 대한 皂角刺 추출물의 세포 독성 효과를 확인하기 위해 皂角刺 추출물을 처리하여 MTT 방법으로 확인한 결과 메탄올 추출물과 이의 에틸아세테이트 분획에서 농도 및 시간 의존적으로 皂角刺 추출물에 의해 세포 독성이 확인되었다(Fig. 1).

세포 독성이 약물에 의한 necrosis 인지 프로그램된 세포 사멸 과정인 apoptosis 인지 구별할 필요가 있는데, 초기 apoptosis를 인지할 수 있는 Annexin-V와 PI 염색법을 이용하여 apoptosis 유도 여부를 확인하였다. Annexin-V는 apoptosis가 진행되고 있는 세포의 세포막에 결합하는데, apoptosis가 진행되면 세포는 내부에 있는 phosphatidylserine을 세포막 외부로 노출하게 되고 이 노출된 phosphatidylserine에 annexin-V가 결합하게 된다. 또한, PI는 핵에 결합하는 물질로 세포에 apoptosis가 유도되면 세포의 세포막에 구멍이 생기게 되고 PI가 세포 내로 유입되게 되어 핵에 염색이 일어나게 된다. 이렇게 염색된 세포를 flow cytometry를 이용하여 형광과장으로 확인을 한 결과, 皂角刺 추출물의 농도가 증가함에 따라 apoptosis가 유도되는 세포의 수가 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

위의 결과들을 통해 皂角刺 추출물이 전립선암 세포주 사멸을 유도하였으며 이 과정에 apoptosis가 관여했다는 것이 확인되었다. 따라서 이후 다양한 분석 및 분취 과정 및 세포 사멸 확인을 통해 활성 물질 분리의 기초 작업을 수행하고 향후 약물 개발의 기본 연구로 삼고자 하였다.

皂角刺 에틸아세테이트 분획 건조 추출물을 클로로포름과 메탄올 10:1의 이동상 조건에서 전개했을 때 Rf 값이 0.5에 해당하는 부위에서 구성 성분들이 많이 검출되었으며(Fig. 3) 분취용 TLC법을 통해 얻은 16종의 세부 분획(Fig. 4A)을 재료로 PC-3에 농도별로 분획물을 처리하여 MTT 방법으로 전립선암 세포 사멸 활성을 확인한 결과 3번과 16번 분획에서 비교적 강력한 농도 의존적인 세포

사멸을 확인할 수 있었으며 농도 의존적인 활성은 3번 분획에서 더 명확하게 나타났다(Fig. 5).

皂角刺 에틸아세테이트 하위 3번 분획의 전립선암 세포주에 대한 항암 활성이 확인 되었으며 다양한 이동상을 이용하여 분리 조건을 찾은 결과 헥산과 에틸아세테이트 2:1의 이동상 조건이 가장 적합한 것으로 확인되었다(Fig. 6). 위의 이동상 조건에서 분취용 TLC법을 이용하여 다시 11개의 하위 세부 분획을 얻었으며(Fig. 7) 이를 재료로 다시 전립선암 세포주인 PC-3에 분획물을 처리하여 MTT 방법으로 암세포 사멸 활성을 확인한 결과 4번, 5번, 6번 및 11번 분획에서 비교적 강력한 농도 의존적인 세포 사멸이 나타났다(Fig. 8).

또한 순상 및 역상 TLC 확인을 통해 에틸아세테이트 3번 분획과 이의 세부 분획 중 5번 및 6번에서 활성을 보일 것으로 추정되는 물질이 있음을 확인하였으며(Fig. 9), HPLC를 이용해 분취하고 다시 분석용 TLC를 이용하여 다시 Rf 값을 확인하는 과정을 거쳐 HPLC 크로마토그램에서 하나의 피크를 보이는 성분을 확인하였다(Fig. 10).

위의 결과들을 통해 皂角刺 추출물의 PC-3에 대한 세포 사멸에 apoptosis 반응이 관여하며, 메탄올 추출물에서부터 점차적으로 세부 분획을 얻어가는 과정에서 활성 물질로 추측되는 물질의 추출 및 분리 조건을 확인하였다.

V. 결론

皂角刺 추출물을 이용하여 인체 유래 전립선암 세포주인 PC-3의 apoptosis를 유도에 대한 실험을 수행한 결과 메탄올 추출물과 이의 에틸아세테이트 분획에서 농도 및 시간 의존적으로 皂角刺 추출물에 의해 세포 독성이 확인되었다. 또한 flow cytometry를 이용하여 형광과장으로 확인하여 皂角刺 추출물의 농도가 증가함에 따라 apoptosis가 유도되는 세포의 수가 증가하는 것을 확인하였으며, 이후 다양한 분석 및 분취 과정 및 세포 사멸

확인을 통해 활성 물질 분리를 수행하여 HPLC 크로마토그램에서 하나의 피크를 보이는 성분을 확인하였으므로 활성 물질 분리 및 분석 조건을 확립할 수 있었다.

참고문헌

- Burks D, Littleton R. The epidemiology of prostate cancer in black men. *Henry Ford Hosp Med J* 1992;40:89-92.
- Jemal AR, Siegel JX, Ward E. 2010 Cancer statistics. *Cancer J Clin* 2010;60:277-300.
- Chi BH, Chang IH. Prostate cancer: recent trends in Korea. *Uro Int* 2010;85:88-93.
- American Cancer Society. Prostate cancer overview : What is prostate cancer?. *American Cancer Society* 2012;1-48.
- Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 2003;3:768-80.
- Zhang HN, Yu CX, Chen WW, Jiang AL, Kong F, Deng JT, et al. Curcumin downregulates homeobox gene NKX3.1 in prostate cancer cell LNCaP. *Acta Pharmacol Sin* 2007;28:423-30.
- 전국한의과대학 본초학교수 공편저. *本草學*. 서울: 永林社; 2007, p. 478-9.
- 金仁洛. 皂莢과 皂角刺의 기원에 대한 연구. *大韓本草學會誌*. 2006;21(1):44-9.
- 李時珍. *本草綱目*. 北京: 人民衛生出版社; 1982, p. 2014-23.
- Park EH, Shin MJ. Anti-inflammatory Activity of Aqueous Extract from *Gleditsiae Spina*. *Yakhak Hoeji* 1993;37(2):124-8.
- Kang SY, Cho KW, Han JH, Cho NG. Effect of *Gleditsiae Spina* on Hep G2 cells cytotoxicity and Apoptosis and NO. *Korean J Orient Int Med* 1997;18(1):48-61.
- Park YK, Kang BS, Kim JT, Park IS, Ahn SH. The Experimental Study on Antitumor effects of *Gleditsia spina*. *Journal of Herbology* 1997;12(1):53-66.
- Lee SK, Shin JI, Seo UK, Jeong JC. A Study on Activities of Antioxidant and Antimutagenicity of the Extracts from *Gleditsia sinensis*. *Korean J Orient Int Med* 2001;22(2):215-22.
- Kim CH, Hah DS, Leu JD, Heo JH, Jung MH, Choe YT, et al. Oral Toxicity Studies for 2 weeks of *Gleditschia-saponin* in Sprague Dawley Rats. *J Toxicol Public Health* 2002;18(3):285-92.
- 유지현, 정봉태, 길기정. 조각자(皂角刺) 추출물의 항응혈 활성. *대한본초학회지* 2010;25(1):39-43.
- 정기훈. 皂角刺가 만성 비세균성 전립선염 Rat 모델에서 혈액 및 세포조직의 변화에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 2007;28(4):779-90.
- Furre IE, Miller MT, Shanzhidi S, Nesland JM. Involvement of both caspase-dependent and -independent pathways in apoptotic induction by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy in human lymphoma cells. *Apoptosis* 2006;11:2031-42.
- Kim KW, Choi CH, Kim TH, Kwon CH, Woo JS, Kim YK. Silibinin inhibits glioma cell proliferation via Ca²⁺/ROS/MAPK-Dependent mechanism in vitro and glioma tumor growth in vivo. *Neurochem Res* 2009;34:1479-90.
- Shin TY. The Extract of *Gleditsiae Spina* Inhibits Mast Cell-Mediated Allergic Reactions Through the Inhibition of Histamine Release and Inflammatory Cytokine Production. *Natural Product Sciences* 2010;16(3):185-91.
- 대한비뇨기과학회. *비뇨기과학*. 서울: 고려의학; 2001, p. 12-3, 15-60.
- Arthur CG, John EH. *의학생리학*. 서울: 도서

- 출판정답: 2002, p. 175, 434, 446, 447, 1073.
22. 吳大眞, 王炎, 王鳳岐, 等 主編. 現代名中醫前列腺治療絕技. 北京: 科學技術文獻出版社: 2004, p. 29, 55, 58, 123, 135, 178.
 23. 王琦 主編. 男科疾病中西醫匯通. 沈陽: 遼寧科學技術出版社: 2003, p. 141.
 24. 陳茂仁, 張俊龍 總主編. 中西醫結合專科病診療大系 男科病學. 山西: 山西科學技術出版社: 1999, p. 214, 215.
 25. Jianming W, Jian L, Zhiyong Z, Jiang L, Guojun H, Yao T, et al. Protective effects of echinocystic acid isolated from *Gleditsia sinensis* Lam. against acute myocardial ischemia. *Fitoterapia* 2010; 81(1):8-10.
 26. Tadashi K, Nobuwa A, Emi O, Yasushi K, Shinji O. Saikachinoside A, a novel 3-prenylated isoguanine glucoside from seeds of *Gleditsia japonica*. *Tetrahedron Letters* 2010;51(6):2099-101
 27. Zhizhen Z, Kazuo K, Zhonghua, Tamotsu N, Dean G, Junhua Z. Triterpenoidal saponins from *Gleditsia sinensis*. *Phytochemistry* 1999; 52(4):715-22.