



Original Article / 원저

참웃 추출물의 MCF-7 인체 유방암 세포에서 증식 억제 효과

김민성, 안원근, 이장천*

부산대학교 한의학전문대학원

Inhibitory effect of *Rhus verniciflua* Stokes extract in MCF-7 human breast cancer cells

Min Sung Kim, Won Gun An, Jang Cheon Lee*

Pusan National University School of Korean Medicine

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to investigate the anti-cancer effects of extract of *Rhus verniciflua* Stokes (RVS) in human breast cancer cell lines.

Methods : In cultured human breast cancer MCF-7 cells, we investigated growth inhibitory effect of RVS. MCF-7 cells were cultured with various concentrations (0, 200, 300, and 400 ug/ml) of RVS at 37°C for 24 h. We performed CCK-8 assay and flow cytometry for detection of Annexin V-PI staining.

Results : As a result, RVS inhibits the cell growth and induction of apoptosis in dose dependent manner in MCF-7 breast cancer cells.

Conclusion : RVS has anti-cancer activities and induced apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells. Therefore we suggest that RVS can use as a novel class of anti-cancer drugs.

Key words : *Rhus verniciflua* Stokes, human breast cancer MCF-7 cells, apoptosis

I. 서론

암은 정상 세포가 비 특이적인 자극에 의해 유전적인 변이가 발생하여 무절제한 증식을 통해 발생하는 질병이다. 유방암은 전 세계적으로 여성들에게 흔히 발생하는 질병으로 발병률과 사망률이 점차 증가하고 있다¹⁾. 2014년에 발표된 보건복지부 중앙암등록본부의 자료에 따르면 2012년 우리나라의 유방암 발생률이 갑상선암, 위암, 대장암, 폐암 다음으로 높았으며 인구 10만 명당 33명의 발생률을 나타내고 있다²⁾. 유방암의 유발 요인은 서구화된 식습관, 비만, 음주 등의 환경적 요인과 유전적인 요인으로 알려져 있으나 그 발생기전은 아직 확실히 밝혀지지 않은 실정이다³⁾. 한의학에서 건칠(Lacca Sinica Exiccata : 옷)은 옷나무과 (Anacardiaceae)에 속한 낙엽교목인 옷나무 (*Rhus verniciflua* Stokes)의 수지이다. 옷은 간, 비장에 작용하여 破血祛瘀, 消積시키는 효능이 있어 부녀의 생리불통과 癥瘕, 瘀血 등의 질환에 사용되며, 또한 심장질환, 혈액 순환 개선, 위장질환, 부인과 질병에 효능이 있다고 알려져 있다⁴⁾. 최근 우리나라는 옷나무를 고부가가치 산업으로 인식하여 산업적 이용을 위해 다양한 방법으로 연구되고 있다. 옷나무 추출물은 항산화^{5,6,7)}, 항염증^{5,6)}, 항돌연변이⁸⁾, α -glucosidase 억제⁹⁾효과 등 다양한 생리 활성이 보고되고 있으며, 유방암, 간암, 림프종에 대해 항암 효과가 있다고 알려져 있다^{9,10)}. 따라서 본 연구는 인체 유방암세포인 MCF-7 세포에 참옷나무 추출물 (RVS)을 농도 별로 처리하였을 때 암세포의 성장이 억제되는 것을 관찰하였으며, apoptosis가 유도되는 유의적인 결과를 확인하였기에 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 준비

본 실험에 사용한 참옷나무 (*Rhus verniciflua* Stokes)는 광명당제약 (Ulsan, Korea)에서 구입하였으며 부산대학교 한의학전문대학원 약물의학부 이장천 교수가 외부형태를 비교 조사하여 확인한 후 사용하였으며,

일부는 보관하였다. 참옷나무 25 g을 증류수에 담근 후 30분간 초음파 처리한 후 환류추출기에서 끓는 시점으로부터 2시간 동안 가열 추출하였다. 추출물을 filter (Advantec MFS, CA, USA) 로 여과한 후 40°C에서 회전농축기 (N-100SWD, Eyela, Japan)를 사용하여 농축하였다. 농축된 추출물은 동결건조기 (Labocnco, Kanas City, MO, USA) 감압 하에 24시간 동안 동결 건조 하여 분말을 시료로 사용하였다.

2. 세포 배양

인체 유방암 세포주인 MCF-7은 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 분양 받았으며, 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Gibco, Grand Island, NY, USA)와 1% antibiotic-antimycotic (Gibco)가 포함된 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM; Gibco) 배지에서 37°C, 5% CO₂조건으로 배양하였다. 배양된 세포는 2일 간격으로 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS; Gibco)로 2회 세척한 후 0.25% trypsin-EDTA (Gibco)로 부착된 세포를 분리시켜 100 mm culture dish (SPL, Seoul, Korea)에 1×10^6 cells/well의 밀도로 계대 배양하였다.

3. Cell viability 측정

참옷나무 추출물의 MCF-7 세포의 증식억제 효과를 확인하기 위해 MCF-7 세포를 1×10^3 cells/well의 밀도로 96 well plate에 넣고 12시간 배양한 후, 참옷나무 추출물을 100, 200, 300, 400 ug/mL의 농도로 처리하였다. 24시간 후 Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Dojindo, Koshu, Japan) 용액을 10ul 첨가하여 2시간 동안 반응시킨 후 microplate reader (Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 470nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 대조군의 흡광도 값과 비교하여 아래 공식을 사용하여 계산하였다. Cell viability(%) = $\frac{\text{흡광도}_{\text{처리군}}}{\text{흡광도}_{\text{대조군}}} \times 100$

4. Annexin V-FITC and PI Staining

MCF-7 세포에 RVS를 처리하였을 때 apoptosis의 유발을 정량적으로 분석하기 위하여 annexin V-FITC

*Corresponding author : Jang Cheon Lee, School of Korean Medicine, Pusan National University, 49, Busandaehak-ro, Mulgeum-eup, Yongsan-si, Gyeongsangnam-do, 50612, Republic of Korea.

Tel : +82-51-510-8459, Fax : +82-51-510-8437, E-mail : jcl7788@pusan.ac.kr

• Received : November 3, 2016 / Accepted : November 17, 2016

와 PI 로 염색한 후 Muse™ cell analyzer (Millipore, CA, USA)를 이용하여 측정 하였다. MCF-7 세포에 RVS $\mu\text{g/mL}$ 를 0, 200, 300, 400 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 24시간 처리하였다. 세포를 DPBS로 3회 세척 후 trypsin-EDTA를 이용하여 모은 다음, 1×10^6 cells/mL의 농도로 부유시켰다. 100 μL 의 부유시킨 세포를 E-tube에 옮긴 후 Muse annexin V and dead cell Reagent (Millipore)를 100 μL 첨가하여 20분 동안 암실에서 반응하였다. 이 후 Muse™ cell analyzer를 이용하여 viable, early apoptotic, late apoptotic 및 necrotic 세포의 수를 분석하였다.

5. 통계 분석

모든 실험 결과에 대한 분석은 통계 프로그램인 SPSS 23 (SPSS, IL, USA)의 Student's *t*-test로 검정하였으며, $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의한 차이가 있다고 판정하였다. 실험결과는 mean \pm S.D. 또는 빈도 (%)로 나타내었다.

III. 결과

1. 참옷 추출물에 의한 MCF-7 세포 증식 억제 효과

RVS가 MCF-7 세포의 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 RVS를 100, 200, 300, 400 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 24시간 처리하였다, 그 결과 RVS의 농도가 증가함에 따라 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 $94.83 \pm 2.96\%$, 200

$\mu\text{g/mL}$ 에서 $76.92 \pm 4.17\%$, 300 $\mu\text{g/mL}$ 에서 $63.93 \pm 3.87\%$, 400 $\mu\text{g/mL}$ 에서 $53.83 \pm 6.12\%$ 로 세포 생존율이 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 특히 200 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 처리군에서 농도의존적으로 통계적 유의한 세포사멸 효과를 보였다.

2. 참옷 추출물에 의한 MCF-7 세포의 apoptosis 유도 효과

MCF-7 세포에서 RVS에 의한 세포사멸 효과가 apoptosis에 의해 유도된 것인지를 확인하기 위해 유의적인 차이를 보인 200, 300, 400 $\mu\text{g/mL}$ 의 처리군을 대상으로 Annexin V-propidium iodide staining을 이용하여 apoptosis가 일어난 세포비율을 측정하였다. 실험 결과, RVS를 24시간 처리하였을 때 apoptosis가 유도되는 것을 확인 하였으며 농도에 따라 apoptosis가 더욱 효과적으로 나타남을 확인하였다(Fig. 2A, B). Early apoptotic cell, late apoptotic cell (%) 세포의 구성 비율이 RVS 300 $\mu\text{g/mL}$ 처리군에서 10.58 ± 0.62 , $15.45 \pm 0.55\%$ 로 대조군과 비교하여 각각 5%와 10%의 유의적인 차이를 보였다. 또한, RVS 400 $\mu\text{g/mL}$ 처리군에서는 14.7 ± 0.58 , $20.25 \pm 1.88\%$ 로 대조군과 비교하여 각각 10%와 15%의 총 25%의 세포에서 apoptosis가 유도됨을 확인 하였다. 이러한 결과를 바탕으로 RVS를 처리한 MCF-7 세포는 농도의존적으로 apoptosis가 유도되는 것을 알 수 있다.

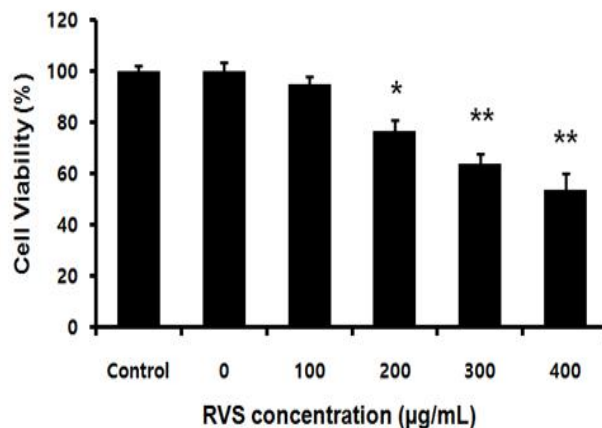


Fig. 1. The effect of *Rhus verniciflua* Stokes extract on cell viability in MCF-7 human breast cancer cells. MCF-7 cells were treated with *Rhus verniciflua* Stokes (RVS) as indicated dose ($\mu\text{g/mL}$) at 37°C . After 24 h, cell viability was measured by Cell Counting Kit-8 assay. The values are indicate mean \pm S.D. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$

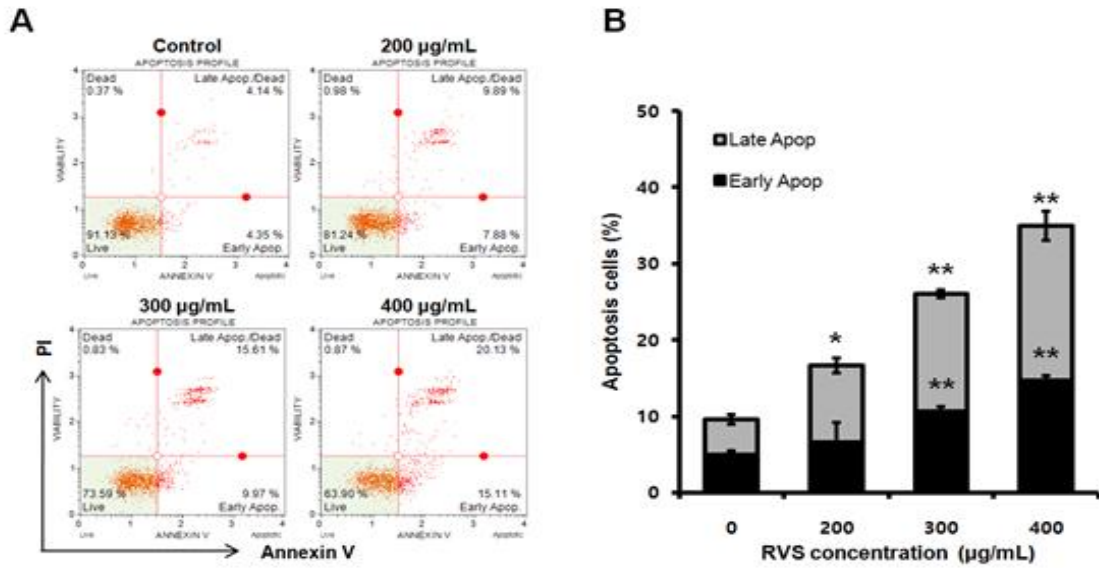


Fig. 2. The effect of *Rhus verniciflua* Stokes extract on apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. MCF-7 cells were treated with *Rhus verniciflua* Stokes (RVS) as indicated dose (µg/mL) at 37°C. (A) After 24 h, the apoptotic and necrotic cell death was evaluated by Annexin V-fluorescein isothiocyanate and propidiumiodide (PI). (B) Percentage of early apoptotic and late apoptotic cells by various concentrations of RVS. The values are indicate mean±S.D. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$

IV. 고찰 및 결론

최근 율나무 추출물인 건칠에 대한 연구가 많이 시도되고 있으며, 특히 항암 활성에 대한 연구가 활발히 시행되고 있다. 율나무의 수피는 清代 조학민의 陸川本草에서 辛溫하며 약간의 독이 있고 接骨의 효능이 있어 찢어 술에 볶아서 환부에 붙이는 방법으로 사용한다고 기재되어 있다. 또한, 민간에서는 닭이나 오리에 넣어 식용으로 사용하고 있다. 건칠산(乾漆散) 전탕액은 MCF-7, HeLa, SK-OV3 등의 암 세포주를 대상으로 세포 생존을 억제한다는 보고가 있다⁹⁾. AGS 위암 세포주에 건칠 추출물을 처리 하였을 때, 세포사멸과 세포주기 억제현상을 일으킨다¹¹⁾. 이러한 건칠의 세포주기 억제현상은 p27Kip1 단백질이 Cyclin E-CDK2 복합체 형성을 억제시킴으로써 G1 cell cycle arrest 유발한다는 것으로 알려져 있다. 율나무 추출물 또한 건칠과 유사한 생리 활성 효과를 보인다^{12,13)}. 알려진 성분으로 알려진 urushiol을 제거한 율나무 추출물이 난소암 세포주를 대상으로 세포주기 억제 현상과 세포사멸 현상을 유발하며¹²⁾, 항균 및 항산

화 효과에 대한 연구가 보고되고 있다¹⁴⁾. 또한, 율나무 추출물이 MCF-7 세포주에서 reactive oxygen species (ROS) 를 발생시켜 AMP-activated protein kinase가 인산화시키는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾. 뿐만 아니라, 율나무 추출물을 MCF-7 세포에 처리하였을 때, 종양억제 유전자 p53의 발현을 증가시켰으며 p53 의존적으로 p21(Waf1/Cip1)의 발현을 증가시키는 것으로 보고 되었다¹⁵⁾. 하지만 율의 생리 활성 효능에 대해 검토된 연구 내용을 보면 율나무의 부위와 전처리 방법 그리고 추출 방법 등에 따라 그 활성이 차이가 있는 것을 알 수 있다^{16,17)}. 따라서 율나무를 추출 과정을 최소한으로 줄이면서 보다 효과적인 방법을 선택하여 율나무 추출물의 유방암세포에 대한 항암효과를 확인하였다.

유방암은 방사선 치료, 항암제 투여, 외과적 절제술 등을 이용하여 환자의 생존율을 향상시키고 있지만, 기존 항암제는 부작용이 심하여 지속적인 치료가 어렵기 때문에 부작용이 적은 새로운 항암제 및 항암보조제의 개발이 필요하다^{18,19)}.

본 연구는 MCF-7 세포에 RVS를 처리 했을 때 암 세포의 세포사멸과 apoptosis 유도를 확인하고자 실험



을 수행하였다. RVS는 MCF-7 세포의 증식에 농도 의존적으로 세포사멸을 유도하였다(Fig. 1). 또한 annexin V와 PI 염색을 이용한 실험에 있어서, 농도 의존적으로 early/late apoptosis가 진행되는 세포 비율이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 2). 이는 참웃 나무 추출물이 MCF-7 세포주에서 p53 의존적 세포주기 억제 효과뿐만 아니라 apoptosis에 의한 세포사멸이 일어난다는 것을 의미한다. 결론적으로 참웃나무 추출물은 유방암 세포 MCF-7 세포 증식을 억제하여 apoptosis를 유도하는 기전이 확인되어 앞으로 천연물 유래 부작용 없는 암 예방 및 항암보조제로서의 가능성을 제시하고 있다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 기본연구 지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

References

- Farber E, Rubin H. Cellular adaptation in the origin and development of cancer. *Cancer Res.* 1991;51(11):2751-61.
- Jung KW, Won YJ, Kong HJ, Oh CM, Cho H, Lee DH, Lee KH. Cancer Statistics in Korea: Incidence, Mortality, Survival, and Prevalence in 2012. *Cancer Res Treat.* 2015;47(2):127-41.
- Hatcher H, Planalp R, Cho J, Torti FM, Torti SV. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cell and Mol Life Sci* 2008;65(11):1631-52.
- Namba T. Coloured illustrations of Wakan-Yaku. Hoikusha Publishing Co.1980: p215.
- Jeon WK, Lee JH, Kim HK, Lee AY, Lee SO, Kim YS, Ryu SY, Kim SY, Lee YJ, Ko BS. Anti-platelet effects of bioactive compounds isolated from the bark of *Rhus verniciflua* Stokes. *J Ethnopharmacol.* 2006;106(1):62-9.
- Kim J, Kim KL. Study on the Characteristics of Fermented *Rhus verniciflua* Stem Bark (FRVSB) as a Cosmetic Raw Material. 2015;13(5):559-67.
- Son YO, Lee KY, Lee JC, Jang HS, Kim JG, Jeon YM, Jang YS. Selective antiproliferative and apoptotic effects of flavonoids purified from *Rhus verniciflua* Stokes on normal versus transformed hepatic cell lines. *Toxicol Lett.* 2005;155(1):115-25.
- Park, KY, Jung GO, Lee KT, Choi JW, Choi MY, Kim GT, Park HJ. Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *vernificlua*. *J. Ethnopharmacol.* 2004;90(1): 73-9.
- Lee JS, Yoo DY. Effect of water extract of *Kun Chil San* on human female tumor cells. 1997;10(2):201-21
- Hong SH, Han MH, Choi YH, Park SE. Induction of p53-Dependent G1 Cell Cycle Arrest by *Rhus verniciflua*. Stokes Extract in Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells. *J.Int. Korea Med.* 2015;36(1):13-21
- An JY, Ko SG, Ko H. Effects of *Rhus verniciflua* Stokes Extract on Cell Viability, Cell Cycle Progression and Apoptosis of AGS Cell *J Physiol & Pathol Korean Med.* 2007;20(3):701-9.
- Choi HS, Kim MK, Choi YK, Shin YC, Cho SG, Ko SG. *Rhus verniciflua* Stokes (RVS) and butein induce apoptosis of paclitaxel-resistant SKOV-3/PAX ovarian cancer cells through inhibition of AKT phosphorylation. *BMC Complement Altern Med.* 2016;16:122.
- Lee JC, Lee KY, Kim J, Na CS, Jung NC, Chung GH, Jang YS. Extract from *Rhus verniciflua* Stokes is capable of inhibiting the growth of human lymphoma cells. *Food Chem Toxicol.* 2004;42(9):1383-88.
- Lee SH, Jeong HS, Kang TS. Antimicrobial and antioxidative activities of hot water extracts from heat-air dried *Rhus verniciflua* stokes. *Food Eng. Prog.* 2013;17(1):1-7.
- Lee JO, Moon JW, Lee SK, Kim SM, Kim N, Ko SG, Kim HS, Park SH. *Rhus verniciflua* extract modulates survival of MCF-7 breast cancer cells through the modulation of AMPK-pathway. *Biol Pharm Bull.* 2014;37(5):794-801.
- Park HS. Antioxidant and nitrite scavenging ac-

- tivities of solvent extracts from *Rhus verniciflua* Stokes. J. East Asian Soc. Dietary Life. 2011;21(5):677-682.
17. Kim JS, Kwon YS, Chun WJ, Kim TY, Sun J, Yu CY, Kim MJ. *Rhus verniciflua* Stokes flavonoid extracts have antioxidant, antimicrobial and α -glucosidase inhibitory effect. Food Chem. 2010;120(2):539-543.
18. Huang Z. Bcl-2 family proteins as targets for anticancer drug design. Oncogene. 2000;19(56):6627-6631.
19. Dorssers LC, Van der Flier S, Brinkman A, van Agthoven T, Veldscholte J, Berns EM, Klijn JG, Beex LV, Foekens JA. Tamoxifen resistance in breast cancer: elucidating mechanisms. Drugs. 2001;61(12):1721-1733.