

白花蛇舌草 메탄올 抽出物の 抗腫瘍 效果 및 抗癌 機轉에 關한 研究

魯勳政* · 文 九* · 文錫哉* · 元秦喜* · 文永昊* · 朴來佶**

Study of *Hedyotis Diffusa* Methanol Extract on Anti-tumoral Effect and Mechanism

Hoon-Jeong No*, Gu Moon*, Seok-Jae Moon*, Jin-Hee Won*, Young-Ho Moon*, Rae-Gil Park**

* Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

** Dept. of Microbiology, College of Medicine, Wonkwang University

Objectives: This experimental study was carried out to evaluate the effects of aqueous and methanol extracts of *Hedyotis diffusa* which has long been used for cancer treatment in oriental medicines on the induction of apoptotic cell death in human lymphoid leukemia cell line, HL-60.

Methods: Cells were treated with various concentrations (200 to 0.4 μ g) and periods (6 to 30hr) of H₂O and methanol extracts of *Hedyotis diffusa*. Then, cells were tested for viability by MTT assay. Cells were treated with 200 μ g/ml of methanol extract for various periods. Genomic DNA was isolated, separated on 1.5% agarose gels, stained with ethidium bromide and visualized under UV light. Cells were treated with 200 μ g/ml of each extract for 16 hr. Then, cells were stained with Hoechst dye 33342 and observed by fluorescence microscopy. Cells were treated with various doses of each extract for 12 hr and 100 μ g/ml of methanol extract for various periods. Lysate from the cells used to measure the activity of Caspase-1 and -3 proteases by using fluorogenic peptide substrates including acetyl-YVAD- AMC and acetyl-DEVD-AMC, respectively. Cells were treated with 200 μ g/ml of each extract for various periods. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-JNK1 antibodies. The immune complex was reacted with 32P-ATP and c-Jun as a substrate. The phosphotransferase activity of JNK1 was measured by using PhosphoImage analyzer (Fuji Co., Japan). Nuclear extracts were isolated and incubated with

* 원광대학교 한의과대학 소화기내과학교실

** 원광대학교 의과대학 미생물학교실

oligonucleotide probe of NF- κ B. Transcriptional activation of NF- κ B was measured by using EMSA and visualized by PhosphorImage analyzer (Fuji Co, Japan). Cell lysates were prepared and analyzed by Western blotting with anti-Bcl2 antibodies and anti-Bax antibodies. Cells were pretreated with various doses of methanol extract for 2 hr. Then, the extract was removed by centrifugation. Cells were resuspended with RPMI-1640 media containing 0.3% agarose, 10% FBS, overlaid onto bottom layer agarose and incubated at CO₂ incubator for 6 days. The number of colony was counted under light microscopy ($\times 100$).

Results: The death of HL-60 cells was markedly induced by the addition of methanol extract of *Hedyotis diffusa* in a dose and time-dependent manners. The apoptotic characteristic ladder pattern of DNA strand break was observed in death of HL-60 cells. In addition, it was shown nucleus chromatin condensation and fragmentation under Hoechst staining. Therefore, *Hedyotis diffusa* extract-induced death of HL-60 cells is mediated by apoptotic signaling processes.

The activity of Caspase 3-like proteases remained in a basal level in HL-60 cells treated with aqueous extract of *Hedyotis diffusa*. However, it was markedly increased in HL-60 cells treated with methanol extract of *Hedyotis diffusa*. In addition, the phosphotransferase activity of JNK1 was increased in HL-60 cells treated with methanol extract of *Hedyotis diffusa*. Furthermore, the activation of transcriptional activator, NF- κ B was markedly induced by methanol extract of *Hedyotis diffusa*.

Anti-apoptotic Bcl2 was cleaved into 23Kda fragment by treatment of methanol extract of *Hedyotis diffusa*. However, expression of proapoptotic Bax protein was increased by treatment of methanol extract of *Hedyotis diffusa* in a time-dependent manner. Furthermore, methanol extract markedly inhibited the colony forming efficiency of HL-60 cells in semisolid agar culture.

Conclusions: Above results suggest that methanol extract of *Hedyotis diffusa* induces the apoptotic death of human leukemic HL-60 cells via activations of Caspase-3 proteases, JNK1, transcriptional activator NF- κ B. In addition, our results also suggest that methanol extract of *Hedyotis diffusa* reduces the malignant potential of HL-60 cells via down regulation of colony forming efficiency through cleavage of Bcl2 as well as induction of Bax.

Key words: *hedyotis diffusa*, Apoptosis, HL-60

I. 緒 論

白花蛇舌草는 꼭두서니과(茜草科; Rubiaceae)에 속한 1년생 초본인 백운풀(쌍냥시 돌풀; *Hedyotis diffusa* WILLD. (= *Oldendia diffusa*(WILLD.) ROXB.)의 줄grass로서¹⁾, 성이 寒,

平, 無毒하며 味는 甘, 苦하고 效能은 清熱解毒, 利濕, 通淋, 消癰 등²⁾이며, 최근에는 消化器腫瘍, 子宮癌 및 各種 癌症을 치료하는 抗癌劑로도 응용되고 있으며³⁾, 金⁴⁾이 白花蛇舌草의 主要抗癌物質인 ursolic acid를 이용하여 抗癌效果를. 宋 等⁵⁾은 大食細胞로 하여금 NO(산화질

소)의 생성을 촉진하여 P 815 murine mastocytoma 암주의 성장을 억제했다고 보고하였다.

항암제의 효율성은 세포고사 유도능력과 밀접한 관련이 있다고 알려져 있는데, 세포고사(apoptosis)는 다세포 생명체에서 정상적인 기관의 발달과 조직의 항상성 유지에 필수적인 생리현상으로⁶⁾,壞死(necrosis)와는 다른 遺傳子 活性에 의하여 調節받는 생리過程이다. 一般적으로 細胞가 심각한 傷害를 입었을 경우에 나타나는 壞死가 細胞膜의 破壞, 細胞의 膨脹(swelling), 溶解(lysis)를 동반하는 것과는 달리, 세포고사 현상은 빠른 細胞脫水現狀에 의한 細胞의 收縮, 細胞膜의 氣泡化 現狀(blebbing), 細胞質內의 칼슘(calcium) 濃度の 增加, chromatin의 凝縮, endonuclease의 活性化에 의한 DNA의 사다리 모양의 分節(ladder pattern DNA fragmentation, 200 base pairs) 形成, transglutaminase의 活性化 및 核의 切斷과 아포토틱 소체(apoptotic body)의 形成을 同伴한다⁷⁾.

세포고사의 誘導 機轉은 腫瘍致死因子(tumor necrosis factor)에 의한 細胞死滅 研究에서 信號傳達機轉이 밝혀지기 시작하였으며⁸⁾ 最近에는 Caspase계 cysteine proteases(Caspase family cysteine proteases)나 MAP kinase(mitogen activated protein kinase)의 重要性이 제기되고 있고⁹⁾, 세포고사에 관한 많은 분자생물학적 지식이 축적되어지면서, 세포고사의 기전이 AP-1(activator protein-1), NF- κ B와 같은 초기 반응 유전자(early immediate gene)와 많은 연관이 있음이 알려졌으며, 이러한 인자들의 활성화 여부는 세포고사 연구에 중요한 단서가 될 수 있다.

따라서 저자는 白花蛇舌草의 抽出物이 사람의 백혈병에서 유래된 HL-60 癌細胞에 어떠한 영향을 미치는지를 究明하기 위하여 세포고사

의 기전, 특히 Caspase cysteine protease의 활성화도와 c-Jun N-terminal kinase(JNK) 및 전사활성인자(transcriptional activator)인 AP-1과 NF- κ B의 활성화변화, p53, Bcl₂ 및 Bax 등의 발현 변화 등을 관찰한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

1) 藥材

이 실험에 사용한 白花蛇舌草(*Hedyotis diffusa* WILLD.)는 원광대학교 전주한방병원에서 購入한 후 精選하여 사용하였다.

2) 檢液調製

實驗에 使用된 藥材는 먼저 두가지 용매를 사용한 추출방법을 사용하여 본 실험에 이용하였다. 먼저 물 抽出物(H₂O extract)은 陰乾된 白花蛇舌草 100g을 물 1 l 와 함께 冷却器를 부착한 환저플라스크에서 3시간 끓인 다음 거즈로 濾過하고 3,200rpm으로 20분간 遠心分離 후 濃縮器(Rotary evaporater)로 濃縮한 다음 -70℃ (Deep Freezer)에서 12시간 이상 凍結시키고 Freeze Dryer로 凍結乾燥 시킨 것을 試料로 使用하였다. 한편, 메탄을 抽出物은 陰乾된 白花蛇舌草 100g을 細切한 후 메탄을 1 l 와 함께 플라스크에 넣어 하루동안 우려나오도록 방치한 다음 거즈로 濾過하고 3,200rpm으로 20분간 遠心分離 후 濃縮器로 濃縮한 다음 -70℃에서 12시간 이상 凍結시키고 Freeze Dryer로 凍結乾燥 시킨 것을 試料로 使用하였다.

2. 方法

1) 백혈병유래 HL-60 癌細胞柱 배양

사람 백혈병으로부터 유래된 癌細胞柱인 HL-60세포는 CO₂ 세포배양기에서(37℃, 5% CO₂) 10% fetal bovine serum(Hyclones)이 포함된 RPMI- 1640(Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD) 배지에서 배양하였다. 약 48시간 주기로 RPMI-1640 배양액을 교체하여 주며 log phase 에 있는 세포에 백화사설초 추출물을 처리한 뒤 세포의 세포고사 현상과 이에 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

2) 細胞 生存率 측정

세포의 생존율은 MTT assay 방법을 이용하였다¹⁰⁾. 簡記하면 세포배양판(24-well plate)에 세포를 1×10⁵씩 1ml의 배양액에 넣어 분주한 후, 실험에 필요한 각 조건의 白花蛇舌草 추출물 등을 처리한 다음, MTT를 최종농도가 100 μg/ml이 되도록 넣어주었다. 생존율의 판정은 MTT 처리 후 4시간 후에 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 불용성의 formazan을 100 μl 의 10% SDS가 포함된 0.01 N HCl 용액으로 24 시간 동안 37℃ 5% CO₂ 세포배양기에서 방치하여 녹인다음, ELISA reader로 540nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

3) Caspase계 cysteine protease 활성도 측정

HL-60 세포(2×10⁶cells)를 4℃에서 15분 동안 lysing buffer(1% TritonX-100, 0.32 M sucrose, 5mM EDTA, 1mM PMSF, 1μg/ml aprotinin, 1μg/ml leupeptin, 2mM dithiothreitol(DTT), 10mM Tris/HCl, pH 8.0)에서 용해하고 14,000rpm으로 15분 동안 원심분리시켰다. 원심분리하여 얻은 상층액은 BCA(Bicinchoninic acid, Sigma Co. St.

Louis, MO)법으로 정량하여 assay buffer (100mM Hepes, 10% sucrose, 0.1% Chaps, pH 7.5, 1mM PMSF, 1μg/ml aprotinin, 1μg/ml leupeptin, 2mM DTT)에 희석되어 형광표지된 기질(YVAD-AMC 혹은 DEVD-AMC)과 37℃에서 30분간 반응시킨 후 fluorometer(Molecular Devices Co, Sunnyvale, CA)로 측정하였다. 이때의 파장은 380nm(excitation wavelength)와 460nm(emission wavelength)를 사용하였다. 기질은 Caspase-3 protease의 경우 fluorogenic substrate인 7-amino-4-coumarin(AMC)-DEVD (Calbiochem Co, San Diego, CA) 50μM을, Caspase-1 protease는 7-amino-4-coumarin(AMC)-YVAD(Calbiochem, San Diego, CA) 50μM을 사용하여 이들의 proteolytic cleavage를 측정하여 Caspase 활성을 결정하였다.

4) DNA 추출 및 전기영동

DNA 분절현상을 알아보기 위해 genomic DNA 추출은 Wizard Genomic DNA purification kit(Promega Co, Medison, WI)를 이용하여 추출하였다. 먼저 한약제가 처리된 세포를 수확하여 nuclear lysis buffer를 첨가하여 세포를 파괴한 후 RNase를 37℃에서 5분 처리하여 RNA를 제거한 후 단백질 침전용 완충용액으로 단백질을 제거하고 isopropanol 침전에 의하여 응축된 DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 진공건조기로 건조하였다. 여기에 TE 완충용액(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, pH 8.0)을 가하여 DNA pellet을 용해한 후 260nm와 280nm의 Spectrophotometer(Beckman, Du-7 Model, Palo Alto, CA)하에서 OD값을 측정하여 DNA를 정량하였다. DNA 5μg을 1.8% agarose gel에서 전기영동(50V, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV light 아래에서 DNA 분절을 관찰하였다.

5) In vitro immunocomplex kinase assay

배양된 HL-60 세포(2×10^6 세포)에 $200 \mu\text{g/ml}$ 농도의 白花蛇舌草 메탄을 抽出物을 처리한 후에 포집하여 cold PBS로 2회 세척하였다. 이를 1ml의 추출용해완충액 EB(Extraction Buffer)를 가하여 30분동안 파쇄하고자 얼음상에서 용해시킨 후, 30분, 12,000rpm, 4°C에서 원심분리하여 상층액을 다른 튜브에 모았다. 여기에 JNK1에 대한 항체(Anti-JNK1(C17), Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, U.S.A)를 $1 \mu\text{g}$ 넣고 2시간 반응시켰다. 미리 EB buffer로 씻어준 10%(v/v)의 pansorbin(Calbiochem, CA, U.S.A) 용액 $100 \mu\text{l}$ 씩을 세포부유액에 넣고 1시간 얼음 위에서 반응시켜 준 후 4,000rpm에서 5분동안 원심분리하여 상층액은 버리고 침전물을 다시 동일 EB buffer로 1회, PAN buffer(10mM Pipes, pH 7.4, 0.1M NaCl, 0.1% aprotinin)로 2회 더 세척한 후 상층액을 버리고 면역반응 침전체만을 얻었다. 카이네이즈 효소활성측정은 이 침전체에 $1 \mu\text{g}$ GST-c-Jun과 $2 \mu\text{Ci}$ 의 γ - ^{32}P ATP를 가하여 최종 $20 \mu\text{l}$ 의 kinase reaction buffer(Tris-HCl pH 7.5, 20mM, MgCl_2 , 20mM, DTT 2mM, cold ATP 20mM)를 넣고 진탕에 의해 재현탁시킨 후 30°C에서 20분 반응을 진행시켰다. 여기에 $20 \mu\text{l}$ 의 SDS-PAGE sample buffer를 넣고 98°C에서 5분 간 끓인 후 12.5%의 SDS-PAGE를 행하였다. 이후 이 gel을 건조시켜 autoradiography에 의해 JNK1 활성정도를 판단하였다. JNK1의 기질인 GST-c-Jun 단백질은 full sequence c-Jun cDNA의 아미노산 서열 1-79까지만을 pGEX 2T vector에 삽입 후에 E. coli BL-21(DE3)에서 발현시켰다. E. coli에서 발현된 GST-c-Jun 단백질은 glutathione-conjugated Sepharose beads (Pharmacia Co, Sweden)을 이용하여 순수분리,

정량하여 사용하였다.

6) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

유전자 전사인자의 활성을 측정기 위해 먼저 약제가 처리된 HL-60 세포에서 핵抽出物은 Jeong 등의 방법¹¹⁾으로 모았다. NF- κ B의 활성 측정은 NF- κ B의 consensus binding site를 가진 oligonucleotide probe¹²⁾는 5' -ccg gCC GGT TAA CAG AGG GGG CTT TCC GAG; 5' -ccg gCT CGG AAA GCC CCC TCT GTT AAC CGG 를 합성하여 10mM Tris-HCl 용액(pH 8.0, 50mM NaCl, 10 MgCl_2 , 1mM DTT 함유)에 희석한 후 85°C에서 5분 annealing한 후 100ng을 Rediprime kit(Amersham, England)을 이용하여 32P를 부착시켰다. 방사선 동위원소가 부착된 probe는 5-10 μg 의 핵단백질과 실온에서 30분 반응시킨 후 냉온실에서 4% polyacrylamide gel에 걸어 0.5 \times TBE buffer로 전기영동하였다. 이 gel은 건조 후 autoradiography 방법으로 X-ray 필름에 현상하여 NF- κ B 활성을 측정하였다.

AP-1의 활성도 측정은 Santa Cruz사로부터 구입한 probe를 이용하여 유사한 방법으로 방사선 동위원소 labeling 후 사용하였다.

7) Hoechst staining

약제가 처리된 세포들을 4% formaldehyde 용액에서 고정시킨 후 PBS로 씻어주고 Hoechst 33342(Sigma Biosciences, St. Louis, Missouri, USA) 염색약을 PBS에 $10 \mu\text{M}$ 이 되게 희석하여 10분간 염색한 후 다시 PBS에서 씻어서 형광 현미경으로 관찰하였다.

8) HL-60 암세포 고사시 Bcl2 및 Bax 단백질의 발현 변화 측정-Western blotting

배양된 HL-60 세포에 白花蛇舌草 추출물을 처리 후 세포를 포집하여 冷 Hank's balanced salt 용액(HBSS)으로 2회 세척하였다. 얻은 세포는 RIPA 용액(50mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin)으로 얼음에서 용해하였다. 용해 세포 부유액에 2 \times sample buffer와 섞어 100 $^{\circ}$ C에서 3분 끓인 후, 10% sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 4 $^{\circ}$ C, 30V에서 16시간 transfer한 후 blocking buffer(10% skim milk)로 상온에서 2시간 반응시켰다. Bcl2나 Bax에 대한 항체를 Tris-buffered saline에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응시켰다. 2차 항체인 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxydase(TBS로 1:1,000으로 희석, Amersham, England)와 상온에서 1시간 반응시킨 후 ECL kit (Enhanced chemiluminescence kit: Amersham, England)를 사용하여 필름에 노출시켰다.

9) 종양세포의 콜로니 형성억제실험-Colony forming assay

白花蛇舌草 抽出物이 종양세포에 미치는 transforming efficiency를 측정하기 위해 Hamburger 등의 방법을 변형한 semisolid double layer agarose법을 이용하여 colony forming assay를 시행하였다. 簡記하면 0.5% agarose, 10% FBS를 함유한 RPMI-1640 배지 1ml씩을 35 \times 10mm plastic petri dish에 분주하여 응고될 때까지 실온에 방치하여 bottom layer agar층을

만들었다. 한편 시험관내에 배양시킨 종양세포를 1 \times 10⁵cells/ml로 넣고 白花蛇舌草 抽出物을 최종적으로 500, 250, 125, 62.5 및 31.25mg/ml이 되도록 처리 후 배양기에서 2시간 배양하였다. 이후 원심분리하여 상층액은 버리고 세포를 잘 부유시킨 후 0.3% agarose, 10% FBS를 함유한 RPMI-1640배지를 2 \times 10⁴cells/ml 되도록 조정하여 넣어준 후 이미 응고된 0.5% bottom layer agar 위에 중층하였다. 그후 CO₂ 배양기에서 50개의 세포로 구성되는 colony의 형성여부를 6일간 관찰하면서 6일째에 colony수를 판정하였다. 각각의 白花蛇舌草 추출물 처리 농도하에서의 결과판정은 무처리 대조군(media)의 colony수를 100%로 약제에 반응시킨 종양세포주의 colony수를 산출하였다. 각군의 colony수는 군당 4개의 petridish의 colony수의 평균치를 이용하여 평가하였다.

III. 實驗成績

1. 白血病由來 癌細胞 HL-60의 細胞生存率에 미치는 영향

白花蛇舌草 물 抽出物과 메탄올 抽出物이 백혈병환자로부터 유래된 HL-60 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 배양액에 첨가되는 우태아혈청(FBS)의 양을 5%와 10%로 한 후 抽出物의 농도를 변화시키면서 세포의 생존율을 MTT assay 방법으로 측정하였다. 배양액에 10%의 우태아 혈청이 첨가된 경우 물을 抽出物의 경우는 생존률에 변화가 없었으며, 메탄올 抽出物의 경우에는 200 μ g/ml 농도하에서만 약간의 생존률 감소를 야기시켰다(Fig. 1A). 그러나 5%의 우태아 혈청하에서는 메탄올 抽出物에만 농도의존적으로 HL-60세포의

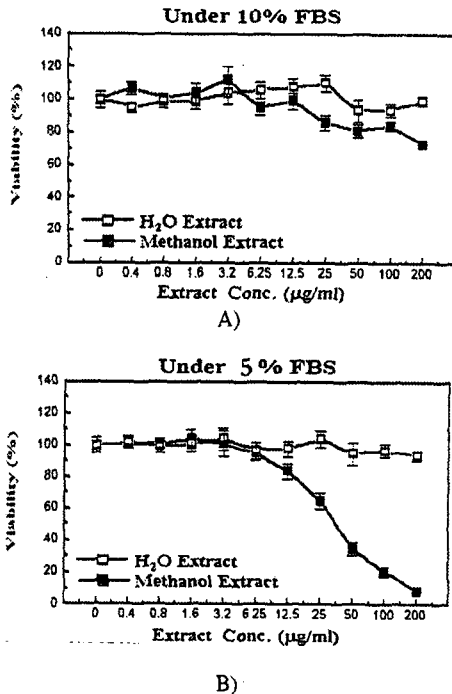


Fig. 1. Effects of *Hedyotis diffusa* extracts on the viability of HL-60 cells in a dose-dependent manner. Cells were treated with various concentrations (200 to 0.4 µg) of H₂O and methanol extracts of *Hedyotis diffusa* in the presence of 10% (A) or 5% FBS (B) for 48 hours. Cells were tested for viability by MTT assay. The data represented mean ± S. D. of triplicates.

생존율을 감소시켰다. 특히 100 µg/ml의 메탄올 추출물 처리시 대략 20% 정도의 생존율을 나타내었으며, 물 추출물은 200 µg/ml의 농도에서도 HL-60 세포의 생존율에는 유의한 변화를 일으키지 못하였다(Fig. 1B).

또한 200 µg/ml 농도하에서 각 추출물에 의한 시간별 생존율의 변화를 측정할 때, 시간에 따른 HL-60 세포의 생존율은 물 추출물 처리시에는 24시간 이후에도 별다른 변화가 보이지 않았으나, 메탄올 추출물 처리시에는 6시간 이후부터 현저한 저하가 시작되어 30시간 이후에는

20% 미만의 HL-60 세포만이 생존할 수 있었다 (Fig. 2).

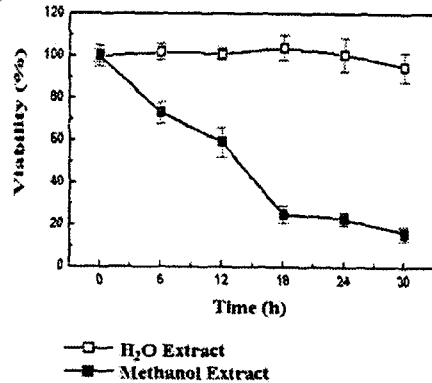


Fig. 2. Effects of *Hedyotis diffusa* extracts on the viability of HL-60 cells in a time-dependent manner. Cells were treated with various periods (6 to 30hr) of H₂O and methanol extracts of *Hedyotis diffusa*. Then, cells were tested for viability by MTT assay. The data represented mean ± S. D. of triplicates.

2. 白血病由來 HL-60 癌細胞 chromatin의 condensation과 fragmentation에 미치는 영향

白花蛇舌草 메탄올 추출물에 의한 HL-60 세포의 죽음 기전이 세포고사인지 아니면 괴사성 과정에 의하여 이루어졌는지를 확인하기 위해, agarose electrophoresis법을 이용한 세포고사 현상의 특징인 ladder형 DNA 분절 및 Hoechst staining에 의한 nucleus의 염색을 통하여 chromatin의 condensation과 fragmentation을 확인하였다(Fig.3 & 4). Agarose electrophoresis에 의한 DNA분절 현상을 관찰키 위해 메탄올 추출물을 200 µg/ml 농도에서 HL-60 세포주를 다양한 시간 처리한 후 DNA를 추출하여 1.5% agarose gel에서 전기영동하였다. 이후 ethidium bromide 염색을 통하여 HL-60 세포 DNA를 조

사한 결과, 물 抽出物을 24시간 처리한 비교군에서는 ladder형의 DNA 분절이 관찰되지 않았으나, 메탄올 抽出物 처리군에서는 6시간 이후부터 DNA ladder pattern 현상을 관찰할 수 있었으며(Fig. 3), 또한 Hoechst staining에 의한 세포의 형광현미경하에서의 관찰에서도 메탄올 抽出物 처리시에만 세포고사를 확인할 수 있는 chromatin의 분절이 관찰되었다(Fig. 4A, 4B & 4C).

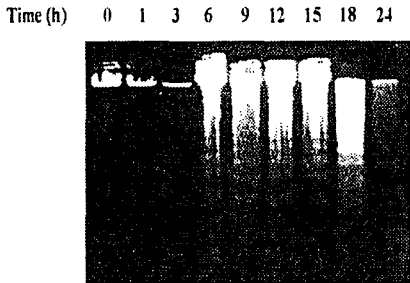
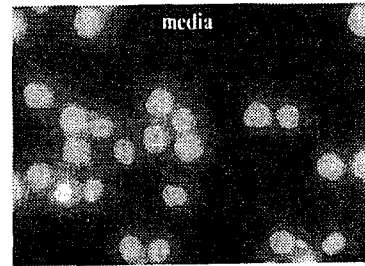


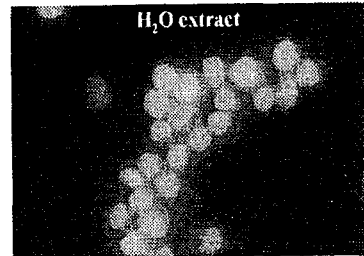
Fig. 3. Methanol extract of *Hedyotis diffusa* induced ladder pattern of DNA fragmentation in HL-60 cells. Cells were treated with $200\mu\text{g/ml}$ of methanol extract for various periods. Genomic DNA was isolated, separated on 1.5% agarose gels, stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

3. Caspase 활성화에 미치는 영향

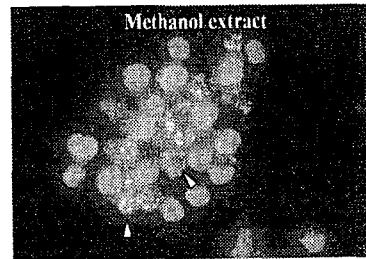
위에서 관찰된 白花蛇舌草 메탄올 抽出物에 의한 HL-60 세포의 세포고사가 Caspase의 활성화와 관계가 있는지를 확인하기 위하여, Caspase계 cysteine proteases 중에서 Caspase-1 및 Caspase-3 cysteine proteases의 활성화 변화 정도를 다양한 농도의 抽出物을 15시간 처리 후에 활성도를 조사하였다(Fig. 5A와 Fig. 5B). 먼저 白花蛇舌草 抽出物을 $10\text{-}200\mu\text{g/ml}$ 등의 다양한 농도로 처리 후 Caspase-1 protease의 활성화 변화를 조사하였다(Fig. 5A). Caspase-1 활성화는 세



A)



B)



C)

Fig. 4. Methanol extract of *Hedyotis diffusa* induced chromatin fragmentation in HL-60 cells. Cells were treated with $200\mu\text{g/ml}$ of each extract for 16 hr. Then, cells were stained with Hoechst dye 33342 and observed by fluorescence microscopy. Media control and H₂O extract-treated cells were demonstrated as normal nuclear morphology with diffused chromatin structure. A) media control B) treated with H₂O extract C) treated with methanol extract.

포의 생존율에 변화를 주지 않는 물 抽出物 처리 시에는 별다른 활성화변화를 보이지 않았으나, 메탄올 抽出物 처리시에는 시간에 따른

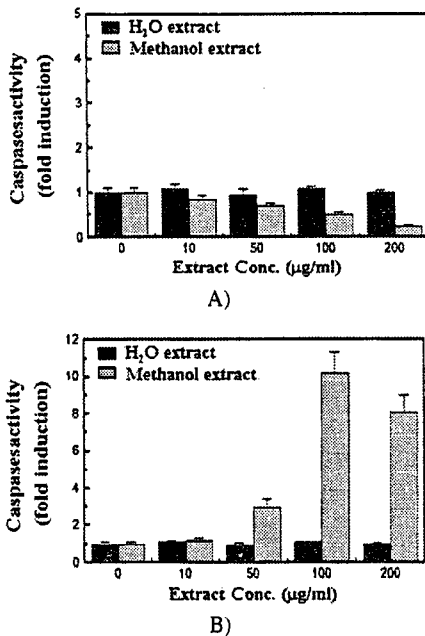


Fig. 5. Methanol extract of *Hedyotis diffusa* induced the enzymatic activation of Caspase-3 proteases of HL-60 cells in a dose-dependent manner. Cells were treated with various doses of each extract for 12 hr. Lysate from the cells used to measure the activity of Caspase-1 and -3 proteases by using fluorogenic peptide substrates including acetyl-YVAD-AMC and acetyl-DEVD-AMC, respectively.

Caspase-1 활성의 감소가 미약하게 나타났다 (Fig. 5A). 또한 Caspase-3 활성도는 세포의 생존율에 변화를 주지 않는 물 추출물 처리 시에는 별다른 활성변화를 보이지 않았으나, 메탄올 추출물을 처리 시에는 용량 의존적인 Caspase-3 활성증가가 나타났다. 메탄올 추출물의 경우 Caspase-3 활성도는 100 µg/ml 약제 처리시 가장 높은 활성(배양배지 대조군에 비해 약 10배정도 활성증가) 증가를 보여 주었으며 그 이후에는 감소하였다(Fig. 5B). 한편 메탄올 추출물을 100 µg/ml 농도하에서 다양한 시간 처리 후 Caspase 활성을 측정할 결과, Caspase-3

활성은 처리 시간에 의존적으로 작용하여, 12 시간 후에는 16배 이상 증가한 후 감소하였으나, Caspase-1 활성도는 거의 변화하지 않았다 (Fig. 6).

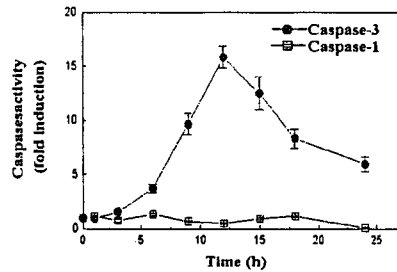


Fig. 6. Methanol extract of *Hedyotis diffusa* induced the enzymatic activation of Caspase-3 proteases in HL-60 cells in a time-dependent manner. Cells were treated with 100 µg/ml of methanol extract for various periods. Lysate from the cells used to measure the activity of Caspase-1 and -3 proteases by using fluorogenic peptide substrates including acetyl-YVAD-AMC and acetyl-DEVD-AMC, respectively.

4. JNK1 활성화에 미치는 영향

JNK/SAPKs는 세포가 자외선에 노출되었을 때 전사인자인 c-Jun을 인산화시키는 단백질로서 처음 발견되었으며, 이외에도 Nitric oxide 및 종양괴사인자 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 interleukin-1(IL-1)과 같은 inflammatory cytokines, 단백질 합성저해제 또는 osmotic shock과 같은 생리적/환경적 스트레스 등의 자극에 의해 일련의 JNK kinase 군들이 활성화되어 세포고사, 분화(differentiation)와 활성화(activation) 등에 관여한다. 따라서 메탄올 추출물에 의한 HL-60 세포의 세포고사시 이러한 JNK kinase의 활성은 어떤변화를 보이는지를 조사하였다. 먼저 메탄올 추출물을 200 µg/ml 농도로 처리 후, 처리시간에 따른 JNK1의 활성

변화를 조사하였다. JNK1의 활성도는 메탄을 抽出物 처리시에 시간에 따른 활성증가가 나타났다. JNK1 활성은 약제 처리 30분 후부터 나타나기 시작하였으며, 1시간째 최고치에 달했다가 9시간까지 유지되고 이후 감소하였다 (Fig. 7).

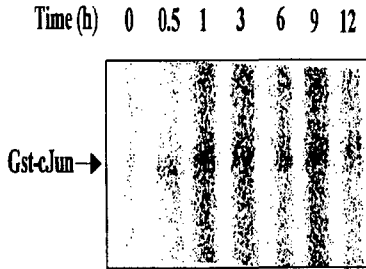


Fig. 7. Methanol extract of *Hedyotis diffusa* activated JNK1 in HL-60 cells. Cells were treated with 200 $\mu\text{g/ml}$ of each extract for various periods. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-JNK1 antibodies. The immune complex was reacted with ^{32}P -ATP and c-Jun as a substrate. The phosphotransferase activity of JNK1 was measured by using PhosphorImage analyzer (Fuji Co., Japan).

5. 전사활성인자(transcriptional activator) NF- κ B 활성화에 미치는 영향

白花蛇舌草 메탄을 抽出物에 의한 HL-60 암세포의 세포죽음이 NF- κ B 전사인자의 활성변화와 관계가 있는지를 확인하기 위하여 메탄을 抽出物의 처리후, 세포의 nuclear extract만을 얻은 후 electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 방법으로 NF- κ B 활성을 조사하였다(Fig. 8). NF- κ B 전사인자의 활성은 메탄을 抽出物 처리 10분 후에 이미 활성화가 진행되었으며, 30분에 최고 활성을 보여 주었으며 이후 약물 처리

3시간 후까지 활성이 유지되다가 6시간 후부터는 급격히 전사인자의 활성을 보이지 않았다 (Fig. 8).

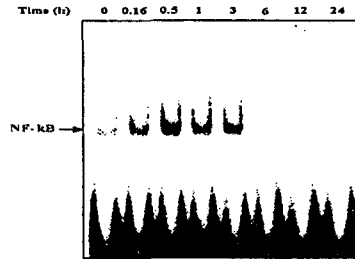


Fig. 8. Methanol extract of *Hedyotis diffusa* induced the transcriptional activation of NF- κ B of HL-60 in a time-dependent manner. Cells were treated with 200 $\mu\text{g/ml}$ of methanol extract for the indicated periods. Nuclear extracts were isolated and incubated with oligonucleotide probe of NF- κ B. Transcriptional activation of NF- κ B was measured by using EMSA and visualized by PhosphorImage analyzer (Fuji Co, Japan).

6. HL-60 암세포 고사시 Bcl2 및 Bax 단백질의 발현 변화에 미치는 영향

세포고사를 조절하는데 관여하는 여러 가지 유전자 산물 중에서 제일 먼저 알려진 암유발 유전자산물의 하나인 Bcl2는 다른 암 유전자 단백질과는 달리 세포증식에는 관여하지 않고 세포의 생존을 조절, 즉 세포의 사멸을 억제하는 기능이 있다. 한편 Bcl2계에 속하는 Bax 단백질은 세포사멸을 촉진시키는 단백질로 처음 밝혀졌으며 Bcl2와의 hetero- 혹은 homodimer를 형성함으로써 세포사멸의 조절에 깊이 관여하고 있다고 알려져 왔다. 따라서 본 실험에서는白花蛇舌草 메탄을 抽出物에 의한 HL-60 암세포의 세포죽음시 Bcl2나 Bax의 발현을 확인하

였다. 배양된 HL-60 세포에 메탄을 抽出物을 처리 후 세포를 포집하여 세포파쇄액(cell lysate)을 얻었다. 이 후 전기영동 및 nitrocellulose membrane상으로의 흡착등을 거친 후 Bcl2 및 Bax 등에 대한 항체를 사용하여 Western blotting을 시행하였다. Bcl2의 발현은 시간이 지남에 따라 약간 감소하는 경향을 보였으며, 6시간 이후부터 Bcl2의 degradation에 의한 Bcl2 fragment의 증가가 나타났으며 이것은 12시간에서 18시간 사이에 최고치를 나타냈

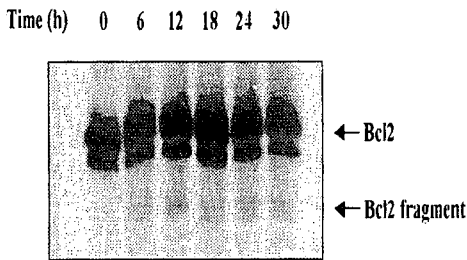


Fig. 9. Methanol extract of *Hedyotis diffusa* induced the degradation of Bcl2 protein in a time-dependent manner. Cells were treated with 200 $\mu\text{g/ml}$ of methanol extract for the indicated periods. Cell lysates were prepared and analyzed by Western blotting with anti-Bcl2 antibodies.

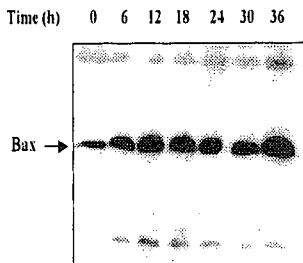


Fig. 10. Methanol extract of *Hedyotis diffusa* induced the induction of Bax protein in a time-dependent manner. Cells were treated with 200 $\mu\text{g/ml}$ of methanol extract for the indicated periods. Cell lysates were prepared and analyzed by Western blotting with anti-Bax antibodies.

다(Fig 9). Bax 단백질은 약제 처리 6시간부터 서서히 증가됨이 확인되었으며 12시간 쯤에는 대략 대조군에 비하여 3배정도의 발현이 증가되어 나타났다(Fig. 10). 따라서, 이러한 Bcl2 및 Bax 단백질의 발현변화는 白花蛇舌草 메탄을 抽出物 유도성 HL-60 세포고사에 밀접하게 연관되어 있음을 알 수 있었다.

7. HL-60 암세포의 colony forming efficiency에 미치는 영향

白花蛇舌草 抽出物이 종양세포에 미치는 형질전철(transforming) 억제효과를 측정기 위해 Hamburger 등의 방법을 변형한 semisolid double layer agarose 법을 이용하여 colony forming assay를 시행하였다. 이 방법은 항암제에 의해 얼마나 암세포의 전이능(malignant potential)이 감소되는 지를 측정하는 방법이다. 본 실험결과, 白花蛇舌草의 물 抽出物은 배양액 대조군

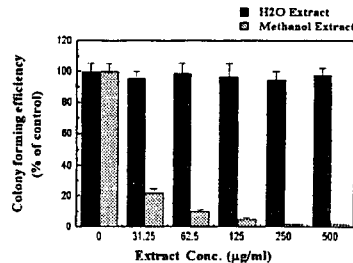


Fig. 11. Methanol extract of *Hedyotis diffusa* reduced the colony forming efficiency of HL-60 cells in a dose dependent manner. Cells were pretreated with various doses of methanol extract for 2 hr. Then, the extract was removed by centrifugation. Cells were resuspended with RPMI-1640 media containing 0.3% agarose, 10% FBS, overlaid onto bottom layer agarose and incubated at CO_2 incubator for 6 days. The number of colony was counted under light microscopy ($\times 100$).

에 비교하여 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도하에서도 colony(50 개 이상의 세포만을 colony로 정의하였음)형성 능력이 저해되지 않았으나, 메탄을 抽出物은 농도 의존적으로 HL-60 세포의 colony 형성을 억제하였으며, 31.25 $\mu\text{g/ml}$ 의 메탄을 抽出物 농도하에서도 80% 이상의 colony 형성능력을 저해하였다(Fig. 11).

IV. 考 察

腫瘍은 一般的으로 人體에 不利하거나 破壞的인 組織의 自律的인 過剩의 成長으로 정의되며 이를 구성하는 細胞의 행동양식에 따라 良性腫瘍과 惡性腫瘍으로 나눌 수 있는데, 그 중에서 癌은 周圍組織을 浸潤하고 轉移를 일으켜 人體를 사망케 하는 惡性腫瘍을 의미한다¹³⁾.

癌의 발생은 “正氣存內 邪不可干”¹⁴⁾, “邪氣所湊 其氣必虛”¹⁵⁾라고 언급한 바와 같이 주로 正氣가 不足한 상태에서 痰凝毒聚하여 腫塊가 형성된다¹⁵⁻¹⁶⁾.

腫瘍의 치료는 辨證求因, 즉 다양한 질병의 樣相을 望聞問切과 八剛을 통하여 病證을 辨別하여 治療方向을 정하는데¹⁷⁾ 증상에 따라 扶正培本法과 攻邪法, 扶正祛邪法으로 大別한다¹⁸⁾. 이 중에서 宿主의 抗癌能力을 強化시켜주는 扶正培本法과 “祛邪而不傷正 扶正而不助邪”하여 祛邪하되 正氣를 損傷시키지 않는 扶正祛邪法을 가장 效果的인 方法으로 인식하고 있다¹⁴⁾.

세포고사는 1980년대 후반기부터 중요 관심 분야로 세포생물학 영역에 도입되면서 많은 분야에 혁명적인 변화를 가져 왔으며 특히 신경계와 면역계 세포의 생성, 분화 및 기능 발현 등에 중요하게 작용함이 밝혀졌다⁶⁾. 이런 세포고사 기전의 장애는 암발생, 항암치료에 대한

내성발현, 자가면역질환의 발생, 퇴행성 질환 및 HIV에 의한 병리에 중요한 역할을 수행한다¹⁹⁾. 최근 흔히 사용되는 많은 항암제들, 특히 Ara-c, cis-platinum, cyclophosphamide, adriamycin, etoposide, teniposide, vincristine, mitoxantrone, taxol, hydroxyurea 및 bleomycin 등이 작용기전에 관계없이 다양한 암세포주에서 세포고사를 유도함이 밝혀졌고, 그 작용기전으로는 Fas/Fas ligand 계, sphingomyelin/ceramide 경로, 발현 초기유전자(early immediate gene) 발현, 세포고사 관련 단백질분해효소인 Caspase 및 DNA fragmentation을 일으키는 endonuclease 등이 관여하는 것으로 보고되고 있다²⁰⁾. 따라서 항암제의 효율성은 세포고사 유도능력과 밀접한 관련이 있다고 알려지고 있으며, 효과적인 암치료과정을 도입키 위한 세포고사의 정확한 생화학적인 기전에 대한 연구가 빠르게 진행되고 있는 실정이다.

이에 저자는 한방에서 암치료에 사용되고 있는 白花蛇舌草의 항암 효과를 사람의 백혈병에서 유래된 HL-60 암세포주를 사용하여, 白花蛇舌草 抽出物들이 직접적으로 암세포주에서 다양한 신호전달 과정을 통하여 세포고사를 일으켜 세포 죽음을 초래할 수 있는지를 究明하고, 이들의 항암효과 및 그 작용기전을 밝히고자 실험을 시도하였다.

먼저 白花蛇舌草 抽出物이 HL-60 암세포에 직접적으로 치사작용을 일으키는지를 알아보기 위하여 각각의 抽出物을 농도별로 처리한 결과 메탄을 抽出物이 강하게 암세포의 죽음을 초래하는 세포독성 효과를 나타냄을 확인하였다(Fig. 1).

메탄을 抽出物을 처리한 HL-60 세포의 죽음이 세포고사 과정에 의한 것인지 혹은 괴사 과정에 의하여 매개되는지를 확인하기 위해 세포고사 현상의 특징중의 하나인 ladder형 DNA 분

절 및 Hoechst staining에 의한 nucleus의 염색을 통하여 chromatin의 fragmentation을 확인하여 세포고사임이 증명되었다(Fig. 3 & 4).

한편, Caspase family는 염증반응이나 포유동물의 세포고사 유도에 핵심적인 역할을 수행하는 효소로서 정상적으로 세포 내에 불활성화 효소형태로 존재하다가 세포고사 유도 자극시 활성화하며, 세포고사의 특징적인 현상을 초래하는 세포내 신호전달기전에서 Caspase의 중요성은 이미 잘 알려져 있다²¹⁾. 이러한 Caspase는 cysteine protease로서 지금까지 14개가 알려져 있으며 이중 Caspase-3(CPP32, yama)의 役割에 대해서 많은 研究가 進行되고 있다. Caspase作用은 표적기질(substrate)에 따라 아미노산 배열 중 DEVD를 인식해서 절단하는 CPP32-like Caspase(Caspase-3)와 YVAD를 인식해서 절단하는 ICE-like Caspase로 대별된다. 일단 Caspase-3이 활성화가 되면 poly(ADP-ribose) polymerase(PARP), lamin, MEKK, 및 다른 Caspases 등 여러 표적 단백질에 작용해서 기능적 활성화나 불활성화를 유도하여 세포내의 여러 신호전달활성을 조절하므로써⁸⁾, 이들은 대부분 세포고사에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²²⁾. 또한 최근 보고에 의하면 세포고사 억제 단백질중의 하나인 Bcl2 단백질 역시 Caspase-3에 의해 分節(cleavage)됨이 보고되고 있다. 본 연구에서 白花蛇舌草 메탄을 抽出物에 의한 세포고사에서 역시 Caspase-3 효소활성이 증가함을 관찰할 수 있었다(Fig. 5 & 6).

한편, 유핵세포의 신호전달경로의 가장 주된 형태는 mitogen activated protein kinases MAPKs)라 불리는 것들로서, 다양한 기질특이성이나 세포의 자극에 대한 반응성을 보여 주지만 기본적인 구조와 활성화 방법등은 매우 유사한 것으로 밝혀지고 있다. 현재까지 밝혀진 포유

동물에서의 MAPK kinase계 신호 전달계는 ERKs, JNK/SAPKs, 그리고 p38로 구분되는 3개의 MAPK 활성화 반응과정(cascade)이 확인되었다. 이중 JNK/SAPKs는 세포가 자외선에 노출되었을때 전사인자인 c-Jun을 인산화시키는 단백질로서 처음 발견되었다²³⁾. 이외에도 Nitric oxide 및 TNF- α 와 IL-1과 같은 inflammatory cytokines, 단백질 합성저해제 또는 osmotic shock와 같은 생리적/환경적 스트레스 등의 자극에 의해 일련의 JNK kinase 군들이 활성화된다. 이러한 일련의 JNK 효소군의 활성이 가지는 의미는 세포고사, 분화와 활성화 등에 밀접한 관련을 보여주고 있음이 보고되고 있다²⁴⁻²⁵⁾. Verheij²⁴⁾ 등은 스트레스에 의해 유도되는 세포고사에 있어 JNK 활성이 필요하다고 제시하였고, Wilson²⁵⁾ 등은 인간 T세포의 Fas-매개 세포고사에 있어서도 JNK 활성의 선행이 이루어진다고 보고하였다. 한편 가장 최근에 밝혀진 p38은 JNK/SAPKs와 마찬가지로 TNF, IL-1, LPS(lipopolysaccharide), 혹은 osmotic stress 등에 의해 활성화된다¹⁰⁾. p38신호전달 과정은 사이토카인의 TNF, IL-1 등의 생합성 등을 통한 염증성 반응에 관련되어 있음이 보고되고 있다. 지금까지 알려진 JNK활성화는 그 상위단계 kinase인 SEK1/MKK4에 의해 촉진되며, 이 kinase는 또한 p38kinase도 활성화시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 최근 이러한 SEK1/MKK4에 의한 JNK 활성화 외에도, Moriguchi 등은²⁶⁾ TNF를 처리시 SEK1/MKK4와는 별개의 새로운 kinase MKK7이 JNK/SAPKs를 활성화시킬 수 있음을 보고하였다. 더우기 Nishina 등은¹¹⁾ SEK1 세포를 사용하여 JNK/SAPK의 활성은 SEK1에 의존적인 신호전달과정을 거치기도 하며, 또한 전혀 다른 SEK1 비의존적 경로, 즉 SEK1 이외의 다른 kinase를 통하여 JNK/SAPK 활성화가 이루어짐

을 보고하였다. 한편 이러한 SEK1의 활성화 역시 JNK의 세포고사기전체와 같이 서로 상반된 역할을 보임이 보고되고 있다^{11,27}). JNK는 UV light, interleukin-1, TNF- α , 그리고 CD28의 자극에 의해서도 활성화된다. 특히 MAPK/ERK kinase kinase(MEKK), JNK-activating kinase를 라발렌시키면 fibroblast에서 치사효과가 있었고, 강력한 세포고사 유발물질인 TNF- α 가 JNK를 활성화시키기 때문에 본 연구에서도 JNK 신호전달 기전이 白花蛇舌草 메탄을 抽出物에 의해 유도되는 세포고사에 관여하는지를 확인하였다. 이 결과로 메탄을 抽出物에 의한 시간 의존적인 JNK의 활성화가 나타났다. 특히 약제 처리 후 30분 후부터 JNK 활성이 나타났으며 1시간에 최고치를 나타냈고 이후 9시간까지 지속적인 JNK 활성이 유지되었다¹²). 따라서 장시간의 JNK 활성은 白花蛇舌草 메탄을 抽出物에 의한 세포고사 과정에 깊이 관련되어 있으리라 사료된다.

NF- κ B는 p50, p65, C-Rel, B-rel 및 p52 등의 subunit으로 이루어진 단백질로, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF, M-CSF 등 염증반응에 관련된 유전자의 전사적 활성을 조절하는 역할을 한다²³). 또한 NF- κ B는 각기 다른 자극에 의해서 발생하는 세포고사에 저항성을 나타내는 것으로 보고되고 있으며²⁸), 이와는 반대로 활성화된 NF- κ B가 세포고사 유도에 직접적으로 관련이 있음이 보고되고 있다. NF- κ B는 자극이 없을 때에는 기능억제 단백질인 I κ B- α 나 또는 I κ B- β 와 결합하고 있어, 핵안으로 이동하지 못하지만, 적절한 신호가 전달되면 I κ B- α 나 또는 I κ B- β 가 파괴되어 NF- κ B가 활성화가 된다. NF- κ B의 부적절한 활성화는 급성염증반응, 급성기반응(acute phase response), 방사선 손상, 동맥경화증(atherosclerosis) 및 악성종양과 같은 여러 가지 질병의 유발과 밀접한 관련이

있다고 보고되고 있다²⁹). 본 연구에서도 白花蛇舌草 메탄을 抽出物 처리 10분 후부터 NF- κ B의 활성 증가가 관찰되었으며 30분에 최고활성에 도달했다가 3시간까지 활성이 유지된 후 이후 급격히 감소하였다. 아마도 이러한 전사인자의 초기활성은 세포고사 과정에 요구되는 단백질들의 발현(예로써, Fas, Fas ligand 및 Bax 등)에 필요한 유전자들의 전사를 통한 발현을 증진시키기 위한 것으로 사료된다.

한편, Bcl2는 사람의 림프종(human follicular lymphomas)과 밀접하게 관련된 유전자로서 단백질의 분자량은 26Kda이며, 다른 암유전자와는 달리 세포증식에는 관여하지 않고 세포사멸의 억제기능에 관여하고 있다. Bcl2에 의한 세포사멸 방지에 관련기작으로서 제시되고 있는 것은 산화환원 상태 조절, 세포내 이온의 분포 조절, Caspase 활성, 미토콘드리아 막전위, 핵 DNA 분절화, 세포 사멸 신호전달계의 활성화(JNK, p38 등)의 조절 등 광범위하다. 이러한 Bcl2는 Caspase3 등에 의해 잘려져 23Kda의 Bcl2 분획을 생성하며, 이러한 Bcl2 분획은 완전한 Bcl2형태의 기능과는 정반대로 세포고사를 촉진시키는 역할을 하는 것으로 보고되어 있다. 한편 Bax 단백질은 Bcl2와는 달리 오히려 세포사멸을 촉진시키는 기능을 수행한다고 알려져 있다. 따라서 본 연구결과에서 白花蛇舌草 메탄을 抽出物에 의한 Bcl2의 분해 및 Bax의 발현증가는 암세포의 세포고사를 촉진하는 방향으로 진행되는 것으로 사료된다.

이상의 결과로 보아 白花蛇舌草 메탄을 抽出物에 의한 HL-60 암세포의 사멸은 이 抽出物이 암세포의 세포고사 신호전달기전인 Caspase 3-like cysteine protease, Jnk1, NF- κ B 등을 활성화시키며, 세포죽음을 저해하는 역할을 수행하는 Bcl2의 degradation을 촉진시키는 반면에 세포죽음을 촉진시키는 Bax 단백질의 발현을 증가

시키는 과정을 통해서 이루어짐을 알 수 있다. 또한 colony 형성저해능력을 확인함으로써 白花蛇舌草 메탄을 抽出物은 강력하게 암세포의 malignat potential을 저해시킬 수 있음을 알 수 있다. 따라서, 현재 암분야의 치료에 광범위하게 이용되고 있는 白花蛇舌草가 매우 유용한 항암효과를 지니고 있음이 실험적으로 증명되었으며, 이후에 더 많은 연구가 진행되어지기를 기대한다.

V. 結 論

白花蛇舌草의 메탄을 抽出物이 사람의 백혈병 유래 HL-60 癌細胞에 어떠한 영향을 미치는지를 究明하기 위하여, Caspase cysteine protease의 활성화도와 JNK 및 전사활성인자인 NF- κ B의 활성화변화, Bcl2 및 Bax의 발현변화, colony forming efficiency 등의 과정들을 관찰하였던 바 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 白花蛇舌草 메탄을 抽出物만이 농도 의존적으로 암세포 HL-60의 죽음을 유발시켰다.
2. 白花蛇舌草 메탄을 抽出物에 의한 세포의 죽음 시 DNA분절 및 chromatin의 fragmentation 등이 관찰되어 세포고사에 의한 세포죽음이 진행됨을 확인할 수 있었다.
3. 白花蛇舌草 메탄을 抽出物을 농도별, 혹은 시간별로 처리 후 Caspase-1, Caspase-3의 활성화변화를 조사한 결과 Caspase-3 protease 활성화만이 용량 및 시간 의존적으로 증가하였다.
4. 白花蛇舌草 메탄을 抽出物을 HL-60 암세포에 처리 후 EMSA 방법을 통해 NF- κ B 활

성을 조사한 결과, 10분부터 활성이 증가하였으며 30분에 최고 활성을 보이고 이후 3시간까지 유지되다가 활성이 사라졌다.

5. 白花蛇舌草 메탄을 抽出物을 HL-60 암세포에 처리 후 Bcl2 및 Bax의 발현양상 변화를 관찰한 바, Bcl2의 degradation에 의한 23Kda의 Bcl2 분절 생성이 관찰되었으며, Bax의 경우는 약제처리 후 6시간부터 시간 의존적으로 발현이 증가되었다.
6. 白花蛇舌草 메탄을 抽出物을 HL-60 암세포에 처리 후 colony forming assay 에 의해 colony 형성을 측정 한 결과 HL-60 암세포의 colony 형성이 완전하게 저해됨을 확인하였다.

이상의 결과로 보아 白花蛇舌草 메탄을 抽出物에 의한 HL-60 암세포의 사멸은 이 抽出物이 암세포의 세포고사 신호전달기전인 Caspase 3-like cysteine protease, JNK1, NF- κ B 등을 활성화시키며, 세포죽음을 저해하는 역할을 수행하는 Bcl2의 degradation을 촉진시키는 반면에 세포죽음을 촉진시키는 Bax 단백질의 발현을 증가시키는 과정을 통해서 이루어짐을 알 수 있다. 또한 colony 형성저해능력을 확인함으로써 白花蛇舌草 메탄을 抽出物은 강력하게 암세포의 전이능 (malignat potential)을 저해시킬 수 있음을 알 수 있다.

參 考 文 獻

1. 辛民教: 臨床本草學, 서울. 永林社, p.569-570, 1995.
2. 上海中醫學院: 中草藥學, 香港. 商務印書館 香港分館, pp.190-191, 1975.
3. 常敏毅: 抗癌本初, 湖南城. 湖南科學技術出

- 版社, pp. 126-128, 1987.
4. 金聖勳 : 白花蛇舌草로부터 分離한 ursolic acid의 自然殺害效果와 抗轉移作用, 大田大學校韓醫學研究所論文集, 5(2) : 523-533, 1997.
 5. 송호준, 김대현 : 白花蛇舌草 煎湯液 投與가 마우스의 抗腫瘍 免疫反應에 미치는 영향, 본초분과학회지 9(1) : 83-97, 1994.
 6. Williams GT. Apoptosis in the immune system. *J. Pathol*, 173: 1-4, 1994.
 7. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of cell death. *Int. Rev. Cytol.* 68: 251-306, 1980.
 8. Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, Dumont JE, Galand P. : Tumor necrosis factor induces apoptosis in normal endothelial cells in vitro. *Am. J. Pathol.* 138: 447-453, 1991.
 9. Alnemri ES, Livingstone DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. : Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171, 1996.
 10. Han J, Lee JD, Bibbs L, and Ulevitch RJ : A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265 : 808-811, 1994.
 11. Nishina, H., Fischer, K.D., Radvanyi, L., Shahinian, A., Hakem, R., Rubie, E.A., Bernstein, A., Mak, T.W., Woodgett, J.R., and Penninger, J.M. : Stress-signalling kinase Sek1 protects thymocytes from apoptosis mediated by CD95 and CD3. *Nature* 385 : 350-353, 1997.
 12. McBride, K., and Nemer, M : The c-terminal domain of c-fos is regulated for activation of an AP-1 site specific for jun-fos heterodimers. *Mol. Cell. Biol.* 18 : 5073-5081, 1998.
 13. 崔昇勳 : 東醫腫瘍學, 서울, 행림출판사, pp.142-162, p.632, 641, 1993.
 14. 홍원식 : 黃帝內經素問, 서울, 동양의학연구원, pp.14, 124, 285, 1981.
 15. 홍원식 譯 : 현대중공의 암치료, 서울, 영문사, pp.286-287, 342-345, 378-388, 1994.
 16. 徐龍生 外 : 扶正培本法在腫瘤臨床的應用, 浙江中醫學院, 12(3) 22-24, 1988.
 17. 허대석 : 암환자에서 림프구의 종양에로의 이동, 서울, 암세포생물학, pp.173-181, 1992.
 18. 孟琳升 等 : 中醫治癌大成, 北京科學技術出版社, pp.98-127, 1997
 19. Thomson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462, 1995.
 20. Mesner P, Budihardjo I, Kaufmann SH. : Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv. Pharmacol.* 41: 461, 1997.
 21. Widmann C, Gibson S. : Caspase-dependent Cleavage of signaling proteins during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273(12): 7141-7147, 1998.
 22. Tewari M, and Dixit VM. : Fas-and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J. Biol. Chem.* 270, 3255-3260, 1995.
 23. Amer A. Beg and David Baltimore : An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science.* 274(1): 782-784, 1996.
 24. Verheij M, Bose R, Lin, Yao B, Jarvis W, Grant S, Birrer M, Szabo E, Zon L, Kyriakis J, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, and Kolensnick R. : Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-

- induced apoptosis. *Nature* 380 : 75-79, 1996.
25. Wilson DJ, Fortner KA, Lynch DH, Mattingly RR, Macara IG, Posada JA and Budd RC :
Eur J Immunol. 26 : 989-994, 1996.
26. Moriguchi, T., Toyoshima, F., Masuyama, N., Hanafusa, H., Gotoh, Y., and Nishida E : A novel SAPK/JNK kinase, MKK7, stimulated by TNF- α and cellular stress. *EMBO J* 16 : 7045-7053, 1997.
27. Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A and Karin M. : Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that bind and potentiate the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 7: 2135-2148, 1993.
28. Siebenlist, U., Franzo, G., and Brown, K : Structure, regulation and function of NF- κ B. *Ann. Rev. Immunol.* 12 : 405-455, 1994.
29. May, M. J., and Ghosh, S. : Signal transduction through NF- κ B. *Immunology Today* 19 : 80-88, 1998.