大韓韓方腫瘍學會誌
J. of Kor. Oriental Oncology
Vol.6, No.1, 2000

# 백화사설초 메탄올 추출물에 의한 HL-60 細胞 枯死過程에서의 cell cycle 關聯因子의 活性變化 硏究

한세희 · 이종범 · 문 구 · 문석재 · 원진희* · 박래길** · 이종덕***

# Studies on Expression of Cell Cycle Related Genes in HL-60 Cells Undergoing Apoptosis by the Methanol Extract of Hedyotis diffusa

Se-Hee Han, Jong-Bum Lee, Gu Moon, Suk-Jae Moon, Jin-Hee Won*,
Lae-Gil Pak**, Jong-deok Lee***

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

**Objectives:** Hedyotis diffusa is used to treat cancer in traditional Korea Medicine. So this study was carried out to examine the expression of cell cycle related genes in HL-60 cells undergoing apoptosis by the methanol extract of Hedyotis diffusa.

**Methods:**

1. HL-60 cells were treated with various concentrations (from 200 to 50μg/ml) of methanol extract and H2O extract (200 μg/ml) of *hedyotis diffusa*. After 48 h later, the cells were tested for viability by MTT assay.
2. The HL-60 cells were treated with 200 μg/ml of methanol extract for the indicated periods. The whole cell lysates were prepared and analyzed by western blotting using anti-p53 antibody, .
3. The nuclear extract were prepared and analyzed by western blotting using anti-p21 antibody, anti-p27 antibody, anti-cyclin A antibody, anti-cyclin E antibody and anti-CDK2 antibody.

* 원광대학교 한의과대학 비계내과학교실
** 원광대학교 의과대학 미생물학교실
*** 원광대학교 한의과대학 진단방사선과교실

**Results :**

1. The methanol extract of *Hedyotis diffusa* induced the death of HL-60 cells in a dose dependent manner.
2. The methanol extract of *Hedyotis diffusa* markedly decreased the level of p21/Cip1 and cyclin A in a time dependent manner.
3. The methanol extract of *Hedyotis diffusa* markedly increased the level of p27/Kip1 and cyclin E in a time dependent manner.
4. The methanol extract of *Hedyotis diffusa* markedly did not affect the level of CDK2.

**Conclusions**: These results provide evidence that expression of cell cycle related genes in HL-60 cells undergoing apoptosis by the methanol extract of *Hedyotis diffusa* mainly results from decreased level of p21/Cip1 and increased level of p27/Kip1 of the cell cycle related genes.

Key words : *Hedyotis diffusa,* HL-60 cells, p21/Cip1, p27/Kip1, cyclin A, cyclin E, CDK2.

# Ⅰ. 緖 論

細胞의 分裂 및 機能의 變化와 관련된 一部 天然産物은 중요한 生物學的 反應 調節制(biological response modifier, BRM)로 취급되어 그 特性은 물론 作用過程에 대하여 자세히 硏究되어 오고 있다[1-3]. 天然産物이 硏究者들의 관심의 대상이 되고 있는 이유는 一部의 天然産物에 抗腫瘍 效果가 있다는 사실과 이들의 抗腫瘍 效果가 腫瘍細胞의 分裂을 직접적으로 抑制하거나 또는 癌을 가진 動物의 免疫能을 增加시키는 것으로 밝혀지고 있기 때문이다[4-6].

白花蛇舌草는 淸熱解毒, 利水通淋, 活血化瘀, 消癰의 效能이 있어 咽喉炎, 蟲垂炎, 痢疾, 黃疸, 子宮附屬器炎, 各種 炎症, 消化器癌, 淋巴癌, 咽喉癌 等에 應用되고 있다[7].

白花蛇舌草의 抗癌作用에 대한 硏究로는 金[8-9]은 白花蛇舌草로부터 分離한 ursolic acid의 抗癌 및 抗轉移 效果를, 宋[10]은 白花蛇舌草가 大食細胞의 貪食能과 反應窒素中間物質 形成能을 亢進시켜 抗腫瘍作用을 나타낸다고 報告하였다.

Apoptosis는 多細胞 生命體에서 正常的인 器官의 發達과 組織의 恒常性 維持에 必須的인 生理現狀의 하나인 細胞의 計劃된 죽음(programmed cell death)을 말하는 것으로[11], 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의 增加, chromatin의 凝縮, endonuclease의 活性化에 의한 DNA의 사다리 模樣의 分節 (ladder pattern DNA fragmentation) 形成, transglutaminase의 活性化 및 核의 切斷과 아포토틱 소체 (apoptotic body)의 形成을 同伴한다[11-12].

細胞週期 調節에 관련하는 蛋白質들은 각 細胞週期에 特異的으로 發顯이 增加하였다가 減少하는 각종 cyclin들(cyclin A, cyclin B, cyclin C, cyclin D, 및 cyclin E 등), cyclin 들과 결합하여 각 細胞週期에 特異的인 蛋白質의 燐酸化에

관여하는 cyclin dependent kinases (CDKs), CDK와 結合하여 CDKs의 機能을 억제하는 cyclin dependent kinase inhibitors (CKIs), retinoblastoma 蛋白質(Rb) 結合能이 있는 轉寫調節因子 E2F, DNA 合成에 관여하는 PCNA (proliferating cell nuclear antigen), E2F 등과 結合能을 가진 Rb 蛋白質, G1/S 이행 및, 遺傳子 repair등에 관여하는 p53 蛋白質등이 대표적인 것이다[13]. 細胞週期의 조절은 成長 및 分裂하는 細胞에도 중요하지만 손상된 DNA 복구 및 다양한 자극에 의해 誘導된 apoptosis에 있어서도 매우 중요한 역할을 수행한다. 細胞에 apoptosis를 誘導하는 자극들은 放射線照射, 抗癌劑等의 化學療法劑 처리, hyperthermia, glucocorticoid 투여, 成長因子 제거, serum withdraw등이 포함된다[14-15].

본 硏究에서는 白花蛇舌草의 抽出物이 사람의 白血病에서 유래된 HL-60 癌細胞의 細胞枯死時 나타나는 여러 細胞週期關聯 蛋白質들(cyclin A, cyclin E, CDK2, p21, p27, p53)에 미치는 變化樣相을 觀察하였던 결과 유의한 結果를 얻어 報告하는 바이다.

## Ⅱ. 實驗材料 및 方法

### 1. 材 料

#### (1) 藥 材

白花蛇舌草는 圓光大學校 全州韓方病院에서 購入한 後 精選하여 사용하였다.

#### (2) 檢液調製

實驗에 使用된 藥材는 먼저 두가지 溶媒를 사용한 抽出方法을 사용하여 본 實驗에 이용하였다. 먼저 물 抽出物 ($H_2O$ 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 3200rpm으로 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, 메탄올抽出物은 陰乾된 白花蛇舌草 100g을 細切한 후 메탄올 1 *l* 와 함께 플라스크에 넣어 하루동안 우러나오도록 방치한 다음 거즈로 濾過하고 3200rpm으로 20분간 遠心分離 후 濃縮器(Rotary evaporator)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.

### 2. 方 法

#### (1) HL-60 白血病由來 癌細胞株 培養

사람 白血病으로부터 由來된 癌細胞株인 HL-60 (ATCC CCL240) 는 $CO_2$ 細胞배양기에서 (37℃, 5% $CO_2$) 10% fetal bovine serum (Hyclones)이 포함된 RPMI- 1640 (Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD) 배지에서 培養하였다. 약 48時間 週期로 RPMI-1640 培養液을 교체하여 주며 log phase에 있는 細胞에 韓藥劑를 처리한 뒤 細胞의 죽음을 관찰하고, 이에 연관된 生化學的 實驗을 수행하였다.

#### (2) 細胞 viability 測定

細胞 生存率은 MTT assay 方法을 이용하였다. 簡記하면 細胞培養板 (24-well plate)에 細胞를 $1\times10^5$ 씩 1*ml*의 培養液에 넣어 분주한 후, 實驗에 필요한 각 조건의 韓藥材 등을 처리한 다음, MTT를 最終濃度가 100 $\mu$g/ml이 되도록 넣어주었다. 生存率의 판정은 MTT 처리 후 4시간 후에 살아있는 細胞에 의해 생성된 보라색 不溶性의 formazan을 100 $\mu l$의 10% SDS가

포함된 0.01 N HCl 溶液으로 24시간 동안 37℃ 5% $CO_2$ 細胞培養基에서 방치하여 녹인 다음, ELISA reader로 540 nm의 파장하에서 吸光度를 測定하여 決定하였다.

### (3) Nuclear extract 준비

核 抽出物(nuclear extract)에 있는 細胞週期 關聯因子(cyclin A, cyclin E, CDK2)의 發顯樣相 變化를 測定키 위해 먼저 藥材가 처리된 HL-60 細胞에서 Jeong 등의 方法[16]에 따라 核 抽出物을 얻었다. 요약하면, HL-60細胞는 200 μM PMSF, 10 μg/ml aprotinin, 20 μM pepstatin A, 100 μM leupeptin 및 100 μM antipapain이 들어 있는 底滲透壓 溶解溶液과 10 분간 얼음에서 膨脹시킨 후 NP-40를 0.1%되게 反應시킨 후 2,500 rpm에서 遠心 分離하여 細胞質液만을 버린다.

### (4) Western blotting

培養된 HL-60 細胞에 藥劑를 처리한 일정 시간 후에 細胞를 채취하여, cold Hank's balanced salt solution (HBSS) 로 2회 洗滌하였다. 얻은 細胞는 total cell lysate를 얻기위해 RIPA 溶液 (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSH, 1 μg/ml aprotinin)으로 얼음에서 溶解하였다. 溶解 細胞 浮游液에 2 X sample buffer와 섞어 98℃에서 5분간 끓인 후, 12.5 % dodesyl sulfate-polyAcrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 蛋白質을 nitrocellulose membrane으로 4℃, 30 V에서 16시간 동안 transfer한 후 blocking (5% skim milk)로 상온에서 1시간 동안 反應시켰다. p53, p21, 및 p27등에 대한 抗體를 Tris-buffered saline에 1:1000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 4시간 반응시켰다. 이어서, 二次抗體인 anti-rabbit IgG conjugated horseradish peroxidase (TBS로 1:3000으로 희석)와 상온에서 2시간 동안 反應시킨 후, enhanced chemiluminescence kit (ECL kit)를 사용하여 필름에 노출시켰다.

## Ⅲ. 實驗成績

### 1. 白花蛇舌草 抽出物이 白血病由來 癌細胞 HL-60의 細胞生 存率에 미치는 影響

實驗에서는 먼저 白花蛇舌草 메탄올 抽出物이 細胞의 生存率에 어떤 影響을 미치는가 알아보기 위해 먼저 白花蛇舌草 메탄올 抽出物의 濃度를 변화시키며 生存率을 MTT방법으로 측정하였다. 韓藥材가 12.5 μg/ml이하의 濃度에서는 HL-60 細胞의 生存率에는 유의한 變化가 없었으나 50 μg/ml의 韓藥材를 처리한 후 48시간 뒤 生存率이 20% 減少하였고, 100 μg/ml 處理

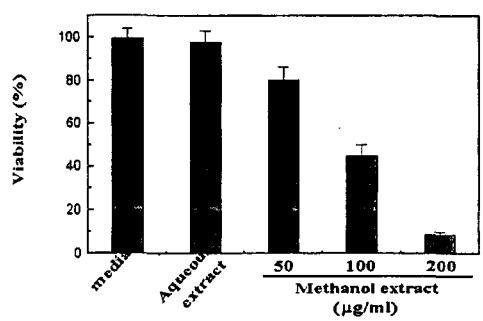


**Fig. 1.** The Effects of *hedyotis diffusa* extracts on the viability of HL-60 cells in a dose dependent manner. HL-60 cells were treated with various concentrations (from 200 to 50 μg/ml) of methanol extract and H2O extract (200 μg/ml) of *hedyotis diffusa*. After 48 h later, the cells were tested for viability by MTT assay. The data represented mean ± S. D. of triplicates.

時에는 34%, 200 μg/ml 處理時에는 90% 이상 生存率이 減少하였다 (Fig. 1).

## 2. 白花蛇舌草 抽出物에 의한 HL-60 癌細胞 枯死時 p53蛋白 質의 發現 變化에 미치는 影響

p53은 53-kDa의 蛋白質로 SV40 transformed cell에서 分離되었으며, 17번 染色體의 단완에 위치하는 腫瘍抑制 遺傳子로서 wild type 과 mutant type이 존재한다. wild type p53은 細胞增殖 過程中 G1에서 S phase로의 轉換時 check point로 作用하여 apoptosis로의 進行與否를 결정한다[17-19]. 따라서, 본 實驗에서는 白花蛇舌草 메탄올 抽出物에 의한 HL-60 癌細胞의 apoptosis때 이러한 p53의 發顯은 어떤 影響을 받는지 확인하였다. 메탄올 抽出物을 다양한 시간동안 處理 후 細胞를 包集하여 細胞破碎液 (cell lysate)을 얻었다. 이 후 전기영동 및 nitrocellulose membrane 上으로의 吸着等을 거친 후 p53에 대한 抗體를 사용하여 western blotting을 시행하였다. p53 蛋白質은 藥材 處理 6시간부터 서서히 增加되기 시작하며 이 增加됨은 24시간까지 유지되다가 藥材處理 30시간부터는 서서히 減少하기 시작하였다 (Fig. 2).

## 3. 白花蛇舌草 抽出物에 의한 HL-60 癌細胞 枯死時 p21/Cip1蛋白質의 發現 變化에 미치는 影響

p21Cip1/WAF1遺傳子는 이 遺傳子에 의해 만들어진 蛋白質이 cyclin dependent kinase 2 (CDK2)와 反應하는 物質로 처음 밝혀졌다. 이러한 p21은 細胞週期의 negative regulator로서 뿐만 아니라 apoptosis에도 중요한 연관이 있다고 보고되고 있다. 따라서 본 實驗에서는 白花蛇舌草 메탄올抽出物 處理에 의한 p21의 時間別 發顯樣相 變化를 측정함으로써 이들이 역할을 규명하고자 하였다. 메탄올 抽出物을 다양한 시간동안 處理 후 細胞를 包集한 후 "材料 및 方法"에 제시된 方法을 따라 核 抽出物만을 얻었다. 이 후 전기영동 및 nitrocellulose membrane 상으로의 吸着등을 거친 후 p21에 대한 抗體를 사용하여 western blotting을 시행하였다. p21 蛋白質은 藥材 處理 6시간부터 서서히 減少되기 시작하며 이 36시간 후에는 처음 양의 70 -80 %이상이 減少하였다 (Fig. 3).

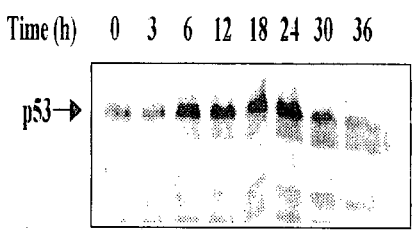


**Fig. 2.** Methanol extract of *Hedyotis diffusa* induced the expression of p53 in a time dependent manner. The HL-60 cells were treated with 200 μg/ml of methanol extract for the indicated periods. The whole cell lysates were prepared and analyzed by western blotting using anti-p53 antibody.

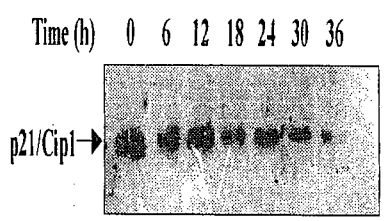


**Fig. 3.** Methanol extract of *Hedyotis diffusa* markedly decreased the level of p21/Cip1 in a time dependent manner. The HL-60 cells were treated with 200 μg/ml of methanol extract for the indicated periods. The nuclear extract were prepared and analyzed by western blotting using anti-p21 antibody.

## 4. 白花蛇舌草 抽出物에 의한 HL-60 癌細胞 枯死時 p27/Kip1 蛋白質의 發現 變化에 미치는 影響

p27Kip1 蛋白質은 接觸抑制 (contact inhibition)에 의하여 休止期에 있는 細胞나 transforming growth factor (TGF)-β處理를 한 細胞에서 negative growth regulator로서의 역할을 하는 것으로 밝혀졌다[20].

본 實驗에서는 白花蛇舌草 메탄올抽出物 處理에 의한 p27의 시간별 發顯樣相 變化를 측정함으로써 이들이 白花蛇舌草 메탄올抽出物 處理된 HL-60細胞의 細胞週期 變化 過程 중에서의 역할을 규명하고자 하였다. 메탄올 抽出物을 다양한 시간동안 處理하여 細胞를 包集한 후 "材料 및 方法"에 제시된 方法을 따라 核 抽出物만을 얻었다. 이 후 전기영동 및 nitrocellulose membrane 상으로의 吸着등을 거친 후 p27에 대한 抗體를 사용하여 western blotting을 시행하였다. 흥미롭게 p21과는 달리 p27 蛋白質은 전부터 藥材 處理 6시간 후 까지는 蛋白質의 존재가 檢出되지 않다가 12시간 후 서서히 增加하였으며, 30시간째에 최고 發顯을 보이다가 이후 약간 減少하였다 (Fig. 4).

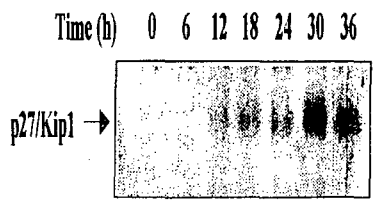


**Fig. 4.** Methanol extract of Hedyotis diffusa markedly increased the level of p27/Kip1 in a time dependent manner. The HL-60 cells were treated with 200 μg/ml of methanol extract for the indicated periods. The nuclear extract were prepared and analyzed by western blotting using anti-p27 antibody.

## 5. 白花蛇舌草 抽出物에 의한 HL-60 癌細胞 枯死時 cyclin A 蛋白質의 發現 變化에 미치는 影響

Cyclin은 CDK와 더불어 細胞週期를 조절하는 因子로서 현재 30여종의 cyclin 遺傳子들의 sequence가 밝혀져 있다. 動物細胞에서는 8종류의 cyclin 즉, cyclin A, B1, B2, C, D1, D2, D3, E가 밝혀져 있다. 이들은 G1 및 G2期에서 S 및 M期로의 細胞週期進行을 조절하는 主因子로서 G1 cyclin, G2 cyclin으로 분류된다. 이들 cyclin은 주관하는 正常的인 細胞週期에서 최대로 發顯되어 CDK와 더불어 S 期 및 M 期로 진행되는데 필요한 因子를 活性化하며 일단 그 역할이 끝나면 cyclin은 분해되어 없어진다. G1, S 期에 특정하게 作用하는 G1 type cyclin에는 cyclin A, D, E 등으로 CDK2 나 CDK4와 결합하여 G1에서 S 期로의 細胞週期를 진행시키게 한다. G1, S 期에서 특정하게 作用하는 G1 type cyclin으로서는 Cyclin A, D, E 로서 CDK2 나 CDK4와 결합하여 細胞週期를 시작하게 하는데 중심 역할을 한다. 본 實驗에서는 白花蛇舌草 메탄올抽出物 處理에 의한 cyclin A의 時間別 發顯樣相 變化를 측정함으로써 이들이 白花蛇舌草 메탄올抽出物 處理된 HL-60細胞의

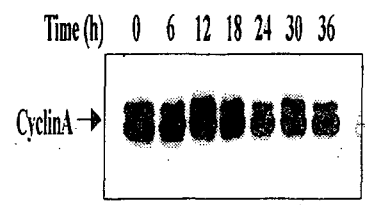


**Fig. 5.** Methanol extract of Hedyotis diffusa markedly decreased the level of cyclin A in a time dependent manner. The HL-60 cells were treated with 200 μg/ml of methanol extract for the indicated periods. The nuclear extract were prepared and analyzed by western blotting using anti-cyclin A antibody.

細胞週期 變化 過程 중에서의 역할을 규명하고자 하였다. 메탄올 抽出物을 다양한 시간동안 處理하여 細胞를 包集한 후 "材料 및 方法"에 제시된 方法을 따라 核 抽出物만을 얻었다. 이후 전기영동 및 nitrocellulose membrane 상으로의 吸着等을 거친 후 cyclin A에 대한 抗體를 사용하여 western blotting을 시행하였다. Cyclin A 蛋白質은 藥材 處理 12시간 후부터 서서히 減少하기 시작하였으며, 36시간 후에는 대략 처음 發顯量의 50% 이하로 현저하게 줄어들었다 (Fig. 5).

## 6. 白花蛇舌草 抽出物에 의한 HL-60 癌細胞 枯死時 cyclin E 蛋白質의 發現 變化에 미치는 影響

한편, 또 다른 G1 cyclin의 하나인 Cyclin E의 發顯 變化도 관찰하였다. 이를 위해 메탄올 抽出物을 다양한 시간동안 處理하여 細胞를 包集한 후 "材料 및 方法"에 제시된 方法을 따라 核 抽出物만을 얻었다. 이 후 전기영동 및 nitrocellulose membrane 상으로의 吸着等을 거친 후 cyclin E에 대한 抗體를 사용하여 western blotting을 시행하였다. western blotting 결과 50kda 과 42 kda의 分子量을 갖는 두 개의 band가 관찰되었다(Fig. 6). 그러나 Cyclin A 의 發顯樣相과는 달리 cyclin E蛋白質은 藥材 處理 12시간 후부터 약간 增加하기 시작하였다. 이러한 현상은 分子量 42kDa의 band에서 보다 현저하게 확인되었다.

## 7. 白花蛇舌草 抽出物에 의한 HL-60 癌細胞 枯死時 CDK2 蛋白質의 發現 變化에 미치는 影響

Cyclin과 결합하여 그 作用을 나타낼 수 있는 cyclin dependent kinase (CDK)는 cyclin과 더불어 주요한 細胞週期 調節因子이다. 酵母에서 처음 cdc2 (cell devision cycle)가 밝혀진 이후 CDK2, CDK3, CDK4, CDK5 및 CDK6 등이 動物細胞에서 존재함이 밝혀졌다. 본 實驗에서는 白花蛇舌草 메탄올抽出物 處理에 의한 CDK2의 시간별 發顯樣相 變化를 측정함으로써 이들이 白花蛇舌草 메탄올抽出物 處理된 HL-60細胞의 細胞週期 變化 過程 중에서의 역할을 규명하고자 하였다. 메탄올 抽出物을 다양한 시간동안 處理하여 細胞를 包集한 후 "材料 및

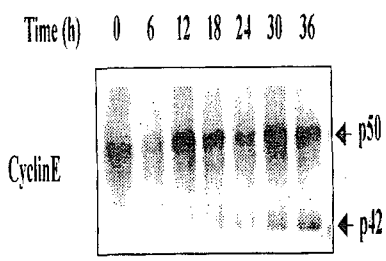


**Fig. 6.** Methanol extract of Hedyotis diffusa markedly increased the level of cyclin E. The HL-60 cells were treated with 200 μg/ml of methanol extract for the indicated periods. The nuclear extract were prepared and analyzed by western blotting using anti-cyclin E antibody.

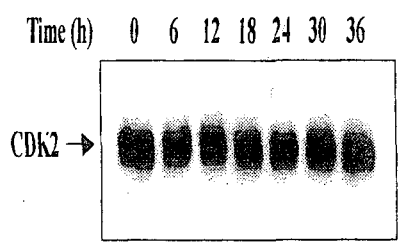


**Fig. 7.** Methanol extract of Hedyotis diffusa markedly did not affect the level of CDK2. The HL-60 cells were treated with 200 μg/ml of methanol extract for the indicated periods. The nuclear extract were prepared and analyzed by western blotting using anti-CDK2 antibody.

方法"에 제시된 方法을 따라 核 抽出物만을 얻었다. 이 후 전기영동 및 nitrocellulose membrane 상으로의 吸着等을 거친 후 CDK2 에 대한 抗體를 사용하여 western blotting을 시행하였다. CDK2 蛋白質의 發顯樣相은 藥材處理후 處理時間에 상관없이 거의 동일한 발현수준을 나타내었다 (Fig. 7)

## Ⅳ. 考　察

腫瘍은 組織의 自律的인 過剩成長이며, 이것은 個體에 대해서 意義가 없거나 이롭지 않을 뿐더러 正常組織에 대해서 破壞的인 것을 말한다[21]. 癌의 原因으로는 食餌의 變化와 外部 環境에서 化學的 및 物理的 因子에 대한 露出 等을 들 수 있으며, 環境因子로는 크게 放射線, 多樣한 化學物質 및 바이러스가 있을 수 있다[22]. 癌의 治療方法에는 手術療法, 放射線療法, 化學療法 등이 使用되고 있는데 手術療法과 放射線療法 局所性 癌에 適用되는 限界가 있고, 化學療法은 個體의 抵抗力이 너무 떨어진다는 副作用이 있다[23].

韓醫學에서 癌은 瘤, 岩, 癥瘕, 積聚, 崩漏, 噎膈, 腸覃, 失榮, 舌菌, 茧脣 等의 範疇에 속하며[24], 原發性 原因으로는 風, 寒, 暑, 濕, 燥, 火의 外感原因과 情志鬱結, 飮食傷, 過勞의 內傷原因이 있고, 續發性 原因으로는 痰飮, 瘀血로 分類된다[25].

腫瘍에 대한 韓醫學的 治療方法은 主로 扶正培本을 基礎로 하여 淸熱解毒, 以毒攻毒을 配合하는 것이다. 扶正培本法은 人體의 抗癌能力을 增强시키는 모든 方法을 말하며, 淸熱解毒法은 腫瘍을 直接 抑制하거나 腫瘍細胞를 殺害하고, 人體의 免疫能力을 增强시키는 作用을 한다[26]. 現代的인 藥理硏究와 臨床觀察을 통해 白花蛇舌草, 紫草, 白英, 半枝蓮, 山豆根과 같은 많은 淸熱解毒 藥物은 直接 혹은 間接的으로 腫瘍細胞抑制作用이 있음이 證明되고 있으며, 특히, 白花蛇舌草는 抗癌作用과 백혈병세포, 간암 세포, 생쥐의 유선육종인 랫트의 유선육종세포주W256, 자궁 경부암세포주인 U14, 육종세포주인 S180 등에 억제作用이 있고, 망상내피계통을 顯著하게 增生하며, 貪食活性 및 白血球의 貪食機能을 增强시켜 人體免疫 過程 中 防禦 機能을 顯著하게 增强시켜 준다[26].

최근 硏究에 의하면 洋方에서 흔히 使用되는 많은 抗癌劑들이 作用機轉에 관계없이 多樣한 細胞主에서 apoptosis를 誘導함이 밝혀져 있고[27], 한편 각종 자극에 의해 이러한 apoptosis가 誘導되면서 여러 가지 細胞週期 調節因子의 變化 역시 수반된다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 白花蛇舌草 메탄올抽出物에 의해 誘導되는 apoptosis에서 細胞週期調節 因子들의 發顯 變化를 조사함으로서 白花蛇舌草의 抗癌效果에 대한 分子生物學的 機轉의 이해를 유추하고자 하였다.

먼저 이러한 白花蛇舌草 抽出物들이 HL-60 細胞에 직접적으로 殺傷作用을 일으키는지를 알아보기 위하여 抽出物을 濃度別로 處理한 결과 메탄올 抽出物만이 濃度 依存的인 癌細胞의 죽음을 초래하는 細胞毒性 效果를 나타냄을 확인하였다 (Fig. 1). 본 연구자의 공동연구자들에 의해 이러한 메탄올 抽出物 處理에 의한 HL-60 細胞의 죽음은 DNA fragmentation, caspase 活性化 等이 수반되는 apoptotic process에 의한 細胞죽음임이 확인되었다. 최근 여러 연구들에 의해 apoptosis때에 細胞週期調節의 變化가 수반된다는 것이 보고되어 있어 白花蛇舌草 메탄올 抽出物에 의한 HL-60細胞 죽음시 나타나는 細胞週期 調節因子들(cyclin A, cyclin E, CDK2,

p21/Cip1, p27/Kip1 및 p53)의 發顯 樣相을 蛋白質 수준에서 調査하기 위하여 western blot analysis를 수행하였다. 實驗結果 가장 의미있는 結果는 p21/Cip1 및 p27/Kip1의 相反的인 發顯樣相 變化였다. p21은 CDK2와 反應하는 蛋白質로서 처음 알려졌으며[28], wild type p53의 活性化에 의해 發顯이 誘導되어진다[39]. 이렇게 發顯된 p21은 p21의 N-termianl 部位를 통해 G1 cyclin-CDK 複合體와 결합하여 cell cycle 進行을 방해하며 p21의 c-terminal 部位를 통해서는 proliferating cell nuclear antigen (PCNA)에 結合하여 PCNA에 의한 DNA polymerase δ의 活性化를 沮害한다고 報告되고있다[30]. 최근에 p21/Cip1이 apoptosis 細胞를 보호할 수 있는 또 다른 중요한 機能이 報告되었다. 예로서 Gorospe등은 p21/Cip1이 人間 黑色腫(melanoma cells)細胞의 p53 媒介性 apoptosis를 저지할 수 있음을 報告하였다[31]. 또한 MCF-7 細胞에서도 prostaglandin A2에 의한 스트레스성 apoptosis를 p21/Cip1의 發顯이 沮止할 수 있음이 報告되었다[32]. 한편 Asada 등은 p21의 역할이 cell cycle progression 혹은 apoptosis를 방해하는 쪽으로 作用할지는 p21/Cip1의 細胞내에서의 존재위치에 달려있다고 報告하였다. 예를 들면 未成熟 單核球(monocytes)에서 發顯시킨 p21/Cip1은 核에 존재하며 分化(differentiation) 誘導와 연관된 cell cycle의 arrest를 야기시킨다. 이어 未成熟 單核球의 分化는 核속의 p21/Cip1이 細胞質로의 재배치와 연관되어 있다. 細胞質內 p21/Cip1은 apoptosis signal-regulating kinase-1 (ASK1)과 complex를 형성하여 스트레스등에 의한 ASK1 및 그 아래의 SAPK/JNK등이 活性化되는 것을 차단하여 apoptosis를 저지한다[33]. 또한 Zhang 等은 p21/Cip1이 caspase-3에 의하여 cleavage되며 이때 이 p21/Cip1은 PCNA에 binding하는 능력을 상실하며 또한 核속에 위치하는 능력을 상실하게된다고 報告하였다. 따라서 이들은 caspase-3에 의하여 잘려진 p21/Cip1은 癌細胞를 growth arrest 상태로부터 apoptosis를 진행하는 상태로 전환시켜 癌細胞의 chemotherapy- induced apoptosis를 促進시킬 수 있다고 報告하였다[34]. 본 硏究에서도 p21/Cip1의 發顯은 白花蛇舌草 메탄올 抽出物 處理후 處理時間에 의존적으로 줄어드는 것이 觀察되었다. 이것은 앞선 언급된 先行硏究者들의 硏究內容에 비교하여 설명해보면 核속의 p21/Cip1 역시 메탄올 抽出物 處理시 이루어지는 apoptotic death signal 傳達過程의 일환으로 활성화되는 caspase-3등에 의해 切斷되어 cell cycle를 arrest 할 수 있는 效果를 상실하며 또한 ASK1에 附着할 수 있는 能力이 상실되어 ASK1/SEK1/JNK1 등의 일련의 apopotisis를 촉진시키는 信號傳達過程을 活性化시키는 것으로 사료된다. 이러한 점은 白花蛇舌草 메탄올 抽出物을 연구하는 본 硏究의 共同硏究者들에 의해 白花蛇舌草 메탄올 抽出物 處理시 caspase-3를 포함한 다양한 caspase의 活性化가 일어난다는 것을 證明한 것에서도 立證되고 있다.

한편 p27/Kip1 역시 다양한 cyclin과 CDK의 複合體의 活性化를 저해함으로서 G1에서 S phase로의 轉移를 조절하는 중요한 細胞週期調節因子이다. p27遺傳子가 결여된 생쥐의 경우 成長이 促進되며, 다양한 기관의 異常增殖(hyperplasia), pituitary tumor의 自然 發生등이 나타나고 있다[35].흥미롭게도 p27 遺傳子는 人間癌細胞들에 있어 突然變異의 명백한 대상이 아니지만[36] p27 發顯減少가 breast cancer의 治療時 豫後가 좋지 않음이 報告되고있다[37-38]. 또한 Fugieda등은 p27의 發顯은 Bax등의 發顯을 促進시킴으로서 oral 및 oropharngeal carcinoma 등에서 일어나는 spontaneous

apoptosis에 밀접한 연관이 있다고 報告하였다[39]. 따라서 이러한 先行硏究者들의 結果는 본 硏究에서 觀察된 白花蛇舌草 메탄올 抽出物에 의한 p27/Kip1의 發顯增加(Fig. 3). 및 Bax의 發顯增加 (본 硏究者의 共同硏究結果- data not shown)가 癌細胞 apoptosis에 밀접하게 관련되어 있음을 시사한다. 보다 흥미로운 것은 동일하게 CDK inhibitor로 作用하는 p21/Cip1 및 p27/Kip1이 白花蛇舌草 메탄올 抽出物에 의한 癌細胞 枯死時 그 發顯이 相反되게 나타나는 것이다. 이는 아마도 이 調節因子들이 細胞週期 調節이외의 또 다른 機能을 수행하리라 사료된다.

한편 본 硏究에서 동일한 G1 cyclin에 속하는 cyclin A 와 cyclin E의 發顯 樣相 變化가 약간은 相反되게 나타나고 있어 細胞週期가 G1에서 S phase로의 轉移 與否는 명확하게 판단할 수 없었다. 이는 追後 類細胞分析機등을 사용한 보다 자세한 硏究를 통해 밝혀야 되리라 사료된다.

마지막으로, 본 硏究에서 白花蛇舌草 메탄올 抽出物을 HL-60細胞에 處理하여 p53의 發顯樣相을 조사하였는바 p53의 뚜렷한 發顯增加를 확인하였다. 그러나 일반적으로 HL-60 細胞主는 p53을 가지지 않은 細胞로 알려져 있어 이에 대한 설명이 요구된다. Band등은 HL-60 細胞主들 (Clones) 및 HL-60로 부터 유래된 것으로 생각되는 BII 細胞主들을 Southern blot analysis를 통해 p53遺傳子의 存在 與否를 확인하였다. 이 결과, HL-60 細胞主들에서는 대부분 p53遺傳子가 결여된 상태를 나타냈으나 BII 細胞主들은 p53遺傳子를 가지고 있는 것으로 확인되었다고 보고하였다[40]. 이러한 결과로부터 유추해 볼 때 대부분의 HL-60 細胞主는 p53 遺傳子가 결여되어 있지만 소수의 HL-60 clone은 p53遺傳子를 지니고 있는 것으로 사료되며, 또한 HL-60 로부터 유래된 細胞들에서 p53 遺傳子가 정상적으로 존재할 수 있음을 추측할 수 있다. 이러한 가능성을 생각하면 우리가 관찰한 p53의 發顯增加는 Northern blotting등을 통해 보다 면밀하게 p53遺傳子의 存在與否 및 發顯增加與否를 조사하여야 할 것으로 생각된다.

이상의 結果로 종합하면, 白花蛇舌草 메탄올 抽出物에 의한 HL-60 癌細胞의 死滅時 細胞週期調節 因子들의 發顯樣相 變化를 조사한 바 p21/Cip1의 時間依存的 減少 그리고 p27/Kip1의 時間依存的 增加가 두드러진 변화로 觀察되었다. 이들 因子들의 發顯 樣相變化는 apoptosis 誘導와 밀접한 연관이 있는 것으로 사료되며, 추후 그 구체적인 作用機轉이 더 밝혀지면 apoptosis機轉에서의 細胞週期調節因子의 역할들에 대한 이해를 넓힐 수 있으며 이를 바탕으로 보다 나은 抗腫瘍 治療劑의 開發이 가능할 것으로 생각된다.

## Ⅴ. 結　論

白花蛇舌草의 메탄올 抽出物이 사람의 白血病에서 유래된 HL-60 癌細胞에 어떠한 影響을 미치는지를 규명하기 위하여 細胞週期調節因子의 發顯樣相 變化들을 관찰하였던 바 아래와 같은 結論을 얻었다.

1. 白花蛇舌草 메탄올抽出物은 濃度 依存的으로 癌細胞 HL-60의 죽음을 유발시켰다.
2. 白花蛇舌草 메탄올抽出物을 HL-60 細胞에 투여 후 western blot analysis를 통해 p21/Cip1의 發顯樣相變化를 조사한 결과 메탄올 處理時間에 依存的으로 p21/Cip1

의 蛋白質의 減少가 진행되었다.

3. 白花蛇舌草 메탄올抽出物을 HL-60 細胞에 투여 후 western blot analysis를 통해 p27/Kip1의 發顯樣相變化를 조사한 결과 메탄올 處理時間에 依存的으로 p27/Kip1의 蛋白質 增加가 관찰되었다.
4. 白花蛇舌草 메탄올抽出物을 HL-60 細胞에 투여 후 western blot analysis를 통해 cyclin A 및 cyclin E의 發顯樣相變化를 조사한 결과, 메탄올 處理時間에 依存的으로 cyclin A 蛋白質은 減少되었지만 cyclin E 蛋白質은 增加되는 경향을 나타내었다.
5. 白花蛇舌草 메탄올抽出物을 HL-60 細胞에 투여 후 western blot analysis를 통해 CDK2의 發顯樣相變化를 조사한 결과, 메탄올 處理時間에 상관없이 일정하게 유지되었다.

이상의 結果로 보아 白花蛇舌草 메탄올 抽出物에 의한 HL-60 癌細胞의 死滅은 細胞週期 調節因子에서는 p21/Cip1의 減少, 그리고 p27/Kip1의 增加가 주로 apoptosis와 연관되어 있는 것으로 사료된다. 또한 cycin A의 점진적인 減少 및 cycin E의 增加도 apoptosis에 연관이 있으리라 사료되나 CDK2는 별다른 변화를 나타내지 않아 白花蛇舌草 誘導 apoptosis에는 별다른 影響을 주지 못하는 것으로 사료된다.

## 參考文獻


1. 大韓病理學會 : 병리학, 서울, 高文社, pp. 213-222, 231-258, 1994.
2. 李岩 : 腫瘤學, 北京, 人民衛生出版社, pp. 2-5, 1985.
3. 巢元方 : 巢氏諸病源候論, 臺中, 昭人出版社, p. 370, 1960.
4. 葉銘洪 : 治癌中藥及處方, 臺北, 華聯出版社, pp. 4-10, 48-50, 282-283, 1981.
5. 黃文東 外 : 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp. 486-496, 621-623, 627-631, p. 634, 1988.
6. 上海中醫學院 : 中醫學基礎, 香洪, 商務印書, p. 101, 1976.
7. 전국한의과대학본초학교수 : 본초학, p. 223, 1991.
8. 金聖勳 : 白花蛇舌草로부터 分離된 抗癌活性物質에 關한 硏究, 대전대학교 한의학연구소 논문집, 4(2) : 273-297, 1997.
9. 金聖勳 : 白花蛇舌草로부터 분리한 ursolic acid의 自然殺害效果와 抗轉移 作用, 대전대학교 한의학연구소 논문집, 5(2) : 523-533, 1997.
10. 宋昊埈, 金台晛 : 白花蛇舌草 煎湯液 投與가 마우스의 抗腫瘍 免疫反應에 미치는 影響, 本草分科學會誌, 9(1) : 83-97, 1994.
11. Cohen JJ. Apoptosis. Immunol. Today 14 : 126-130, 1993.
12. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death : the significance of cell death. Int. Rev. Cytol. 68 : 251-306, 1980.
13. Sherr, C. J. Cancer cell cycles. Science 274, 1672-1677, 1996.
14. Hickman, J. Apoptosis induced by anticancer drugs. Cancer metastasis Rev. 11, 121-139, 1992.
15. Sellins, K. S. Hypermia induces apoptosis in thymoctes. Radiat Res. 126, 88-95, 1997.
16. Jeong, J. Y., and Jue, D. M. Chloroquine inhibits processing of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. J Immunol 158, 4901-4907, 1997.

17. Xia Z, Dickens M, Raingaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Oppersing effect of ERK and JNK-p38 MAP kinase on apoptosis. Science 270: 1326-1331, 1995.
18. Allen RT, Cluck MW, Agrawal DK. Mechanism controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. CMLS. 54 : 427-445, 1998.
19. Widmann C, Gibson S. Caspase-dependent Cleavage of signaling proteins during apoptosis. J. Biol. Chem. 273(12) : 7141-7147, 1998.
20. Polyak, K. Lee, M. H., Erdjument-Bromage, H et. al. Cloning of p27Kip1, a cyclin dependent kinase and a potent mediator of extracellular antimitogenic signals. Cell 78, 59-66, 1994.
21. 서울대학교 의과대학 : 腫瘍學, 서울, 서울대학교 출판부, pp. *1-3, 1992*
22. 해리슨내과학 편찬위원회 : 해리슨 내과학 Ⅱ권, 서울, 정담, p. 1967, 1997.
23. 李文鎬 外 : 內科學(下), 서울, 학림사, pp. 2466-2467, 1986
24. 原安微中醫學院 : 中醫師臨床手冊, 서울, 成輔社, p. 219, 1983
25. 崔昇勳 : 동의종양학, 서울, 행림서원, pp. 19, 24, 207-218, 1995.
26. 문구, 정병학, 김병주 : 암 동서의 결합치료 권1, 익산, 원광대학교출판국, p258, 268, 1999
27. Raynal, P. and Pollard, HB. Annexins: The problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium and phospholipid-binding proteins. Biochemica et Biophysica Acta. 1197 : 63-93, 1997.
28. Harper, J. W., Adami, G. r., Wei, N., Keyomarsi, K.. and Elledge, S. J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinase. Cell 75, 805-816, 1993.
29. El-Deiry, W. S. et al., WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell 75, 817-825, 1993.
30. Chen, J., Jackson, P. K., Kirschner, M. W. and Dutta, A. Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. Nature 374, 386-388, 1995.
31. Gorospe, M., Cirielli, C., Wang, X., Seth, P., Capogrossi, M. C. and Holbrook, N. J. p21 (Waf1/Cip1) protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells. Oncogene 14, 929-935, 1997.
32. Guadagno, T. M. and Newport, J. W. Cdk2 kinase is required for entry into mitosis as a *positive regulator of cdc-2cyciln B kinase* activity Cell 84, 73-82, 1996.
33. Asada, M., Yamada, T., Ichijo, H., Delia, D., Miyazono, K., Fukumuro, K., and Mizutani, S. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21Cip1/WAF1 in monocyte differntiation. EMBO J. 18, 1223-1234, 1999
34. Zhang, Y., Fujita, N., and Tsuruo, T. Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts *cancer cells from growth arrest to undergoing* apoptosisis. Oncogene 18, 1131-1138, 1999.
35. Nakayma K, Ishida N, Shirane m, Inomata A, Inoue T, Shishido N, Horii I, Loh DY, Nayama K, Mice lacking p27(Kip1)display increased body size, multiple organ hyperplasia, and pituitary tumors Cell, 31;85(5):707-20, 1996.
36. Kawamata N, Morosetti R, Miller CW, Park

D, Spirin KS, Nakamaki T, Takeuchi S, Hatta Y, Simpson J, Wilcyznski S, et al, Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/Kipl in human malignancies, Cancer Res 1;55(11) : 2266-9, 1995.

37. Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, Alexander GM, Gatti LA, Firpo EJ, Daling JR, Robers JM, Expression of cell-cycle regulators p27Kipl and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young brest cancer patients, Nat med ;3(2) : 222-5, 1997.
38. Catzavelos C, Bhattacharya n, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, Shaw P, Yeger H, Morava-Protzner I, Kapusta L, Franssen E, Pritchard KI, Slingerland JM, Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kipl protein: prognostic implications in primary breast cancer, Nat Med ;3(2) : 227-30, 1997.
39. Fujieda, S., Inuzuka, M., Tanaka, N., Sunaga, H., Fan, G. K., Ito, T., Sugimoto, C., Tsuzuki, H., and Saito, H. Expression of p27 is associated with Bax expression and spontaneous apoptosis in oral and oropharyngeal carcinoma. Int. J. Cancer 84, 315-320, 1999.
40. Band, H., Corredor, V., Lustgarten, J., Huebner, K., Griffin, J. D., Kufe, D. W., Yunis, E. J. Southern blot analysis of BII cell line - a putative variant of HL-60. Leukem, 1987.