

알킬화제인 MMS를 선처리한 NIH3T3 세포에서 소목 추출물에 의한 세포고사의 촉진

황성진 · 이정섭¹ · 전병훈² · 김원신 · 우은란³ · 박종군*

원광대학교 자연대 생명과학부
¹조선대학교 자연대 생물과학부
²원광대학교 한의과대학
³조선대학교 약학대학

Extracts of *Caesalpinia sappan* L. Potentiate the Apoptosis of NIH3T3 Cells Exposed to Methymethane Sulfonate

SJ Hwang, JS Lee¹, BH Jeon², WS Kim, ER Woo³ and JK Park*

Division of Biological Science, Wonkwang Univ., Iksan, Chonbuk
¹Department of Biological Science, Chosun Univ., Kwangju
²College of Oriental Medicine, Wonkwang Univ., Iksan, Chonbuk
³College of Pharmacy, Chosun Univ., Kwangju

Abstract

In this study we have investigated the effect of *Caesalpinia sappann* L. extracts on the apoptosis in NIH3T3 cells exposed to methylmethan sulfonate (MMS), an alkylating agent. MTT assay study showed that *Caesalpinia sappann* L. extracts potentiate the MMS-induced viability. Cell morphology studies, acridine orange (AO) staining, and DNA fragmentation analysis indicated that the postincubation of *Caesalpinia sappann* L. extracts increase the nuclear condensation of MMS-induced apoptotosis. These results suggest that *Caesalpinia sappann* L. extracts contain components potentiating MMS-induced apoptosis of NIH3T3 cells

Key words – *Caesalpinia sappann* L., MMS, apoptosis, NIH3T3

서 론

콩과(Legminosae) 식물인 소목(*Caesalpinia sappann* L.)은 관목의 껍질을 제거한 심재를 건조한 한약재로 중국의 광서성, 광둥성, 대만과 서남아시아에 주로 분포하며 산비탈에

서 자란다[17]. 한약제로써 소목은 혈기통, 이질, 파상풍, 울종에 효능을 보이고, 항균작용, 중추억제작용, 및 심혈관의 억제작용을 한다[14-16]. 소목의 주요성분은 정유, 페놀성 화합물(Brazilin and hematoxylin), 지방산-에테르 및 배당체로 구성되어있다[9]. 기존의 소목 추출물을 이용한 연구는 항균 효과를 이용한 김치 숙성[5], 세포독성 효과와 topoisomerase I 억제 활성작용[3], 항산화 활성 효과 및 물질분리[6], 위암 세포주에서의 세포독성효과[11]가 이루어졌고, 최근의 연구

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 063-850-6200, Fax : 063-843-2781
E-mail : jkpark@wonkwang.ac.kr

에서는 페놀성 화합물인 brazinin 및 brazileine 등의 gastric mucosa와 intestinal metaplasia에 대한 안전한 투약효과[7], 혈관확장 효과[13] 및 anticomplementary 효과[10], BrCCl3-유도성 독성에 대한 rat 간암세포에 대한 보호 효과[8] 및 면역증진 효과[2]에 관한 보고가 있다.

암의 치료법으로 기존의 치료법은 정상세포와 암세포를 선택적으로 명확히 구분을 못하는 수술요법, 방사선요법, 화학치료법등이 주를 이루고 있으며, 이점을 보완하기 위하여 세포독성이 약하지만 기존 항암제와 병용 투여하여 항암성을 증가시키고 부작용을 줄일 수 있는 세포고사(apoptosis)나 면역요법 및 혈관형성 저해 등과 관련된 새로운 방법의 연구가 활발히 진행중이다. 유전독성(genotoxicity)은 대부분의 생명체의 유전인자인 DNA나 몇 가지로 국한된 생명체의 유전인자인 RNA에 대한 구조 및 기능적인 변화에 의해 야기되는 돌연변이(mutagenesis), 기형유발(teratogenesis), 및 노화(aging)등의 세포 생리적 장애를 일컫는데, 이러한 유전독성의 결과, 또는 동반되어 나타나는 현상이 세포독성(cytotoxicity)으로 세포수의 감소, 세포구조물의 파괴, 세포막의 손상 등의 다양한 현상들을 포함한다.

알킬화제들은 환경 안에서 자연적으로 존재하고 그리고 아마도 정상 대사 과정 중에서도 만들어진다[12]. DNA 알킬화제인 MMS는 박테리아나 동물배양세포의 돌연변이원으로 이용된다[4]. 본 연구에서는 알킬화제에 의한 세포독성의 증·감소 효과에 소목추출물이 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위하여 MMS를 선처리한 NIH3T3 세포에 정상 배지와 소목추출물이 첨가 된 배지로 배양한 후에 세포독성의 증·감소 결과를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

소목은 2001년 조선대학교 약학대학의 우은란교수 연구팀에서 추출한 것을 실험에 사용하였다.

시료의 조제

문헌조사 및 전통한약에 기초하여 소목을 Fig. 1에 따라 조제한 식물의 폐탄을 역기스 및 각 용매 분획물에 대하여 농축한 후 동결 건조하여 가루상태가 된 시료를 0.5% DMSO 용액에 녹여 0.45 membrane filter로 여과멸균하여 실험에

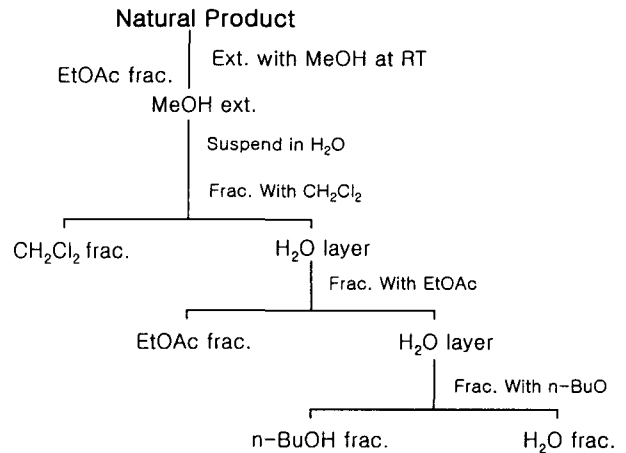


Fig. 1. Extraction and solvent fractionation of *Caesalpinia sappan* L.

사용하였다.

소목은 MeOH 추출(M), Methylene chloride fraction (D), EtOAc fraction (E), n-BuOH fraction (B), water fraction (H)해서 동량을 합한 후 25, 50, 100 μ g/ml 사용하였다.

세포주 및 세포배양

실험에 사용한 세포주는 한국세포주은행(KCLB)에서 분양받은 mouse 섬유아세포인 NIH3T3 세포를 이용하였고, 이세포들은 plastic petri dishes상에서 37°C CO₂ humidified incubator에서 10% fetal bovine serum, penicillin (100U/ml) 및 streptomycin (100 μ g/ml)이 존재하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies, Inc.) 조건에서 배양하였고, exponential phase의 세포들을 0.025% trypsin-EDTA를 이용해서 계대배양을 하였다. 배양액의 pH는 7.2-7.4로 10mM HEPES buffer와 0.37% sodium bicarbonate를 이용해서 적정하였다.

Mutagen

Methylmethane sulfonate (MMS, Sigma)는 9M 용액을 DMEM을 이용하여 실험에 유용한 농도로 희석해서 이용하였다.

MTT 분석법

MTT ((4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltertrazolium bromide) dye assay는 1988년에 Alley등[1] 방법에 의해서

수행하였다. NIH3T3 세포를 96well plate에 1×10^3 cells/ml 씩 각각 triplicate seeding하고 24시간동안 배양 후 serum이 들어가지 않은 배지에서 MMS 1mM, 1시간동안 처리 후 phosphate-buffered saline (PBS, 150mM NaCl, 3mM KCl, 12mM Na_2HPO_4 , 2mM KH_2PO_4)로 2회 세척한 후 정상배양액과 정상배양액에 다양한 농도로 소목추출액을 희석해서 6시간동안 배양한다. 5mg/ml MTT dye를 각각의 well에 첨가한 후 4시간동안 배양하고, MTT dye가 함유된 배양액을 버리고 dimethylsulfoxide (DMSO)로 살아있는 세포를 용해시켜 ELISA reader로 570nm에서 측정하였다.

세포형태관찰

세포 수 4×10^5 을 35mmdish에서 배양하고, MMS 1mM, 1시간동안 처리한 후 PBS로 2회 세척한 후 정상배양액과 정상배양액에 다양한 농도로 소목추출액을 희석해서 6시간동안 배양하고, 대조군으로 MMS를 처리하지 않은 세포에 소목추출액을 처리하였다. 위상차현미경을 이용하여 세포형태를 관찰하였다.

세포고사형태관찰

세포형태관찰과 마찬가지로의 방법과 같이 세포에 소목추출액을 처리하고, 0.025% trypsin-EDTA를 이용하여 단세포화 시킨 후 $15 \mu\text{M}$ AO (acridine orange)로 염색하였다. 이 세포들을 Zeiss Axioskop 2 Plus fluorescence microscope의 fluorescence filter (excitation 450-490nm 그리고 dichroic 510nm)와 long-band-pass emission filter 520nm를 이용해서 살아있는 세포들의 핵을 염색해서 관찰하였다.

DNA fragmentation 분석법

세포형태관찰과는 달리 60mmdish에서 소목추출액을 처리하고 수거하여 1000rpm에서 2분동안 원심분리 한다. 상층액을 제거하고 PBS로 2회 세척하고, proteinase K reaction buffer (10mM EDTA, 50mM Tris-HCl(pH8.0), 0.5% SDS)를 넣고 50°C에서 1시간 반응시켰다. Phenol/chloroform으로 2회 가하여 수층을 회수하고, 수층의 2배의 95% EtOH를 넣고 -70°C에서 2시간동안 DNA를 침전시켰다. 공기 건조로 완전히 말린 후 TE buffer (pH 8.0)을 이용하여 녹인다. 1.5% 아가로스 겔에 DNA를 전기영동하고 EtBr로 염색한 후 UV-transilluminator에서 확인하였다. 200bp 간격의 DNA lad-

der가 관찰되는지 여부로 세포고사 유도를 확인하였다.

결과 및 고찰

NIH3T3 세포에 적당한 상해를 입히기 위하여 MMS의 농도별 실험을 통하여 얻은 결과 1mM, 1시간동안 처리하면 세포독성이 약 15% 정도의 세포생존률을 감소시킴을 MTT 분석을 통해서 알 수 있었고(data not shown), 그리고 정상배지(GM, growth medium)로 교환 후 6시간동안 배양했을 때 28%정도의 세포생존률이 감소됨이 관찰되었다(Fig. 2 GM). 반면에 소목추출물 만을 농도별로 처리하면 정상세포의 세포생존률과의 차이가 나지 않는 것으로 봐서 최고 농도인 $100 \mu\text{g/ml}$ 에서도 소목추출물 자체적인 세포독성은 존재하지 않음을 알 수 있고(Fig. 2 MMS-, 25, 50, $100 \mu\text{g/ml}$ 소목추출물), MMS를 처리한 세포군에 소목추출물을 처리하고 6시간동안 배양하면 세포생존률이 소목추출물을 농도별로 처리했을 때 정상배지의 교환시 보다 더 감소됨이 관찰되었고(Fig. 2 MMS+, 25, 50, $100 \mu\text{g/ml}$ 소목추출물), 특히 소목 $100 \mu\text{g/ml}$ 에서는 50% 이상 세포생존률이 감소하였다. 결과적으로 소목추출물 자체적으로는 세포독성이 없으면서 DNA 상해에 대해서는 세포독성을 촉진시켜 세포사

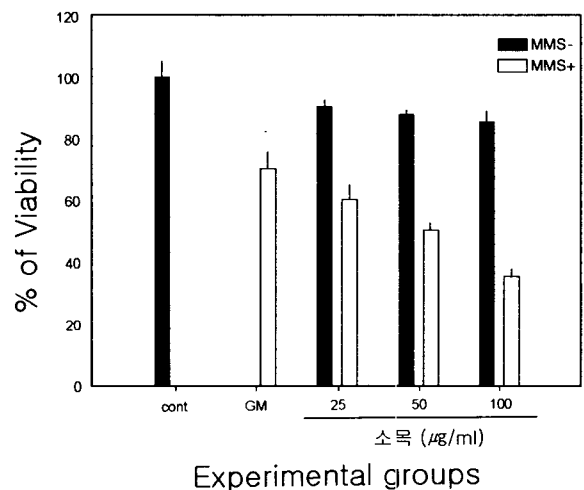


Fig. 2. Effect of *Caesalpinia sappan* L. extracts postincubation on the cytotoxicity of MMS (1mM, 1hr)-treated NIH3T3 cells.

Cells tested with MMS (grey bars) or not (black bars) were incubated for 6hr with either growth medium (GM) or various concentrations (25-100 $\mu\text{g/ml}$) of *Caesalpinia sappan* L. extracts and then processed for MTT assay.

멸에 이르게 함을 내포하고 세포고사에 의해서 세포생존률이 감소함이 시사되었다.

MTT 분석결과를 토대로한 소목추출물의 세포생존률을 세포형태로써 관찰했는데, 이 결과도 Fig. 2와 마찬가지로 소목추출물 자체적인 세포독성은 나타나지 않지만, 세포에 MMS를 선처리한 후에 소목추출물에서는 농도 의존적으로 정상배지에서 교환보다 더 세포독성을 증가시켜 세포사의 촉진시킨 결과를 얻었다(Fig. 3). 이러한 현상은 세포가 세포

사멸의 형태를 보여줌으로써 알 수 있다. 특히 MMS 선 처리 후의 50과 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 경우 세포막의 blebbing 및 응축 현상에 의해서 세포사멸이 일어남이 관찰되었다.

또한 세포독성의 증가 촉진 현상이 나타남이 세포고사의 특징적인 현상으로 나타남이 관찰되었다(Fig. 4). 정상적인 세포의 경우 AO에 의한 세포는 green색을 띄며 핵의 특징이 정상적으로 관찰되었고(Fig. 4a), 또한 소목추출물 자체적인 효과는 정상적인 세포와 거의 차이가 나지 않았다(Fig.

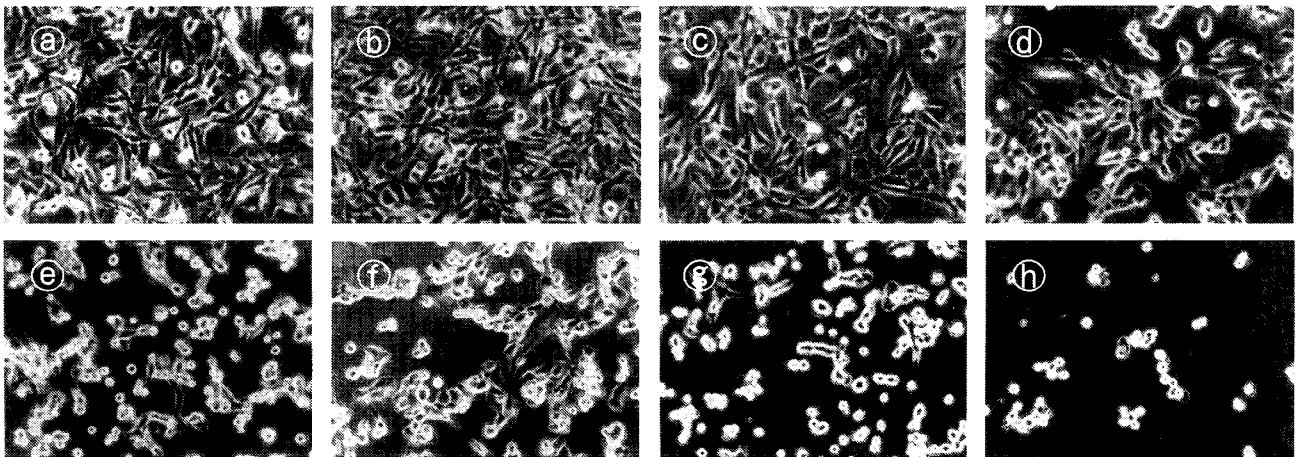


Fig. 3. Effect of *Caesalpinia sappan* L. extracts postincubation on the morphological changes of MMS (1mM, 1hr)-treated NIH3T3 cells.

MMS-nontreated (a-d) or treated (e-f) cells were postincubated with growth medium (a and e), 25 $\mu\text{g/ml}$ *Caesalpinia sappan* L. extracts (b and f), 50 $\mu\text{g/ml}$ *Caesalpinia sappan* L. extracts (c and g) or 100 $\mu\text{g/ml}$ *Caesalpinia sappan* L. extracts (d and h) for 6 hrs. Original magnification, X200.

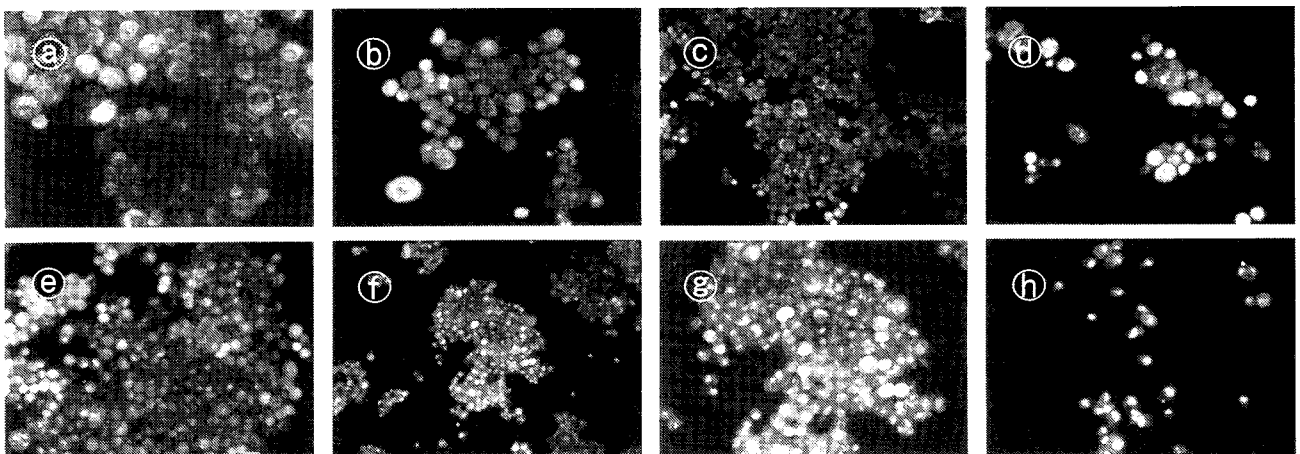


Fig. 4. Acridine orange staining for the effect of postincubation with growth medium (a and e, 6hrs), 25 $\mu\text{g/ml}$ *Caesalpinia sappan* L. extracts (b and f, 6hrs), 50 $\mu\text{g/ml}$ *Caesalpinia sappan* L. extracts (c and g, 6hrs) or 100 $\mu\text{g/ml}$ *Caesalpinia sappan* L. extracts (d and h, 6hrs) on the apoptosis of NIH 3T3 cells exposed to 1 mM MMS for 1hr (e h) or not (a d).

요 약

본 연구에서는 알킬화제인 methylmethane sulfonate (MMS)를 선처리한 NIH3T3 세포에서 소목추출물의 효과를 분석하였다. MTT 분석결과 MMS에 의해서 유도된 세포생존률이 소목추출물에 의해서 감소되었다. 세포형태분석, acridine orange 염색법, 그리고 DNA fragmentation 분석에서 MMS에 의해서 유도된 세포고사의 특징인 핵 응축 및 DNA laddering이 소목추출물에 의해서 증가됨이 관찰되었다. 이러한 결과들로 소목추출물은 NIH3T3 세포에서 MMS에 의해서 유도된 세포고사를 촉진시킴을 보여준다.

감사의 글

본 연구는 2001년 보건복지부의 과제인 한방치료기술연구 개발사업(HMP-99-O-01-0003)의 지원에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

1. Alley, M. C., M. L. Hursey, R. H. Shoemaker, J. G. Czerwinski, D. L. Fine and B. J. Abbott. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* **48**, 589-601.
2. Choi, S. Y., K. M. Yang, S. D. Jeon, L. Y. Kim, T. S. Chang and C. K. Moon. 1997. Brazilin modulates immune function mainly by augmenting T cell activity in halothane administered mice. *Planta Medica.* **63(5)**, 405-408.
3. Jeon, W. K., K. J. Park, S. Y. Kim, J. Y. Ma and H. J. Sung. 1999. In vitro studies on the anticancer effect and topoisomerase I inhibition activity of *Caesalpinia sappan* L. extract. *Kor. J. Pharmacogn.* **30(1)**, 1-6.
4. Lawrence, C. W. 1991. Classical mutagenesis techniques. *Method Enzymol.* **194**, 273-281.
5. Lee, S. H., W. J. Choi, O. K. Jo and S. J. Son. 1997. Antimicrobial activity of ethanol of *Caesalpinia sappan* L. and Effect of the extract on the fermentation of *Kimchi*. *J. Food Sci. and Technol.* **9**, 167-171.
6. Lim, D. K., L. U. Choi and D. H. Shin. 1996. Antioxidative activity of some solvent extract from *Caesalpinia sappan* L. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **28(1)**, 77-82.

4b-d), 반면에 세포에 MMS를 선처리한 후에 정상배지에서는 약 30% 정도의 세포고사 특징의 세포가 관찰되었고(Fig. 4e), 소목추출물에서는 정상배지에서 보다 더 세포고사의 특징인 orange 색깔을 띠며 핵 응축 현상을 수반하는 세포고사 특징 세포가 증가했음이 관찰되었다(Fig. 4f-h). 100 μ g/ml에서는 선행되었던 MTT 분석이나 세포 형태 분석의 결과보다 더 세포고사의 특징이 현저하게 나타나고 있다.

Fig. 5에서 보여주는 결과는 소목추출물의 세포독성 증가를 촉진시켜서 세포고사의 촉진이 확실하게 나타남이 DNA fragmentation 결과에서 보여지고 있다. 정상세포와 소목추출물만을 처리한 세포에서는 DNA에 아무런 이상이 없는 형태로 보여졌다. 그러나, MMS를 선처리한 후 정상배지에서 배양된 세포에서는 약간의 DNA fragmentation이 나타났고(Fig. 5. lane 2), 반면에 50 μ g/ml 소목추출물이 처리된 세포에서는 정상배지로 교환된 배지와 비슷한 수준에서 DNA fragmentation이 나타났고(Fig. 5. lane7) 100 μ g/ml에서는 확실하게 DNA fragmentation이 증가했음을 관찰할 수 있었다(Fig. 5. lane8). 이러한 결과는 100 μ g/ml 소목추출물이 DNA 상해에 의한 세포고사를 촉진함을 알 수 있었다. 이후의 연구에서는 이러한 효과의 구체적인 기작에 대해 규명하고자 한다.

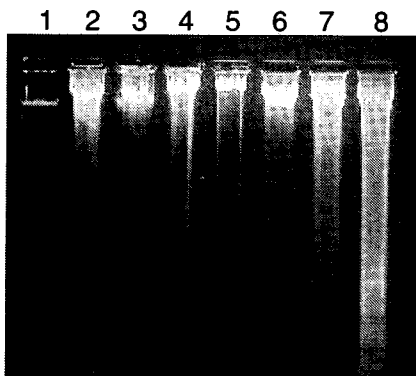


Fig. 5. DNA fragmentation of MMS (1mM, 1hr)-treated NIH3T3 cells postincubated for 6 hrs with various concentrations of *Caesalpinia sappan* L. extracts. MMS-nontreated (1, 3, 4, 5) or treated (2, 6,7) cells were postincubated with growth medium (1 and 2), 25 μ g/ml *Caesalpinia sappan* L. extracts (3 and 6), 50 μ g/ml *Caesalpinia sappan* L. extracts (4 and 7) and 100 μ g/ml *Caesalpinia sappan* L. extracts (5 and 8), and then processed for DNA fragmentation analysis.

7. Liu, X. R., W. Q. Han and D. R. Sun. 1992. Treatment of intestinal metaplasia and atypical hyperplasia of gastric mucosa with xiao wei yan powder. *Chung-Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih.* **12(10)**, 602-603, 580.
8. Moon, C. K., K. S. Park, S. G. Kim, H. S. Won and J. H. Chung. 1992. Brazilin protects cultured rat hepatocytes from BrCCl₃-induced toxicity. *Drug and Chemical Toxicology.* **15(1)**, 81-91.
9. Namikosi, M. and T. Saitoh. 1987. Homoisoflavoids and related compound. IV. Absolute configurations of homoisoflavonoids from *Caesalpinia sappan* L. *Chem. Pharm. Bull.* **35(9)**, 3579-3602.
10. Oh, S. R., D. S. Kim, I. S. Lee, K. Y. Jung, J. J. Lee and H. K. Lee. 1998. Anticomplementary activity of constituents from the heartwood of *Caesalpinia sappan*. *Planta Medica.* **64(5)**, 456-458.
11. Park, K. J., E. H. Kim, Y. A. Eun, B. J. Kang and H. J. Sung. 1997. Cytotoxic effect of Korean traditional prescription on the human gastric cancer cell lines. *Kor. J. Pharmacogn.* **28(4)**, 233-238.
12. Taverna, P. and B. Sedgwick. 1996. Generation of an endogenous DNA-methylating agent by nitrosation in *Escherichia coli*. *J. Bacterial* **171**, 5105-5111.
13. Xie, Y. W., D. S. Ming, H. X. Xu, H. Dong and P. P. But. 2000. Vasorelaxing effects of *Caesalpinia sappan* involvement of endogenous nitric oxide. *Life Sci.* **67**, 1913-1918.
14. 김창민, 신민교, 이경순, 안덕규. 1997. 중약대사전. pp. 3130-3133, 정담사, 한국.
15. 신문농출판공사. 1995. 중약대사전. pp.2782, 일중사, 한국.
16. 장상문, 최정, 김종원, 박병윤, 박선동. 1996. 한약자원식물학. pp. 519, 학문사, 한국.
17. 전국한의학대학 본초학교수. 1995. 본초학. pp.438, 영림사, 한국.

(Received February 27, 2002; Accepted April 3, 2002)