

실험적 간암모델에서 한국산 겨우살이 추출물 및 렉틴 투여가 전암성 병변의 생성 및 Apoptosis에 미치는 영향

김미정 · 이미숙* · 김정희†

서울여자대학교 자연과학대학 식품영양학전공

*서울대학교 의과대학 병리학교실

Effect of Korean Mistletoe Extract and Lectin on the Preneoplastic Hepatic Lesion and Apoptosis in Experimental Hepatocarcinogenesis

Mi Joung Kim, Mi Sook Lee* and Jung Hee Kim†

Dept. of Food and Nutrition, College of Natural Sciences, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

*Dept. of Pathology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract

This study was done to investigate the effects of Korean mistletoe water extract and lectin on the apoptosis and preneoplastic lesion in chemically induced rat hepatocarcinogenesis. To attain the above objectives, weanling Sprague-Dawley male rats were fed modified AIN-76 diets containing 10% corn oil for 9 weeks. One week after feeding starts, rats were intraperitoneally injected twice with a dose of diethylnitrosamine (DEN, 50 mg/kg body weight (BW)). Rats were provided with 0.05% phenobarbital (PB) in drinking water from one week after DEN treatment until the end of experiment. During the period of PB treatment, rats were injected with mistletoe extract (100 µg/kg BW) and lectin (10 µg/kg BW) twice a week. At the end of 9th week, rats were sacrificed and the formation of hepatic glutathione S-transferase placental form positive (GST-P⁺) foci, apoptosis, DNA fragmentation and apoptosis related proteins were determined respectively. The formation of GST-P⁺ foci was significantly decreased by mistletoe extract or lectin treatment. Although there was no effect on apoptosis and DNA fragmentation in hepatic tissue by mistletoe extract or lectin treatment, caspase-9 and fas-L were increased. These results suggest that Korean mistletoe extract and lectin have a potential to inhibit hepatocarcinogenesis by increasing apoptosis.

Key words: mistletoe, lectin, carcinogenesis, apoptosis, western blotting

서 론

겨우살이는 여러 나무에서 자라는 전세계에 걸쳐 있는 다년 생 반기생 상록 식물로 예로부터 동서양을 막론하고 질병치료에 사용하여 고혈압, 동맥경화증 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있으며(1), 유럽에서는 폐암, 결장암, 유방암 등의 암치료를 위하여 건강식품이나 주사제와 같은 의약품의 형태로 이용하고 있다.

유럽에서 암치료를 위한 겨우살이의 사용은 Steiner(2)에 의해 처음 제안되었다. 지금까지 겨우살이에 관한 연구는 주로 여러 암세포에 대한 세포독성 및 선택적인 세포독성 효과(3-5)와 항종양 면역조절작용에 관한 연구(6-8)로 겨우살이는 NK cell 및 macrophage에 대한 살균능력, 세포독성효과 및 면역력 증강 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(9-11). 겨우살이의 이런 효과는 렉틴, viscotoxins, 다당류 등의 고분자 물질에

의함이며, 특히 중요한 활성을 갖는 물질은 렉틴으로 알려져 있다(6). 렉틴은 NK cell과 cytotoxicity의 활성을 증가시켜 면역력을 증가시키며, 단백질 혹은 당단백질로 구성되어 있어 암세포의 세포표면에 있는 당과 결합하여 세포 내부로 침투함으로써 암세포에만 선택적으로 작용할 수 있다. 암세포 내로 침투한 렉틴은 진핵세포의 리보솜을 불활성화시켜 apoptosis를 억제하는 것으로 알려진 Bcl-2, c-IAP2와 같은 단백질 합성을 저해하거나 암세포의 세포막을 파괴하여 apoptosis로 유도하고, DNA 복구율을 증가시켜 정상세포로 돌아가게 한다고 한다(12,13). Bcl-2는 세포내 미토콘드리아와 결합하여 apoptosis를 유발시키는 cytochrome C가 용출되지 못하게 하는 작용을 하므로 cytochrome C에 의해 caspase-8이나 caspase-3, caspase-9이 활성화되어 apoptosis를 유도하는 작용을 차단하는 것으로 알려져 있으며, Fas는 fas-L과 결합함으로써 apoptosis를 유도하는 대표적인 단백질로 알려져 있다(14).

†Corresponding author. E-mail: jheekim@swu.ac.kr
Phone: 82-2-970-5646. Fax: 82-2-976-4049

이제까지 알려진 겨우살이 추출물을 이용한 암치료의 면역요법에서는 주로 유럽산 겨우살이 물 추출물을 이용한 것이 대부분이고, *in vitro* 실험 위주로 진행되어, 한국산 겨우살이를 이용한 동물실험이나 임상실험은 미흡한 실정이다. 또한 유럽 등 일부 겨우살이를 항암제로 이용하고 있는 외국의 연구들도 유방암, 폐암 등으로 우리나라에서 발병률이 높은 간암에 대한 연구는 부족한 실정이다. 그러나 본 연구진의 선행연구(15)에서 한국산 겨우살이 물 추출물과 렉틴이 실험적 간암모델에서 발암을 억제할 수 있는 가능성이 있는 것으로 나타났다.

따라서, 본 연구에서는 실험적으로 간암을 유도한 흰쥐에서 한국산 겨우살이 물 추출물과 이로부터 분리한 렉틴의 발암 억제 기전의 일환인 apoptosis와의 관련성을 조사하기 위하여 간세포 암의 초기지표로서 태반형 glutathione S-transferase 양성 병소의 면적과 수를 면역조직화학적으로 측정하고, 간세포 내 apoptosis 정도 측정, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), DNA fragmentation 및 apoptosis와 관련이 있는 단백질인 Bcl-2, c-IAP2, caspase 9, caspase-3, fas L 함량을 측정하여, 한국산 겨우살이의 발암억제 기전에 대해 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 실험설계

간암은 실험동물을 이용한 중기 간 발암모델인 Jang 등의 방법(16)으로 유도하였다. 80~90 g 정도로 이루어진 3주령 숫컷 Sprague-Dawley을 사용하여, 먼저 발암물질 투여군과 비투여군으로 나누고, 각각을 다시 겨우살이 물 추출물 또는 렉틴 투여군으로 나누어 실험군을 총 여섯 군으로 나누었다.

발암물질 투여는 실험개시 1주에 개시물질인 diethylnitrosamine(DEN)을 체중 kg당 50 mg농도로 생리식염수에 녹여 2회 복강 투여하였고, 1주일 후부터 음수에 0.05% phenobarbital을 섞어서 공급하여 발암의 촉진을 유도하였다.

겨우살이 물 추출물과 렉틴은 선행연구(15)에서와 같은 방법으로 추출 및 정제를 하여 미리 준비하였고, 겨우살이 물 추출물과 렉틴의 투여는 발암물질 투여 1주일 후부터 한국산 겨우살이 물 추출물을 100 µg/kg BW, 렉틴은 10 ng/kg BW 농도로 매주 2회 동일한 요일에 복강투여를 하였으며, 대조군은 주사에 의한 효과를 배제하기 위하여 동일한 양의 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4)를 투여하였다. 총 사육기간은 9주로 하였다(Fig. 1).

실험동물 희생 및 시료 수집

사육기간 종료 후 실험동물은 에테르로 마취하여 해부대에 고정시키고 개복한 후 간을 분리하여 무게를 측정하고, 간엽의 대표적인 세 부분에서 중심부분을 5 mm 두께로 절제하여 10% neutral buffered formaline에 24시간 실온에서 고정하였다.

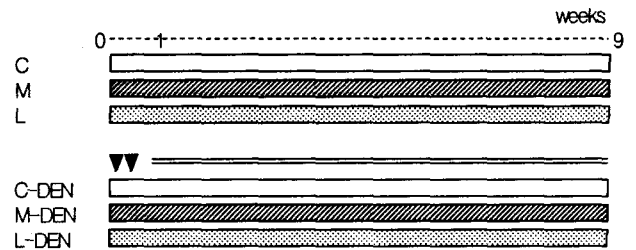


Fig. 1. Experimental design.

- ▼ DEN injection 50 mg/kg BW.
- == 0.05% PB in drinking water.
- C: Control group.
- ▨ M: Korean mistletoe 100 µg/kg BW injected group.
- ▩ L: Lectin 10 ng/kg BW injected group.

고정이 끝난 간 절편은 조직병리학의 일반적인 방법으로 함수, 탈수 처리를 거쳐 파라핀 블록을 만들었다. 파라핀 블록으로 만들어진 조직은 마이크로톰으로 약 4 µm두께의 미세절편을 만들어 슬라이드글라스에 부착시키고 수분을 건조시킨 후, 60°C 오븐에서 파라핀을 녹여 조직병리학적 염색에 사용하였다.

남은 간은 tube에 담아 액체질소로 급속 냉동시킨 후 -80°C 냉동고에 보관하였다가 western blot 및 DNA 분석에 사용하였다.

조직병리학적 측정

GST-P⁺ foci: GST-P⁺ (glutathione S-transferase placental form positive) foci는 일반적인 ABC법(17)을 이용하여 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 면역염색은 건조가 끝난 조직 슬라이드를 4단계의 xylene처리로 파라핀을 제거하고, 100%, 95%, 90%, 80%, 70%의 alcohol을 차례로 거치면서 함수시킨 후 실시하였다. 조직의 수세에는 cold PBS를 사용하였고, 3% H₂O₂로 내재성 peroxidase를 blocking시킨 후 포르말린 고정으로 인해 조직 내에 감추어진 항원을 노출시키기 위해 0.01 M citrate buffer(pH 6.0)에 담귀 압력솥에서 10분간 가열하였다.

가열이 끝난 조직 슬라이드는 실온에서 냉각시킨 후 정상 말혈청과 30분간 반응시키고, GST-P항체(polyclonal Ab, MBL, Japan)를 실온에서 2시간 반응시켰다. 그 후 cold PBS로 수세하고 이차항체인 biotinylated anti-mouse IgG(Research Genetics)를 30분간 반응시키고, 다시 cold PBS로 수세하여 avidin-biotin peroxidase complex(Research Genetics)와 30분 반응시켰다. 발색시약으로는 DAB(Zymed)를 사용하였고, Mayers hematoxylin(Research Genetics)으로 대조염색을 실시하였다.

광학현미경으로 foci의 수를 관찰하였고, 영상분석기로 간 절편의 넓이를 측정하여, 단위면적당 foci 수를 계산하고 이 수치를 통계에 이용하였다. GST-P항체는 1:200으로 희석하여 사용하였고, foci는 염색된 세포가 최소 5개 이상 되는 것으로 기준을 정하여 분석하였다.

PCNA: PCNA(Proliferating cell nuclear antigen)의 염색

방법은 앞에서 설명한 GST-P' foci와 동일하고 일차항체만을 PCNA 항체(monoclonal Ab, Santa-Cruz, USA)로 바꾸어 사용하였다. PCNA 항체의 희석 배율은 1:400으로 하였고, 염색의 결과는 현미경으로 관찰하여 양성반응의 빈도점수로 나타내었으며 핵에 진한 갈색으로 염색된 것을 양성으로 간주하였다. PCNA labelling index(LI)는 세포 1,000개중 양성세포의 수를 백분율로 나타내었다.

Apoptosis: 간조직 절편 상에서 apoptosis는 TACS 2 TdT-DAB apoptosis detection kit(Trevigen, USA)를 사용하여 측정하였다. 탈 파라핀과 합수과정을 거친 조직을 proteinase K로 먼저 처리하여 DNA를 노출시킨 후 37°C incubator에서 한시간 동안 TdT dNTP mix와 반응시키고, DAB로 발색시켜 현미경으로 염색유무를 관찰하였다. 양성대조염색은 nuclease를 처리하여 절단된 DNA가 염색되도록 하였으며, 음성대조염색은 methyl green을 사용하였다.

DNA fragmentation: 급속 냉동시켜 보관된 간조직에서 DNA 추출용 kit(QIAGEN, USA)를 사용하여 DNA를 분리하고, 1.5% agarose gel에 loading시켜 DNA fragmentation을 관찰하였다.

Apoptosis 관련 단백질 측정: Apoptosis에 관련된 단백질의 정량은 western blot법을 사용하여 측정하였다. 간조직을 막자사발에서 곱게 간 후 400 µL의 lysis buffer(150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 50 mM Tris, 1tablet/10 mL protease inhibitor)에 넣어 얼음 위에서 1시간동안 방치한다. 이를 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 buffer내에 녹아있는 단백질을 얻었고 BCA protein assay kit를 이용하여 단백질을 정량하였다.

각각의 단백질을 50 µg이 되게 분주하여 SDS sample buffer(4% SDS, 20% glycerol, 0.2% bromophenol blue, 2.8% 2-mercaptoethanol, 125 mM Tris-HCl pH 6.8)와 섞어 12%나 15%의 SDS-PAGE gel에 전기영동하여 단백질을 분리하였다. Gel을 전기적으로 nitrocellulose membrane에 옮긴 다음 이를 immunoblot에 사용하였다.

Nitrocellulose상의 비 특이적 반응을 막기 위해 membrane을 5% 탈지분유가 함유된 TBST(0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.2, 0.2% Tween20)로 30분간 blocking시키고 TBS(0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.2)로 20분간 씻어준 다음 일차항체를 1 mg/mL의 BSA가 들어 있는 TBST에 2 µg/mL의 농도로 희석하여 4°C에서 12시간 반응시켰다. 일차항체로는 Bcl-2, c-IAP2, caspase-9, caspase-3, fas-L(Santa Cruz, USA)를 사용하였다.

Membrane을 TBST로 10분씩 3번 씻어주고 이차 항체를 1:500의 비율로 2%탈지분유가 함유된 TBST에 희석하여 1시간 반응시킨 다음 TBST로 10분씩 3번, TBS로 1시간 씻어 주었다. ECL용액을 1:1로 섞어 membrane을 발광시킨 후 X-ray film에 노출하여 band를 얻었다.

Band의 density는 CCD 카메라로 이미지를 읽고 BAS 2500

의 Tina 2.10을 이용하여 단위 면적당 density를 측정하였다.

통계처리

겨우살이 물 추출물이나 렉틴의 투여, 발암물질 투여에 따른 효과를 보기 위하여 실험결과를 2-way analysis of variance(ANOVA)로 분석하여 $\alpha=0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 유의성을 검증하였다. 모든 실험 결과의 통계 처리는 Statistical Analysis System(SAS) program을 이용하였다.

결과 및 고찰

체중 및 간 무게

9주의 사육기간 중 각 군의 체중증가는 모든 군에서 정상적인 성장곡선을 보여주었으며, 군간의 통계적인 체중차이는 나타나지 않았다(Fig. 2). 이로써 본 실험에 사용된 DEN이나 겨우살이 물 추출물, 렉틴은 성장기 동물의 정상적인 체중 증가에 지장을 주지 않는 농도임을 알 수 있었다.

부검시점에서 체중은 각 군당 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았으나, 간의 무게는 발암물질 투여군에서 유의하게 증가되었다(Table 1). 간의 무게를 체중으로 나누어 계산한 상대적 간 무게 역시 발암물질 투여에 의하여 유의적으로 증가되는 것으로 나타났다(Table 1). 그러나 겨우살이 물 추출물 또는 렉틴의 투여는 실험동물의 간 중량에 변화를 초래하지는 않았다.

발암물질 투여시간의 무게나 상대적 간 무게의 증가는 많은 선행연구(15,18)와 일치하는 것으로, 이러한 현상은 발암물질에 대한 신체의 방어작용으로 간에서 여러 가지 해독효소의 발현이 증가하기 때문으로 알려져 있다. 겨우살이 물 추출물이나 렉틴의 투여시간 무게의 증가가 관찰되지 않은 결과로부터, 본 연구에 사용된 겨우살이 물 추출물과 렉틴의 농도는 실험 동물에게 심각한 독성을 나타내는 농도가 아님을 확인할 수 있다.

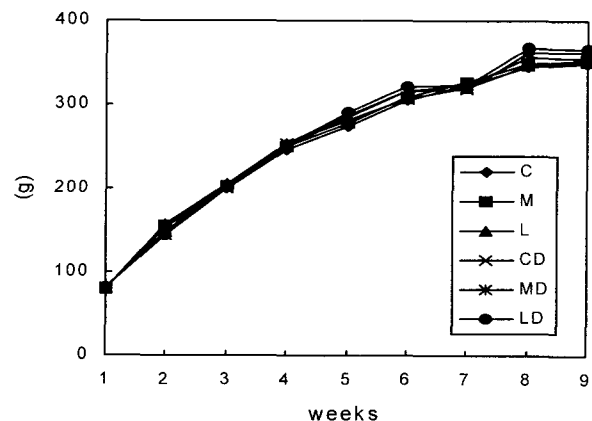


Fig. 2. Growth curve of rats treated with DEN and mistletoe extract or lectin.

C: not treated, M: Korean mistletoe 100 µg/kg BW injection, L: lectin 10 ng/kg BW injection, D: DEN 50 mg/kg BW injection.

Table 1. Effect of mistletoe extract and lectin on body weight, liver weight and relative liver weight of rats treated with DEN

Group ¹⁾ (N)	Body weight (g)	Liver weight (g)	Relative liver weight (%)
C (12)	350.3 ± 21.3 ^{2)NS}	9.8 ± 0.8 ³⁾	2.80 ± 0.17 ^b
M (12)	353.7 ± 13.3	9.6 ± 0.5 ^b	2.72 ± 0.10 ^b
L (12)	351.2 ± 23.3	9.7 ± 1.0 ^b	2.75 ± 0.17 ^b
CD (15)	362.4 ± 9.2	14.4 ± 1.3 ^a	3.97 ± 0.34 ^a
MD (15)	355.9 ± 17.1	13.8 ± 1.3 ^a	3.87 ± 0.31 ^a
LD (15)	365.9 ± 18.6	13.8 ± 1.1 ^a	3.78 ± 0.23 ^a

¹⁾C=not treated, M=Korean mistletoe 100 µg/kg BW injection, L=lectin 10 ng/kg BW injection, D=DEN 50 mg/kg BW injection, N=number of animals.

²⁾Values are mean ± SD.

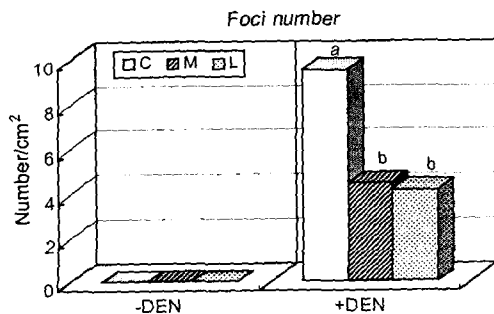
³⁾Means with different superscripts within a column are significantly different at p<0.001 by Duncan's multiple range test. NS=not significantly different.

겨우살이 물 추출물 및 렉틴의 항암활성

실험적 간암의 경우 GST 중 태반형인 GST-P⁺ foci는 정상적인 간조직에서는 나타나지 않으나, 간세포의 전암성 병변에서는 현저하게 높게 발현되며 anti-GST rabbit 항체를 사용하여 조직면역학적 방법으로 검색할 수 있다. 따라서 GST-P⁺ foci 측정은 간암유발과 높은 상관관계를 가지므로 쥐의 간세포 암화과정에서 전암성 병변의 유용한 지표로 사용되고 있다 (17).

본 연구에서 GST-P⁺ foci 생성정도를 측정한 결과 발암물질 투여하지 않은 군에서는 전혀 나타나지 않았으며, 발암물질 투여군에서는 모든 개체에서 foci의 발생을 관찰할 수 있었다. 그리고 겨우살이 물 추출물이나 렉틴 투여시 foci의 개수와 면적이 발암물질만 투여한 대조군에 비해서 통계적으로 유의하게 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 3).

이러한 실험 결과는 선행연구(15) 결과와 일치하는 것이며, 한국산 겨우살이 물 추출물과 렉틴 투여에 따른 차이는 본 연구에서는 나타나지 않았다. 그러나 선행연구(15)에 따르면 한국산 겨우살이 물 추출물과 렉틴의 투여수준이 각각 100 µg/kg BW과 10 ng/kg BW일 때 물 추출물 투여군의 foci 개수나 면적의 감소 정도가 렉틴 투여군보다 높은 경향을 나타내 본 연구의 결과와 차이를 보이지만 이런 차이는 유의적인 것은



아니어서, 결과를 종합해 보면 한국산 겨우살이 물 추출물 중 간암의 발생단계에 억제효과를 나타내는 주요 성분이 렉틴임을 다시 한번 확인할 수 있었다.

물 추출물 및 렉틴의 세포증식 억제효과

PCNA는 DNA polymerase-δ의 보조 단백질로 활발하게 증식하는 세포에서 증가하고, 특히 S phase 동안 현저히 증가하는 것으로 알려져 있으며 최근 apoptosis와 세포주기와의 관계 및 PCNA에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

본 연구에서 PCNA는 발암물질 투여시 모든 군에서 유의적으로 증가되었으며, 겨우살이 물 추출물이나 렉틴 투여시 그 증가 정도가 발암물질만 투여한 군보다 유의적으로 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 4).

이러한 연구 결과는 겨우살이 물 추출물이나 렉틴이 발암물질의 투여에 의해 활발하게 일어나는 세포분열 단계에서 세포분열을 어느 정도 억제할 수 있음을 시사하는 것으로, 이것이 겨우살이 물 추출물이나 렉틴의 발암 억제작용을 설명하는 하나의 기전이 될 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 정확한 관련기전을 밝히기 위해서는 세포주기관련 단백질의 발현 정도를 측정하는 후속 연구가 필요할 것으로 생각된다.

물 추출물 및 렉틴의 apoptosis 유도 가능성

본 연구에서는 발암과정에서 증가되는 것으로 알려져 있는 apoptosis가 겨우살이 물 추출물 및 렉틴의 항암작용기전으로

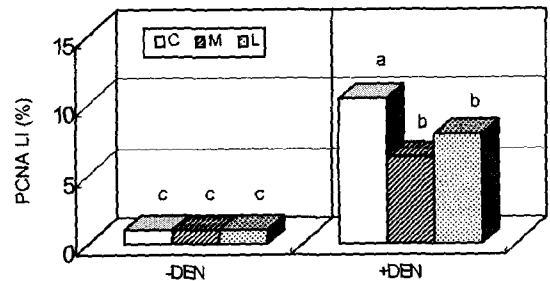


Fig. 4. Effect of mistletoe extract and lectin on hepatic PCNA expression of rats treated with DEN.

Values are mean. Different alphabets above the bar indicate significant difference by Duncan's multiple range test at p<0.05. Abbreviations are the same as Fig. 2.

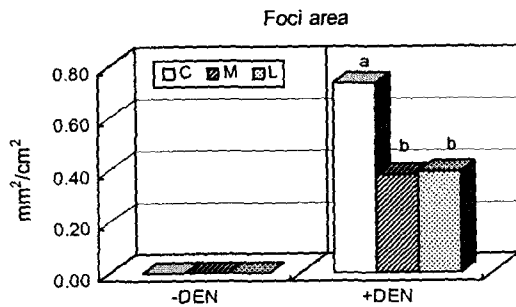


Fig. 3. Effect of mistletoe extract and lectin on hepatic GST-P⁺ foci number and area of rats treated with DEN. Values are mean. Different alphabets above the bar indicate significant difference by Duncan's multiple range test at p<0.05. Abbreviations are the same as Fig. 2.

작용하는지를 검토하고자 다양한 방법으로 apoptosis에 대한 실험을 실시하였다.

먼저 apoptosis 세포의 특징인 DNA fragmentation을 확인하기 위해서 간조직의 DNA를 agarose gel에서 loading시킨 결과, apoptosis의 증거인 DNA ladder를 어느 군에서도 확인할 수 없었다. 이러한 실험 결과는 본 연구에서 사용된 중기간 발암모델에서는 DNA ladder가 나타날 만큼 충분한 양의 apoptosis가 일어나지 않음을 시사하는 것이다.

슬라이드 조직상에서 조직화학적으로 apoptosis염색을 실시한 결과 역시, 모든 군에서 음성의 염색결과를 나타내었다. 반면, nuclease를 처리한 양성 대조염색에서는 모든 세포에서 양성의 염색결과를 나타내었다. 이로써 슬라이드 조직상에서의 apoptosis 염색은 실험 방법상에는 전혀 문제가 없으며, 이 역시 apoptosis 세포의 수가 지나치게 적었기 때문으로 추측된다.

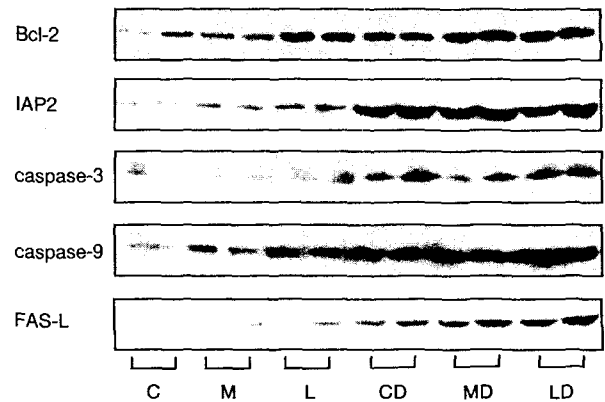
그러나 apoptosis를 조절하는 것으로 알려진 몇 가지 단백질의 발현 정도를 western blot으로 측정된 결과를 분석해 보면, 겨우살이 물 추출물과 렉틴이 간의 발암과정에서 세포의 apoptosis에 어느 정도 영향을 미칠 수 있다는 가능성이 나타난다(Fig. 5).

Apoptosis를 증가시키거나 감소시키는 단백질들은 모두 발암물질의 투여로 증가하는 경향을 나타내게 되는데, 겨우살이 물 추출물과 렉틴의 투여가 이들의 증가 또는 감소에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 먼저, Bcl-2와 IAP는 apoptosis를 억제하는 것으로 알려진 단백질인데, 이 두 가지 단백질은 발암물질 투여에 의하여 증가되며, 이러한 증가는 겨우살이 물 추출물이나 렉틴의 투여에 의해서 유의적으로 증가하거나 감소되지 않았다. 반면, apoptosis를 촉진하는 단백질인 caspase-9, fas-L의 경우 발암물질 투여에 의해 증가된 발현 정도가 겨우살이 물 추출물 및 렉틴의 투여시 더욱 더 증가됨을 관찰할 수 있었다.

Apoptosis는 비정상적인 세포를 제거하기 위해 능동적으로 일어나는 일련의 방어기전으로 정상상태에서보다는 발암물질투여와 같이 비정상세포의 생성 가능성이 증가된 상태에서 활발하게 일어나게 되며, 본 연구와 같이 발암물질을 투여하여 간암을 유도한 상태에서는 Bcl-2, IAP와 같은 apoptosis 억제 단백질의 발현이 증가되어 암이 발생하는 쪽으로 진행되도록 하는 과정도 증가하게 된다. 그러므로 발암물질 투여시에는 발암상태에 대응하기 위한 apoptosis 촉진 단백질과 발암을 진행시키기 위한 apoptosis 억제 단백질의 발현이 모두 증가하게 된다. 그러나 겨우살이 물 추출물이나 렉틴의 투여에 의해 apoptosis 억제 단백질의 발현 정도에는 영향을 미치지 않고, apoptosis 촉진 단백질의 발현을 증가시킨 것을 볼 때 apoptosis가 겨우살이 물 추출물 및 렉틴의 간 발암 억제작용의 기전일 가능성을 배제할 수 없을 것으로 생각된다.

그러므로 본 실험결과를 종합해 보면, DNA fragmentation이나 apoptosis 염색 측정 시점에서는 발암물질 투여 후 8주

(A)



(B)

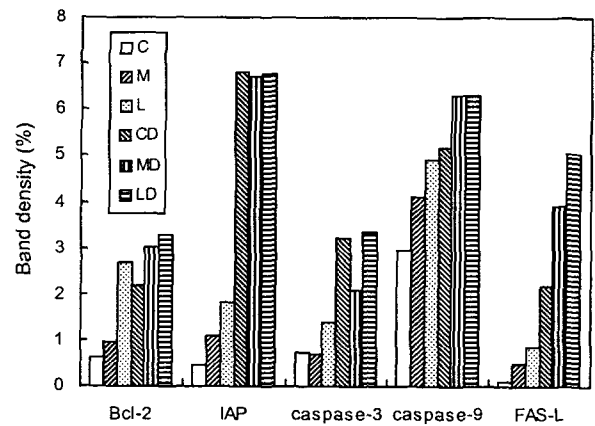


Fig. 5. Western blots (A) and quantitation of each band (B) of apoptosis related proteins.

Abbreviations are the same as Fig. 2.

동안의 사육으로 인해 상당수 발암이 유도된 상태이므로 염색 결과가 양성으로 나타날 정도의 apoptosis가 나타나지 않은 것으로 사료되나 apoptosis 관련 단백질 측정결과 apoptosis가 겨우살이 물 추출물 및 렉틴의 간 발암 억제작용의 기전일 수 있으므로, 이를 정확히 확인하기 위해서는 apoptosis가 가장 활발하게 일어나는 발암물질 투여 직후에 분석하는 모델이 더욱 효과적일 것으로 기대된다.

요 약

본 연구는 한국산 겨우살이 물 추출물과 이것에서 분리한 렉틴 성분을 실험적으로 간암을 유도한 흰쥐에게 투여하여 이들이 간 발암억제 효과 및 그기전의 일부인 apoptosis와의 관련성을 조사하고자 하였다. 이를 위해 80~90 g 정도로 이유된 3주령 Sprague-Dawley종을 한국산 겨우살이 물 추출물 투여(100 µg/kg BW), 렉틴의 투여(10 ng/kg BW)와 DEN 투여 여부에 따라 6군으로 나누어 발암물질 투여 1주일 후부터 주 2회 복강 투여하였다. 총 사육기간은 9주간이었고, 희생시

킨 후 간조직을 분리하여 조직 병리학적 변화 측정을 위한 전암성 병변의 지표인 GST-P⁺ foci의 수와 면적을 측정하였고, apoptosis와의 관련성을 조사하기 위하여 apoptosis 염색, DNA fragmentation 측정 및 Bcl-2, c-IAP2, caspase-9, caspase-3, fas-L의 발현정도 측정을 위한 western blotting을 실시하였다. 그 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. (1) 체중은 발암물질에 의해 식이 섭취가 감소하는 것을 고려하여 제한 섭취를 실시하였으므로 발암물질 투여에 따른 차이는 없었으며, 겨우살이 또는 렉틴의 투여에 따른 차이도 나타나지 않았다. 간 무게는 겨우살이, 렉틴의 투여에 따른 변화는 보이지 않았으나 발암물질 투여에 따라 유의적으로 증가하였고, 체중에 대한 상대적인 간 무게에 대한 결과도 간 무게의 결과와 유사하였다. 따라서 본 연구에 사용한 투여량의 한국산 겨우살이 물 추출물 및 렉틴이 간에 독성을 나타내는 농도가 아닌 것으로 보여진다. (2) GST-P⁺ foci의 수, 면적과 PCNA은 겨우살이 물 추출물과 렉틴의 투여에 따라 모두 유의적으로 감소하였고, 겨우살이 물 추출물과 렉틴에 따른 차이는 보이지 않았다. (3) 조직화학적으로 apoptosis염색한 결과와 DNA fragmentation을 측정된 결과는 모두 apoptosis에 대한 증거가 나타나지 않았다. 그러나 western blot을 측정된 결과 apoptosis을 억제하는 것으로 알려진 단백질인 Bcl-2와 IAP2는 발암물질 투여에 의해 증가된 발현 정도가 겨우살이 물 추출물이나 렉틴의 투여에 따른 차이를 보이지 않았으며, apoptosis를 촉진하는 단백질인 caspase-9, fas-L의 경우에는 발암물질 투여에 의해 증가된 발현 정도가 겨우살이 물 추출물 및 렉틴의 투여시 더욱 증가되었다.

감사의 글

본 연구는 2000년도 한국과학기술기획평가원의 서울여자대학교 연구기반확충사업(과제번호: 00-B-WB-08-A-01) 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사를 드립니다.

문헌

1. Franz H. 1986. Mistletoe lectins and their A and B chains. *Oncology* 43 (suppl. 1): 23-34.
2. Steiner R. 1920. *Spiritual sciences and medicine*. Rudolf Steiner Publishing Co., London.
3. Doser C, Doser M, Huelsen H, Mechelke F. 1989. Influence of carbohydrates on the cytotoxicity of an aqueous mistletoe drug and of purified mistletoe lectins tested on human T-leukemia cells. *Arzneimittel-Forschung/Drug Res* 39: 647-651.
4. Khwaja TA, Dias CB, Pentecost S. 1986. Recent studies on the anticancer activities mistletoe (*Viscum album*) and its alkaloids. *Oncology* 43 (suppl. 1): 42-50.
5. Ribereau-Gayon G, Jung ML, Baudino S, Salle G, Beck JP. 1986. Effect of mistletoe (*Viscum album L.*) extracts on cultured tumor cells. *Experientia* 42: 594-599.
6. Bocci V. 1993. Mistletoe (*Viscum album*) lectins as cytokine inducers and immunoadjuvant in tumor therapy. A review. *J Biol Regul Homeost Agents* 7: 1-6.
7. Joller PW, Menrad JM, Schwarz T, Pfueller U, Parnham MJ, Weyhenmeyer R, Lentzen H. 1996. Stimulation of cytokine production via a special standardized mistletoe preparation in an in vitro human skin bioassay. *Arzneimittel-Forschung/Drug Res* 46: 649-653.
8. Schink M. 1997. Mistletoe therapy for human cancer: the role of natural killer cells. *Anti-Cancer Drugs* 8 (suppl. 1): s47-s51.
9. Klett CY, Anderer FA. 1989. Activation of natural killer cell cytotoxicity of human blood monocytes by a low molecular component from *Viscum album* extract. *Arzneimittel-Forschung/Drug Res* 39 (II): 1580-1585.
10. Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Baeck YJ, Huh CS, Song SK, Lee KH, Azuma I, Kim JB. 1998. Prophylactic effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumor metastasis is mediated by enhancement of NK cell activity. *International J Immunopharmacology* 20: 163-172.
11. Bloksma N, Dijk HV, Korst P, Willers JM. 1979. Cellular and Humoral adjuvant activity of a mistletoe extract. *Immunobiol* 156: 309-319.
12. Schumacher U, Stamouli A, Adam E, Peddie M, Pfuller U. 1995. Biochemical, histochemical and cell biological investigations on the actions of mistletoe lectins I, II and III with human breast cancer cell lines. *Glycoconjugate Journal* 12: 250-257.
13. Timoshenko AV, Gabius HJ. 1993. Efficient induction of superoxide release from human neutrophils by the galactoside-specific lectin from *Viscum album*. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 374: 237-243.
14. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 2001. *Immunobiology; The immune system in health and disease*. 5th ed. Garland publishing, a member of the Taylor & Francis group, New York. p 209-217.
15. Kim MJ, Kim JH. 2001. Anti-carcinogenic effects of Korean mistletoe extract and lectin in experimental hepatocarcinogenesis. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 697-702.
16. Jang JJ, Lee MS, Kim TH. 1994. Development of GST-P⁺ foci in 3 week old rats induced by diethylnitrosamine: preliminary data for liver foci model. *J Korean Cancer* 26: 23-235.
17. Hsu SM, Raine L, Fanger H. 1981. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580.
18. Yoon HJ, Kim JH, Jang JJ. 1996. Effect of sardine oil feeding and vitamin E supplementation on the preneoplastic hepatic lesion and cholesterol metabolism in hepatocarcinogenesis of rats. *J Food Sci Nutr* 1: 214-219.

(2002년 7월 24일 접수; 2002년 10월 9일 채택)