大韓本草學會誌 제21권 제4호 (2006년 12월)
Kor. J. Herbology 2006 : 21(4) : 27-36

간암 세포주 HepG2에 대한 대황 추출물의 항암효과

윤현정#, 황성구, 윤형중, 김창현, 서교수, 박원환, 박선동*

동국대학교 한의과대학 방제학교실

Anticancer effect of Rheum Rhizoma on human liver cancer HepG2 cells

Hyun-Joung Yun#, Seong-Goo Hwang, Yun Hyung-Joong, Kim Chang-Hyun, Seo Gyo-Soo, Won-Hwan Park, Sun-Dong Park*

Department of Prescriptionology, Collage of Oriental Medicine, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : This study was performed for the investigation of anticancer effects of methanol extract of Rheum Rhizoma (MeOH-RR) on a human liver cancer cell line (HepG2).

Methods : To study the cytotoxic effect of MeOH-RR on HepG2 cells, the cell viability was determined by XTT reduction method and trypan blue exclusion assay. The cleavage of poly ADP-ribose polymerase (PARP), a substrate for caspase-3 and a typical sign of apoptosis, and the activation of procaspase-3, -8 and -9 were examined by western blot analysis. Furthermore, MeOH-RR-induced apoptosis was confirmed by DNA fragmentation. The release of cytochrome c from mitochondria to cytosol, the level of Bcl-2 and Bax were examined by western blot analysis.

Results : MeOH-RR reduced proliferation of HepG2 cells in a dose-dependent manner at 24 h and 48 h treatment. MeOH-RR induced the activation of caspase-3, -8, and -9 and the cleavage of poly ADP-ribose polymerase (PARP), a substrate for caspase-3. Furthermore, treatment with MeOH-RR resulted in internucleosomal DNA fragmentation, evidenced by the formation of a DNA ladder on agarose gel, a hallmark of cells undergoing apoptosis. MeOH-RR downregulated Bcl-2, upregulated Bax, and increased the release of cytochrome c from the mitochondria into cytosol in a dose-dependent manner. Moreover, MeOH-RP increased caspase-3 activity.

Conclusion : These results suggest that MeOH-RR induce apoptosis via mitochondrial pathway and caspase-3-dependent pathway in HepG2 cells. These results suggest that MeOH-RR is potentially useful as a chemotherapeutic agent in human liver cancer.

Key words : Rheum Rhizoma, MeOH-RR, apoptosis, caspase-3, mitochondrial pathway

*교신저자: 박선동, 동국대학교 한의과대학 방제학교실
· Tel: 054-770-2654 · E-mail: sundong@dongguk.ac.kr
#제1저자: 윤현정, 동국대학교 한의과대학 방제학교실
· Tel: 054-770-2654 · E-mail: sksms97@hanmail.net
· 접수 : 2006년 10월 31일 · 수정 : 2006년 11월 19일 · 채택 : 2006년 12월 20일

서 론

간암은 간 조직에서 기원하는 원발성 간암과, 다른 부위의 암에서 떨어져 나온 암세포가 혈관이나 림프관을 통해서 또는 직접적으로 간에 도달하여 간 조직에 암 덩어리를 만드는 전이성 간암으로 나눌 수 있다. 이와 같이 간에 발생하는 악성종양을 모두 간암이라 말할 수 있으나, 일반적으로는 원발성 간암을 일컫는다[1]. 우리나라에서 간암은 아주 흔하여 인구 10만 명당 남자 20.7명, 여자 6.2명으로 세계에서 가장 높은 발생률을 보이고 있으며, 나이가 많을수록 발병이 증가하는 경향을 보이고 있다. 예로부터 간암은 암중의 암이라 불릴 만큼 타 부위 암에 비해 그 진행속도나 예후가 극히 불량한 형태의 질환으로 여겨지고 있다.[2]

한의학의 역대 문헌 중에서 간 종양과 유사한 병증은 黃疸, 積聚, 脇痛, 鼓脹, 虫門등에서 볼 수 있으며[3], 종양의 형성은 正氣不足, 六鬱, 七情所傷, 起居不節, 飮食不節, 勞力過度 등의 복합적인 상호연계작용에 의해 이루어지는 것으로 알려져 있다.

한의학에서의 간암에 대한 변증은 크게 2가지로 나눌 수 있는데, 하나는 氣血瘀滯型이며, 다른 하나는 熱毒內盛型이다. 氣血瘀滯의 경우 脇部가 脹痛하며 脇下에 癥塊가 형성되고, 少食하고 권태무력하며 形體가 마르고 面色은 흑색을 띠며, 황달과 복수를 동반하는 경우가 많다. 舌質은 紫暗하고 혹은 瘀斑을 형성하며 맥은 弦澁을 띤다. 치료는 活血化瘀之劑를 투여한다. 熱毒內盛의 경우 황달이 더욱 심해지며 발열, 口渴, 脇下腫塊, 鼻衄, 피부 發斑, 大便秘結, 小便短赤 등의 證을 발현하며 심하면 便血, 尿血, 의식혼탁, 舌質紅色, 舌上黃苔 등의 證이 수반된다[4,5]. 이에 저자는 상기 두 가지 병증치료에 모두 적용될 수 있는 약물인 大黃의 작용을 살펴보고 간암치료에 활용되는 기전을 조사하고자 하였다.

大黃 (Rheum Rhizoma)은 마디풀과 다년생 초본인 掌葉大黃, 唐古特大黃 혹은 藥用大黃의 根과 根莖을 건조한 것으로, 늦은 가을에 줄기와 잎이 마를 때 채취하거나 또는 이른 봄에 채취하여 외피를 제거하고 잘라서 건조시킨 것이다. 大黃은 성미가 苦寒沈降하고 猛力善行하여 下焦에 直達하므로 腸胃의 積滯를 蕩滌하고, 血分에 實熱을 淸熱瀉火하는 효능을 도와 血로 들어가 降泄시키며 또한 活血逐瘀의 효능이 있어 攻積 瀉火 逐瘀의 중요한 약으로 활용되어져 왔다[6-8]. 대황 및 대황 으로부터 분리한 성분들을 이용한 간암 및 유사 종양 등에 항암 효과가 있는지를 탐색한 바 그 분자적 작용 기작에 관한 연구는 미흡하였다.

이에 본 연구에서는 대황이 사람의 간암 세포주인 HepG2의 세포사멸 유도에 어떠한 영향을 주는 지를 검토한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 대황 (Rheum Rhizoma)은 동국대학교 한의과대학 본초학 교실에서 선별된 것을 정선하여 사용하였으며, 500 g의 대황에 3배량의 80% methanol을 가한 다음 48시간 동안 추출하였다. 이 과정을 2회 반복한 후 여과하여 농축한 것을 동결 건조하여 97.76 g (수율 : 19.55%)을 얻었다. 이 분말을 세포 배양액인 Dulbecco's Modifide Eagle Medium (DMEM)에 녹여 (MeOH-RR) 실험에 사용하였다.

2) 시약

Dulbecco's Modifide Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), streptomycin-penicillin 등의 세포배양용 시약들은 Gibco BRL사 (Grand Island, USA)에서, 배양조는 Corning사 (Rochester, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 sodium dodesyl sulfate (SDS), acrylamide는 Bio-Rad 사 (Hercules, USA)에서 구입하였고 NP-40, CAPS, protease inhibitors 등은 Sigma사 (St. Louis, USA)에서, caspases inhibitor인 Z-VAD-FMK와 Ac-DEVED-CHO는 Promega사에서 구입하였다. 실험에 사용된 1차 항체인 anti-caspase-3, anti-caspase-8, anti-caspase-9, anti-Bax는 Santa Cruz Biotechnology사 (Santa Cruz, USA)에서, anti-Bcl-2와 anti-cytochrome *c*는 BD PharMingen사 (San Jose, USA)에서, anti-PARP, anti-beta-actin은 Cell Signaling Technology사 (Beverly, USA)에서 구입하였다. 2차 항체인 Anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody, anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody, anti-goat IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody는 Santa Cruz Biotechnology사 (Santa Cruz, USA)에서 구입하였다.

XTT assay용 kit는 Amersham Pharmacia Biotechnology사 (USA)에서 구입하였고 caspase-3 activity assay kit는 Santa Cruz Biotechnology사 (Santa Cruz, USA)에서, protein assay reagent는 Bio-Rad사 (Hercules, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

2. 방법

1) 세포배양

HepG2 (human liver cancer cell line, KCLB)와 Chang (human liver cell line)을, 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배지에서 5% CO_2, 37℃ 배양기에서 배양하였다.

2) XTT Assay

대황의 추출물이 HepG2와 Chang 세포의 증식에 영향을 주는지 알아보기 위하여 XTT Assay Kit를 사용하여 실험을 수행하였다. 96 well plate에 1×10^4개의 세포를 분주하고 37℃ 배양조에서 24시간 동안 배양한 다음, serum free media로 교체하여 16시간 동안 starvation 시킨 후, 대황 추출물을 농도별로 24~48시간 동안 처리하였다. Well당 50 ㎕의 XTT labeling mixture (5 ㎖ XTT labeling reagent + 0.1 ㎖ electron coupling reagent를 첨가하여 4시간 반응시킨 후, microplate reader (DYNEX, Opsys MR, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다. 약재가 갖는 흡광도를 보정하기 위하여 세포를 뺀 배지를 같이 배양하여 대조군과 실험군의 흡광도를 비교 보정하여 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

3) Trypan blue exclusion assay

60 mm 배양조에 1×10^6 cells/㎖로 세포를 심고 serum free media로 16시간동안 starvation 시킨 후, 대황 추출물을 농도별로 처리하여 24시간, 48시간 배양하였다. Trypsin-EDTA를 처리한 후 원심분리하여 세포들을 모아서 trypan blue dye (0.4%)로 염색하여 hematocytometer를 사용해서 생존한 세포의 수를 counting하였다.

4) 현미경 관찰

6 well 배양조에 0.5×10^6 cells/㎖로 심고 serum free media로 16시간 동안 starvation 시킨 후, 대황 추출물을 농도별로 처리하여 24시간, 48시간 동안 배양하였다. 광학 현미경 (Nicon, Japan)을 사용하여 세포의 형태 변화를 관찰하였다.

5) Caspase-3 activity assay

Caspase-3 activity assay kit를 사용하여 caspase-3 activity를 측정하였다. 대황 추출물을 농도별로 처리한 HepG2 세포를 모아서 lysis buffer를 넣은 다음 얼음에서 30분간 반응시킨 후, 4℃, 13,000×g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 모은다. 96 well plate에 caspase-3 저해제 (Ac-DEVD-CHO)와 caspase-3 substrate (acetyl-Asp-Glu-Val-Asp *p*-Nitroanilide ; Ac-DVED-*p*NA), assay buffer를 첨가하고 37℃에서 12시간 이상 반응시킨 후, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) Western blot analysis

전기영동을 위한 단백질 시료의 추출은 처리 시간별로 세포를 ice-cold tris buffered saline (TBS ; 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl)으로 3회 수세한 후 lysis buffer (TBS, 1% NP-40, 1 mM sodium orthovanadata, 10 ㎍/㎖ aproptinin, 10 ㎍/㎖ leupeptin 및 1 mM PMSF)를 넣어 4℃에서 30분간 반응시키고 12,000×g에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 모았다. 동일한 양의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리시킨 후, 단백질을 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 이 membrane을 항체의 비특이적 결합을 차단하기 위하여 blocking buffer (5% non-fat milk와 0.1% Tween 20을 함유한 TBS 용액)에서 1시간동안 반응시킨 후 각 검증 단백질에 대한 항체를 가하여 1~2시간동안 반응시켰다. 이어서 0.1% Tween 20을 함유한 TBST 용액으로 40분간 수세한 다음, peroxidase-conjugated anti-mouse IgG 혹은 anti-rabbit IgG를 secondary antibody로 반응시켰다. 이어서 ECL system으로 반응 시킨 후 X-ray film상에서 단백질을 검증하였다. 각 시료의 단백질 정량은 bradford protein assay kit를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 실시하였다.

결 과

1. 대황 추출물에 의한 세포의 증식 억제 효과

대황 추출물이 간암 세포주인 HepG2 세포와 정상 간세포인 Chang 세포의 증식에 어떠한 영향을 주는지 알아 보기 위하여 다양한 농도 (0.01~1 ㎎/㎖)로 24시간, 48시간 동안 처리하여 XTT assay 와 trypan blue exclusion assay를 수행하였다. XTT assay 결과, HepG2 세포의 경우 24시간 처리 시, 농도 의존적으로 세포의 증식이 억제되었고 0.3 ㎎/㎖의 농도에서 55.5%까지 증식이 억제되었다. 반면 Chang 세포의 경우에는 0.3 ㎎/㎖의 농도에서 91.4%까지 증식이 억제되었고 0.5 ㎎/㎖의 농도까지 증식 억제 효과가 거의 나타나지 않았다. 48시간 처리한 경우, 0.3 ㎎/㎖의 농도에서 HepG2 세포와 Chang 세포의 증식이 각각 12.1%와 22.3%까지 저해되었다 (Figure 1. Trypan blue 염색을 통해 세포 생존율을 알아 본 결과, 24시간 처리 시 HepG2 세포의 경우에는 농도 의존적으로 감소하였고 48시간 처리 시에는 0.1 ㎎/㎖의 농도에서 50%, 0.5 ㎎/㎖의 농도에서 15.5%까지 감소하였다 (Figure 2).

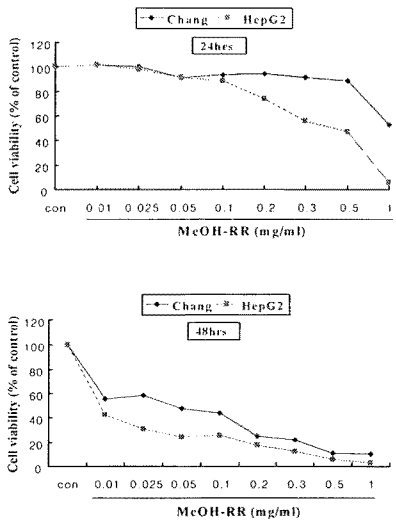

Figure 1. Effects of MeOH-RR on the cell proliferation of the HepG2 cells and Chang cells. HepG2 cells and Chang cells were incubated in the absence or presence of the various concentrations of MeOH-RR for 24 hrs and 48 hrs. Cell viability was measured by XTT assay as described in materials and methods. Data were chosen from six independent triplicate experiments.

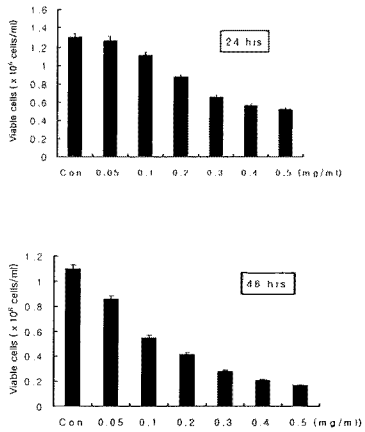

Figure 2. Effects of MeOH-RR on the cell viabilities of the HepG2 cells. Cell viability was determined by trypan blue exclusion assay as described in materials and methods. Data were chosen from six independent triplicate experiments. Values are mean±S.D.

2. 대황 추출물에 의한 HepG2 세포의 형태적 변화

대황 추출물 처리 시 HepG2 세포의 형태에 어떠한 변화가 나타나는지 관찰하였다. 0.05~0.5 ㎎/㎖ 농도로 24시간, 48시간 처리한 후 현미경을 통해 세포를 관찰한 결과, 24시간 처리 시 대황 추출물의 농도에 의존적으로 생존한 세포의 수가 감소하였고, 세포의 형태적 변화를 통해 세포사를 관찰할 수 있었다 (Figure 3(A)). 48시간 처리 시에는 0.1 ㎎/㎖ 의 농도에서 세포사가 관찰되기 시작하였고 그 이상의 농도에서 대부분의 세포의 죽음을 관찰할 수 있었다 (Figure 3(B)).

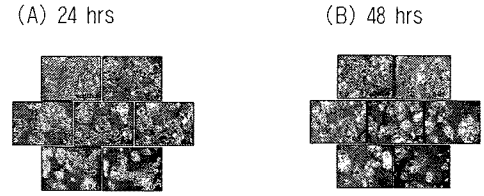

Figure 3. Morphological changes of HepG2 cells. HepG2 cells were incubated in the absence or presence of the various concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/ml) of MeOH-RR for 24 hrs (A) and 48 hrs (B). MeOH-RR exposed cells undergoing apoptosis are shown by their characteristically shrunken cytosol, nuclear condensation. MeOH-RR treated cells showed more apoptotic cells with condensed and fragmented nuclei. Morphological changes were observed by microscopy at ×400 magnification.

3. 대황 추출물에 의한 HepG2의 세포사멸

대황 추출물에 의한 세포사가 apoptosis에 의한 것인지 확인하기 위하여 HepG2 세포에 대황을 농도별 시간별로 처리하여 세포사멸의 진행 정도를 알아보았다. 세포사멸을 유도하는 자극이 있는 경우 세포 내 signaling cascades에 의해 PARP의 cleavage가 나타난다. 따라서 PARP의 cleavage가 세포사멸을 확인할 수 있는 하나의 지표가 된다. 이에 western blot을 통해 PARP의 cleavage와 PARP의 upstream인 proocaspase-3, -8, -9의 발현양상를 관찰하였다. 그 결과, Figire 4에서 보듯이 대황 추출물을 24시간 처리한 경우 0.2 mg/ml이상의 농도에서 PARP의 cleavage가 관찰되었고, 또한 처리 농도에 의존적으로 procaspase-3, -8, -9가 감소함을 확인할 수 있다. 48시간 처리한 경우에는 0.05 mg/ml의 농도에서부터 PARP의 cleavage가 관찰되었고, 대황 추출물의 농도에 의존적으로 procaspase-3, -8, -9가 감소함을 확인할 수 있었지만 전체적으로 signal이 약하게 나타났다.

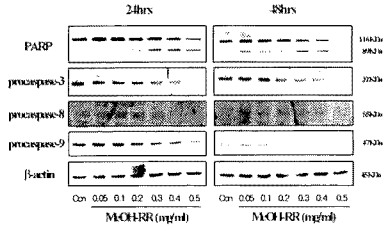

Figure 4. MeOH-RR-induced apoptosis. HepG2 cells were treated with various concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/ml) of MeOH-RR for 24 hrs and 48 hrs. Equal protein of the total cell lysates were analyzed by 10% SDS-PAGE. The cleavages of PARP and the reduction of procaspase-3, -8, -9 were detected by Western blot. b-actin levels were used as internal markers for loading variation.

4. Mitochondrial pathway를 통한 세포사멸

대황 추출물에 의해 유도되는 세포사멸이 세포 내 어떠한 신호전달을 통해 일어나는지 알아보기 위하여 세포사멸의 경로 중 하나인 mitochodrial apoptotic pathway에 관여하는 Bcl-2와 Bax의 발현양상과 mitochodria로부터 세포질로 cytochrome *c*가 방출되는 정도를 알아보았다. 그 결과, Figure 4에서 보듯이, 24시간 처리한 경우 대황 추출물의 농도에 의존적으로 세포질 내의 cytochrome *c*가 증가하였고, cytochrome *c*의 방출을 저해하는 Bcl-2의 발현이 점차적으로 감소하였다. 또한 pro-apoptotic regulator인 Bax의 발현은 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 48시간 처리 시에는 24시간 처리한 경우와 같은 양상으로 결과가 나타났으나 전체적으로 그 signal이 약하게 나타나는 것을 볼 수 있었다. 이로써 대황 추출물에 의해 유도되는 세포사멸이 mitochondria pathway를 경유하는 것으로 보인다.

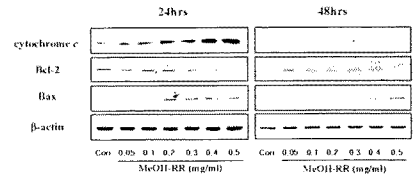

Figure 5. Effect of MeOH-RR on cytochrome c release from mitochondria to cytosol and the expression of Bcl-2 and Bax in HepG2 cells. Cells were treated with various concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/ml) of MeOH-RR for 24 hrs and 48 hrs. Equal protein of the total cell lysates were analyzed by 12.5% SDS-PAGE. Western blotting analysis was used to assess the protein expressions. Cytosolic fractions were isolated and analyzed by Western blot using an anti-cytochrome *c* antibody. b-actin levels were used as internal markers for loading variations.

5. Caspases를 매개로 한 세포사멸

대황 추출물에 의해 HepG2의 세포사멸 유도 시 procaspases의 감소를 관찰하였다. 이에 caspases를 매개로 한 apoptosis인지 확인하기 위해 caspase-3 activity를 측정하였다. 대황 추출물을 농도별로 24시간 동안 처리한 결과, 농도 의존적으로 caspase-3 activity가 증가하는 것을 확인하였다 (Figure 6). Caspase-3의 특이적인 저해제인 Ac-DEVD-CHO와 pan caspases 저해제인 Z-VAD-FMK를 대황 추출물과 함께 처리한 경우 대황 추출물에 의한 세포의 생존율 감소가 억제되었고 (Figure 7(A)), PARP의 발현양상을 알아 본 결과 대황에 의한 세포사멸이 저해되는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 7(B)). 특히 caspase-3의 특이적인 저해제에 의한 세포사멸의 억제효과가 현저하게 나타났다. 이와 같은 실험 결과로 보아 대황 추출물에 의한 세포사멸이 caspases를 매개로 한 것임을 알 수 있었다.

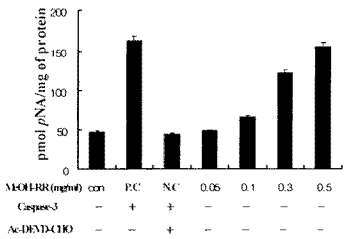

Figure 6. Analysis of caspase-3 activity. Caspase-3 substrate, acetyl-Asp - Glu - Val - Asp *p*-nitroanilide (Ac-DEVD-*p*NA) cleaved by caspase-3 was measured at 405 nm. Cells were treated with various concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/ml) of MeOH-RR for 24 hrs. Caspase-3 and Ac-DEVD-CHO (caspase-3 inhibitor) were used as a positive control and a negative control, respectively. Four separate experiments were done. Results are presented as mean±S.D.

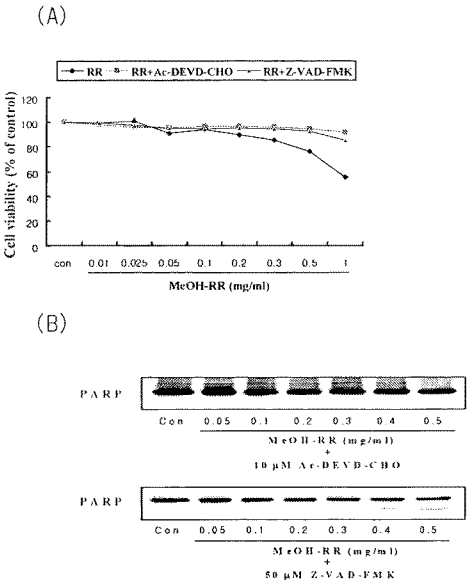

Figure 7. Effect of inhibition of caspases activation by the caspase inhibitors. HepG2 cells were pretreated with caspase-3-specific inhibitor Ac-DEVD-CHO and the nonspecific caspase inhibitor Z-VAD-FMK and then treated with various concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/ml) of MeOH-RR for 24 hrs. Cell viability was measured by XTT assay (A). The cleavages of PARP were detected by Western blot (B).

고 찰

간암은 세계적으로 가장 빈도가 높은 종양이다. 특히 아시아와 사하라남부의 아프리카에 많으며, 이 지역에서 연간 발생률은 10만명당 500명 정도이다. 미국과 서유럽에서는 그 빈도가 낮아 부검에서 발견된 악성종양의 1-2%정도이다. 간암은 여성보다 남성이 4배정도 많으며 보통 간경변이 있는 환자에서 발생한다. 아시아와 아프리카에서 간암이 높은 원인은 B형과 C형 간염바이러스 보유자가 많기 때문이며 이로 인해 발생되는 간경변도 간암의 위험인자가 된다.[2]

한의학의 역대 문헌 중 간암과 유사한 병증으로는 黃疸 積聚 脇痛 鼓脹 忠門등에서 찾아볼 수 있으며, 간에서 종양의 형성은 正氣不足 六鬱 七情所傷 起居不節 飮食不節 勞力過度 등의 복합적인 상호연계 작용에 의해 이루어지며, 이외 기생충감염이나 오래된 황달 등의 전이로도 형성됨을 알 수 있다.

한의학에서의 간암에 대한 변증은 크게 氣血瘀滯型과 熱毒內盛型으로 나눌 수 있다. 이에 상기 두 가지 작용을 모두 발휘하는 약물인 대황의 작용에 대해 살펴보고 간암치료에 활용되는 기전을 알아보았다.

대황은 마디풀과에 속한 다년생 草本인 장군풀의 根과 根莖을 건조시킨 것으로, 性은 寒, 無毒하고 味는 苦하다. 歸經은 脾 胃 肝 大腸에 들어가 작용한다. 이 약재는 free antraquinone류인 citreoroserin, physcion, aloe-emodin, chrysophanol 등을 함유하고 있고 dianthrone류인 sennoside A-F와 tannin 배당체인 (+)-catechin, glucogallin, 6-o-gallate 등을 함유하고 있다[9]. Anthraquinone 유도체는 비교적 강한 항균작용이 있어 황색포도구균, 적리균, 콜레라균, 폐렴쌍구균, 디프테리아균, 대장균, 피부진균 등에 대한 모든 작용을 억제한다. 또한 대황에 포함된 rhein류 물질은 대장벽을 자극하여 장관의 수축과 분비의 증가를 일으켜 배설을 촉진하여 통변작용을 하고, aloe-emodin은 골반 내 기관의 충혈을 발생시키므로 活血通經작용이 있다[7].

이처럼 대황은 性味가 苦寒沈降하고 猛力善行하여 藥力이 下焦에 直達하므로 腸胃의 積滯를 蕩滌하고, 血分에 實熱을 淸熱瀉火하는 효능을 도와 血로 들어가 降泄시키며 또한 活血逐瘀의 효능이 있어 攻積 瀉火 逐瘀의 중요한 약이 된다. 대황은 이와 같이 氣血瘀滯를 풀어주고 熱毒이 內盛한 것을 모두 치료할 수 있는 작용을 가지고 있다.

대황은 修治에 따라 藥性이 다양한데 生用하면 瀉下力이 강하여 實熱證을 치료하고, 熟用시에는 瀉下力이 緩하고 瀉火解毒시켜 火毒瘡瘍을 치료하며, 酒製하면 상부의 熱을 淸熱하고, 아울러 活血行瘀의

효능을 증가시키며, 炒炭하면 和瘀止血하여 血熱로 인한 어혈성 출혈증을 다스린다[6-8].

본 연구에서는 대황 추출물에 의한 사람 간암 세포주인 HepG2의 세포사멸에 대해 실험해본 결과 다음과 같은 결과를 얻었다. 먼저 대황의 추출물이 정상 간세포주인 Chang과 간암세포주인 HepG2에 대해 독성을 갖는 지 확인하였다. 각 세포주에 농도별 (0.01~1 ㎎/㎖)로 24시간, 48시간 동안 처리하여 XTT assay 와 trypan blue exclusion assay를 수행한 결과, 정상 간 세포주인 Chang 세포의 세포 생존율에는 거의 영향을 주지 않았고 간암 세포주인 HepG2 세포의 경우 농도 의존적으로 세포의 증식이 저해되었다. 48시간 처리한 경우에는 0.3 ㎎/㎖의 농도에서 HepG2 세포와 Chang 세포의 증식이 각각 12.1%와 22.3%까지 저해됨으로써 낮은 농도에서부터 세포독성을 나타내었다. 현미경을 통해 세포의 형태적 변화를 관찰한 경우에도 농도 의존적으로 HepG2 세포의 세포사를 볼 수 있었는데, 48시간 처리 시에는 0.1 ㎎/㎖ 의 낮은 농도에서 세포사가 관찰되기 시작하였고 그 이상의 농도에서 대부분의 세포의 죽음을 관찰할 수 있었다. 대황 추출물에 의한 이러한 세포사가 apoptosis에 의한 것인지를 조사해 보았다.

Apoptosis (programmed cell death)는 세포가 적절한 신호 자극을 받았을 때 스스로를 파괴하는 기작으로, 신체에 그 세포가 더 필요 없거나, 그 세포의 존재가 유기체 전체의 건강을 위협하는 등 여러 가지 경우에 시작된다[10-12]. 또한 성숙한 개체의 일상을 유지하는데 필요할 뿐 아니라 태아기의 발생과정에도 필수적이다. Apoptosis는 세포 증식과 균형을 이루는 정상적인 생리적 과정으로, 세포 안팎에서 전달되는 자극에 의해 작용을 시작하도록 유전적으로 계획되어 있다. 신호가 전달되면 세포의 자살 메커니즘 경로를 주관하는 유전자가 활성화되는데 이 유전자는 세포의 구조 단백질과 유전물질을 파괴하는 단백질을 암호화하고 있다[13-15]. Apoptosis가 유도되면 세포의 형태적 변화가 일어나 다른 세포로부터 떨어져 나가며, 핵에 있는 염색사 (염색체 DNA와 핵단백질)가 응축하는 등의 변화가 나타난다[16]. 이렇게 된 세포는 다른 세포에 의해 분해되거나, 작은 조각으로 부서져 다른 포식세포에게 둘러싸인다.

이러한 apoptosis를 조절하는 체계가 교란되면 여러 가지 질병들이 생길 수 있다. 예를 들어 종양억제 유전자인 p53처럼 apoptosis를 조절하는데 관여하는 유전자에 돌연변이가 생기면 그 세포는 자살 신호에 적절히 대응하지 못하게 되고 결과적으로 통제를 벗어난 증식을 계속해서 종양을 형성하게 되는 것이다[17-19].

대황 추출물을 처리한 경우 유도되는 세포사가 apoptosis에 의한 것인 지 확인하기 위해 HepG2 세포에 농도별, 시간별로 처리하여 세포사멸의 진행 정도를 알아보았다. 세포사멸을 유도하는 자극이 있는 경우 세포 내 signaling cascades에 의해 PARP의 cleavage가 생기게 된다. 따라서 PARP의 cleavage가 세포사멸을 확인할 수 있는 하나의 지표가 된다[20-21]. 이에 western blot을 통해 procaspase-3, -8, -9의 발현양상과 PARP의 cleavage를 확인 한 결과, 24시간 처리한 경우 0.2 ㎎/㎖이상의 농도에서 PARP의 cleavage가 관찰되었고 농도 의존적으로 procaspase-3, -8, -9가 감소함을 확인할 수 있었다. 48시간 처리한 경우에는 0.05 ㎎/㎖의 낮은 농도에서부터 PARP의 cleavage가 관찰되었고 procaspase-3, -8, -9의 발현양상도 약하기는 하지만 24시간 처리한 경우와 같은 양상으로 감소함을 확인할 수 있었다. 이로써 대황 추출물이 HepG2세포의 apoptosis를 유도한다는 것을 알 수 있었다.

대황 추출물에 의해 유도되는 apoptosis가 세포 내 어떠한 신호전달 경로를 통해 일어나는지 알아보기 위하여 mitochodrial pathway[22-23]에 관여하는 Bcl-2와 Bax의 발현양상과 mitochodria로부터 세포질로 cytochrome c가 방출되는 정도를 알아보았다. 그 결과, 대황 추출물의 농도에 의존적으로 세포질로 cytochrome c가 방출되는 양이 증가하였고, cytochrome c의 방출을 저해하는 anti-apoptotic Bcl-2의 감소가 관찰되었으며, pro-apoptotic regulator인 Bax의 증가를 확인할 수 있었다. 이로써 대황 추출물에 의해 유도되는 apoptosis가 mitochondria pathway를 경유할 것으로 생각되었다.

Caspase는 cystinyl aspartate-specific protease를 일컷는 용어로서 active site에 cysteine을 가지고 있으며, sequence specific proteolytic activity를 가지게 됨으로써 활성화되게 되고, 이로 인해 세포의 DNA 복제 및 유전자 발현과 관련된 단백질 및 핵의 구조 유지, 세포의 항상성 유지 등과 관련된 단백질들을 파괴시키거나 관련된 단백질을 활성화시켜 apoptosis를 유도하게 된다[24-26]. 이렇게 caspase를 활성화시키는 신호는 크게 막 단백질을 통한 신호, mitochondria를 통한 신호, endoplasmic reticulum (ER)을 통한 신호로 크게 세 가지로 나뉘어 질 수 있으며, 면역세포의 granule 속의 효소 및 단백질에 의한 caspase의 activation 기작도 존재한다. 이들은 발

현이 되면 precursor form으로 존재하다가 세포 안팎의 상태에 따라서 processing이 되어 mature한 활성을 가진 형태로 바뀌게 된다[27-29].

대황 추출물에 의해 HepG2의 세포사멸 유도될 때 caspases를 매개로 한 것인지 확인하기 위해 caspase-3 activity를 측정하였다. 대황 추출물을 농도별로 24시간 동안 처리한 결과, 농도 의존적으로 caspase-3 activity가 증가하였다 (Figure 6). Caspase-3의 특이적인 저해제인 Ac-DEVD-CHO와 pan caspases 저해제인 Z-VAD-FMK를 대황 추출물과 함께 처리한 경우 대황 추출물에 의한 세포의 생존율 감소가 억제되었고, PARP cleavages 감소되는 것을 확인함으로서 대황에 의한 세포사멸이 저해되는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 7). 이로써 대황 추출물에 의한 세포사멸이 caspases를 매개로 한 것임을 알 수 있었다.

이러한 실험결과들로 보아, 대황 추출물은 간 세포주인 Chang의 증식에는 큰 영향 없이 간암 세포주인 HepG2의 apoptosis를 유도할 수 있으며, 이는 mitochondria를 경유하며, 또한 caspases를 매개로 한 apoptosis임을 알 수 있었다. 이로써 대황이 간암 치료에 효과적으로 작용할 수 있을 것으로 보이며 앞으로 더 많은 실험을 통하여 대황이 간암세포 내에 관여하는 분자적 기전에 대해 조사해 보아야 할 것이다.

결 론

대황 추출물에 의한 사람 간암 세포주인 HepG2의 세포사멸 유도와 그 mechanism에 관한 연구를 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 대황 추출물에 의한 HepG2 세포와 Chang 세포의 증식 억제 효과를 확인하기 위해 XTT assay와 trypan blue exclusion assay를 수행한 결과, 24시간 처리 시 HepG2 세포의 경우에는 농도 의존적으로 세포의 증식이 저해된 반면 Chang 세포의 증식의 변화는 거의 관찰되지 않았다. Trypan blue 염색을 통해 세포 생존율을 알아 본 결과, 24시간 처리 시 HepG2 세포의 경우에는 농도 의존적으로 감소하였고 48시간 처리 시에는 0.5 ㎎/㎖의 농도에서 15.5%까지 감소하였다. 또한 현미경을 이용한 세포 형태학적 관찰을 통해서도 이와 같은 결과를 얻었다.

2. 대황 추출물에 의한 세포사가 apoptosis에 의한 것인지 확인하기 위하여 western blot을 수행한 결과, 처리한 대황 추출물의 농도에 의존적으로PARP cleavages가 확인되었고 procaspase-3, -8, -9의 발현이 감소하였다.

3. 대황 추출물에 의한 apoptosis가 어떠한 경로를 통해 유도되는 지 알아보기 위해 mitochondrial pathway에 관여하는 Bcl-2, Bax, cytochrome c의 발현양상을 조사한 결과, 처 리한 대황 추출물의 농도가 증가함에 따라 세포질로 cytochrome c의 방출이 증가하였고, anti-apoptotic Bcl-2의 발현이 감소하였고 pro-apoptotic Bax의 발현이 증가하였다.

4. 대황 추출물에 의한 apotosis가 caspases를 매개로 한 apoptosis인지 확인하기 위해 caspase-3 activity를 측정한 결과, 농도가 증가함에 따라 caspase-3 activity가 증가하였다. 또한 caspase-3의 특이적인 저해제인 Ac-DEVD-CHO와 pan caspases 저해제인 Z-VAD-FMK를 대황 추출물과 함께 처리한 경우 대황 추출물에 의한 세포의 생존율 감소가 억제되었고 PARP의 발현양상을 통해 세포사멸이 저해되었다. 특히 caspase-3의 특이적인 저해제에 의한 세포사멸의 억제효과가 현저하게 나타났다.

이 같은 결과로 보아, 대황 추출물은 간 세포인 Chang의 증식에는 큰 영향 없이 간암 세포주인 HepG2의 apoptosis를 유도할 수 있으며, 이는 mitochondria를 경유하며 또한 caspases를 매개로 한 apoptosis임을 알 수 있었다.

감사의 글

-본 연구는 동국대학교 학술지원 사업비로 이루어진 논문임.

-본 연구는 과학기술부/한국과학재단 기초의과학연구센터 육성사업의 지원으로 수행되었음 (과제번호:R13-2005-013-01000-0).

-본 연구는 2005학년도 동국대학교 연구년 지원에 의하여 이루어졌음.

참고문헌

1. 의학교육연구원 편. 가정의학. 서울대학교 출판부. 1995:266.

2. 해리슨 내과학 편찬위원회 편2. 내과학. 정담출판사. 1997:1610.

3. 許浚著. 동의보감국역위원회 편역. 동의보감. 남

산당. 1992:741-758.
4. 전국한의과대학 간계내과학 교수 공저. 간계내과학. 동양의학연구원. 1989:274-280.
5. 文濟典, 安圭錫, 崔昇勳. 동의병리학. 고문사. 1990:284.
6. 전국 한의과 대학 본초학교수 공저. 본초학. 영림사. 1991:242-244.
7. 康秉秀, 金永坂. 임상 배합 본초학. 영림사. 1994:507-510.
8. 김준기, 서부일, 김상찬 편역. 상한론 처방과 약증. 법인 출판사. 2000:200-213.
9. 한종현, 김기영. 한방약리학. 도서출판 의성당. 서울. 2004:197-203.
10. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. Cell. 116(2). 2004:205-219.
11. Fumarola C, Guidotti GG. Stress-induced apoptosis: toward a symmetry with receptor-mediated cell death. Apoptosis. 9(1). 2004:77-82.
12. Thorburn A, Thorburn J, Frankel AE. Induction of apoptosis by tumor cell-targeted toxins. Apoptosis. 9(1). 2004:19-25.
13. Guseva NV, Taghiyev AF, Rokhilin OW, Cohen MB. Death receptor-induced cell death in prostate cancer. J Cell Biochem. 91(1). 2004:70-99.
14. Viktorsson K, Lewensohn R, Zhivotovsky B. Apoptotic pathways and therapy resistance in human malignancies. Adv Cancer Res. 94(1). 2005:143-196.
15. Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. Int J Low Extrem Wounds. 4(3). 2005:138-144.
16. Jaeschke H, Bajt ML. Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. Toxicol Sci. 89(1). 2006:31-41.
17. Hattangadi DK, DeMasters GA, Walker TD, Johnes KR, Di X, Newsham IF, Gewirtz DA. Influence of p53 and caspase 3 activity on cell death and senescence in response to methotrexate in the breast tumor cell. Biochem Pharmacol. 68(9). 2004:1699-1708.
18. Tan J, Zhuang L, Leong HS, Iyer NG, Liu ET, Yu Q. Pharmacologic modulation of glycogen synthase kinase-3 beta promotes p53-dependent apoptosis through a direct Bax-mediated mitochondrial pathway in colorectal cancer cells. Cancer Res. 65(19). 2005:9012-9020.
19. Zhang N, Hartig H, Dzhagalov I, Draper D, He YW. The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. Cell Res. 15(10). 2005:749-769.
20. Thoren FB, Romero AI, Hellstrand K. Oxygen Radicals Induce Poly(ADP-Ribose) Polymerase-Dependent Cell Death in Cytotoxic Lymphocytes. J Immunol. 176(12). 2006:7301-7307.
21. Ilnytska O, Lyzogubov VV, Stevens MJ, Drel VR, Mashtalir N, Pacher P, Yorek MA, Obrosova IG. Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibition Alleviates Experimental Diabetic Sensory Neuropathy. Diabetes. 55(6). 2006:1686-1694.
22. Bayir H, Fadeel B, Palladino MJ, Witasp E, Kurnikov IV, Tyurina YY, Tyurin VA, Amoscato AA, Jiang J, Kochanek PM, Dekosky ST, Greenberger JS, Shvedova AA, Kagan VE. Apoptotic interactions of cytochrome c: Redox flirting with anionic phospholipids within and outside of mitochondria. Biochim Biophys Acta. 53(2). 2004:1788-1796.
23. Mihara K. Regulation of mitochondrial biogenesis and morphogenesis. Fukuoka Igaku Zasshi. 97(1). 2006:8-14.
24. Vitale I, Antoccia A, Crateri P, Leone S, Arancia C. Caspase-independent apoptosis is activated by diazepam-induced mitotic failure in HeLa cells, but not in human primary fibroblasts. Apoptosis. 10(4). 2005:909-920.
25. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. J Clin Invest. 115(10). 2005:2665-2672.
26. Movsesyan VA, Stoica BA, Yakovlev AG, Knoblach SM, Lea PM 4th, Cernak L, Vink R, Faden AI. Anandamide-induced cell death in primary neuronal cultures: role of calpain and caspase pathways. Cell Death Differ. 11(10). 2004:1121-1132.
27. Anazetti MC, Melo PS, Duran N, Haun M. Dehydrocrotonin and its derivative, dimethylamide-crotonin induce apoptosis with lipid peroxidation and activation of caspases-2, -6 and -9 in human leukemic cells HL60. Toxicology. 203(1-3). 2004:123-137.
28. Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. Acta Biochim

Biophys Sin. 37(11). 2005:719-727.
29. Harwood SM, Yaqoob MM, Allen DA. Caspase and calpain function in cell death: bridging the gap between apoptosis and necrosis. Ann Clin Biochem. 42(6). 2005:415-431.