

半枝蓮과 항암제 병용 투여에 의한 암세포 성장 저해에 관한 연구

*동국대학교 한의과대학 부인과학교실, **동국대학교 생명과학대학 생명과학과
남주영*, 성정석**, 전현익**, 이정원*, 권수경*, 김동일*

ABSTRACT

Increasing Effects of Apoptosis When Co-treated *Scutellaria barbata* D. Don. with Anti-cancer Drugs

Ju-Young Nam*, Jung-Suk Sung**, Hyun-Ik Jun**,
Jeong-Won Lee*, Su-Kyung Kwon*, Dong-Il Kim*

*Dept. of Ob&Gy, College of Korean Medicine, Dongguk Univ.

**Dept. of Life Science, College of Life Science, Dongguk University

Purpose: This experiment was designed to find out increasing effects of *S. barbata*. co-treatment with anti-cancer drugs at cancer cell's growth inhibition effect.

Methods: Divergent observational study of the *S. barbata*. co-treatment with Cisplatin treatment on HeLa cell. Cell viability using MTT assay, Cell Culture and Cytotoxicity Studies, Cell Cycle Analysis, Annexin V-FITC/PI assay, Cell morphological assessment, PARP cleavage using Western blotting analysis when HeLa cell were co-treated with Cisplatin and *Scutellaria Barbata* extracts.

Results: When HeLa cell were co-treated with Cisplatin and *Scutellaria Barbata* extracts, we found out viability of HeLa cell, changing in the distribution of cell cycle, Annexin V-FITC staining, DAPI staining, PARP clavage protein assay by Western-blot. So *Scutellaria Barbata* extracts have increased apoptosis

Conclusion: When co-treated *Scutellaria Barbata* extracts with anti-cancer drugs, the anti-cancer effects were increased.

We still not sure which constituent apoptosis at cancer cells and activates anti-cancer effects suppressing, but we believe that it'll be revealed here after with following experiments.

Keywords: *Scutellaria Batatae* D. Don, Cisplatin, HeLa cell, Apoptosis

“본 연구는 2009년 동국대학교 논문게재장려금 지원으로 이루어졌음.”
“This work was supported by the Dongguk University Research Fund of 2009”

I. 서 론

WHO의 통계 자료에 따르면 전 세계적으로 매년 약 50만 명의 새로운 자궁경부암 환자가 발생하는데, 이는 발생빈도 상 여성암 중 2위를 차지하고 있으며, 우리나라의 경우 1995년까지는 자궁경부암이 여성에서 발생하는 악성 종양 중 가장 높은 발생빈도를 차지하였다. 한국 중앙 암 등록 사업 보고서에 의하면 2002년 한 해에도 3,979명의 신환이 발생하는 등 서구 선진국에 비하여 아직은 높은 발생률을 보인다¹⁾.

한의학에서의 자궁경부암은 崩漏, 帶下, 癥瘕, 血枯, 石瘕 등의 범주에 속한다^{2,3)}. 이 중 여성의 하복강 내에 생기는 여성 고유의 腫塊를 지칭하는 癥瘕가 질병의 구조적 범주 인식으로는 자궁경부암과 가장 유사한 한의학 병증으로 생각할 수 있다.

자궁경부암을 비롯한 암의 치료를 위해 수술요법, 방사선 치료, 화학 요법 등이 시행되어왔다. 이러한 암의 화학요법에 활용되어온 약물인 Cisplatin, Cisplatinum, Neocarzinostatin(NCS), Adriamycin, Taxol 등의 항암치료제에 의한 암세포의 사멸은 주로 apoptosis 기전에 의한다⁴⁻⁶⁾.

기존의 항암치료가 세포독성이 강력한 항암제에 의한 단독 또는 병합요법에 의존했다면 최근에는 신체의 각 장기에 미치는 독성을 최소화하면서 항암제의 항암효과는 증대시킬 수 있는 방법을 찾기 위한 노력을 기울이고 있다⁷⁻⁹⁾. 그와 관련된 최근의 연구 사례들로 항암제와 한약재 등을 병용 투여하여 항암효과의 증대를 확인하거나¹⁰⁾, 항암제의 부작용을 감소시키는 작용을 확인하는 연구¹¹⁾들이

계속 이루어지고 있음을 예거 할 수 있다.

半枝蓮(Scutellaria barbata D.Don)은 꿀풀과에 속한 1년생 혹은 다년생 식물로, 淸熱解毒, 祛瘀止痛, 消腫散結, 行氣利水, 止血 등의 효능이 있으며¹²⁾, 단방으로 혹은 복합 처방에 배합되어 각종 암에 대한 치료를 목적으로 활용된다.

半枝蓮을 이용한 연구로는 난소암¹³⁾, 유방암¹⁴⁾, 폐암 세포 성장 억제효과¹⁵⁾, 자궁근종세포 활성화억제효과¹⁶⁾, 항균작용¹⁷⁾, 암세포에서의 DNA 합성억제와 암세포 성장 억제효과¹⁸⁾ 등이 검토되었고, 간 장애에 대한 보호 효과^{19,20)}가 있어 장기간 항암치료에 응용할 수 있다는 연구 결과도 있었다. 아울러 자궁경부암 세포주인 HeLa cell에 대한 농도별 세포독성과 형태학적 변화와 단백질 합성 억제 작용²¹⁾, 성장억제 작용²²⁾, 농도별 처치에 따른 시간별 세포활성, 세포 사멸의 신호전달효소와 유전자발현으로 증식억제와 사멸에 미치는 영향²³⁾, 半枝蓮의 Methyl chloride 분획이 단핵세포 암주의 sub G1기의 증가와 DNA fragmentation, PARP cleavage에 미치는 영향을 알아본 암세포의 apoptosis에 대한 연구²⁴⁾ 등이 있었다.

한편 본 연구와 관련된 최근 논문으로 Cisplatin과 Berberine의 병용 처리시 활성산소종의 영향에 의한 HeLa cell의 apoptosis를 통한 세포의 성장억제 효과를 상승시키는 효과에 관한 연구²⁵⁾와 山藥을 半枝蓮과 Cisplatin 및 H2O2와 병용 투여하여 자궁경부암 세포 HeLa cell의 apoptosis유도에 미치는 억제작용에 대해 연구²⁶⁾하여 한약과 기존 항암제의 병용에 대한 가능성을 검토한 바 있다.

이 연구는 이와 같은 일련의 선행 연구를 참고하여 半枝蓮과 항암제를 병용 투여하였을 때 암세포의 성장저해를 증강시키는 효과가 있는지 확인하기 위해 기획되었다.

양방항암제와 半枝蓮의 병용투여가 암세포 성장저해에 미치는 효과를 평가하기 위해 추출용매별, 농도별, 투여순서별 차이를 두고 세포활성을 측정하고, DNA 분절형성에 미치는 작용, apoptosis에 미치는 작용, cell cycle pattern에 미치는 작용, PARP cleavage에 미치는 작용 등을 관찰하였다.

반지련과 cisplatin 각각을 사용하였을 때보다 반지련과 cisplatin 병용 투여 시 HeLa cell에 대한 항암작용이 보다 우수하여짐을 보여주는 실험 관찰 결과를 얻어 이에 보고하는 바입니다.

II. 재료 및 방법

1. Materials

Cell culture와 관련된 시약은 JBI (Korea)에서, 이를 제외한 모든 시약은 Sigma/Aldrich (St Louis, USA)로부터 구입하였다.

2. Plant extraction

半枝蓮 whole plant 84g을 methanol (MeOH) 320 ml에 넣고 추출하였다. 半枝蓮 추출물을 거름종이 (Lot. No 2)에 거른 후, Centrifuge tube에 담고 Centrifugation (5000rpm, 30min, 4°C)을 2번 해주었다. Centrifugation한 추출물을 동결건조 (-50°C, 8기압)시켰다. 동결건조가 끝난 半枝蓮 추출물을 수거하여 50 ml falcon tube에

옮겨 담고 4°C cold chamber에 보관하였다.

분말형태의 半枝蓮 20g을 100 ml의 water를 사용하여 1시간 30분 동안 중탕 가열하였다. 그리고 Filter paper (Lot No.2)를 이용해 1차적으로 filter하였다. Centrifugation (5000 ×g/30 min/2회) 실시하고, 동결건조 후 cell culture grade water와 1.8×PBS에 녹여 1 M NaOH (200 μl)를 이용하여 pH를 중성 (pH 6~8)으로 보정하였다. 그 후 clean bench내에서 filtering하고 결과물을 1 ml 씩 나누어 -20°C에서 보관하였다.

3. Cell Culture and Cytotoxicity Studies

HeLa cells을 89% DMEM, 10% fetal bovine serum 그리고 1% antibiotics가 포함된 배지로 37°C, 95% air/ 5% CO₂가 유지되는 incubator에서 이틀마다 배지를 바꿔주며 배양하고 약물 처리한 후 cell viability를 살펴보았다.

Cell viability는 MTT assay를 통해서 측정하였다. 항상 최종 incubation 시간은 24시간에 맞추었다. 그리고 MTT (5 mg/ml) 10 ml을 각각의 well에 처리해 주었다. 처리 후 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan의 검출을 위하여, MTT가 들어있는 배양액을 모두 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 200 μl씩 처리하여 충분히 녹인 후, Optical density는 ELISA reader를 사용해 570 nm에서 측정하였다.

4. Cell Cycle Analysis

Control, 25 μM Cisplatin, x40 半枝蓮의 MeOH extract, 복합처리를 24시간 한 후, HeLa cells를 수거하고, 1 × Ice

Cold PBS로 2번 washing 해주었다. Cell pellets에 100% ethanol을 첨가하고 -20°C에서 overnight시켰다. Fixed된 Cell을 Centrifugation한 후, 1 × Ice Cold PBS로 한 번 washing해 주고 50 ug/ml RNase -A가 포함된 PI staining buffer를 첨가해서 현탁시켰다. 현탁된 sample을 FACS 전용 유리관으로 옮겨 담고, 어두운 상태의 Room Temperature에서 1시간 incubation시켰다. 그런 다음, Flow Cytometry는 서울대 임상의학연구소에 의뢰하여 분석하였다.

5. Annexin V-FITC/PI assay

Control, 25 μ M Cisplatin, $\times 40$ 半枝蓮의 MeOH extract, 복합처리를 24시간 한 후, HeLa cell을 수거하고, 1 × Ice Cold PBS로 2번 washing 해주었다. Cell pellets에 100% ethanol을 첨가하고 -20°C에서 overnight시켰다. Fixed된 Cell을 Centrifugation한 후, 1 × Ice Cold PBS로 한 번 washing해 주고 Annexin V-FITC / PI (propidium iodide) apoptosis detection kit (BD Biosciences, USA) 사용해서 현탁시켰다. 현탁된 sample을 FACS 전용 유리관으로 옮겨 담고, 어두운 상태의 Room Temperature에서 30분 incubation시켰다. 그런 다음, Flow Cytometry는 서울대 임상의학연구소에 의뢰하여 분석하였다.

6. Cell morphological assessment

HeLa cell을 6-well plates에 분주하고, 각각 25 μ M Cisplatin, $\times 40$ 半枝蓮의 MeOH extract, 복합처리를 24시간 하였다. 역주기 명암 현미경(inverted phases-contrast microscope (Leica, Germany))

을 이용하여 morphology 사진을 촬영하였고 핵을 DAPI (10 mg/ml)로 염색하여 형광 현미경[fluorescence microscopy (Olympus VENOX-AHBT3, Japan)]으로 관찰하였다.

7. Western blotting analysis

24시간 약물처리 한 세포를 파쇄완충용액(CLBC 100 μ M, 4°C)에 넣어 sonification 한 후 30분 동안 ice상에서 incubation 하고 centrifuge (16200rpm, 4°C, 30분) 하여 세포파쇄액을 만들었다. 세포파쇄액의 단백질을 bradford protein assay를 통해 정량하고, 70 μ g의 단백질을 10% SDS-PAGE 전기영동으로 단백질을 분리한 다음, wet electrotransfer system(34 mA/cm²)을 통해서 PVDF membrane에 이동시켰다. membrane은 5% skim milk로 blocking시킨 후에 primary antibody (PARP) 1:1000과 상온에서 1시간 30분 동안 반응시키고 TBS-T로 15분 세척(5분, 3회)하였다. primary antibody와 반응시킨 membrane을 secondary antibody와 45분 반응시킨 후 TBS-T로 15분 세척(5분, 3회) 하였다. 각각의 단백질은 enhanced chemiluminescence (ECL)로 발색시키고 X-ray film에 감광하여 분석하였다.

III. 결 과

1. 半枝蓮과 Cisplatin의 병용투여가 HeLa cell의 viability에 미치는 영향

HeLa cells에 0, 5, 10, 25, 50 μ M Cisplatin과 0, $\times 80$, $\times 40$, $\times 20$, $\times 10$ dilution factor 半枝蓮 MeOH extract를 각각 24

시간 처리한 후, MTT assay를 통해 농도 의존적으로 cell viability가 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 1A, B).

半枝蓮 extracts와 Cisplatin을 HeLa cells에 병용투여한 후 viability를 살펴 보았다. 즉 25 μ M의 Cisplatin과 0, \times 80, \times 40, \times 20, \times 10 dilution 半枝蓮 물중탕 추출한 것과 MeOH 추출한 것을 각각 24시간 처리한 후 cell viability를 측정하였다. 물중탕 추출한 半枝蓮 extract 처리의 경우 80배 희석농도에서, Methanol 추출은 40배 희석농도부터 감소를 보여 생존률이 급격히 감소하였다. 半枝蓮 물중탕 추출한 경우 80배 희석 농도에서 Cisplatin만 있는 경우의 viability와 30% 정도 차이가 났고 40배 희석 농도에서는 40% 차이가 났다.

또한 40배 희석된 半枝蓮 물중탕 추출물과 MeOH 추출물을 0, 5, 10, 25, 50 μ M Cisplatin과 각각 24시간 병용처리한 후, cell viability를 확인하였다. 이 경우 半枝蓮 Methanol 추출물이 半枝蓮 물중탕 추출물보다 세포독성 효과가 더 좋은 것으로 나타났다. 半枝蓮 물중탕 추출시 Cisplatin의 농도가 5 μ M일 때 29%, 10 μ M 일 때 34%이상의 차이를 보여 여기에서도 半枝蓮과 Cisplatin의 상호작용에 의해 세포독성의 효과가 더 커지는 것을 확인 할 수 있었다. 즉 Cisplatin이 일으키는 DNA damage에 半枝蓮이 일으키는 또 다른 형태의 damage가 더해져 더 많은 세포사멸을 일으키는 것으로 유추할 수 있었다. (Fig. 1C, D)

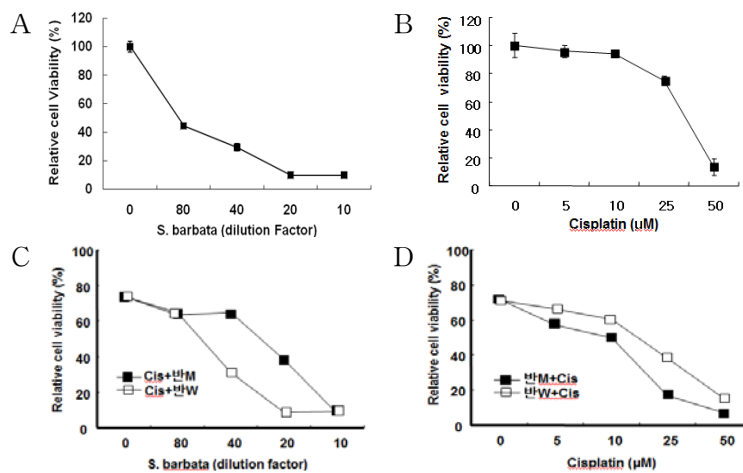


Fig. 1. The Effect of *S. barbata* MeOH Extracts and Cisplatin on Cytotoxicity against HeLa cells

A. HeLa cells were treated with various concentrations 0, 80, 40, 20, 10-fold diluted *S. barbata* extracts for 24h, respectively; B. HeLa cells were treated with various concentrations(5-50 μ M) of Cisplatin for 24 h, respectively; C. HeLa cells were co-treated 25 μ M Cisplatin and 0, 80, 40, 20, 10-fold diluted *S. barbata* water extracts (opened squares) and MeOH extracts (closed squares) after 24 h; D. HeLa cells were co-treated with 40-fold diluted *S. barbata* water extract (closed square) and MeOH extracts (opened square) , 0, 5, 10, 25, 50 μ M Cisplatin after 24 h; Cell viability was determined by MTT assay and the absorbance was measured by ELISA at wavelength of 570 nm. Results are expressed as the mean \pm S.D. of three independent experiments.

2. 半枝蓮 MeOH extract와 Cisplatin 병용투여에 따른 HeLa cell morphology의 변화

HeLa cells 대조군과 각각 Cisplatin (25 μ M), 半枝蓮 MeOH 추출물 ($\times 40$), Cisplatin (25 μ M)과 半枝蓮 MeOH 추출물을 합한 것을 HeLa cells에 24시간

처리한 후, cell morphology를 관찰한 결과 각각의 약물이 세포를 효과적으로 사멸시키는 것을 확인하였다. 또한, 각각의 약물의 단독처리 시보다 병용처리 시에 cell viability가 더욱 감소함이 보였다 (Fig. 2).

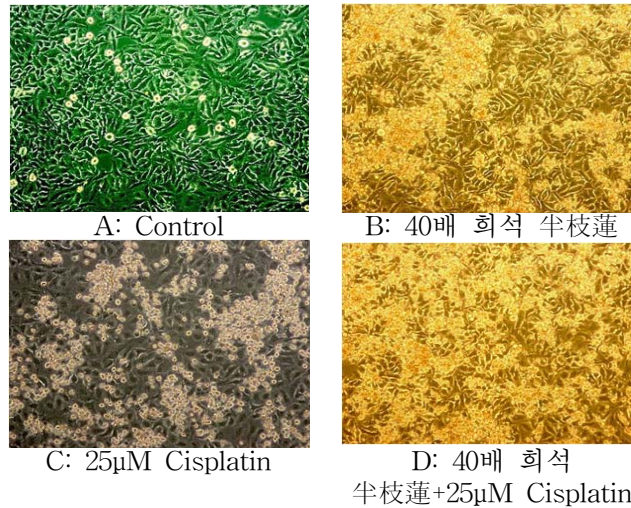


Fig. 2. Morphology Changes of HeLa cells which Treated with *S. barbata* MeOH Extract and Cisplatin

3. 半枝蓮과 Cisplatin 병용투여가 HeLa cell의 apoptotic morphology에 미치는 영향

半枝蓮과 Cisplatin 병용투여와 단독처리에 의한 각각의 항암작용을 apoptotic analysis를 통해 직접 비교분석하였다. 이는 Annexin V-FITC와 propidium iodide (PI) 염색을 통해 세포의 early apoptosis (Annexin V 양성 및 PI 음성), late apoptosis (Annexin V 양성 및 PI 양성) necrosis (Annexin V 음성 및 PI 양성)와 생존세포(Annexin V 음성 및 PI 음성)를 감별 측정하는 것이다.

대조군은 대부분 생존세포가 관찰되었

고 cisplatin으로 단독 처리했을 때에는 necrosis 5.02%, late apoptosis 49.86%와 early apoptosis 20.94%가 두루 관찰되었다. 半枝蓮 추출물로 단독 처리했을 때는 necrosis 8.58%, late apoptosis 88.32%, early apoptosis 0.30%가, 半枝蓮 추출물과 Cisplatin을 병용 처리했을 때에는 necrosis 6.08%, late apoptosis 91.58%, early apoptosis 0.38%로 半枝蓮 추출물만을 투여했을 때처럼 late apoptosis의 비율이 높은 양상을 띠었다.

Apoptosis assay를 통해 半枝蓮 MeOH 추출물과 cisplatin이 유도하는 apoptosis mechanism은 다르다는 것을 유추할 수

있었고, 병용투여 시 세포사멸의 효과가 Cisplatin 만을 단독 투여했을 때보다 약 21.16% 증가하고 半枝蓮 추출물만을 투여한 경우보다는 3.34% 증가하는 것을 보였다. 이중에서도 late apoptosis의 경우 병용 투여 시에 91.58%로 半枝蓮 추출물만을 투여했을 때 88.32%와 거의 흡사한 높은 비율을, early apoptosis의 경우 0.38%와 0.30%라는 매우 낮은 비율을 띠었고, 오히려 necrosis의 경우에는 병용 투여 시 6.08%로 半枝蓮 추출물만을 투여했을 때 8.58%보다도 낮아졌다. 이처럼 병용 투여 시 Cisplatin만을 단독 투여한 경우보다는 半枝蓮 추출물만을 단독 투여한 경우와 보다 유사한 양상의 세포사멸양상을 띠는 것을 관찰할 수 있

었다(Fig. 3).

그리고 apoptotic hallmark인 DNA fragmentation과 nuclear condensation의 변화를 DAPI staining을 이용하여 핵을 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다. 대조군에서는 apoptosis가 일어나지 않은 균질한 타원형 형광염색된 핵을 관찰하였고, 나머지 그룹에서는 DNA fragmentation과 nuclear condensation을 띄는 apoptosis 형태가 관찰되었고, 40배 희석 半枝蓮과 25 μ M Cisplatin을 병용 투여 시에 분절현상이 보다 더 진행되었고, 25 μ M Cisplatin 단독 투여 시보다는 40배 희석 半枝蓮 단독 투여 시의 핵에 근접한 모양이 관찰되었다(Fig. 4).

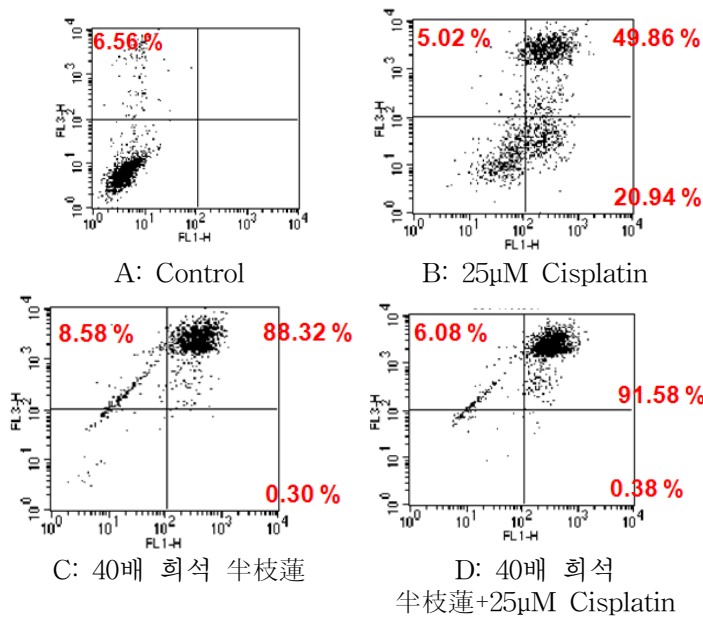


Fig. 3. The Effect of Cisplatin and *S. barbata* Extract on Apoptotic Portion in HeLa cells by Annexin V-FITC/PI Assay

Apoptosis was quantified by FAC Scan flow cytometry of Annexin V-FITC / PI double staining. A. HeLa cells were treated with control for 24 h; B. HeLa cells were treated with 40-fold diluted *S. barbata* extract for 24 h; C. HeLa cells were treated with for 25 μ M Cisplatin 24 h; D. HeLa cells were co-treated with of 40-fold diluted *S. barbata* extract and 25 μ M Cisplatin for 24 h.

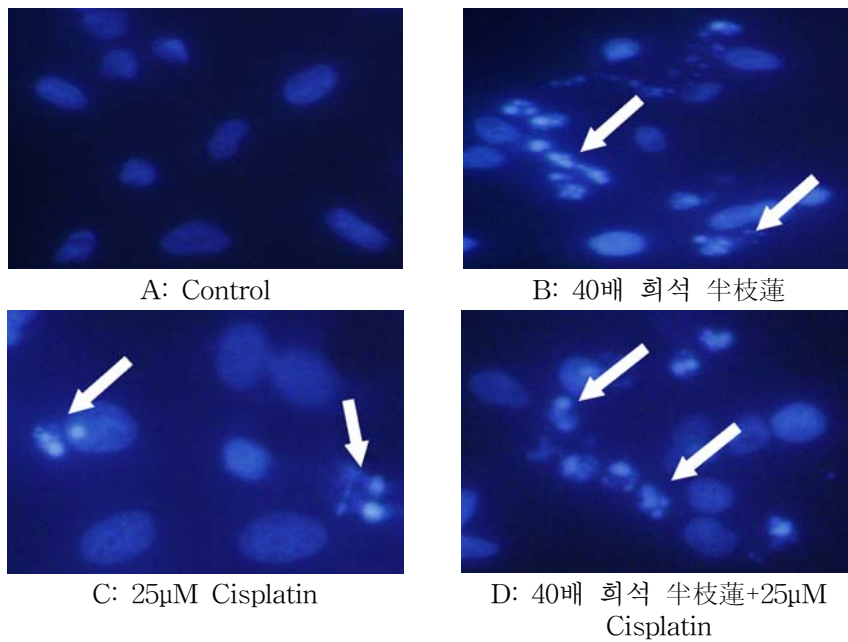


Fig. 4. DNA Fragments of Nuclei Were Observed in HeLa cells by DAPI Staining. Arrows indicate apoptotic cells and DNA fragments. A. Control; B. 40-fold diluted *S. barbata* extract; C. 25 µM Cisplatin; D.Co-treatment of 40-fold diluted *S. barbata* extract and 25 µM Cisplatin

4. 半枝蓮 MeOH extract와 Cisplatin의 병용투여가 HeLa cell의 cell cycle pattern에 미치는 영향

半枝蓮과 Cisplatin의 단독투여와 병용투여가 HeLa cells의 cell cycle pattern에 미치는 영향을 알아보기 위해서 cell cycle analysis를 수행하였다. 40배 희석된 半枝蓮과 25 µM Cisplatin의 단독투여와 병용투여된 HeLa cells의 cell cycle pattern을 비교 분석한 결과, 세포 주기 중에서 apoptotic portion을 나타내는 sub G1기를 살펴보면 25 µM Cisplatin만을 투여 시 18.52%, 40배 희석 半枝蓮만을 투여 시 4.29%, 40배 희석 半枝蓮

과 25 µM Cisplatin 병용투여 시 7.19%로 분석되었다. 이는 40배 희석 半枝蓮과 25 µM Cisplatin 병용투여 시 오히려 25 µM Cisplatin 단독투여 시 보다도 낮은 수치를 나타내며 半枝蓮 단독 투여 시와 비슷한 수치를 나타냄을 알 수 있었다. 앞선 apoptotic analysis에서 半枝蓮 단독투여와 병용투여 시 높은 apoptosis가 관찰된 결과와 달리 sub G1의 apoptotic portion이 낮게 관찰된 것은 半枝蓮이 cell cycle pattern에는 크게 영향을 미치지 않은 것으로 사료된다. 이는 궁극적으로 半枝蓮과 Cisplatin이 다른 세포사멸 기작을 가짐을 알 수 있다(Fig. 5).

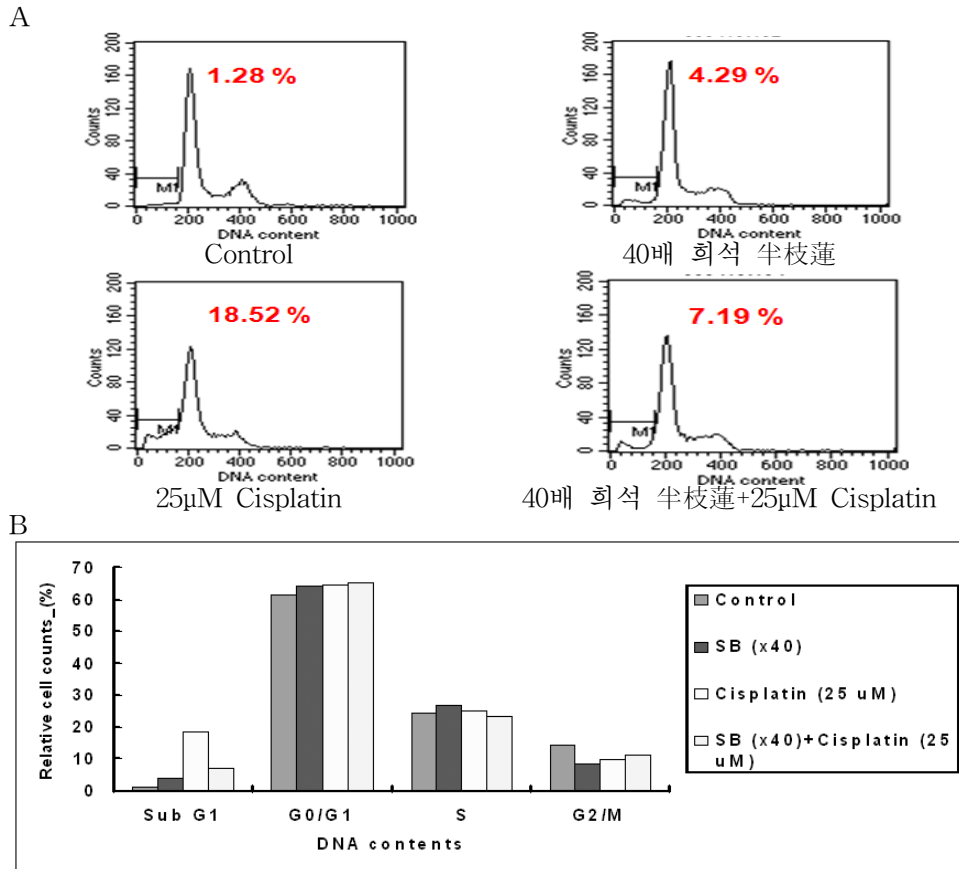


Fig. 5. The Effect of *S. barbata* Extract and Cisplatin on Cell Cycle Pattern and Apoptotic Portion in HeLa Cells
 HeLa cells were treated with control, 40-fold diluted *S. barbata* extract , 25 µM Cisplatin, and co-treatment of 40-fold diluted *S. barbata* extract and 25 µM Cisplatin for 24 h by cell cycle analysis.

5. 半枝蓮 MeOH extract와 Cisplatin의 병용투여가 단백질체 분리에 미치는 영향

protein 수준에서 半枝蓮 MeOH extract와 Cisplatin 병용투여가 대표적인 apoptotic maker인 Poly ADP ribose polymerase (PARP)의 cleavage에 주는 영향을 알아보기 위해 western blot analysis로 관찰 분석하였다. 대조군에서는 116kd의 PARP만 존재한다. 이와 비교해서 각 항암제를 처리했을 때 절단된

PARP가 나타났다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6A). PARP가 cleavage되는 일은 apoptosis일어나는 세포에서 나타나는 것으로 이는 곧 처리한 항암제들이 세포에 apoptosis를 유도한다고 결론내릴 수 있다. 그러나 PARP band를 image scanning 하여 densitometry를 측정한 결과 半枝蓮과 Cisplatin 병용투여 시에 PARP cleavage 수치가 半枝蓮 단독투여에 비해 낮은 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 6B). 이는 viability가 크게 감소했

던 위의 실험결과에 비추어 보면 병용투여는 세포를 고사시키긴 하되 apoptosis가 아닌 다른 기전에 의해서 임을 알 수 있다. 즉, 복합작용이 apoptosis를 감소시켰다고 유추할 수 있다. 즉, Morphology의 변화, apoptosis 분석, cell cycle pattern의 변화, 단백질 분석 모두 공통적으로

Cisplatin의 pattern과는 다른 양상을 보이며 게다가 半枝蓮과 Cisplatin의 병용투여 시에는 Cisplatin 단독투여의 효과보다 半枝蓮의 효과가 더욱 더 강하게 나타남을 보이며 궁극적으로는 각각의 단독투여보다는 HeLa cells의 사멸을 더욱 촉진하는 것으로 사료된다(Fig. 2-6).

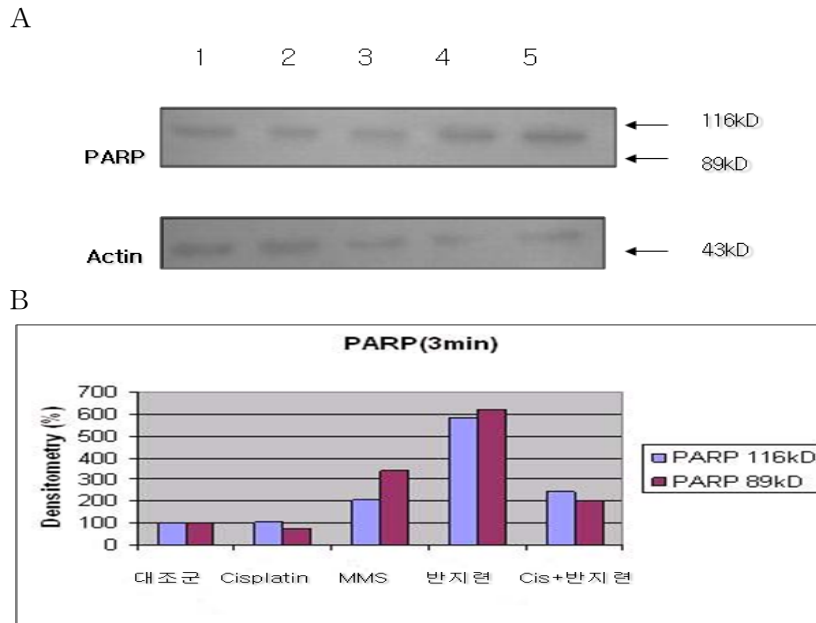


Fig. 6. The PARP Cleavage Changes by Western Blot Analysis of Cisplatin and *S. barbata* MeOH Extract

A. Western blotting analysis of apoptosis-regulating proteins such as PARP in HeLa cells treated with various reagents for 24 h. Lane 1, Untreated; Lane 2, 25 μM cisplatin; Lane 3, 6 mM MMS; Lane 4, 40-fold diluted *S. barbata* MeOH extracts; Lane 5, Co-treatment with 25 μM cisplatin and 40-fold diluted *S. barbata* MeOH extracts; B. Graphical representation of the data shown in A.

IV. 고찰

半枝蓮(*S. barbata*.)은 藥性이 平 또는 涼하고, 味는 辛微苦하며 肝, 脾, 肺, 胃, 大腸으로 歸經한다¹²⁾. 그 효능은 清熱解毒, 祛瘀止痛, 消腫散結, 行氣利水, 止血 등의 작용이 있어서 濕熱黃疸, 咽喉腫痛,

肺癰, 疔瘡, 瘰癧, 吐血, 衄血, 血淋과 같은 熱毒症狀과 간암, 소화기암, 자궁암 등의 각종 암치료에 사용되는 한약재이다¹³⁻²⁴⁾.

현재 半枝蓮의 암세포에 대한 cytotoxicity mechanism은 명확하게 밝혀지지 않았다. 하지만 선행된 연구 결과를 통해 半

半枝蓮이 다양한 cancer cell type에 세포사멸을 유도하는 것을 알 수 있다. 이에 선행된 연구를 바탕으로 HeLa cell에 암세포의 apoptosis를 증가시키는 cytotoxicity mechanism을 관찰하였다.

Cisplatin은 암세포의 DNA에 비가역적으로 반응하여 guanine redue 사이에 intra, inter strand crosslink를 형성함으로써 DNA 구조를 변화시켜 암세포를 사멸시키거나 또는 calcium transduction channel을 방해하여 세포에 손상을 주는 항암제이다^{27,28}. 따라서 자궁경부암, 대장암, 폐암, 난소암 등 고형암 치료에 있어서 효과적인 화학요법제로 이용되고 있다^{29,30}. Cisplatin의 반응율은 단독요법보다는 복합 항암화학요법에서 더 뛰어났다는 결과 보고가 이어지고 있다¹. 항암제의 부작용을 줄이고 암세포에 세포독성을 일으키는데, 보다 효과증강을 위하여 서로 다른 기전을 지닌 항암제들의 용량을 낮추어 함께 투여하는 방법들이 연구되어지고 있다^{7,11,25,31}.

한편 HeLa cell은 자궁경부암 조직에서 유래된 세포주로서 부인과 악성질환 중 주요한 부분을 차지하는 자궁경부암의 연구 및 일반적인 항암제 연구에 많이 이용되는 세포주이다^{7,31}.

半枝蓮 extracts와 Cisplatin을 HeLa cell에 병용투여한 후 MTT assay로 cell viability를 살펴보았다. 半枝蓮 MeOH extracts와 Cisplatin 각각 처리 시 농도 의존적으로 생존율이 감소하는 것을 확인하고 그 정도를 비교하여 半枝蓮 물중탕 extracts과 MeOH extracts와 Cisplatin의 상호작용에 의해 세포독성의 효과가 더 커지는 것을 알 수 있었다. 이때 Cisplatin의 농도를 포화농도였던 25 μ M

로 일정하게 하고 半枝蓮의 농도를 점차 높여서 처리하였고, 半枝蓮은 물중탕 extracts과 MeOH extracts를 이용하였다. 또한 半枝蓮의 농도를 포화농도였던 40배 희석으로 일정하게 하고 Cisplatin의 농도를 점차로 높여서 처리하여 일련의 실험을 진행하였다. 이 경우에도 半枝蓮은 물중탕 extracts과 MeOH extracts를 이용하였다.

세포사(cell death)의 기전 중에는 necrosis와 apoptosis가 있는데, necrosis는 주로 미토콘드리아를 포함하는 세포질의 변화를 중심으로 일어나는 현상으로 광범위한 세포 무리의 용해와 함께 세포 내용물의 무질서한 누출과 이에 수반되는 염증 반응을 특징으로 세포가 사멸하는 것이라면, apoptosis는 초기에 핵의 응축, 세포질의 응축, 수포상의 세포돌기 형성 등이 관찰되며 핵 DNA가 절단되어 일어나는 세포사멸과정이다³². 특히 비가역적인 세포 손상을 일으키는 necrosis와는 달리 apoptosis는 일정 단계에서 가역적이며, 항암제에 의해서 유도되는 apoptosis는 종양세포에 대해 전형적인 형태학 및 생화학적 소견을 보임으로써 종양세포의 apoptosis와 종양의 치유기전 사이에 깊은 연관이 있다³³.

Apoptosis assay를 통해 半枝蓮 MeOH extracts와 Cisplatin이 유도하는 apoptosis mechanism이 다르다는 것을 유추할 수 있었고, 이 결과 또한 복합처리 시 세포사멸의 효과가 증가하는 것을 보였다. 이는 Annexin V-FITC와 propidium iodide (PI) 염색을 통해 세포의 early apoptosis (Annexin V 양성 및 PI 음성), late apoptosis (Annexin V 양성 및 PI 양성) necrosis (Annexin V 음성 및 PI 양성)

와 생존세포(Annexin V 음성 및 PI 음성)를 감별 측정하였다. 半枝蓮 추출물과 Cisplatin을 병용 투여할 때 나타나는 양상이 半枝蓮 추출물만을 투여했을 때처럼 late apoptosis의 비율이 높은 양상을 띠었다. Cisplatin이 유도하는 apoptosis mechanism보다는 半枝蓮 추출물의 apoptosis mechanism과 매우 흡사한 것을 관찰할 수 있었고, 이를 통해 복합효과가 半枝蓮에 의해서 강화된다는 것을 알 수 있었다.

정상세포에서의 apoptosis는 적절히 진행되어야 하는데, 이 과정의 부적절한 진행은 물론 과잉생성 역시 다양한 질병을 야기시킬 뿐만 아니라 정상태아발달 과정과 노화에 깊이 관여한다³⁴⁾. 따라서 모든 세포는 G1, S, G2, M기로 이루어진 일정한 세포주기를 반복하며 성장하게 되고³⁵⁾, 이러한 세포주기는 다양한 cyclin들에 의하여 조절되는데³⁶⁾, 다양한 산화적 스트레스를 세포에 가하면 apoptosis가 유발되면서 세포주기의 정지를 초래하게 된다^{37,38)}.

실험 결과 cell cycle analysis에서는 Cisplatin만을 투여했을 때보다 半枝蓮 추출물과 Cisplatin을 병용 투여 시 sub G1의 증가가 보였고, 이는 半枝蓮과 유사한 양상을 보였다. 이를 통해 半枝蓮이 cell cycle pattern에 더 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.

半枝蓮, Cisplatin, 半枝蓮과 Cisplatin 병용 투여에 의한 HeLa cell의 DNA 분절현상을 확인하기 위해 DAPI staining을 이용하여 핵을 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다. Cell morphological assessment 결과 모두 DNA 분절현상의 apoptosis 형태가 관찰되었고, 半枝蓮과

Cisplatin 병용 투여 시 분절현상이 조금 더 진행된 것으로 관찰되었다.

Cell 실험을 통해 알아본 半枝蓮과 Cisplatin의 복합효과가 실제적으로 대표적인 apoptotic maker인 PARP의 cleavage에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위해 western blot analysis로 protein 수준에서 분석하였다. 기질 단백질인 PARP를 분해하여 핵 밖으로 노출시켜 DNA 분절 등의 핵변화보다 먼저 apoptosis를 감지할 수 있다. PARP 단백질의 분절로 세포내 apoptosis의 전형적인 형태학적 변화인 DNA 분절을 일으킨다³⁹⁾. PARP가 cleavage되는 일은 apoptosis가 일어나는 세포에서 나타나는 것으로 이는 곧 처리한 항암제들이 세포에 apoptosis를 유도한다고 결론 내릴 수 있었다. 그런데 PARP band를 image scanning하여 densitometry를 측정한 결과 半枝蓮과 Cisplatin 병용 처리 시에 PARP cleavage 수치가 半枝蓮 단독 처리에 비해 낮은 것을 확인 할 수 있었다.

이처럼 MTT assay를 통해 cell viability를 분석하고, cell cycle analysis를 통하여 半枝蓮이 HeLa cell의 cell cycle arrest에 미치는 영향을 확인하였고, DAPI staining을 이용하여 DNA 분절현상을 형광현미경으로 관찰하고, Cell morphological assessment 결과 모두 DNA 분절현상의 apoptosis 형태를 관찰할 수 있었다. 半枝蓮과 Cisplatin의 복합처리 시에는 Cisplatin 단독처리의 효과보다 半枝蓮의 효과가 더욱 강하게 나타남을 보이며, 궁극적으로는 각각의 단독처리보다는 HeLa cell 사멸을 더욱 촉진하는 것으로 사료되었다. 더욱이 Annexin V-FITC와 propidium iodide(PI) 염색을 통한 관찰

과 PARP의 cleavage의 분석, 세포주기 subG1비율분석은 Cisplatin의 pattern과는 다른 양상을 보이고 있어 半枝蓮이 apoptosis 이외의 다른 기전으로 항암효과를 더욱 증가시킨다는 것을 추측하게 하였다.

향후 후속 연구들을 통해 半枝蓮의 병용 투여가 갖는 항암작용 증가 효과와 그 기작을 보다 상세히 밝히고 항암환자들에게 임상적으로 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

半枝蓮 추출물과 Cisplatin을 HeLa cell에 처리순서, 농도별, 추출용매(물, MeOH)를 달리하여 병용 투여 시 半枝蓮의 항암작용의 증강효과를 다각도로 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

半枝蓮의 MeOH 추출물은 HeLa cell에 대해 cytotoxicity를 가지는데, 半枝蓮의 MeOH 추출물과 Cisplatin은 HeLa cell에 대해 apoptosis를 유도하며 병용 투여 시 세포사멸의 효과는 증대되었다.

즉 Morphology의 변화, cell cycle pattern의 변화, apoptosis 분석, 단백질 분석 등에 의하면 Cisplatin가 유도하는 apoptosis와는 다른 양상을 보이며, 더욱이 半枝蓮과 Cisplatin의 병용 투여 시에는 半枝蓮과 Cisplatin 각각의 단독 투여 시보다 cytotoxicity 효과가 더 강하게 나타났다.

참고문헌

1. 대한산부인과학회. 부인과학 제4판. 서

울: 고려의학. 2007;693-736.

2. 한의부인과학 편찬위원회. 한의부인과학 상. 서울: 도서출판 정담. 2002;303-307, 322-329.
3. 송병기. 한방부인과학. 서울: 행림출판사. 1998;249-253.
4. Tanakaa-Kagawa T et al. Reduced sensitivity of HeLa cells to cisplatin by imultaneous overexpression of copper, zinc-superoxide dismutase and catalase. Biochemical pharmacology. 1999;57(5):545-548.
5. Mensner PW et al. Chemotherapy-induced apoptosis. Advances In Pharmacology. 1997;41:461-499.
6. Williams G. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. Cell. 1991;65:1097-1098.
7. 안태규 등. 자궁경부암 세포주에서 Cisplatin에 대한 녹차 추출물의 효과. 대한산부인과학회지. 2006;49(3):592-598.
8. JS Eun et al. Cytotoxicity of reaction-precipitate from coptidis Rhzoma and Glycyrrhizae Radix aqueous mixture. Korean Journal of Pharmacognocny. 1994;25(3):356.
9. JS Eun, WY Song. The combined effect of n-BuOH fraction of Ulmi cortex and anticancer drugs on cancer cell lines. Korean Journal of Pharmacognocny. 1994;25(3):144-152.
10. RK Oldham. Biological Response Modifiers. Journal of the National Cancer Institute. 1993;70:789-796.
11. 조수인, 김형우. Cisplatin 유도 신장 독성에 대한 蓮根 추출물의 보호 효

- 과. 대한본초학회지. 2003;18(4):127-134.
12. 김창민 등. 중약대사전. 도서출판 정담. 1997;1501-1504.
 13. 서진우 등. 半枝蓮이 난소암세포(SUN-251)의 성장억제에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 1999;12(1):151-160.
 14. 권은정 등. 半枝蓮이 유방암에 미치는 영향에 관한 연구. 대한한방부인과학회지. 1999;12(2):148-182.
 15. Yin X et al. Anticancer activity and mechanism of *Scutellaria barbata* extract on human lung cancer cell line A549. *Life Sci.* 2004;75(18):2233-2244.
 16. TK Lee et al. Inhibitory effects of *S. barbata* on human uterine leiomyoma smooth muscle cell proliferation through cell cycle analysis. *Int Immunopharmacol.* 2004;4(3):447-454.
 17. Sato Y et al. Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol.* 2000;72(3):483-488.
 18. 김동일. Inhibition effect of *Scutellaria barbata* Don Water-extracts on the growth and DNA incorporation of human cancer cells. 대한한의학회지. 2006;27(4):162-173.
 19. 王西京. 半枝蓮提取物對 H22 肝癌荷瘤小鼠化療的增效減毒作用. 中西醫結合學報. 2008;6(7):720-724.
 20. 王西京. 半枝蓮含葯血清對肝癌 H22 細胞凋亡及錢粒體膜電位的影向. 中西醫結合學報. 2008;6(8):821-826.
 21. 이윤정 등. 半枝蓮이 자궁암세포 (HeLa22918)의 성장억제에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 1999;12(1):185-196.
 22. EK KIM et al. Induction of G1 arrest and apoptosis by *Scutellaria barbata* in the human promyelocytic leukemia HL-60 cell line. *Int J Mol Med.* 2007;20(1):123-128.
 23. 하지연 등. 半枝蓮이 HeLa Cell의 增殖抑制와 死滅에 미치는 影響. 대한한방부인과학회지. 2006;19(4):47-60.
 24. YY Cha et al. Methylene chloride fraction of *Scutellaria barbata* induces apoptosis in human U937 leukemia cells via the mitochondrial signaling pathway, *Clinica Chimica Acta.* 2004;348:41-48.
 25. 조해중. 자궁경부암 세포주에서 활성 산소종의 영향에 의한 Apoptosis를 통하여 세포성장을 억제하는 Cisplatin 과 Berberine의 상승효과. 동의생리병리학회지. 2007;21(4):992-997.
 26. 양정민 등. 山藥의 항산화 작용에 대한 단백질체 분석 연구. 대한한방부인과학회지. 2008;21(2):108-124.
 27. Ravi R et al. Mechanism of cisplatin ototoxicity. Antioxidant system. *Pharmacology & Toxicology.* 1995;76:386-94.
 28. Schmidt F et al. Lovastatin and phenylacetate induce apoptosis, but not differentiation, in human malignant glioma cells. *Acta Neuropathologica.* 2001;101:217-24.
 29. Crown JP. The platinum agents: a role in breast cancer treatment? *Semin Oncol.* 2001;28:28-37.

30. Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci.* 2000 ;57:1229-1235.
31. 김현경 등. 시스플라틴과 녹차 추출물의 병용에 의한 세포성장 저해 효과. *부인종양.* 2005;16(4):347-353.
32. Tomei LD, Kanter P, Wenner CE. Inhibition of radiation induced apoptosis in vitro by tumor promoters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988;155:324.
33. 고경희 등. Cisplatin에 의한 HeLa 세포의 세포고사에 미치는 활성산소종의 영향. *대한산부인과학회지.* 2003 ;46(12):2410-2416.
34. Joaquin A.M, Gollapudi S. Functional decline in aging and disease: a role for apoptosis. *J Am Geriatr Soc.* 2001;49(9):1234-1240.
35. Howard A, Pelc SR. Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity.* 1953;6:261.
36. Minshull J et al. The role of cyclin synthesis, modification and destruction in the control of cell division. *J Cell Sci.* 1989;12(suppl):77-97.
37. Liu MJ et al. Methylprotodioscin induces G2/M arrest and apoptosis in K562 cells with the hyperpolarization of mitochondria. *Cancer Letters.* 2005 ;224(2):229-241.
38. Hou R et al. Diosgenin induces apoptosis in HeLa cells via activation of caspase pathway. *Acta Pharmacol Sin.* 2004;25(8):1077-1082.
39. Hara S et al. Over expression of inhibitor of caspase-3 activated deoxyribonuclease in human renal cell carcinoma cells enhances their resistance to cytotoxic chemotherapy in vivo. *J Urol.* 2001;166:2491-2494.