

와송의 HL60백혈병세포의 Apoptosis유도 효과

오찬호^{1*} · 배진범¹ · 김남석¹ · 전 훈² · 한광수³ · 이문준⁴ · 권 진⁵

¹우석대학교 식품생명공학과, ²우석대학교 약학대학, ³우석대학교 대체의학과,
⁴전북대학교 환경생명자원대학, ⁵한국재활복지대학 의료보장구과

Effect of *Orostachys japonicus* A. Berger on Apoptosis Induction of Human Leukemia HL60 Cells

ChanHo Oh^{1*}, JinBeom Bae¹, NamSeok Kim¹, Hoon Jeon², KwangSoo Han³,
MoonJun Lee⁴ and Jin Kwon⁵

¹Department of Food & Biotechnology, Woosuk University, Wanju 565-701

²College of Pharmacology, Woosuk University, Wanju 565-701

³Department of Alternative Medicine, Woosuk University, Wanju 565-701

⁴College of Environmental & Bioresource Sciences, Chonbuk National University, Jeonju 561-756

⁵Department of Prosthetics and Orthotics, Korea National College of Rehabilitation and Welfare, Pyongtaek 459-070

Abstract – Methanol extracts of *Orostachys japonicus* A. Berger (OAB) were found to exhibit apoptosis induction of HL60 human acute promyelocytic leukemia cells. Treatment of OAB exerted strong cytotoxicity against HL60 cells. OAB induced DNA fragmentation of HL60 cells in a dose dependent manner. Nitric oxide production were also increased in OAB-treated RAW264.7 macrophage cell lines. Treatment of OAB increased the expression of p53 and iNOS gene and the expression of p53, NF-κB and iNOS protein in cultured HL60 and RAW264.7 cells. These results suggest that OAB are effective on strong anti-cancer properties and can be useful as a chemo-preventive agents.

Key words – *Orostachys japonicus* A. Berger, HL60 leukemia cell, apoptosis, p53, NF-κB

와송 (*Orostachys japonicus* A. Berger)은 岩松 또는 屋松으로 불리우며, 들나물과에 속한 다년생 초본으로서 오래된 기와지붕 또는 깊은 산중의 바위 중에서 생육하는 식물이다. 예로부터 알려진 주된 약리효능으로는 혈관수축, 호흡흥분 및 장관의 긴장도 증강작용¹⁾등이 보고되어 있으며 한방에서는 해열, 지혈, 소종, 이뇨 등에 응용되고 있고 민간요법으로 항암 요법제로 많이 사용되고 있지만 자세한 작용기전에 대한 연구보고는 거의 없는 실정이다.^{2,3)} 본 연구자 등은 이미 와송이 면역체계에 미치는 영향 등을 관찰하여 발표⁴⁾를 한 바가 있으며 와송추출물의 각종 암세포에 미치는 항암효능에 관한 연구보고가 아직 미흡한 실정이어서 여기에서는 와송의 주로 인간 백혈병세포에 미치는 아포토시스 유도효과를 검토하고 약간의 지견을 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 및 추출 – 본 실험에 사용한 와송은 울산 광명당제약에서 구입하여 100 g을 95%의 메탄올로 추출한 후, 여과한 여액을 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결건조하여 (이하 OAB라 함) 멸균 PBS에 용해시켜 사용하였다.

계대배양 세포주 – 본 실험에 사용한 세포주로서는 한국세포주은행(KCLB)에서 분양받은 HL60 (human acute promyelocytic leukemia cell) 인간 급성 전골수성 백혈병세포주, 293T (human embryonic kidney epithelial cell) 인간 신장 상피세포주 및 RAW264.7 (mouse monocyte/macrophage cell) 대식세포주를 사용하였다.

시약 및 기구 – 실험에 사용한 시약은 RPMI1640배지, fetal bovine serum (FBS), phosphate buffered saline (PBS), propidium iodide (PI) 등은 Sigma, Nonidet NP-40

*교신저자 (E-mail): choh@woosuk.ac.kr
(Tel): 063-290-1431

(Amresco), Taq DNA polymerase, M-MLV reverse transcriptase, Oligo (dT), PCR marker (Promega), dNTP set (Amersham), p53/iNOS/NF- κ B rabbit polyclonal IgG antibody, goat anti-rabbit IgG-HRP antibody, Coomassie Blue R-250(Santa Cruz) 등이며 사용기기는 ELISA reader (Molecular Device, VERSAmax), Flow cytometer (Coulter, EPICS-XL), PCR system (Takara, PCR Thermal cycler Dice), 전기영동장치(Mupid-21) 등을 사용하였다.

세포생존율 측정 - MTT법⁵⁾에 의해 HL60세포 및 293T 세포배양계에 각 농도의 OAB를 첨가하여 48시간 동안 37°C의 CO₂배양기 (5%-CO₂, 95%-air) 내에서 배양하였다. 배양 종료 4시간 전에 5 mg/ml농도로 DPBS-A(pH 7.4)에 희석한 MTT용액 20 μ l를 각 well에 첨가하고, 0.1 N HCl에 녹인 10% SDS 100 μ l로 용해시켜 18시간 동안 은박지로 빛을 차단하였다. 발색된 각 well의 흡광도를 ELISA reader를 이용해서 570 nm에서 측정하고 대조군의 흡광도와 비교하여 세포생존율을 백분율로 환산하였다.

Flow Cytometer에 의한 Apoptosis 측정 - HL60세포에 각 농도의 OAB를 첨가한 후, 24시간 동안 배양한 다음, 세포를 수집, 세정 ($\times 3$ 회, 1,500 rpm, 5분)한 후, 침전시킨 세포분획에 PI(10 μ g/ml)를 20 μ l/ 1×10^6 세포의 농도로 염색 (4°C, 30분간 반응)한 다음 flow cytometer (Coulter, EPICS XL; excitation: 488 nm, emission: 620 nm)를 이용해서 Sub-G1 peak를 정량하였다.⁶⁾

Nitric oxide (NO) 측정 - Griess 방법⁷⁾에 준하여 RAW 264.7세포를 5×10^5 세포/ml로 조정하여 12 well plate의 각 well에 부착시킨 후, 검체를 농도별로 처리하였다. 37°C의 CO₂ 배양기 내에서 24시간 동안 배양한 후 NO를 측정하였다. NO측정은 Griess시약 (1% sulfanilamide, 0.1% N-naphthyl-ethylenediamine \cdot 2HCl/2.5% phosphoric acid)을 사용하여 570 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하고 미리 작성한 NaNO₂의 검량선에 의해 NO₂의 농도를 환산하였다.

RT-PCR - HL60세포 및 RAW264.7세포에 OAB (1~100 μ g/ml)를 첨가한 후, 24 시간 동안 배양한 후, 세포로부터 RNA를 분리하여 p53 및 iNOS 유전자를 확인하였다. Total RNA는 Trizol reagent를 이용하며 제조사의 방법에 준하였다. cDNA는 M-MLV reverse transcriptase와 oligo dT를 primer로 이용하여 합성하고, Taq DNA polymerase를 이용하여 Takara PCR thermocycler (DICE)에서 30 cycle동안 증폭하였다. 각각의 cycle은 95°C에서 30초간 denaturation 시킨 후, 55°C에서 30초간 annealing시키고, 72°C에서 30초간 extension시켰다. PCR 산물은 1% agarose gel상에서 전기영동하고, ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.⁸⁾

Western Blotting - HL60세포 및 RAW264.7세포에 OAB (1~100 μ g/ml)를 첨가한 후, 24시간 동안 배양하고 1%

NP-40 lysis buffer (250 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA pH 8.0, 1% NP-40, 0.6 mM PMSF, 10 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml pepstatin A)로 단백질을 분리하였으며, Coomassie blue R-250을 이용한 Bradford법을 사용해 정량하였고, Western blot analysis를 하기 위해 단백질 20 μ g을 12.5% SDS-PAGE를 실행한 다음, nitrocellulose membrane으로 transfer한 후, 5% Non-Fat Dry Milk로 18시간 동안 blocking하고, p53/NF- κ B/iNOS rabbit polyclonal IgG antibody (1:1000 dilution)로 1차 염색하여 4°C에서 1시간 동안 반응시키고, goat anti-rabbit IgG-HRP conjugated antibody로 2차 염색하여 동일한 방법으로 반응시켜 X-ray필름을 enhanced chemiluminescence (ECL)법으로 감광하였다.⁹⁾

통계학적 처리 - 모든 data는 mean \pm S.D.로 나타내었고 통계처리는 Student's t-test를 실시하여, p<0.05이하를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.¹⁰⁾

결과 및 고찰

와송(OAB)의 항암효과를 주로 아폽토시스와 관련하여 검토하고자 계대배양한 인간 급성 전골수성백혈병세포주인 HL60세포 배양계에 메탄올로 추출한 OAB를 농도별(1-100 μ g/ml)로 첨가해서 백혈병세포의 생존율에 미치는 효과를 살펴보았다. MTT법으로 측정한 결과에서 OAB는 HL60 백혈병세포의 생존율을 농도의존적으로 감소시키고 있음을 확인하였다(Fig. 1). 또한 대조군으로 사용한 정상 293T (human kidney epithelial cell)세포에서는 세포생존율에 별다른 영향이 없었다. 이러한 결과는 OAB가 백혈병세포의 증식을 억제시켜 항암활성을 나타내는 것으로 추정되며 동일한 농도에서 정상의 신장상피세포에서는 세포독성이 없음을 확인하였다. (Fig. 1)

다음에는 HL60세포의 아폽토시스 유도에 미치는 효과를 검토하기 위하여 HL60세포 배양계에 OAB(1~100 μ g/ml)를 첨가해서 Flow cytometer를 이용해서 Sub G1 peak를 측정한 결과, HL60세포의 apoptosis를 농도의존적으로 유의성있게 촉진시키고 있음을 확인하였는데(Fig. 2), 이 결과는 상기의 세포생존율을 억제시키는 결과와 일맥상통하는 결과이고, OAB가 L1210 및 U937백혈병세포의 아폽토시스를 증가시켜서 항암작용을 가진다는 이전의 연구보고⁴⁾와도 일치하는 결과라 할 수 있으며, 또한 과산화수소로 유도한 신경세포의 아폽토시스를 OAB에 의해 보호한다는 연구결과¹¹⁾에 비추어보면 OAB는 세포에 따라서 선택적으로 작용하고 있는 것으로 사료되어 매우 의미있는 결과라 추정된다. (Fig. 2)

또한 상기의 결과들을 뒷받침하는 작용기전을 확인하기 위하여 이번에는 NO(Nitric oxide)생성에 미치는 와송의 효과를 살펴보려고, 대식세포주인 RAW264.7세포 배양계에 OAB를 농도별로 처리하고 NO생성에 미치는 효과를 살펴

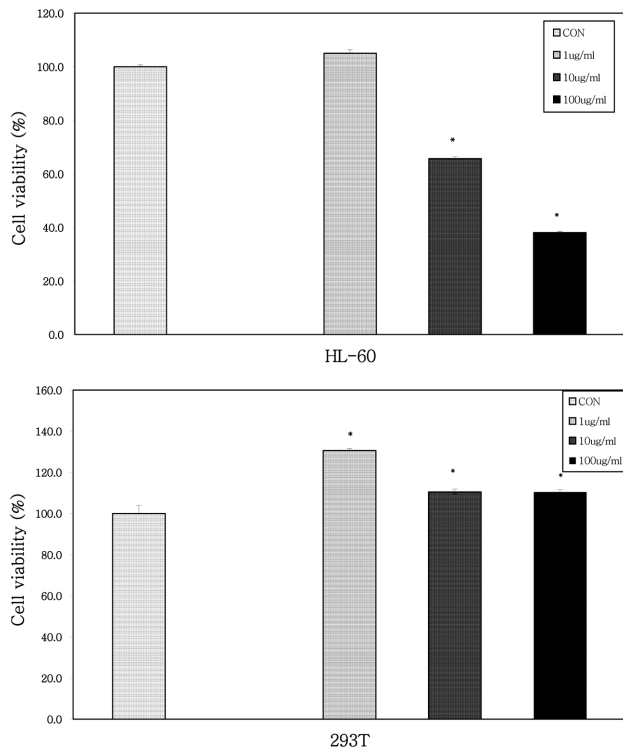


Fig. 1. Effect of the OAB on the proliferation of HL60 (human acute promyelocytic leukemia), and normal 293T (human embryonic kidney epithelial) cell lines *in vitro*. Sample was added into the cultured different cell lines at indicated concentration and cultured for 48 hours at 37°C. The proliferation of the cells was assayed by MTT method. Each bar represents the mean±S.D. of three determinations. *: Significantly different from control group(*p<0.05)

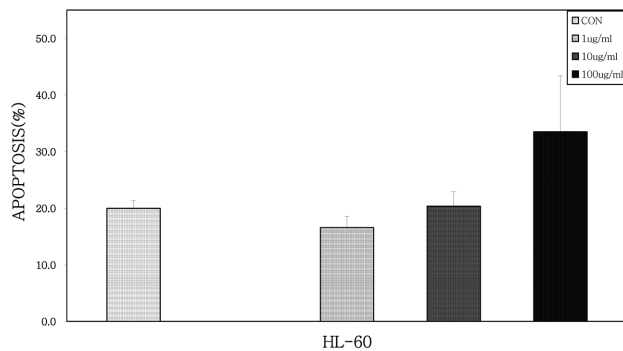


Fig. 2. Effect of the OAB on the DNA fragmentation of HL60 leukemia cell line. Sample were treated to cultured HL60 leukemia cell lines, incubated for 24 hours, and then cells were collected and the DNA fragmentation (Sub G₁ peak) was measured by a flow cytometer staining with propidium iodide. The data represents the mean±S.D. of 3 experiments. *: Significantly different from control group(*p<0.05)

본 결과, OAB 10 및 100 µg/ml의 농도에서 대조군에 비하여 유의성있는 NO생성의 증가가 관찰되었다(Fig. 3). 이 결

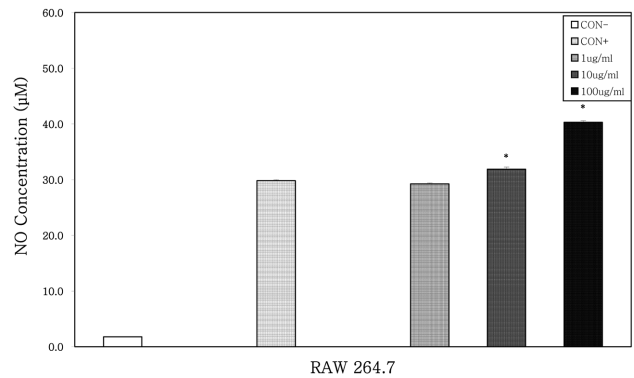


Fig. 3. Effect of the OAB on the nitric oxide production from RAW264.7 macrophage cell line. Sample was added into the cultured RAW264.7 macrophage cell line and incubated in a 5% CO₂ incubator at 37°C for 24 hours. The OD of each well was measured at 570 nm with a ELISA reader. Nitric oxide standard curve were measured with NaNO₂. Each bar represents the mean±S.D. of three determinations. CON(-): Non-treatment, CON(+): LPS-treatment *: Significantly different from control group(*p<0.05)

과는 OAB가 대식세포에서 생성되는 NO를 증가시킴으로써 면역계의 활성을 조절하여 결과적으로 암세포의 아포토시스를 유도하는 것이라 추정된다. NO는 생체내에서 vasodilating agent, neurotransmitter로서의 작용이외에 세균이나 암세포에 대한 비특이적 효능물질로서 잘 알려져 있고 특히 생쥐에서는 대식세포 등의 탐식작용을 지니는 세포에서 분비되는 물질이다.^{12,13)} 상기의 결과는 항암성분인 flavone-8-acetic acid와 xantherone-4-acetic acid가 대식세포를 활성화시키며 NO생성이 촉진되어 항암작용을 한다는 이전의 연구보고¹⁴⁾와 유사한 결과라 할 수 있다. (Fig. 3)

상기의 결과들을 재확인하기 위하여 항암유전자인 p53 및 NO생합효소(iNOS) 유전자발현에 미치는 효과를 검토해보았다. 결과는 HL60세포 및 RAW264.7세포 배양계에 OAB(1~100 µg/ml)를 첨가하여 배양한 결과, 대조군에 비하여 현저한 p53유전자 및 iNOS 유전자의 발현이 촉진되었음이 관찰되었다(Fig. 4). 이러한 결과는 OAB가 NO생합효소인 iNOS 유전자의 활성을 증강시키고 결과적으로는 종양억제유전자인 p53유전자를 활성화시킨 결과, 백혈병세포에 대한 항암활성을 나타내고 있음을 뒷받침하는 중요한 결과라 시사된다. (Fig. 4)

최종으로 상기의 백혈병세포의 아포토시스를 유도하는 활성을 단백질발현 패턴으로 확인하고자 HL60세포에 OAB (1-100 µg/ml)를 첨가해서 24시간 동안 배양한 다음 p53, NF-κB 단백질 발현과 RAW264.7세포에 OAB를 첨가해서 iNOS 단백질발현을 Western blot으로 확인해 본 결과, 대조군에 비하여 OAB를 첨가한 군에서 상기 단백질들의 발현이 농도의존적으로 증가되었다(Fig. 5). p53단백질은 암세포

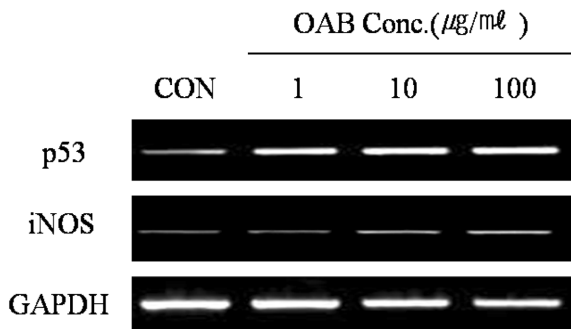


Fig. 4. Effect of OAB on the p53 and iNOS gene expression in HL60 cell and RAW264.7 cell. Treatment of OAB for 24 hours leads to increase the p53 gene expression in HL60 leukemia cell and iNOS gene expression in RAW264.7 cell. Poly(A⁺)RNA isolated from untreated cells(CON) and cells treated with OAB for 24 hours.

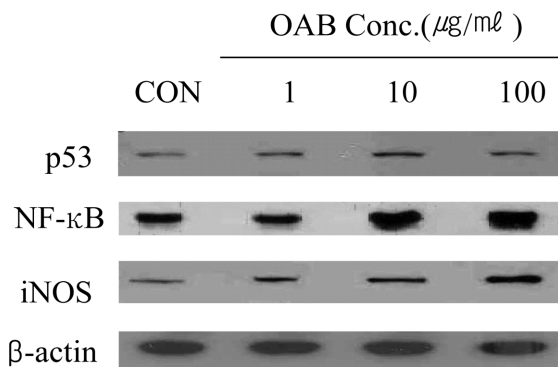


Fig. 5. Western blot analysis of OAB on the expression of p53, NF-κB in HL60 leukemia cell and iNOS in RAW264.7 cell. Treatment of OAB for 24 hours leads to increase the expression of p53 and NF-κB protein in HL60 cell and iNOS expression in RAW264.7 cell.

Lane 1; CON(negative control), Lane 2; OAB 1 µg/ml, Lane 3; OAB 10 µg/ml, Lane 4; OAB 100 µg/ml

의 아폽토시스를 비롯하여 광범위하게 종양억제에 관여하는 단백질로 알려져 있으며, NF-κB는 면역, 염증 스트레스, 세포증식 및 아폽토시스를 조절하는데 관여하는 전사인자로 알려져 있다.¹⁵⁻¹⁹⁾ 본 실험결과에서 OAB는 HL60세포에서의 p53 등 항암관련 단백질과 NF-κB(p50)의 induction을 농도의존적으로 증가시키며 또한 NO 생합성효소인 iNOS 단백질 발현을 농도의존적으로 증가시켜 암세포의 아폽토시스를 유도하는 항암활성을 보유하고 있는 것으로 추정된다. (Fig. 5)

결론

외송 (*Orostachys japonicus* A. Berger; OAB) 메탄추출

물의 HL60 백혈병세포에 대한 항암작용을 연구하기 위하여 HL60(인간 급성 전골수성 백혈병세포주)세포의 아폽토시스 유도에 미치는 효과를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

외송 메탄추출물(OAB)의 세포독성을 확인하기 위하여 MTT assay를 수행한 결과 HL60백혈병세포의 증식을 농도의존적으로 억제시켰으며 대조군으로 사용한 정상 293T(신장 상피세포주)에서는 고농도에서도 세포독성이 없음을 확인하였다. OAB는 HL60세포의 apoptosis를 유의성있게 증가시켰고, 대식세포주인 RAW264.7세포에서의 NO생성을 농도의존적으로 촉진시켰다. 또한 RT-PCR에 의한 아폽토시스 관련 유전자의 mRNA발현을 확인한 결과, HL60세포에서 종양억제인자인 p53유전자 및 RAW264.7세포에서 NO생합성효소인 iNOS유전자의 발현을 농도의존적으로 촉진시켰다. 상기의 결과를 최종 확인하고자 HL60세포에서 p53, NF-κB단백질 발현과 RAW264.7세포에서 iNOS 단백질 발현을 관찰하기 위하여 Western blot analysis를 수행한 결과, p53, NF-κB 및 iNOS 단백질의 발현이 농도의존적으로 증가되었다. 이상의 실험 결과에서 외송은 대식세포에서 생성되는 NO를 경유해서 급성 전골수성 백혈병세포의 apoptosis를 유도하는 항암활성을 보유하고 있는 것으로 추정되며, 장래 외송의 항암병용요법제로서의 개발가능성을 시사하는 결과이다.

사사

“이 논문은 2009년 우석대학교 교내연구비지원 및 교육과학기술부(지역거점연구단육성사업/헬스케어기술개발사업단)로부터 지원받아 수행된 연구임”

인용문헌

1. 鄭善燮 (1990) 鄉藥大事典, 永林社, p. 600.
2. 박희준 (1992) 외송의 화학성분 및 항돌연변이 활성에 관한 연구, 한국생명과학회지, 2(1): 69-71.
3. 양서현 (1989) 靈芝, 山慈姑, 仙鶴草, 瓦松이 흰쥐의 자연 살해세포에 미치는 영향, 대한 한의학회지, 10(2): 103-114.
4. 권진, 한광수 (2004) 瓦松추출물이 면역체계에 미치는 영향, 한국약용작물학회지, 12(4): 315-320.
5. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods*, 65: 55-63.
6. Oh, S. H. and Oh, C. H. (2003) Brown rice extracts with enhanced levels of GABA stimulate immune cells. *Food Sci. Biotechnol.* 12: 248-252.
7. Albina, J. E., Cui, S., Mateo, R. B. and Reichner, J. S. (1993) Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal mac-

- rophages. *J. Immunol.* **150**: 5080-5085.
8. Miyashita, T. and Reed, J. C. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, **80**: 293-299.
 9. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Bio-technology*, **24**: 145-149.
 10. Dowdy, S. and Wearden, S. (1983) Statistics for research, Wiley, New York, p. 262.
 11. Yoon, Y. S., Kim, K. S., Hong, S. G., Kang, B. J., Lee, M. Y. and Cho, D. W. (2000) Protective effects of *Orostachys japonicus* A. Berger(Crassulaceae) on H₂O₂-induced apoptosis in GT1-1 mouse hypothalamic neuronal cell line. *J. Ethnopharmacol.* **69**(1) : 73-78.
 12. Bredt, D. S. and Snyder, S. H. (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.*, **63**: 175-195.
 13. Panossian, A. G., Oganessian, A. S., Ambartsumian, M., Gabrielian, E. S., Wagner, H. and Wikman, G. (1999) Effects of heavy physical exercise and adaptogens on nitric oxide content in human saliva. *Phytomedicine*, **6**(1): 17-26.
 14. Thomsen, L. L., Ching, L. M. and Baguley, B. C. (1991) Evidence for the production of nitric oxide by activated macrophages treated with the antitumor agents flavone-8-acetic acid and xantherone-4-acetic acid. *Cancer Res.*, **51**: 6073-6078.
 15. 전인성, 허민석, 최항문, 이삼선, 최순철 (2000) DMBA유도 햄스터 협낭암 발생과정 에서 방사선 조사가 증식세포 핵항원(PCNA)의 발현과 apoptosis 유발에 미치는 영향, 대한구강악안면방사선학회지, **30**(3): 207-216.
 16. Floryk, D and Huberman, E. (2005) Differentiation of androgen-independent prostate cancer PC-3 cells is associated with increased NF-κB activity, *Cancer Res.*, **65**(24): 11588-11596.
 17. Dai Y, Rahmani M. and Grant S. (2003) An intact NF-κB pathway is required for histone deacetylase inhibitor-induced G1 arrest and maturation in U937 human myeloid leukemia cells, *Cell Cycle*, **2**: 467-472.
 18. Kim J. Y., Ahn M. H., Jun H. S., Jung J. W., Ryu J. S., Min D. Y. (2006) Toxoplasma gondii inhibits apoptosis in infected cells by caspase inactivation and NF-κB activation. *Yonsei med. Journal*, **47**(6): 862-869.
 19. Kastan, M. B., Canman, C. E., and Leonard, C. J. (1995) p53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Cancer Metas. Rev.* **14**(1): 3-15.

(2009년 5월 9일 접수)