

小檗의 간암 억제효과에 대한 연구

이충현, 한효상, 이영종*

경원대학교 한의과대학 본초학교실

Studies on the Inhibitory Effect of Berberidis Ramulus to the Liver Cancer

Chung-Heon Lee, Hyo-Sang Han, Young-Jong Lee*

Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Kyungwon University
Seongnam 461-701, Korea

ABSTRACT

Objectives : This study purposed to research the inhibitory effect of Berberidis Ramulus on the liver cancer.

Methods : A total extract of Berberidis Ramulus decoction were prepared. Through the measurement of the cell proliferation, apoptosis, morphology and cytokine level from the extracts, the influence on HepG2 cell were compared.

Results : Berberidis Ramulus extract significantly inhibited the proliferation, increased the apoptosis, decreased the TGF- β gene expression and the K-RAS gene expression, significantly increased the level of TNF- α secretion and increased the rates of IFN- γ secretory cells.

Conclusion : It is suggested that Berberidis Ramulus extract turned out to have anti-cancer effects on HepG2 cell.

Key words : Berberidis Ramulus, liver cancer, anti-cancer effect

서론

小檗은 新修本草¹⁾에 “小檗, 味苦, 大寒, 無毒. 主口瘡, 疔腫, 殺諸蟲, 去心腹中熱氣. 一名山石榴.” 라고 처음 수재된 이래 임상에서는 淸熱燥濕, 瀉火解毒의 효능이 있어 濕熱泄瀉, 痢疾, 口舌生瘡, 咽喉喉痺, 目赤腫痛, 癰腫瘡癤 등의 증상에 사용되고 있다.²⁾

小檗은 우리나라 공정서에는 수재되어 있지 않으나, 북한약전³⁾에는 황염목(매자나무가지)이라는 약재명으로, 매자나무과(Berberidaceae)에 속하는 매자나무 *Berberis koreana* Palib., 매발톱나무 *Berberis amurensis* Rupr., 및 그 변종의 줄기와 가지로 되어 있으며, 중국은 中華人民共和國藥典 1977년 판⁴⁾에 三顆針이라는 약재명으로, 매자나무과(Berberidaceae)에 속하는 蠟猪刺 *Berberis soulieana* Schneid., 小黃連刺 *Berberis wilsonae* Hemsl., 細葉小檗(당매자나무) *Berberis poiretii* Schneid., 및 匙葉小檗 *Berberis verna* Schneid. 등 同屬의 수종 식물의 뿌리라 하였으나, 1990년 판⁵⁾에서는 약전에서 삭제하고, 부록에 三顆針皮라는 이름으로 蠟猪刺 *Berberis soulieana* Schneid. 등

同屬의 根皮라고 하였다.

이상에서와 같이 小檗의 기원은 *Berberis* 속 식물의 가지, 뿌리 및 뿌리껍질이라 할 수 있으며, *Berberis* 속 식물로 우리나라에는 매발톱나무 *Berberis amurensis* Rupr., 매자나무 *Berberis koreana* Palibin., 당매자나무 *Berberis poiretii* Schneid. 등이 있고, 변종으로 왕매발톱나무 var. *latifolia* Nak., 섬매발톱나무 var. *quelpaertensis* Nak., 좁은잎매자 var. *angustifolia* Nak., 연밭매자 var. *ellipsoidea* Nak. 등이 자생하고 있다.⁶⁾

Berberis 속 식물의 성분으로 berberine, berbamine, jatrorrhizine, berbaminine, oxyberberine, magnoflorine, columbamine, palmatine, julianine, oxyacanthine, glaucine, 및 pakistanamine 등이 보고되었으며²⁾, 왕매발톱나무에서 berberine, jatrorrhizine, magnoflorine, shobakunine, berbamine 등이 보고되었다⁷⁾.

小檗의 약리작용으로는 항균작용⁸⁾, 체온 강하작용⁹⁾, 혈압 강하와 심박동감소 작용¹⁰⁾, 항암작용¹¹⁾, 항백혈병 작용¹²⁾, 소염진통작용¹³⁾, 담즙분비작용¹⁴⁾, 간손상 회복¹⁵⁾, 항히스타민 효과¹⁶⁾ 등이 보고되었다.

*교신저자 : 이영종, 경기도 성남시 수정구 복정동 산 65 경원대학교 한의과대학 본초학교실.
· Tel : 031-750-5415, · E-mail : garak@kyungwon.ac.kr.
· 접수 : 2010년 11월 6일 · 수정 : 2010년 12월 7일 · 채택 : 2010년 12월 15일

新生物 또는 惡性腫瘍을 총칭하는 용어인 암은 정상조직을 파괴하며 인체 내에서 급속도로 자라서 주위 조직에 침윤되고, 다른 조직으로 전이되어 수개월내지는 수 년 내에 생명을 빼앗는 무서운 질병이다.¹⁷⁾

화학요법에 의한 암치료제로 알킬화제, 대사 길항물질, 항생물질 등이 이용되는데¹⁸⁾, 이들은 생체내의 암세포뿐만 아니라 정상세포 및 다른 감염증에 대한 저항까지 약하게 하는 부작용을 일으킨다.¹⁹⁾ 따라서 천연물로부터 면역기능을 높여주고 암세포에만 특수하게 작용하는 항암제를 개발하려는 노력이 최근 많이 시도되고 있는데, 小檗은 淸熱燥濕, 瀉火解毒의 효능이 있어 癰腫瘡癤 등의 증상에 사용되므로²⁾, 항암 효과와 관련이 있을 것으로 사료되어 연구를 하게 되었다.

이에 著者は 본 연구에서 小檗을 전탕 추출과 분획별 추출을 한 후, 그 추출물로 간암세포(HepG2)에 cell proliferation과 apoptosis, morphology, cytokine level 등을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 小檗(Berberidis Ramulus, 이하 BR로 표기)은 중국 안국시장에서 2005년 8월에 구입하였다. 경원대학교 한의과대학 본초학교실에서 기원을 *Berberis*속 식물로 감정하였으며, 실험 약재는 이용하기 전에 초음파 세척기를 이용하여 불순물을 제거하고 실험에 사용하였다.

2) 시약 및 기기

(1) 시약

본 실험을 위해서 n-hexane (Samchun Chemical, Korea), n-butanol (Samchun Chemical, Korea), Ethyl ether (Samchun Chemical, Korea), Ethyl acetate (Samchun Chemical, Korea), Chloroform (Sigma, USA), TRI reagent (Sigma, USA), DMEM (Hyclone, USA), Fetal bovine serum(FBS, Hyclone, USA), Antibiotics (Hyclone, USA), oligo dT (Bioneer, USA), AccuPower RT PreMix (Bioneer, USA), pre-made primer (Bioneer, USA), 10× PCR buffer (Takara, Japan) 등이 사용 되었다.

(2) 기기

본 실험에 사용된 기기는 Rotary evaporator (Eyela, Japan), Research microscope (Nikon, Japan), Bio-freezer (Sanyo, Japan), Micrometer (Mitutoyo, Japan), Camera (Canon, Japan)

Microscope (Leica, Japan), PCR machine (Takara, Japan), Ultrasonic cleaner (BRANSON, USA), Homogenizer (OMNi, USA), Plate shaker(Lab-Line, USA), Flow cytometry (BD Biosciences, USA), ELISA reader (TECAN, Canada), Ice maker (Vision science, Korea), Cytological centrifuge (Hanil, Korea), Pulverizer (Rong Tsong, Taiwan) 등이다.

2. 방법

1) 약물

(1) 전탕 추출

小檗 100 g 에 1 l 의 증류수를 가하고 약탕기를 이용하여 3시간 동안 끓이고, 전탕액을 여과지로 여과한 후, 감압증류장치를 이용하여 감압농축을 실시하고 동결 건조하여 건조 추출물 34 g(34%)을 얻었다.

(2) 분획

小檗 전탕액에서 얻은 건조추출물 30 g에 증류수 500 ml를 넣어 녹인 후, 분획여두를 이용하여 n-hexane, EtOEt(ethyl ether), EtOAc(ethyl acetate) n-BuOH(butanol) 및 증류수로 극성에 따라 분획하였으며, 여기에서 얻어진 각각의 분획물을 모아 감압농축한 후 동결 건조하여 각 분획의 건조 추출물 얻었으며, 모든 분획은 실온 상태에서 실시하였다. 각 분획의 동결 건조하여 얻은 건조 추출물 수득률은 n-hexane에서 12.33%, EtOEt에서는 2.00%, EtOAc에서는 0.67%, n-BuOH에서는 13.00%, 그리고 aqueous에서는 23.33%로 나타났다(Fig. 1).

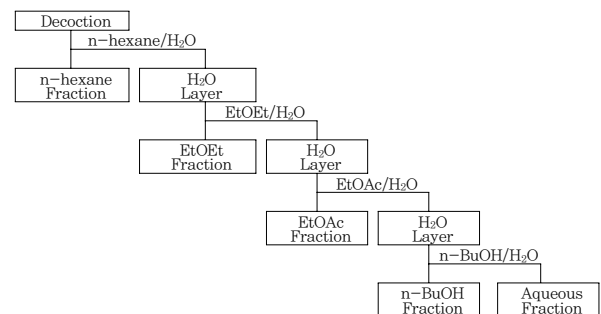


Fig. 1. Procedure of various solvent fractions from water extract of *Berberidis Ramulus*

2) 암세포에 대한 영향 측정

(1) Cell proliferation

한국 세포주 은행으로부터 분양받은 사람의 간암세포주인 HepG2(Hepatocellular carcinoma)는 DMEM에 20% FBS와 antibiotics(penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml)를 첨가하여 배양을 하였다. 증식된 간암세포를 12 well plate에 5×10^4 cell/well로 분주한 다음, 小檗 건조 추출물(BR)을 10, 5, 1, 0.1 mg/ml의 농도로 배양액에 녹여, 농도별로 처리하여 72시간 동안 37°C에서 세포를 배양하였다. 배양된 세포를 수거하기 12~18시간 전에 [³H]-thymidine을 1 µCi/well씩 분주하여 처리를 하였다. 12~18시간 배양, 세포를 beta-counter safe cuvette에 500 µl씩 분주한 다음, cocktail solution을 2 ml첨가 한 후, 세포의 증식정도(proliferation)를 beta-counter를 이용하여 thymidine의 uptake하는 값의 변환으로 확인하였다.

(2) 세포사멸(Apoptosis) 측정

小檗 전탕액 처리에 의한 간암세포의 세포사멸 정도를 확인하기 위해서, 小檗 추출물(BR)을 10, 5, 1, 0.1 mg/ml의 농도로 HepG2 세포에 처리한 후 72시간 동안 배양하였다.

또한 小檗의 분획별 처리에 의한 간암세포의 세포사멸 정도를 확인하기 위해, 小檗물을 1 mg/ml의 농도로 배양액에 희석하여 세포에 처리한 후 72시간 동안 배양하였다.

각 세포를 수거한 후, 1× binding buffer를 이용하여 1 회 washing하였다. Annexin V-FITC와 PI(propidium iodide)를 5 µl 씩 분주한 뒤, 실온에서 빛을 차단한 채로 15분간 반응시키고 flow cytometry를 이용하여 cell population을 확인하였으며, flow cytometry의 software를 이용하여 세포사멸 정도를 분석하였다.

(3) 형태변화(Morphology) 측정

Cell proliferation과 같은 방법으로 증식된 암세포를 12 well plate에 간암세포는 5×10⁴ cell/well로 분주한 다음, 농도별 세포의 형태적 변화를 관찰하기 위해서 小檗 전탕액에서 얻은 건조 추출물의 농도를 10, 5, 1, 0.1 mg/ml로 만들어 배양액에 녹인 후, 농도별로 小檗 전탕액을 처리하여 72 시간 동안 37℃에서 배양하였다. 배양이 끝난 후에 현미경(100배율)으로 관찰을 하였으며, 사진 촬영을 실시하였다.

분획별 morphology의 변화를 확인하기 위해서 小檗 전탕액 및 분획에서 얻은 건조 분말을 배양액에 1 mg/ml로 희석하여 세포를 72시간 동안 배양한 후에 현미경(200배율)으로 관찰을 하였으며, 사진 촬영을 실시하였다.

(4) Cytokine level

① ELISA

小檗 전탕액 추출물을 농도별로 처리하고 암세포의 증식 중에 나타나는 TGF-β 와 TNF-α , IL-2, IL-12의 변화를 알아보기 위해, 세포배양액의 상층액을 취하여 ELISA kit를 사용하여 확인하였다. 1차 항체가 코팅된 96 well plate에

세포배양액을 가하여 반응시킨 후 4번 세척하고, 다시 biotin 이 표식된 2차 항체를 가하여 반응시킨 후 4번 세척하였다. 여기에 streptavidin-HRP를 가하고 incubation을 실시하였다. ELISA 반응을 정지하기 위한 stop solution을 첨가한 뒤 ELISA-reader를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

② Flow cytometry

암세포의 증식 중에 IFN-γ 를 분비하는 세포수의 변화를 알아보기 위해 flow cytometry를 이용하여 확인하였다. 농도별 小檗 전탕 추출물 또는 1 mg/ml의 小檗 분획 추출물을 처리한 배양액에서 24시간 배양한 HepG2 세포를 취하여, fixing solution을 100 µl씩 분주하여 20분간 세포를 고정시킨 후, washing buffer (1×PBS with 2% BSA)로 씻어주었다. Permeabilized solution을 1 ml씩 분주하여 5분간 incubation을 실시한 후, FITC-mouse anti-human IFN-γ 표적 항체를 intracellular staining하였다. Sample이 준비되면 flow cytometry를 이용하여 확인하였다.

(5) RT-PCR

小檗 전탕 추출물을 1 mg/ml 농도로 처리한 배양액에서 배양한 암세포를 수거한 다음, TRI reagent 0.7 ml을 이용하여 cell lysis 시켰다. Chloroform 200 µl를 분주하고 vortex한 뒤, 14,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하였다. 상층액을 새로운 tube에 옮기고 동일한 양의 isopropanol을 분주하여, -20℃에서 하루 동안 incubation을 하였다. Centrifuge를 실시하여 RNA를 침강시킨 후, 75%의 EtOH에 washing하여 RNA를 얻었다. RNA 1 µg으로 cDNA를 합성하고 primer를 첨가하여 원하는 target을 PCR로 증폭시켜 1.5% gel에 전기영동을 실시하여 확인하였다(Table 1).

Table 1. Nucleotide Sequence of Primer

Number	Revers-Sequence	Forward-Sequence	Tm(°C)	Cycle
β -actin	5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GA-3'	5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CAG GGC-3'	60	30
IFN-γ	5'-GGC GAC AGT TCA GCC ATC ACT T-3'	5'-GCA TCG TTT TGG GTT CTC TTG G-3'	59.5	35
TGF-β	5'-TGG TAC AGC TCC ACG TGC TG-3'	5'-CGA GCC TGA GGC CGA CTA CT-3'	57.5	38
TNF-α	5'-CAG CCT ATT GTT CAG CCT CCG T-3'	5'-TTA CCC CCT CCT TCA GAC ACC C-3'	59	32
K-RAS	5'-CCT CTA TTG GAT CAT ATT C-3'	5'-ATG ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA-3'	55	35
IL-6	5'-GGT TGG GTC AGG GGT GGT TAT T-3'	5'-TTC GGT CCA GTT GCC TTC TCC-3'	59.5	33

3. 통계 분석

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 means ± SEM으로 표시하였으며 ANOVA multi t-test(JAVA, Bonferroni Ver II)로 분석하여 p값을 구했다. 각 실험군을 비교하여 p값이 0.05 미만일 경우에 유의성을 인정하였다.

결 과

1. 간암세포에 미치는 영향

1) 세포증식에 대한 효과

간암 세포주인 HepG2에 小檗 전탕 추출물을 농도별로 처리하고 72시간동안 37℃에서 배양한 후, 세포의 증식

(proliferation)을 [³H]-thymidine을 이용하여 uptake 정도로 확인 하였다. 전탕 추출물의 농도가 증가함에 따라 간암세포의 증식이 유의하게 감소하였다(Fig. 2).

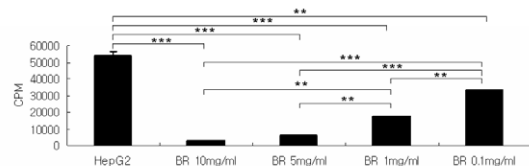


Figure 2. Effect of Berberidis Ramulus extract in HepG2 cell proliferation. HepG2 cell were at a suspended density of 5×10⁴ cell/well on 12 well cell culture plate. Cells were treated with different concentrations of Berberidis Ramulus extract (10, 5, 1, 0.1 mg/ml) and 1 µCi/ml [³H]-thymidine. After 72 hrs., the cells were harvested and counted with beta-counter. Values represent the means ± SEM of 3 experiments. *** : P(0.001), ** : P(0.01) by ANOVA test.

2) 세포사멸에 대한 효과

(1) 농도별

여러 가지 농도의 小檗 추출물을 간암세포 배양액에 처리한 후, annexin V와 PI를 표적항체로 사용하여 세포사멸(apoptosis) 정도를 FACs로 분석하였다.

5 mg/ml 농도의 小檗 전탕 추출물에서 간암세포의 세포사멸율이 가장 높았다(Fig. 3).

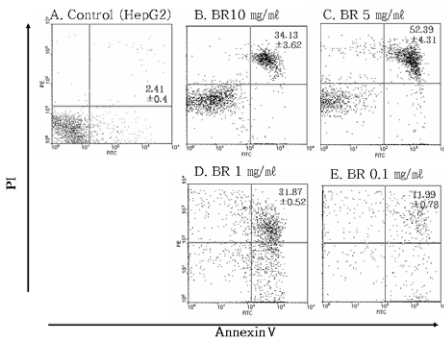


Figure 3. Effect of Berberidis Ramulus extract on apoptosis in HepG2 cells. Cells were seeded at a density of 5×10^4 cell/well on 12 well cell culture plate, and then treated with various concentrations of Berberidis Ramulus extract (10, 5, 1, 0.1 mg/ml) for 72 hrs. Cell apoptosis was determined by flow cytometric analysis.

(2) 분획별

간암세포를 배양하는 동안에 小檗의 전탕액 및 분획 추출물을 처리하여 나타나는 apoptosis 정도를 FACs를 이용하여 확인하였다.

小檗 추출물 및 분획물들에 의한 세포사멸율은 aqueous의 분획을 처리했을 때 가장 낮았고, EtOEt 분획을 처리했을 때 가장 높았다(Fig. 4).

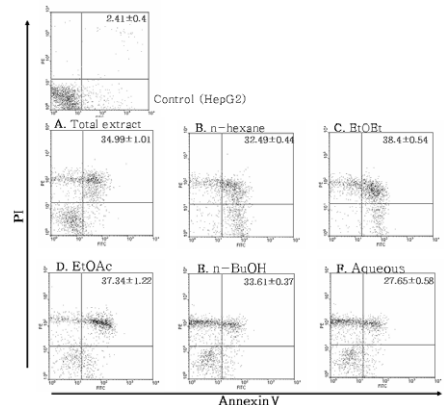


Figure 4. Effect of Berberidis Ramulus extract on apoptosis in HepG2 cells. Cells were seeded at a density of 5×10^4 cell/well on 12 well cell culture plate, and then treated with various concentrations of Berberidis Ramulus extract (1 mg/ml) for 72 hrs. Cell apoptosis was determined by flow cytometric analysis.

3) 형태변화에 대한 효과

(1) 농도별

여러 가지 농도의 小檗 전탕 추출물을 간암세포에 처리하고, 72시간 동안 배양을 한 후, 암세포의 형태를 확인하였다. 대조군은 간암세포인 HepG2에 약물을 처리 하지 않은 것이다. 小檗 전탕 추출물의 농도에 의존적으로 HepG2 세포의 감소와 사멸을 확인하였다(Fig. 5).

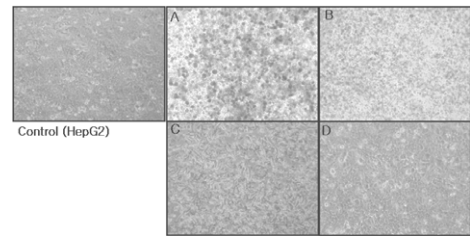


Figure 5. Photomicrograph of HepG2 cells cultured with various concentrations of Berberidis Ramulus extract. Cells were seeded at a density of 5×10^4 cell/well on 12 well cell culture plate, and then treated with various concentrations of Berberidis Ramulus extract (10, 5, 1, 0.1 mg/ml) for 72 hrs. the pictures of the HepG2 cells were taken by fluorescence microscope ($\times 100$). A: 10 mg/ml, B: 5 mg/ml, C: 1 mg/ml, D: 0.1 mg/ml Berberidis Ramulus decoction extract.

(2) 분획별

小檗의 전탕액 및 유기 용매에서 얻은 각각의 분획물을 1 mg/ml의 농도로 처리하고 72시간 동안 배양을 한 후, 암세포의 형태를 확인 하였다. 대조군은 간암세포인 HepG2에 약물을 처리 하지 않은 것이다. 대조군에 비해서 小檗의 분획물을 처리한 경우 세포수가 감소하고 세포가 위축, 사멸되었으며, 특히 n-hexane 분획을 처리한 경우 세포의 사멸이 가장 많이 일어났음을 알 수 있었다(Fig. 6).

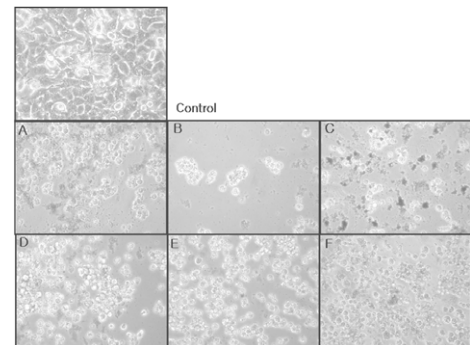


Figure 6. Photomicrograph of HepG2 cells cultured with total extract or various fraction extracts of Berberidis Ramulus decoction. Cells were seeded at a density of 5×10^4 cell/well on 12 well cell culture plate, and then treated with various concentrations of Berberidis Ramulus extract (1 mg/ml) for 72 hrs. the pictures of the HepG2 cells were taken by fluorescence microscope ($\times 200$). A: Total ex. B: n-hexane C: EtOEt D: EtOAc E: n-BuOH F: Aqueous.

4) 사이토카인 분비에 대한 효과

(1) 농도별

간암세포인 HepG2의 배양액에 小檗 전탕액 추출물을 10, 5, 1, 0.1 mg/ml의 농도로 희석하여 처리하고, 72시간 동안 배양한 후, 사이토카인의 변화를 ELISA로 확인하였다. HepG2에 약물을 처리하지 않은 것을 대조군으로 하여 비교 하였다.

① TGF- β

HepG2 세포에 小檗 전탕 추출물을 여러 농도로 처리하여 TGF- β 의 양을 측정하였다. 10 mg/ml 농도의 小檗 전탕 추출물을 처리하였을 때는 대조군에 비해 약간의 감소를 나타냈으나, 통계적 유의성은 없었다. 0.1 mg/ml 농도의 小檗 전탕 추출물을 처리하였을 때에는 유의성 있는 증가를 보였다(Fig. 7).

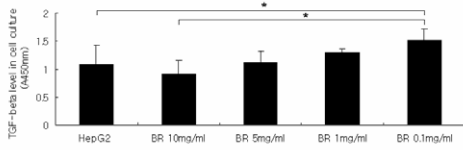


Figure 7. Level of TGF-β in HepG2 cells cultured with various concentrations of Berberidis Ramulus decoction extract. Cells were seeded at a density of 5×10⁴ cell/well cell culture plate, and then treated with various concentrations of Berberidis Ramulus extract for 72 hrs, the cells were harvested and the cell culture supernatant was used. The concentration of TGF-β in the cell culture supernatant was measured by ELISA. Values represent the means ± SEM of 3 experiments. * : P<0.05 by ANOVA test.

② TNF-α

간암세포인 HepG2에 小檗 전탕 추출물을 농도별로 처리한 세포배양액에서 TNF-α의 양을 측정하였다. 5 mg/ml와 1 mg/ml 농도에서 대조군에 비하여 TNF-α의 생성이 유의하게 증가하였다(Fig. 8).

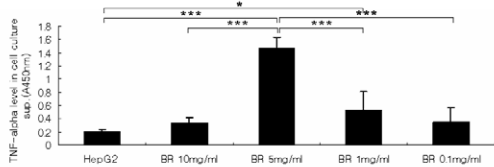


Figure 8. Level of TNF-α in HepG2 cells cultured with various concentrations of Berberidis Ramulus decoction extract. Cells were seeded at a density of 5×10⁴ cell/well cell culture plate, and then treated with various concentrations of Berberidis Ramulus extract for 72 hrs, the cells were harvested and the cell culture supernatant was used. The concentration of TGF-β in the cell culture supernatant was measured by ELISA. Values represent the means ± SEM of 3 experiments. *** : P<0.001, * : P<0.05 by ANOVA test.

③ IFN-γ presenting cell population

HepG2에 小檗 전탕 추출물을 농도별로 처리하여 배양하고, IFN-γ를 분비하는 세포의 비율을 FACs를 이용하여 확인하였다. 小檗 전탕 추출물 10 mg/ml, 5 mg/ml의 농도 처리에 의해 IFN-γ 분비 세포의 비율이 증가하였으며, 5 mg/ml의 농도에서 가장 높은 IFN-γ 분비 세포의 비율을 나타내었다(Fig. 9).

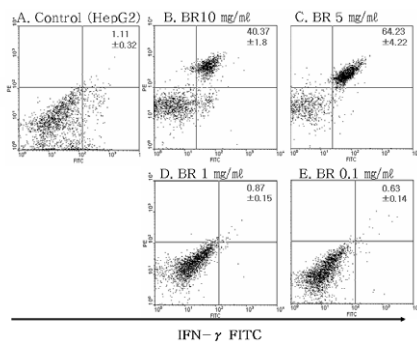


Figure 9. Flow cytometry analysis of IFN-γ presenting HepG2 cells cultured with various concentrations of Berberidis Ramulus decoction extract. Cells were seeded at a density of 5×10⁴ cell/well on 12 well cell culture plate, and then treated with various concentrations of Berberidis Ramulus extract (10, 5, 1, 0.1 mg/ml) for 24 hrs, the IFN-γ presenting HepG2 cells were measured by flow cytometry. Cell apoptosis was determined by flow cytometric analysis.

(2) 분획별

간암세포인 HepG2의 배양액에 小檗의 전탕 추출물 및 분획 추출물을 1 mg/ml로 희석하여 처리하고, 사이토카인의 변화를 ELISA로 확인하였다.

① TGF-β

TGF-β는 대조군에 비해서 小檗 전탕 추출물을 처리한 세포에서 감소하는 경향을 나타내었으며, 특히 aqueous 분획물을 처리한 경우 TGF-β의 양이 가장 적었으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 10).

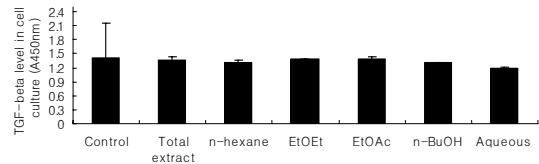


Figure 10. Level of TGF-β in HepG2 cells cultured with total extract or various fraction extracts of Berberidis Ramulus decoction. Cells were seeded at a density of 5×10⁴ cell/well cell culture plate, and then treated with various concentrations of Berberidis Ramulus extract (1 mg/ml) for 72 hrs, the cells were harvested and the concentration of TGF-β in the cell culture supernatant was measured by ELISA. Values represent the means ± SEM of 3 experiments.

② TNF-α

TNF-α의 생성량을 측정한 결과, 小檗 전탕 추출물 및 분획물을 처리한 HepG2세포에서의 TNF-α의 생성은 대조군에 비해 유의한 변화를 나타내지 않았다(Fig. 11).

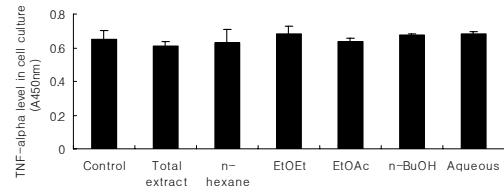


Figure 11. Level of TNF-α in HepG2 cells cultured with total extract or various fraction extracts of Berberidis Ramulus decoction. Cells were seeded at a density of 5×10⁴ cell/well cell culture plate, and then treated with various concentrations of Berberidis Ramulus extract (1 mg/ml) for 72 hrs, the cells were harvested and the concentration of TNF-α in the cell culture supernatant was measured by ELISA. Values represent the means ± SEM of 3 experiments.

③ IL-2

小檗 전탕 추출물 및 분획물의 처리에 따른 IL-2의 변화를 확인한 결과, 대조군에 비해서 n-hexane 분획과 EtOEt 분획을 처리한 경우 IL-2의 생성량이 유의하게 감소하였다(Fig. 12).

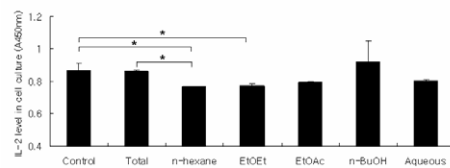


Figure 12. Level of IL-2 in HepG2 cells cultured with total extract or various fraction extracts of Berberidis Ramulus decoction. Cells were seeded at a density of 5×10⁴ cell/well cell culture plate, and then treated with various concentrations of Berberidis Ramulus extract (1 mg/ml) for 72 hrs, the cells were harvested and the concentration of IL-2 in the cell culture supernatant was measured by ELISA. Values represent the means ± SEM of 3 experiments. * : P<0.05 by ANOVA test.

④ IL-12

대조군에 비해서 小檗 전탕 추출물 및 분획물을 처리한 경우 IL-12가 모두 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다 (Fig. 13).

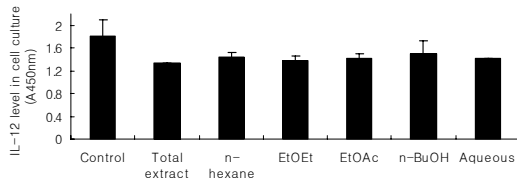


Figure 13. Level of IL-12 in HepG2 cells cultured with total extract or various fraction extracts of Berberidis Ramulus decoction. Cells were seeded at a density of 5×10^4 cell/well cell culture plate, and then treated with various concentrations of Berberidis Ramulus extract (1 mg/ml) for 72 hrs. the cells were harvested and the concentration of IL-12 in the cell culture supernatant was measured by ELISA. Values represent the means \pm SEM of 3 experiments.

5) RT-PCR

약물 처리를 하지 않은 HepG2 간암세포(C)와 小檗 전탕 추출물을 처리한 HepG2 간암세포(T)에서 total RNA를 분리하여 항암관련 인자들의 발현정도를 중합효소연쇄반응(PCR)으로 확인하였다. 암유전자인 K-RAS와 TGF- β 는 小檗 추출물의 처리에 의한 발현정도가 감소하였으며, TNF- α 와 IFN- γ 는 발현 정도가 증가된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 14).

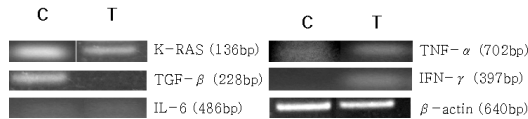


Figure 14. Expression of transcripts of various molecules. Cells were seeded at a density of 5×10^4 cell/well cell culture plate, and then treated with various concentrations without (C) or with (T) of Berberidis Ramulus extract (1 mg/ml) for 72 hrs. the cells were harvested and total RNA was isolated using TRI reagent. The reactions were performed on the individual RNA samples. Oncogen RT-PCR products were separated on 1.5% agarose gels.

고찰

小檗은 新修本草¹⁾에 “小檗, 味苦, 大寒, 無毒. 主口瘡, 疔腫, 殺諸蟲, 去心腹中熱氣” 라고 처음 수재되었다. 圖經本草²⁰⁾에는 小檗이 黃柏(檉木)의 附藥으로 수재되어 “木如石榴, 皮黃, 子赤如枸杞, 兩頭尖, 人到以染黃, 今醫家亦稀用.” 이라 하여 黃柏과 同類로 취급하고, 黃柏에 비하여 드물게 사용된다고 하였으며, 李時珍²¹⁾은 “婦人良方, 治血崩, 阿茄陀丸方中用之.” 라 하여 血崩을 치료한다고 하였다. 임상에서는 淸熱燥濕, 瀉火解毒의 효능이 있어 濕熱泄瀉, 痢疾, 급성 장염, 黃疸, 口舌生瘡, 咽痛喉痺, 目赤腫痛, 癰腫瘡癤, 熱痺, 癩癧, 血崩 등의 증상에 사용되고 있다.²⁾

小檗은 우리나라 공정서에는 수재되어 있지 않으나, 북한 약전³⁾에는 황염목(매자나무가지)이라는 약재명으로, 매자나무과(Berberidaceae)에 속하는 매자나무 *Berberis koreana* Palib., 매발톱나무 *Berberis amurensis* Rupr., 및 그 변종의 줄기와 가지라고 되어 있으며, 중국은 中華人民共和國藥典

1977년 판⁴⁾에 三顆針이라는 약재명으로, 매자나무과(Berberidaceae)에 속하는 蠟猪刺 *Berberis soulieana* Schneid., 小黃連刺 *Berberis wilsonae* Hemsl., 細葉小檗(당매자나무) *Berberis poiretii* Schneid., 및 匙葉小檗 *Berberis verna* Schneid. 등 同屬의 수종 식물의 뿌리라 하였으나, 1990년 판⁵⁾에서는 약전에서 삭제하고, 附錄에 三顆針이라는 이름으로 蠟猪刺 *Berberis soulieana* Schneid. 등 同屬의 根皮라고 하였으며, 2005년 판⁵⁰⁾에도 같은 내용으로 되어 있다.

이상에서와 같이 小檗의 기원은 *Berberis* 속 식물의 가지, 뿌리 및 뿌리껍질이라 할 수 있으며, *Berberis* 속 식물로 우리나라에는 매발톱나무 *Berberis amurensis* Rupr., 매자나무 *Berberis koreana* Palib., 당매자나무 *Berberis poiretii* Schneid. 등이 있고, 변종으로 왕매발톱나무 var. *latifolia* Nak., 섬매발톱나무 var. *quelpaertensis* Nak., 좁은잎매자 var. *angustifolia* Nak., 연발매자 var. *ellipsoidea* Nak. 등이 자생하고 있다.⁶⁾

약리작용으로 김 등⁸⁾은 항균작용을, 조 등⁹⁾은 체온 강하작용을, 이 등¹⁰⁾은 혈압강화와 심박동감소 작용을, 김¹¹⁾은 항암작용을 보고하였고, Xu 등¹²⁾은 항백혈병 작용을, Lans 등¹³⁾은 소염진통작용을, Tsai 등¹⁴⁾은 담즙분비작용을, Janbaz 등¹⁵⁾은 간손상 회복을, Shamsa 등¹⁶⁾은 항히스타민 효과를 보고하였다.

新生物 또는 惡性腫瘍을 총칭하는 용어인 癌은 정상조직을 파괴하며 인체 내에서 급속도로 자라서 주위 조직에 침윤되고, 다른 조직으로 전이되어 수개월내지는 수 년 내에 생명을 빼앗는 무서운 질병이다.¹⁷⁾

화학요법에 의한 암치료제로 알킬화제, 대사 길항물질, 항생물질 등이 이용되는데¹⁸⁾, 이들 항암제는 암세포의 증식과 성장을 억제하는 동시에 정상세포 및 다른 감염증에 대한 저항까지 약하게 하며, 일시적인 혈구감소, 구토, 설사, 식욕감퇴, 탈모 등 여러 가지 부작용을 야기한다¹⁹⁾. 따라서 천연물로부터 면역기능을 높여주고 암세포에만 특수하게 작용하는 항암제를 개발하려는 노력이 최근 많이 시도되고 있는데, 小檗은 淸熱燥濕, 瀉火解毒의 효능이 있어 癰腫瘡癤 등의 증상에 사용되므로, 항암 효과와 관련이 있을 것으로 사료된다.

小檗의 항암 연구로는 김¹¹⁾이 국내산 매자나무 *Berberis koreana* Palib.를 MeOH로 추출한 성분이 암세포 성장을 억제한다고 보고하였고, Anis 등²²⁾은 *Berberis aristata*에서 분리된 berberine이 항암작용이 있음을 시사한다고 하였고, Fukuda 등²³⁾은 *Berberis* 와 *Coptis* 속 식물체 안에 존재하는 isoquinoline alkaloid인 berberine이 결장암 세포들 안에서 COX-2의 전사활동을 효과적으로 저해한다고 보고하였다. 이에 著者は 小檗을 전탕 추출과 분획을 한 후, 그 추출물로 세포증식²⁴⁾과 세포사멸²⁵⁾, 형태변화, 사이토카인 분비에 대한 효과²⁶⁾를 측정 하여 간암세포에 대한 영향을 측정하였다.

본 연구에서는 한국 세포주 은행으로부터 분양받은 사람의 간암세포주인 HepG2(Hepatocellular carcinoma)에 小檗 전탕 추출물을 10, 5, 1, 0.1 mg/ml의 농도로 처리한 뒤에 72 시간동안 37℃에서 배양한 후, 세포의 증식을 [³H]-thymidine을 이용하여 uptake 정도로 확인한 결과, 대조군에 비하여 小檗 전탕 추출물의 농도가 증가함에 따라 간

암세포의 증식이 유의하게 감소하였으며, 암세포의 증식이 감소되었다는 것은 항암효과를 나타내는 것으로 볼 수 있다.

세포의 apoptosis는 DNA 손상, 바이러스 감염 등에 의한 유전적 조절 하에서 일어나는 정교한 인체방어기전이란 점에서 necrosis와 구별되며²⁷⁾, 또한 개체보존 수준에서 손상된 세포들을 제거하는 중요한 수단이 된다²⁸⁾. 정상적인 조직에서는 apoptosis를 통해 세포의 증식과 사멸이 균형을 이루게 되는데 이런 apoptosis의 조절에 이상이 생기므로 인해 세포의 증식과 사멸의 균형이 깨어지면 악성종양이 일어날 수 있게 된다.²⁹⁾ 본 연구에서는 小檗 전탕 추출물을 간암 세포에 처리한 후 apoptosis의 정도를 FACs를 이용하여 확인한 결과, 간암 세포 5 mg/ml 농도에서 apoptosis가 가장 높았다. 또한 小檗 전탕액 및 분획들에 의한 간암 세포사멸은 aqueous의 분획을 처리했을 때 가장 낮았고, EtOEt 분획을 처리했을 때 가장 높았다.

간암 세포에 小檗 전탕 추출물의 농도를 10, 5, 1, 0.1 mg/ml로 처리하고 72시간 동안 배양을 실시한 뒤, 세포의 형태를 확인한 결과, 간암 세포는 대조군에 비해 小檗 추출물을 처리한 경우에 세포의 수가 현저히 감소되었다. 간암 세포에 小檗 전탕액 및 유기 용매에서 얻은 각각의 분획물을 처리한 경우, 대조군에 비해서 小檗의 분획물을 처리한 경우에 세포 수가 감소하고 세포가 위축, 사멸되었으며, 특히 n-hexane 분획을 처리한 경우 세포의 사멸이 가장 많이 일어났음을 알 수 있었다.

Cytokine은 혈액 속에 함유되어 있는 면역단백의 하나로, 여러 가지 면역세포들에 의해 만들어지며, 면역세포의 활성화, 성장, 분화 등에 영향을 미칠 수 있다.³⁰⁾ 본 연구에서는 간암세포의 배양액에 小檗 전탕액 추출물을 10, 5, 1, 0.1 mg/ml의 농도로 희석하여 처리하고, 72시간 동안 배양한 후, 사이토카인의 변화를 ELISA로 확인하였다.

TGF- β 는 배양된 섬유아세포를 종양과 유사한 표현형질로의 변환을 촉진시키는 인자로서 종양 형성을 촉진시키는 역할을 하는데, 최근에는 종양 억제 인자로서의 역할도 큰 것으로 알려져 있다.³¹⁾ 본 연구에서 간암세포에 小檗 전탕 추출물을 처리한 경우 0.1 mg/ml의 농도에서 유의성 있는 증가를 보였으며, 10 mg/ml의 농도에서는 대조군에 비해 약간의 감소를 나타냈으나, 통계적 유의성은 없었다.

TNF- α 는 생체 내에서 단독 또는 cytokines와 협력 작용하여 몇몇 종양의 혈관조직을 손상시킴으로써 종양 괴사(tumor necrosis)를 유발시키거나 malaria 또는 legionella에 의한 감염, 몇몇 바이러스 혹은 기생충에 의한 감염에 대하여 숙주의 저항성을 유도시키기도 하지만, TNF- α 는 중요한 염증매개 인자중 하나로서 어떤 환경에서는 생체에 매우 해로운 영향을 미치기도 한다.³²⁾ 본 연구에서 간암 세포에 小檗 전탕 추출물을 처리한 경우, 5 mg/ml와 1 mg/ml 농도에서 대조군에 비하여 TNF- α 의 생성이 유의하게 증가하였다. 간암세포에 小檗 전탕액의 분획물을 처리한 경우 대조군에 비해 유의한 변화를 나타내지 않았다.

Interferon(IFN)- γ 는 T세포나 NK세포로부터 분비되어지며, 바이러스의 복제 억제나 맥관 관련 세포들의 증식을 억제하는 등 다양한 기능을 가지고 있는 것으로 널리 알려져 있다.³³⁾ 또한 IFN- γ 는 다양한 세포사멸 유도인자들에 대한 세포의 감수성을 증가시킴으로써, 인자들에 의한 세포사멸을 증

강시키는 역할을 하는 것으로 보고되었다.³⁴⁾ 본 연구에서 간암 세포에 小檗 전탕 추출물을 처리한 경우, 10 mg/ml와 5 mg/ml의 농도에서 IFN- γ 분비 세포의 비율이 증가하였다.

약물 처리를 하지 않은 HepG2 간암세포와 小檗 전탕 추출물을 처리한 HepG2 간암세포에서 total RNA를 분리하여 항암관련 인자들의 발현정도를 확인한 결과, 암유전자인 K-RAS와 TGF- β 는 小檗 추출물의 처리에 의한 발현정도가 감소하였으며, TNF- α 와 IFN- γ 는 발현정도가 증가된 것을 확인할 수 있었다. K-RAS는 암유전자로서 암세포 신호전달에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 小檗 약물처리에 의해 암세포에서의 K-RAS 유전자 발현이 감소한 것은 항암 효과를 나타내는 것으로 볼 수 있다.

이상의 결과, 小檗 전탕액은 간암세포에 대하여 항암효과를 나타내는 것으로 사료된다.

결론

小檗을 전탕 추출과 분획별 추출을 한 후, 그 추출물로 cell proliferation과 apoptosis, morphology, cytokine level을 측정하여 간암 세포에 미치는 영향을 비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 小檗 전탕액은 간암세포의 증식을 유의하게 억제하였다.
2. 小檗 전탕액은 간암세포의 자연사멸을 증가시켰다.
3. 小檗 전탕액은 간암세포에서의 TGF- β 유전자 발현과 K-RAS 유전자 발현을 감소시켰다.
4. 小檗 전탕액은 간암세포에서 TNF- α 분비를 유의하게 증가시켰다. 또한 小檗 전탕액은 간암세포에서의 TNF- α 유전자 발현을 증가시켰다.
5. 小檗 전탕액은 간암세포에서 IFN- γ 분비 세포의 비율을 증가시켰다.

이상의 결과, 小檗 전탕액은 간암세포에 대하여 항암효과를 나타내는 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 경원대학교 연구비 지원을 받았기에 감사드립니다.

참고문헌

1. 蘇敬 等撰, 尙志鈞 輯校. 新修本草. 安徽科學技術出版社. 1981:351.
2. 國家中醫藥管理局《中華本草》編委會. 中華本草. 上海:上海科學技術出版社. 1999:(3)285-300.

3. 조선민주주의 인민공화국 보건부 약전위원회, 조선민주주의 인민공화국 약전 제5판. 평양:의과학출판사. 1996:175.
4. 中華人民共和國衛生部藥典委員會 編. 中華人民共和國藥典 1977年版 1部. 北京:人民衛生出版社. 1978:23,24.
5. 中華人民共和國衛生部藥典委員會 編. 中華人民共和國藥典 1990年版 1部. 北京:人民衛生出版社. 1990:부록21.
6. 이창복. 대한식물도감. 서울:향문사. 1982:370.
7. 이용주, 유승조, 이성규, 박동하. 매자나무과 식물의 Alkaloid 연구-왕매발톱나무의 Alkaloid 성분. 생약학회지. 1971;2(1):19-21.
8. 김윤근, 박정순. 매자나무뿌리 알콜 추출물의 항진균 작용. 대한약리학회지. 1969;5(1):51-54.
9. 조선희, 김정일. 매자나무성분이 마우스 수면 및 체온에 미치는 영향. 대한약리학회지. 1974;10(1,15):61-65.
10. 이종화, 박영현, 조병현, 김유재, 김종배, 김천숙, 차영덕, 김영석. Majorin 유도체인 majorol의 환취에 있어서 혈압 및 심박동수에 대한 작용과 적출 개구리 심장에 대한 작용. 대한약리학회지. 1986;22(1,38):34-44.
11. 김영균. 국내산 매자나무과 Berberis속 수목 성분 분석. 과학기술부 최종보고서. 1996:23.
12. Xu R, Dong Q, Yu Y, Zhao X, Gan X, Wu D, Lu Q, Xu X, Yu XF. Berbamine : a novel inhibitor of bcr/abl fusion gene with potent anti-leukemia activity. Leuk Res. 2006;30(1):17-23.
13. Lans C, Turner N, Khan T, Brauer G, Boepple W. Ethnoveterinary medicines used for ruminants in British Columbia, Canada. J Ethnobiol Ethnomedicine. 2007;3:11.
14. Tsai PL, Tsai TH. Hepatobiliary excretion of berberine. Drug Metab Dispos. 2004;32(4):405-12.
15. Janbaz KH, Gilani AH. Studies on preventive and curative effects of berberine on chemical-induced hepatotoxicity in rodents. Fitoterapia. 2000; 71(1):25-33.
16. Shamsa F, Ahmadiani A, Khosrokhavar R. Antihistaminic and anticholinergic activity of barberry fruit (*Berberis vulgaris*) in the guinea-pig ileum. J Ethnopharmacol. 1999;64(2): 161-6.
17. 金昌種. 病態生理學. 서울:癸丑文化社. 1988:72-74.
18. Gilman AG, Good LS, Gilman A. The pharmacological basis of therapeutics 6th ed. New York:Macmillan Co Inc. 1975:110-115.
19. Mervyn J, Mary D, Gerald MC. Antitumor activity of 1-naphthol against L1210 leukemia in vivo and enrlch ascites tumor cells in vivo and in vitro. Cancer letters. 1986;33:347-354.
20. 蘇頌 撰, 胡乃長 王致譜 輯注. 圖經本草. 九龍:龍源出版 公社. 1988:315.
21. 李時珍 著. 本草綱目(校點本). 北京:人民衛生出版社. 1982:1982.
22. Anis KV, Rajeshkumar NV, Kuttan R. Inhibition of chemical carcinogenesis by berberine in rats and mice. J Pharm Pharmacol. 2001;53(5):763-8.
23. Fukuda K, Hibiya Y, Mutoh M, Koshiji M, Akao S, Fujiwara H. Inhibition by berberine of cyclooxygenase-2 transcriptional activity in human colon cancer cells. J Ethnopharmacol. 1999; 66(2):227-33.
24. Pellegrion M, Ferrone S, Theofilopoulos A. Isolation of human T and B cells by rosette formation with 2-aminoethylisothiuronium bromide(AET)-treated sheep red blood cells and with monkey red blood cells. J Immunol Meth. 1976;11:273-277.
25. Kishimoto T, AEG von dem Brorne et al. Leucocyte typing VI : White cell differentiation antigens. Garland publishing Inc. London, 1998.
26. Maiolini R, Masseyeff R. Asandwich method of enzymoimmunoassay. Appication to rat and human alpha-foetoprotein. J Immunol Meth. 1975;8: 223-234.
27. Evans VC. Multiple pathways to apoptosis. Cell Bio1 Int. 1993;17(5):461-476.
28. Shi L, Nishioka WK, Th'ng J, Bradbury EM, Litchfield DW, Greenberg AH. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. Science. 1994;263(5150):1143-1145.
29. Guseva NV, Taghiyev AF, Rokhilin OW, Cohen MB. Death receptor-induced cell death in prostate cancer. J Cell Biochem. 2004;91:70-99.
30. 윤정구. 종양에 대한 생체방어기전. 대한의학협회지. 1989;32(10):1073-1077.
31. Rodriguez GC, Berchuck A, Whitaker RS. Epidermal growth factor receptor expression in normal ovarian epithelium and ovarian cancer. II. Relationshop between receptor expression and response to epidermal growth factor. Am J Obstet Gynecol. 1991;164:745-750.
32. Roit IM, Brostoff J, Male DK Livingstone C. Immunology. London:Gower Medical Publishing. 1989:9,6-9,13.
33. Kakimi K, Guidotti L, Koezuka Y, Chisari FV. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. J Exp Med. 2000; 192:921-930.
34. Shin EC, Shin WC, Choi Y, Kim H, Park JH, Kim SJ. Effect of interferon-gamma on the susceptibility to Fas(CD95/APO-1)-mediated cell death in human hepatoma cells. Cancer Immunol Immunother. 2001;50:23-30.