

정상사람림프구와 HL-60 cell에서 목향의 세포독성과 백혈병세포 분화효과에 관한 연구

이영준¹, 강수진², 구세광^{3*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 예방의학교실, 2 : 영남대학교 약학대학,
3 : 대구한의대학교 한의과대학 해부조직학교실

Cytotoxicity in HL-60 cells and human lymphocytes and effect of leukemia cell differentiation induced by Saussureae Radix extract

Young-Joon Lee¹, Su-Jin Kang², Sae-Kwang Ku^{3*}

1 : Department of Preventive Medicine, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University,
2 : College of Pharmacy, Yeungnam University,
3 : Department of Anatomy and Histology, College of Oriental Medicine,
Daegu Haany University, Gyeongsan

ABSTRACT

Objectives : This study was focused to investigate the toxicity of *Saussurea lappa* (SL) extracts in HL-60 cells and human lymphocytes. We also examined the differentiation effect of SL against leukemia cells.

Methods : For examining the toxicity of SL, cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay and single cell gel electrophoresis (SCGE) assay were used in present study. The cell differentiation effect of SL was evaluated by nitroblue tetrazolium (NBT) reduction assay.

Results : The inhibition of cell growth in HL-60 cells was observed in a dose-dependant manner after SL treatment for 24 h. According to SCGE assay, HL-60 cells treated with SL increased DNA damage at 10 μ g/ml, while DNA damage was induced by 0.1, 1, 10 μ g/ml concentration of SL in human lymphocytes. Our results indicated that SL have no genotoxic effect in HL-60 cells and human lymphocytes. Additionally, the differentiation effect was induced in 1 μ g/ml SL-treated HL-60 cells.

Conclusions : From above results it is suggested that SL could be beneficial for the preparation of the useful agent for treating leukemia.

Key words : Saussureae Radix, Cytotoxicity, Genotoxicity, Leukemia, Terminal differentiation

서 론

木香은 *Saussurea lappa* Clarke의 뿌리를 건조한 것으로 한의학에서 通氣止痛, 止瀉止痢하는 작용이 있어 腹痛과 後重을 치료하는 약재로 사용되고 있다¹⁾. 木香의 주요 유효성분은 sesquiterpenes, polyene alcohols, triterpenes, lignans, alkaloids와 tannins으로서, costunolide는 sesquiterpene lactone의 일종으로 세포독성을 유발시키는 반면에 항암효과와 항염증효과, chemopreventive effect 등을 포함하는 다양한 작용을 하는 것으로 보고되고 있다²⁻⁵⁾. 특히 costunolide는

cell killing effect를 감소시키는 것으로 보고되었다⁶⁾. T cell receptor에서 tyrosine phosphorylation의 증가를 억제함으로써 cytotoxic T lymphocytes의 대부분의 암세포들은 성장 조절기능에 이상이 생겨 정상적으로 분화된 것에서부터 정상적으로 분화되지 못한 것까지 다양한 종류의 세포형태를 가지고 있고, 대부분이 완전한 성인세포로 분화되지 못한 모습을 가지고 있어서 지속적으로 분화가능성을 가지면서 정상세포와 유사한 형태로 자라나게 된다. 그러므로 의학계에서 항암제의 개발은 세포자멸을 유도하거나 세포주기를 억제함으로써 암세포를 사멸시키거나, 정상기능을 가진 세포로 전환시키기 위해

*교신저자 : 구세광. 경산시 유곡동 290, 대구한의대학교 한의과대학.
· Tel : 053-819-1549, · Fax : 053-819-1269, · E-mail : gucci200@hanmail.net,
· 접수 : 2011년 4월 25일 · 수정 : 2011년 6월 3일 · 채택 : 2011년 6월 10일

말단분화(terminal differentiation)를 촉진시키는 것을 목표로 하고 있다. 암의 진행과정에서 세포의 분화도와 암세포의 생존능력은 반비례관계를 가지고 있는데, 즉 세포분화를 유도하면 어떤 암세포는 증식능력을 잃어버리고 그 고유의 성질을 가지게 된다. 백혈병은 구조적으로나 기능적으로 완전히 성숙되지 못한 백혈구가 비정상적으로 증식하는 질병이다. 특히 백혈병의 경우 인체 면역계에서 주요 방어기전을 맡고 있는 백혈구가 제 기능을 하지 못함으로 해서 인체방어기전에 제대로 작동하지 못해 다양한 질병에 2차적으로 노출될 가능성을 가지고 있다. 백혈병 세포는 다양한 물질에 의해 말단분화가 유도되므로 급성 백혈병의 경우 백혈구의 말단분화를 유도하여 치료에 접근할 수 있다⁷⁾.

Costunolide는 사람 급성 백혈병 세포주인 HL-60 cell에서 잠재적인 분화효과를 유도하는 것으로 보고되었다. 일반적으로 암예방에 사용되면서 HL-60 cell의 분화를 유도하는 것으로 알려진 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃)와 비교한 연구에서 costunolide는 HL-60 cell에 대해 antiproliferation 작용을 보였고, 1,25(OH)₂D₃의 기전과는 달리 nitroblue tetrazolium을 감소시키고 CD14와 CD66b 표면항체를 발현시킴으로써 terminal differentiation activity를 가지고 있는 것으로 보고되었다⁸⁾. 다른 연구에서는 costunolide를 HL-60 cell에 처리하였을 때 그 자체만으로는 분화효과가 미약하였고 protein kinase K, extracellular signal-regulated kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, c-Jun N-terminal kinase, nuclear transcription factor κ B를 억제함으로써 1,25(OH)₂D₃와 all-trans retinoic acid에 의해 유도된 terminal differentiation을 증가시키는 것으로 보고되었다^{9,10)}.

기존의 연구결과에서, costunolide가 백혈병 세포주에서 말단분화를 유도할 가능성과 그에 반해 세포독성을 유발시킨다고 보고하였다. 하지만, costunolide의 정상백혈구(human normal lymphocyte)에 대한 세포증식 및 독성에 관해 연구가 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 목향추출물과 주요구성성분인 costunolide의 독성을 정상백혈구에서 평가하고 백혈병 세포주인 HL-60 cell의 증식에 미치는 영향을 평가하여 木香이 백혈병을 치료하기 위한 천연물 신약 후보물질로 가능한지를 알아보고자 한다.

재료 및 방법

1. 목향 추출 및 UPLC diagram 분석

목향(Saussureae radix, 음니허브, 영천)은 파쇄한 후에 탄올을 사용하여 추출하였다. 추출 방법을 간략히 설명하면 다음과 같다. 목향분말 200g을 에탄올 1l에 혼합시켜 72시

간 동안 추출한 후 여과지(Whatman, No.2)로 여과하였다. 그 다음으로 55±2℃에서 회전 감압농축기(EYELA, Tokyo, Japan)로 감압농축하고 초저온냉동고(Nihon freezer, Japan)에서 동결한 후 동결건조기(Labconco, USA)에서 건조하였다. 목향의 최종 수율은 8.43%이었으며 냉장보관 후 DMSO에 녹여 실험에 사용하였다. 목향 추출물내의 costunolide 함량 분석은 AcQUITY UPLC™ System (Waters, UK)으로 분석하였다.

2. 세포 생존율 측정

HL-60 cell을 24 well plate에 1×10⁵개씩 분주하고 각각 costunolide(10, 20μ M; Tocris, Bristol, UK)와 목향추출물(5, 10, 15, 20μg/ml)을 6, 24, 30, 48시간동안 처리하여 trypan blue 염색법을 통해 세포생존을 관찰하였다.

3. 단세포 전기영동법

단세포 전기영동법은 Singh의 방법(1994)에 준하여 시행하였다¹¹⁾. 즉 1.5mL tube에 혈액과 HL-60 cell이 포함된 배지를 넣고 costunolide(1μ M)와 목향추출물(0.1, 1, 10μg/ml)을 처리한 후 3시간 동안 5% CO₂가 공급되는 37℃ 항온기에서 배양하였다. 배양 후에는 DNA 회복을 차단하기 위해 4℃를 유지하면서 전혈의 경우 M'Bemba-Meka et al (2000) 방법¹²⁾에 따라 ficoll로 림프구를 분리하였고, HL-60 cell은 원심분리하여 상등액을 제거한 후 세포를 분리하였다. 분리된 세포를 0.5% low melting agarose gel 75μ l과 섞어 미리 0.6% normal melting agarose gel로 덮고 4℃에 보관된 슬라이드에 펼친 후 coverslip을 덮어 준 후 다시 4℃에서 10분간 두어 굳힌 다음 coverslip을 제거하였다. 여기에 0.5% low melting agarose gel 110μ l를 슬라이드에 펼친 후 coverslip을 덮어 준 후 다시 4℃에서 10분간 두어 굳힌 다음 coverslip을 제거하였다. 슬라이드를 차가운 lysis buffer (2.5M NaCl, 100mM Na₂EDTA, 10mM Tris base, 1% N-Lauryl sarcosinate, 1% Triton X-100, PH10)에 담가서 4℃ 1시간 정도 용해시켰다. 이후 3차 증류수로 슬라이드에 남아 있는 염을 제거한 후 슬라이드를 전기 영동기에 올려놓고 eletrophoretic buffer(300mM NaOH, 0.1% 8-hydroxyquinoline, 2% dimethyl sulfide, 10mM Na₂EDTA, pH)12.3)에 20분간 담귀 DNA의 양가닥이 풀리게 한 후 25분간 22V, 300mA에서 전기영동을 걸었다. 이후 고알칼리 상태를 중화시키기 위해 Tris buffer(0.4M Tris, pH 7.4)로 5분간 3회 중화시켰다. DNA가 슬라이드에 침착될 수 있도록 슬라이드를 에탄올에 적어도 1시간 이상 담가 놓았다. 슬라이드를 건조시킨 후 ethidium bromide(20

μ g/ml) 60μ l로 형광염색 하였다. 형광현미경을 이용하여 515-560nm 의 excitation filter와 590nm의 barrier filter 에서 400배율로 관찰하였다. 무작위로 선택된 한 농도 당 세포 60개는 이미지 분석 프로그램(Image-Pro Plus 4.0)을 통해 DNA의 손상 정도를 head를 포함한 Olive Tail Momentum을 분석하였다.

4. 소핵 분석

소핵분석은 Fenech and Morley (1985)의 방법에 준하여 시행하였다¹³⁾. 혈액과 HL-60 cell에 costunolide(1μ M)와 목향추출물(0,1, 1, 10μ g/ml)을 처리하여 44시간 배양시킨 후 cytochalasin-B (4μ g/ml ; Sigma)를 첨가하여 추가 배양시킨 후 slide를 작성하였다.

작성된 표본은 공기 건조시킨 후 5% giemsa 용액에 10분간 염색하여 소핵의 빈도를 측정하였고 한 농도 당 간시 세포 1000개를 무작위로 관찰하였다. 소핵 분석 방법은 Fenech (2000)의 기준에 준하여 측정하였고 모든 slide는 이중맹검법을 사용하여 측정되었다¹⁴⁾.

5. 백혈구 분화능 측정(NBT assay)

백혈구 분화능에 대한 측정은 Collins 등 (1979)의 방법에 준하여 시행하였다¹⁵⁾. HL-60 cell에 costunolide(1μ M)와 목향추출물(0,1, 1, 10μ g/ml)을 처리한 후 원심분리하여 2×10^5 개의 cell을 수거하여 1% nitroblue tetrazolium (NBT)와 200ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)가 함유된 PBS에 섞은 후 5% CO₂가 공급되는 37℃ 항온기에서 30분동안 배양하였다. 배양한 세포는 cytospin slide에 떨어뜨린 후 2000rpm에서 5분간 원심분리하여 현미경으로 관찰하였다.

6. 통계처리

윈도우용 PASW 18.0을 사용하여 세포생존율의 경우 반복측정 분산분석(repeated measured ANOVA test)을 실시하였으며, 유의한 결과가 나온 경우 Turkey post hoc test를 시행하여 비교분석하였다. 단세포 전기영동 분석은 Kruskal-Wallis test를 시행하여 유의성을 검정하였으며, 유의한 결과가 나온 경우 Mann-Whitney test를 시행하여 군간 차이를 평가하였다. 백혈구 분화능 평가는 일원배치 분산분석(Oneway ANOVA test)을 실시하였고, Turkey post hoc test를 시행하여 군간 차이를 비교하였다. 유의수준은 5%로 설정하여 미만인 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 목향추출물과 costunolide가 HL-60 cell의 생존에 미치는 영향

목향추출물과 costunolide가 HL-60 cell의 생존에 미치는 영향을 살펴본 결과 대조군인 DMSO 10μ l 처리군에 비해 24시간 때부터 세포사멸을 유발시키는 것으로 관찰되었으며, 세포사멸의 정도는 목향추출물보다 costunolide의 영향이 더 크게 나타나는 것으로 조사되었다(Fig. 1). 이 세포생존율의 결과를 근거로 HL-60 cell의 성장억제농도(Growth Inhibition 50 ; GI₅₀)를 산출한 결과 목향 4.46(95%CI ; 2.52, 5.95) μ g/ml, costunolide 3.59(95%CI ; 0.03, 6.41) μ M로 나타났으며, 이 농도를 기준으로 독성평가 농도를 결정하였다.

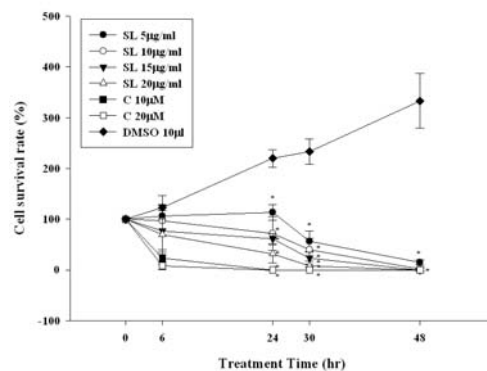


Figure 1. Kinetics of cell death by *Saussurea lappa* and costunolide treatment in HL-60 cells. Cell viability determined by trypan blue exclusion at the incubated time points. Results represent the mean \pm S.D. of triplicate experiments. *, $p < 0.01$ compared to the DMSO treated group. C, costunolide. SL, *Saussurea lappa*.

2. 목향추출물과 costunolide가 DNA 손상에 미치는 영향

목향추출물과 costunolide의 DNA 손상 유발여부를 알아보기 위해 단세포 전기영동법을 시행한 결과 HL-60 cell에서 costunolide는 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 높은 DNA 손상을 유발시키는 것으로 나타났으며, 목향추출물은 0.1과 1μ M 농도에서는 DNA 손상이 관찰되지 않았으나 반수치사농도를 넘는 10μ M의 농도에서는 costunolide보다 더 많은 DNA 손상이 관찰되었다(Fig. 2A). 정상 사람 백혈구에서는 costunolide와 목향추출물 처리군 모두에서 DNA 손상이 관찰되었으며, HL-60 cell의 결과와 유사하게 높은 농도의 목향추출물은 costunolide보다 더 높은 DNA 손상이 관찰되었다(Fig. 2B).

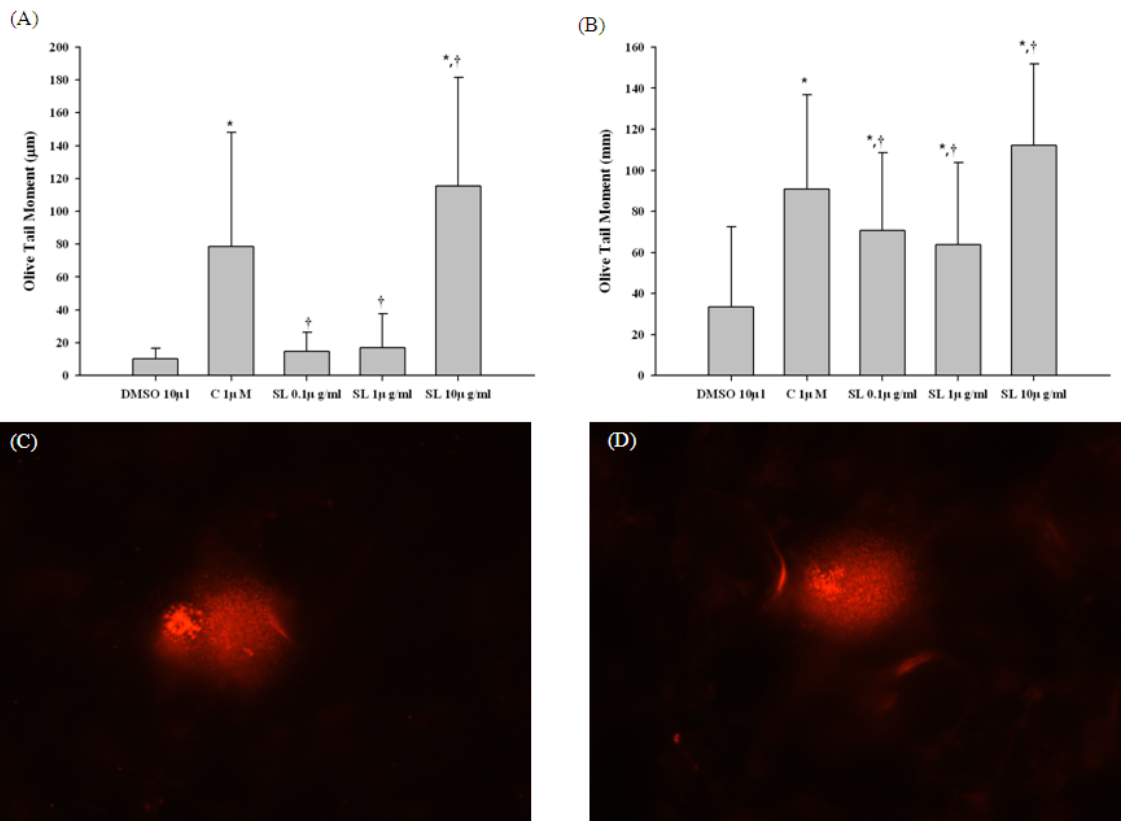


Figure 2. *Saussurea lappa* and costunolide-induced cytotoxicity determined by single cell gel electrophoresis assay. (A) HL-60 cells and (B) human lymphocytes were treated with various concentrations of agents for 3 h. Apoptosis like DNA damage were observed in (C) HL-60 cell and (D) human lymphocyte. Each bar represents the mean±S.D. of triplicate experiments. *, p < 0.01 compared to the DMSO treated group. †, p < 0.01 compared to the costunolide treated group. C, costunolide. SL, *Saussurea lappa*.

3. 목향추출물과 costunolide의 유전독성 분석

유전독성평가에 널리 사용되는 소핵분석을 통해, 목향추출물과 costunolide의 염색체 손상을 살펴보았다. 소핵분석 결과에서 목향추출물과 costunolide는 HL-60 cell과 사람 정상 백혈구에서 소핵형성을 유발시키지 않았다. 이러한 결과는 목향이나 costunolide가 유전독성을 일으키지 않음을 제시하고 있다(Table 1).

Table 1. Genotoxicity of *Saussurea lappa* and costunolide assessed by MicroNucleus (MN) assay.

	MN Frequency				
	DMSO 10µl	C 1µ M	SL 0.1µg/ml	SL 1µg/ml	SL 10µg/ml
HL-60 cells	0/1000	0/1000	0/1000	0/1000	0/1000
MN Normal Human Lymphocytes	0/1000	0/1000	0/1000	0/1000	0/1000

C, costunolide. SL, *Saussurea lappa*.

4. 백혈병 세포 분화능력 측정

백혈구의 말단분화 능력을 파악하기 위해 NBT reduction assay를 시행한 결과 costunolide는 통계적으로 유의하게 백혈구의 말단 분화를 유발시키는 것으로 관찰되었고, 목향추출물의 경우는 1µg/ml의 농도에서 대조군에 비해 백혈구 분화

를 증가시켰지만 다른 농도에서는 백혈구 분화가 관찰되지 않았다(Fig. 3).

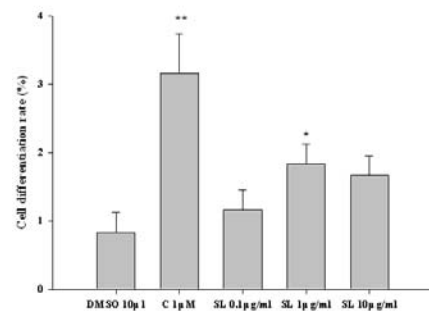


Figure 3. Effects of *Saussurea lappa* and costunolide on HL-60 cell differentiation. Cell differentiation was assessed by the NBT reduction assay. Each bar represents the mean±S.D. of triplicate experiments. *, P < 0.05, **, p < 0.01 compared to the DMSO treated group. C, costunolide. SL, *Saussurea lappa*.

고찰

본 연구에서 목향은 HL-60 세포주에서 실시한 세포생존율 분석과 단세포 전기영동법에서 세포독성이 있음을 확인하였다. 그리고 사람 정상 백혈구에서는 단세포 전기영동법을 통한 세포독성은 확인하였지만, 유전독성은 보이지 않았다. 또한 비교물질로 사용된 costunolide에 비해 목향은 상대적

으로 백혈병 세포의 말단 분화를 적게 유도하는 것으로 관찰되었다.

목향(*Saussurea Radix*)은 行氣止痛, 溫中和胃하는 효능이 있어 우리나라와 중국, 일본에서 식욕부진과 복통, 구토, 설사 등을 치료하는 목적으로 사용되는 理氣藥이다^{16,17}. 기존의 연구에서 sesquiterpenes, polyene alcohols, triterpenes, lignans, alkaloids와 tannins 등이 목향의 성분으로 분석되었으며, 그 중 costunolide와 dehydrocostus lactone과 같은 sesquiterpene lactones이 주요 유효성분을 이루어 생약학적 작용을 나타내고 있다^{2,5,18,19}. 목향의 유효성분 중 costunolide는 약리학적으로 동맥수축억제작용²⁰, 항염²¹과 항궤양효과²²를 나타내는 물질로 알려지고 있으나, 다양한 사람 암세포에서 세포독성을 가지고 있는 연구결과들이 발표되었다²³⁻²⁵. 또한, 기존의 연구에서 목향의 메탄을 분획법에 따라 추출된 추출물들이 암세포주인 A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498과 HCT15 cell line들에게서 세포독성을 가지고 있음이 확인되었다²⁶. 본 연구에서 사용된 목향은 대한약전에서 제시한 방법에 따라 한약재 품질검사를 실시하였으며, UPLC 분석을 통해 목향 추출물 내 costunolide가 약 1%가 포함된 것을 확인하였으며, 본 연구결과에서도 기존의 연구결과들과 유사하게 목향추출물과 costunolide 모두 백혈병 세포주인 HL-60 cell line에서 세포의 성장을 억제시키는 효과가 있음을 확인하였다.

단세포 전기영동법은 DNA 손상을 측정하기 위해 고안된 방법으로 세포독성 및 유전독성을 평가하기 위해 사용되고 있다^{27,28}. 특히 Singh¹¹에 의해 개발된 방법은 DNA 단일가닥 손상(Single strand breakage; SSB)을 측정하기 위해 널리 사용되고 있다. 세포독성의 경우 세포의 사멸이 일어나는 기전은 세포자기사멸(apoptosis)과 세포괴사(necrosis)를 통해 일어난다. 최근에는 단세포 전기영동법을 apoptosis와 necrosis를 빠르게 구별하는 목적으로도 사용되고 있다. 단세포 전기영동법을 통한 apoptosis의 경우 크고 둥근 꼬리부분과 hedgehog이라 불리는 작은 머리부분의 양상으로 관찰되는 반면에 necrosis의 경우는 큰 머리부분과 좁고 다양한 길이의 꼬리부분으로 관찰된다²⁹. 본 연구결과에서 목향추출물과 costunolide 모두 HL-60 cell과 정상 사람 백혈구에서 SSB를 유발시키는 것이 확인되었다. Costunolide는 HL-60 cell에서 활성산소종(Reactive oxygen species; ROS)을 유발시킴으로써 mitochondria membrane의 permeability를 증가시키고, 그 결과 mitochondria내의 cytochrome C를 세포질로 분비시킴으로써 apoptosis를 유발한다는 연구결과가 보고되었다²⁴. 또한, 목향추출물은 AGS cell에서 p53과 p21을 유도하여 G2기에서 세포의 분열을 정지시키고 apoptosis를 유발시키는 연구결과가 보고되었다³⁰. 이러한 연구결과는 본 연구결과에서 관찰된 세포손상의 형태는 apoptosis를 일으키는 형태와 일관된 결과를 보여주고 있으며(Fig. 2C, D), 목향추출물의 경우는 정상세포에서도 apoptosis를 유도시키는 것으로 사료된다.

소핵분석(Micronucleus assay)은 손상된 DNA가 회복되는 과정에서 비정상적인 회복 때문에 발생한 염색체의 절편(chromosomal fragments)때문에 세포가 분열되는 과정에서 형성된 소핵이나 방추사의 비정상적인 형성으로 인해 염색체의 비분리로 형성된 소핵을 관찰함으로써 유전독성을 평가

하는 방법이다³¹. 본 연구에서는 목향추출물과 costunolide 모두에서 소핵의 형성이 관찰되지 않아 목향추출물이나 costunolide는 유전독성을 유발시키지 않는 것을 확인하였다.

理氣는 약물에 行氣, 解鬱, 補中益氣하는 작용이 있는 것을 운용하여 氣滯, 氣逆, 氣虛를 치료하는 방법이며, 益氣의 개념에는 補氣의 작용을 포함하고 있다³². 한의학에서 해석하고 있는 氣의 작용 중에는 면역계의 활성화도 포함이 되고 있다. 백혈병은 구조적으로나 기능적으로 완전히 성숙되지 못한 백혈구가 비정상적으로 증식하는 질병으로 인체 면역계에서 주요 방어기전을 맡고 있는 백혈구가 제 기능을 하지 못함으로 해서 인체방어기전에 제대로 작동하지 못하는 질병이다. 백혈병 세포는 다양한 물질에 의해 말단분화가 유도되므로 급성 백혈병의 경우 백혈구의 말단분화(terminal differentiation)를 유도하여 정상 백혈구의 기능을 가지도록 분화시킬 수 있다⁷. 그러므로 비정상 백혈구의 말단분화를 유도하여 정상적인 기능을 발휘할 수 있게 만드는 작용은 한의학의 理氣작용으로 해석할 수 있을 것이다.

HL-60 cell의 분화를 유도하는 것으로 알려진 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃)와 Costunolide를 비교한 기존의 연구에서 costunolide는 1,25(OH)₂D₃의 기전과는 달리 CD14와 CD66b 표면항체를 발현시킴으로써 terminal differentiation activity를 가지고 있는 것으로 보고되었다⁸. 또한 다른 연구에서는 costunolide를 HL-60 cell에 처리하였을 때 그 자체만으로는 분화효과가 미약하였지만 1,25(OH)₂D₃와 all-trans retinoic acid에 의해 유도된 terminal differentiation을 증가시키는 것으로 보고되었다^{9,10}. 이러한 연구결과들과 유사하게 본 연구에서도 costunolide를 처리한 HL-60 cell에서 nitroblue tetrazolium이 감소되는 경향을 보였다. 그러나 목향추출물을 처리한 HL-60 cell에서는 costunolide보다는 상대적으로 약한 분화가 관찰되었다. 이 결과는 목향이 백혈병 치료제로서 개발될 가능성이 있는 것으로 해석되지만 그 효능을 확인하기 위해서 추가 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

결론

목향추출물과 costunolide의 독성과 백혈병 세포의 말단분화 유도 효과를 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 목향추출물과 costunolide는 백혈병 세포인 HL-60 cell과 사람의 정상 백혈구에서 세포자기사멸 양상의 세포독성을 가지고 있는 것으로 조사되었으나 유전독성은 유발시키지 않는 것으로 나타났다.
2. 목향추출물은 대조물질인 costunolide보다 상대적으로 약하지만 백혈병 세포에 대해서 말단분화를 유도하는 것이 확인되었다.

이상의 결과로 볼 때 목향은 정상세포에서도 세포독성을 가지고 있지만 백혈병 세포의 말단분화 능력을 가지고 있음을 알 수 있다. 따라서 목향은 백혈병 치료에 도움을 줄 수 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2009년도 대구한의대학교 기린연구비 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

참고문헌

- Chen CR, A grand dictionary of oriental medicinal herbs, Seoul : Songak, 1990 : 212-5.
- Robles M, Aregullin M, West J, Rodriguez E, Recent studies on the zoopharmacognosy, pharmacology and neurotoxicology of sesquiterpene lactones, *Planta Med*, 1995 ; 61 : 199-203.
- Yamahara J, Kobayashi M, Miki K, Kozuka M, Fujimura H, Cholagogic and antiulcer effect of saussureae radix and its active components, *Chem Pharm Bull*, 1985 ; 33 : 1285-8.
- Mori H, Kawamori T, Tanaka T, Ohnishi M, Yamahara J, Chemopreventive effect of costunolide, a constituent of oriental medicine, on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats, *Cancer Lett*, 1994 ; 83 : 171-5.
- Ohnishi M, Yoshimi N, Kawamori T, Ino N, Hirose Y, Tanaka T, Yamahara J, Miyata H, Mori H, Inhibitory effects of dietary protocatechuic acid and costunolide on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster cheek pouch carcinogenesis, *Jpn J Cancer Res*, 1997 ; 88 : 111-9.
- Taniguche M, Kataoka T, Suzuke H, Uramoto M, Ando M, Arao K, Magae J, Nishimura T, Otake N, Nagai K, Costunolide and dehydrocostus lactone as inhibitors of killing function of cytotoxic T lymphocytes, *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995 ; 59 : 2064-7.
- Beere HM, Hickman JA, Differentiation : a suitable strategy for cancer chemotherapy? *Anticancer Drug Des*, 1993 ; 8 : 299-322.
- Choi JH, Seo BR, Seo SH, Lee KT, Park JH, Park HJ, Choi JW, Itoh Y, Miyamoto K, Costunolide induces differentiation of human leukemia HL-60 cells, *Arch Pharm Res*, 2002 ; 25 : 480-4.
- Kim SH, Kang SN, Kim HJ, Kim TS, Potentiation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced differentiation of human promyelocytic leukemia cells into monocytes by costunolide, a germacranolide sesquiterpene lactone, *Biochem Pharmacol*, 2002 ; 64 : 1233-42.
- Kim SH, Danilenko M, Kim TS, Differential enhancement of leukemia cell differentiation without elevation of intracellular calcium by plant-derived sesquiterpene lactone compounds, *Br J Pharmacol*, 2008 ; 155 : 814-25.
- Singh NP, Stephens RE, Schneider EL, Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage, *Int J Radiat Biol*, 1994 ; 66(1) : 23-8.
- M' Bemba-Meka P, Lemieux N, Chakrabarti SK, Role of oxidative stress, mitochondrial membrane potential, and calcium homeostasis in nickel sulfate-induced human lymphocyte death in vitro, *Chem Biol Interact*, 2005 ; 156 : 69-80.
- Fenech M, Morley A, Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutat Res*, 1985 ; 147 : 29-36.
- Fenech M, The in vitro micronucleus technique, *Mutat Res*, 2000 ; 455 : 81-95.
- Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, Gallo RC, Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide, *J Exp Med* 1979 ; 149 : 969-74.
- Kim SH, Lee KH, An DK, Lee SI, Lee YJ, Kang BS, Ko WC, Rho SH, Song HJ, Shin MK, Ju YS, *Herbology*, Seoul : Younglimsa, 1992 ; 353-4.
- Bensky D, Gamble A, *Chinese herbal medicine : Materia medica*, Eastland press, Seattle, 1986 ; 339-40.
- Matsuda H, Toguchida I, Ninomiya K, Kageura T, Morikawa T, Yoshikawa M, Effects of sesquiterpenes and amino acid-sesquiterpene conjugates from the roots of *Saussurea lappa* on inducible nitric oxide synthase and heat shock protein in lipopolysaccharide-activated macrophages, *Bioorg Med Chem*, 2003 ; 11 : 709-15.
- Hisashi M, Tadashi K, Yasunao I, Toshio M, Masayuki Y, Absolute stereostructures and syntheses of saussureanines A, B, C, D and E, amino acid-sesquiterpene conjugates with gastroprotective effect, from the roots of *Saussurea lappa*, *Tetrahedron*, 2000 ; 56 : 7763-77.
- Shoji N, Umeyama A, Saits N, Takemoto T, Vasoactive substances from *Saussurea lappa*, *J Nat Prod*, 1986 ; 49 : 1112-3.
- Kang JS, Yoon YD, Lee KH, Park SK, Kim HM, Costunolide inhibits interleukin-1 β expression by down-regulation of AP-1 and MAPK activity on LPS-stimulated RAW 264.7 cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 2004 ; 313 : 171-7.
- Yamahara J, Kobayashi M, Miki K, Kozuka M, Sawada T, Fujimura H, Cholagogic and antiulcer effect of *Saussurea* radix and its components, *Chem Pharm Bull*, 1985 ; 33 : 1285-8.
- Park SH, Choi SU, Lee CO, Yoo SE, Yoon SK, Kim YK, Ryu SY, Costunolide, a sesquiterpene

- from the stem bark of *Magnolia sieboldii*, inhibits the RAS-farnesyl-proteintransferase. *Planta Med.* 2001 ; 67 : 358-9.
24. Lee MG, Lee KT, Chi SG, Park JH. Costunolide induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability and cytochrome C release. *Biol Pharm Bull.* 2001 ; 24 : 303-6.
 25. Jeong SJ, Itokawa T, Shibuya M, Kuwano M, Ono M, Higuchi R, Miyamoto T. Costunolide, a sesquiterpene lactone from *Saussurea lappa* inhibits the VEGFR KDR/FLK-1 signaling pathway. *Cancer Lett.* 2002 ; 187 : 129-33.
 26. Jung JH, Kim YS, Lee CO, Kang SS, Im KS. Cytotoxic constituents of *Saussurea lappa*. *Arch Phar Res.* 1998 ; 21 : 153-6.
 27. Östling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 ; 123 : 291-8.
 28. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988 ; 175 : 184-91.
 29. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/Comet assay : Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mut.* 2000 ; 35 : 206-21.
 30. Ko SG, Kim HP, Jin DH, Bae HS, Kim SH, Park CH, Lee JW. *Saussurea lappa* induces G2-growth arrest and apoptosis in AGS gastric cancer cells. *Cancer Lett.* 2005 ; 220 : 11-9.
 31. Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DEG, Tice R, Waters MD, Aitio A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mut Res.* 2000 ; 463 : 111-72.
 32. Kim HJ, Hong WS. A dictionary of oriental medicine. Seoul : Seongbosa. 1991 : 342-56.