

## 五味子 추출물의 인간 전립선암 세포주 PC-3에 대한 성장 억제 효과

문정민, 석가형, 조수인\*

부산대학교 한의학전문대학원

### Antiproliferative effect of Schisandrae Fructus extract on PC-3 human prostate cancer cells

Jung Min Moon, Ga Hyeong Seok, Su In Cho\*

School of Korean Medicine, Pusan National University

#### ABSTRACT

**Objectives** : Schisandrae Fructus (SF) has traditionally been used to balance level of body fluid and to strengthen kidney function. It has been reported that the SF extract has antioxidant, hepatoprotective, neuroprotective and anticancer effects. This study investigated an antiproliferative effect of SF extract on PC-3 human prostate cancer cells and analyzed active ingredients of SF extract qualitatively and quantitatively.

**Methods** : We examined the antiproliferative effect of SF extract with MTT assay, DAPI staining and annexin-V/7-AAD double staining. The active ingredients of SF extract were identified by using HPTLC and HPLC/DAD system.

**Results** : SF-chloroform fraction inhibited growth of PC-3 cells and changed the morphology of nucleus in a dose dependent manner. A dose-dependent apoptotic cell death was also measured by flow cytometry analysis. It was analyzed that SF-chloroform fraction contained more schizandrin than other fractions by using HPTLC and HPLC/DAD system.

**Conclusions** : These results suggest that SF extract and schizandrin may be a potential chemotherapeutic agent for the control of PC-3 human prostate cancer cells.

**Key words** : Schisandrae Fructus, antiproliferative, PC-3, schizandrin

## 서 론

五味子 (Schisandrae Fructus)는 오미자과 (Schisandraceae)에 속한 落葉 木質藤本人 오미자 (北五味子) *Schisandra chinensis* (Trucz.) Baill. 또는 華中五味子 (南五味子) *S. sphenanthera* Rehd. et Wils.의 완숙한 果實을 건조한 것으로 性은 溫하고, 味는 酸甘하며 肺, 心, 腎經에 들어가 上으로는 肺氣를 斂하고, 下로는 腎陰을 滋하며 澀精止瀉, 生津, 止汗 등의 작용을 가지고 있다<sup>1)</sup>.五味자의 주성분은 schizandrin, deoxyschizandrin,  $\gamma$ -schizandrin, schizandrol, schizandrin C, schizandrol B (gomisin A) 등의 diphenylcyclohexane의 lignan으로 그 양이 18.1~19.2% 정도이며, 이외에 정유를 약 3% 함유하고 citric acid, citral,  $\beta$ -sitosterol, 비타민 C, E 등도 함유하고 있다<sup>2)</sup>.

五味자와 관련된 연구로는 항산화 효과<sup>3-5)</sup>, 간세포 보호

효과<sup>6-7)</sup>, 신경세포 보호 효과<sup>8-9)</sup>, 멜라닌 생성 억제와 미백 효과<sup>10)</sup>, 항당뇨 및 항고지혈 효과<sup>11)</sup>, 항균 효과<sup>12)</sup> 등이 있다.五味자 추출물의 항암 효과에 대한 연구로는 간암세포주 (SNU-398)<sup>13)</sup>, 대장암세포주 (HT-29)<sup>14)</sup>에 대해 보고된 바 있으며,五味자로부터 분리된 성분의 항암 효과에 대한 연구로는 gomisin N의 혈구암세포주 (U937)에 대한 효과, schizandrin의 유방암세포주 (T47D)에 대한 효과를 비롯하여 많은 연구<sup>15-22)</sup>가 보고되었다.

전립선암은 남성에게 발병하는 암으로 미국에서는 매년 28,000명 정도가 이 암으로 사망하고 있다<sup>23)</sup>. 우리나라에서도 최근 전립선암의 발병률이 증가하고 있으며, 연령, 인종, 가족력의 원인 외에도 고기 위주의 식습관과 동물성 지방의 과다 섭취와 같은 서구화된 식생활이 주요 원인으로 알려져 있다<sup>24)</sup>. 전립선암의 치료는 전립선 적출술, 방사선 치료, 화학 요법 등을 이용하지만 부작용이 따르며, 꽤나 다른 장기로

\*교신저자 : 조수인, 경상남도 양산시 물금읍 범어리, 부산대학교 한의학전문대학원 약물의학부 626-870  
· Tel : 051-510-8457 · FAX : 051-510-8420 · E-mail: sicho@pusan.ac.kr  
· 접수 : 2012년 6월 08일 · 수정 : 2012년 6월 26일 · 채택 : 2012년 6월 26일

전이된 전이성 전립선암의 경우에는 호르몬 치료를 하게 되나 치료가 쉽지 않은 실정이다<sup>25)</sup>. PC-3 세포는 p53-negative, 안드로겐 비의존성 인간 전립선암세포주로서 안드로겐 호르몬을 제거하는 방법에 반응하지 않고, 화학요법에 의해 apoptosis가 유도될 수 있지만 현재 임상에서 사용되는 화학요법제에는 반응이 약하므로 새로운 기전을 이용하여 apoptosis를 유도하는 화학 물질 또는 천연물의 개발이 필요하다<sup>26)</sup>.

따라서 본 연구에서는五味子を 메탄올로 추출하여 분획을 실시한 뒤 전립선암세포주 (PC-3)에 대한 성장 억제 효과와 apoptosis 유도 정도를 조사하였고, 활성이 있는 분획이 함유하고 있는 성분의 정성 및 정량 분석을 HPTLC와 HPLC를 이용하여 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)은 Thermo scientific (Utah, USA)에서 구입하였고, penicillin-streptomycin은 GibcoBRL (Eggenstein, Germany)에서 구입하였다. Fetal bovine serum (FBS)3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 및 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Junsei Chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)에서 구입하였으며 FITC annexin-V와 7-Aminoactinomycin D (7-AAD)는 BD Bioscience (San Jose, CA, USA)에서 구입하였다.

### 2. 약재 및 추출

五味子是 화림 제약 (부산, 한국)으로부터 구입하여 사용하였으며, 관능검사를 통해 기원이 오미자 (*Schisandra chinensis* (Trucz.) Baill.)인 것을 확인하였다.

五味子 500 g을 분쇄기로 잘게 부순 다음 메탄올 5 l 로 24 시간 동안 추출한 후 상등액을 filter paper로 여과하고, 회전 증발 진공 농축기 (EYELA, Tokyo, Japan)로 감압 농축하여 농축액을 얻었다. 농축액을 동결시킨 후 동결건조기 (LABCONCO, Kansas, MO, USA)로 건조시켜 109.7 g (수율 : 21.94%)의 메탄올 추출물을 얻었다. 이 중 100 g의 메탄올 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 증류수로 극성에 따라 순차적으로 용매분획을 실시하였으며 각각의 용매 추출물을 농축하여 분획을 얻었다 (Figure 1).

이 분획물을 DMSO에 녹여 100 mg/ml의 stock 용액으로 제조한 뒤 -20℃에 보관하였다가 실험 직전에 해동하여 사용하였다.

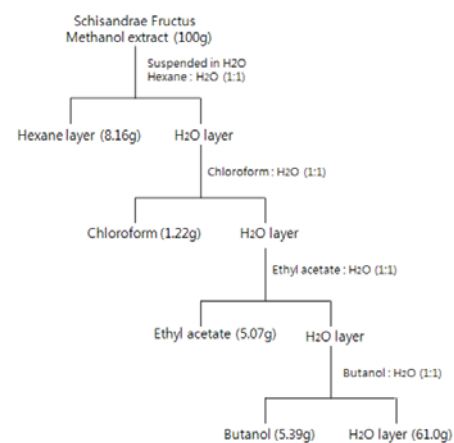


Figure 1. Solvent fractionation from methanol extract of Schisandrae Fructus.

### 3. 세포 배양

인간 전립선암세포주인 PC-3 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)으로부터 분양 받아 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 포함된 DMEM 배지를 사용하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 세포배양기에서 배양하였다.

### 4. 세포생존율 측정

PC-3 세포를 48-well 세포 배양 용기에  $4 \times 10^4$  cells/ml씩 분주하여 24 시간 배양하였고, 용기에 부착된 PC-3 세포에五味子 추출물을 분획별로 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 48 시간 동안 처리하였다. 이후 1 mg/ml MTT 시약을 처리하여 3 시간 동안 37℃ 배양기에서 반응시켰다. 배지를 제거하고 DMSO를 가하여 생성된 보라색 formazan을 용해하여 96-well 세포 배양 용기로 100  $\mu\text{l}$ 씩 옮겨 Fluorescence reader (TECAN, Grödigg, Austria)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 대조군 세포에 비교하여 백분율 (%)로 표시하였다.

### 5. 세포핵의 형태 관찰

PC-3 세포를 현미경 관찰용 glass를 넣은 12-well 세포 배양 용기에  $1 \times 10^5$  cells/ml씩 분주하여 24 시간 배양하였고, 용기에 부착된 PC-3 세포에五味子 클로로포름 분획을 30, 60, 120  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 48 시간 동안 처리하였다. 이후 phosphate buffered saline (PBS, pH7.4)으로 세척하고, 4% paraformaldehyde를 1ml 첨가하여 상온에서 10 분 동안 고정하였다. 고정된 세포를 PBS로 세척한 후 0.1% Triton-X-100을 1ml 첨가하여 상온에서 10 분 동안 방치한 후 다시 PBS로 세척하였다. 1  $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 DAPI 용액을 처리하여 상온에서 20 분간 염색하였다. glass를 꺼내어 slide glass 위에 부착하였고, 형광현미경으로 400배의 배율로 PC-3 세포의 핵 형태를 관찰하였다.

### 6. Apoptosis 유도 세포의 측정

PC-3 세포를 6-well 세포 배양 용기에  $5 \times 10^4$  cells/ml씩 분주하여 24 시간 배양하였고, 용기에 부착된 PC-3 세포에五味子 클로로포름 분획을 30, 60, 120  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 48 시간 동안 처리하였다. 이후 배지와 세포를 flow cytometry 전용 tube로 옮겨 1,500 rpm으로 4 분간 원심 분리하였다. 분리된 세포를 PBS로 세척하여 다시 원심 분리한 후 상등액을 제거하였다. 남아있는 cell pellet에 1x annexin-V binding buffer 100  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 pipetting 하였다. 여기에 4  $\mu\text{l}$ 의 annexin-V와 4  $\mu\text{l}$ 의 7-AAD 시약을 첨가하여 상온에서 15 분간 세포막과 핵을 각각 염색하였다. 염색된 세포는 flow cytometry (FACS Canto, BD Biosciences)를 이용하여 측정하였고, FACSDiva Version 6.0 software (Becton Dickinson Co.)를 이용하여 apoptosis가 유도된 세포를 분석하였다.

### 7. HPTLC 분석 조건

五味子 메탄올 추출물과 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 증류수 분획의 HPTLC 패턴을 분석하기 위하여 동시에 분석 가능한 HPTLC 분석 조건을 설정하였다.

분리-정제된五味子 단일 성분들의 표준품은 메탄올에 녹여 10 mg/ml로 만들었고, DMSO에 녹아있는五味子 메탄올 추출물과 각각의 분획은 20 mg/ml의 농도로 준비하였다. 적당한 양을 syringe로 취하고 3  $\mu\text{l}$ 씩 TLC plate (HPTLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Darmstadt, Germany)에 점적 되도록 하였다. 검액이 점적된 TLC plate를 CAMAG horizontal developing chamber (CAMAG, Switzerland)에서 헥산 : 에틸아세테이트 = 2 : 3의 전개용매로 전개시켰다. 성분들의 확인은 UV 254 nm (CAMAG TLC visualizer)에서 이루어졌다.

### 8. HPLC 분석 조건

五味子 메탄올 추출물과 클로로포름 분획의 HPLC 패턴 분석 및 schizandrin의 정량을 위해 HPLC/DAD (Agilent 1200 series, Netherlands)로 peak를 확인하였다. HPLC에 사용된 column은 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6  $\times$  150 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Agilent)이다. HPLC용 용매는 HPLC grade의 water, acetonitrile, 메탄올 (Fisher Scientific Korea Ltd.)을 사용하였다.

분리-정제된 schizandrin 표준품은 3 mg을 HPLC용 메탄올 3 ml에 녹이고 이것을 stock solution으로 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 단계적으로 희석하여 표준액으로 사용하였다. 3번씩 반복 측정하여 peak area의 평균을 구한 후 표준액의 schizandrin 농도와 peak area 사이의 상관관계를 도출하여 검량선을 작성하였다.

五味子 메탄올 추출물 4 mg과 클로로포름 분획 4 mg을 HPLC용 메탄올 1 ml에 녹여 0.2  $\mu\text{m}$  filter로 2회 여과한 후 분석 검액으로 이용하였다.

column의 온도는 40 $^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였고, UV 254 nm 검출과 장에서 acetonitrile-water을 20 : 80 (0 min)에서 100 :

0 (40 min)으로 gradient를 주었으며 유속은 1.0 ml/min, 주입량은 5  $\mu\text{l}$ 로 하여 3번씩 반복 측정하여 분석하였다.

### 9. 통계적 검증

모든 실험의 표시된 결과는 3번 이상 수행하였으며, 정규성과 등분산 가정이 성립되는 경우는 One-way ANOVA test를 실시하여 통계적 유의성은  $p < 0.05$ 로 판정하였다.

## 결 과

### 1.五味子 분획의 세포 성장 억제 효과

五味子 메탄올 추출물 및 분획의 처리에 따른 세포생존율을 조사하기 위하여 PC-3 세포에五味子 메탄올 추출물 및 분획을 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 48 시간 동안 처리한 후 MTT assay를 이용하여 조사하였다. 그 결과 에틸아세테이트 분획을 제외한 메탄올 추출물 및 나머지 분획은 처리한 농도에 비례하여 세포 성장이 억제되었다. n-헥산과 클로로포름 분획을 처리한 세포에서 세포생존율이 많이 감소되었으며, 특히 클로로포름 분획은 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 세포에서 세포생존율이 각각 51.8%, 33.7%, 19.4%로 다른 분획에 비하여 가장 많이 감소하였다 (Figure 2). 따라서 이후 실험은五味子 클로로포름 분획만을 이용하여 실시하였다.

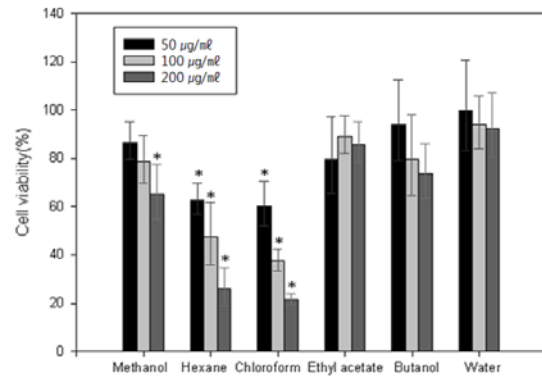


Figure 2. Growth inhibition of Schisandrae Fructus extract in PC-3 cells. PC-3 cells were treated with SF extract (50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ ) for 48h. Cell viability was measured by MTT assay and expressed as a percentage of the control without the addition of SF extract. Values represent mean  $\pm$  SD of three independent experiments (significant as compared to control, \*  $p < 0.05$ ).

### 2.五味子 클로로포름 분획에 의한 세포핵의 형태 변화

五味子 클로로포름 분획의 처리에 따른 PC-3 세포핵의 형태 변화를 조사하기 위하여 PC-3 세포에五味子 클로로포름 분획을 30, 60, 120  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 48 시간 동안 처리한 후 DAPI staining을 실시하여 형광현미경으로 관찰하였다.五味子 클로로포름 분획이 처리되지 않은 PC-3 세포는 핵의 형태가 뚜렷하게 염색이 되었으나五味子 클로로포름 분획이

처리된 PC-3 세포는 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 염색질 응축에 의한 apoptotic body가 관찰되었다.五味子 클로로포름 분획의 처리한 농도에 비례하여 apoptotic body가 더 많이 관찰되었다 (Figure 3).

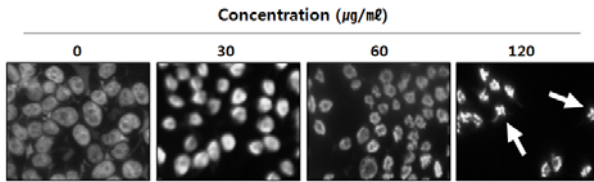


Figure 3. Apoptotic morphological changes induced by SF-chloroform fraction in PC-3 cells. PC-3 cells were treated with SF-chloroform fraction (30, 60, 120 µg/ml) for 48h. Apoptotic bodies were detected by fluorescence microscopy ( $\times 400$ ) after DAPI staining.

### 3.五味子 클로로포름 분획의 apoptosis 유도

五味子 클로로포름 분획의 처리에 따른 PC-3 세포의 성장 억제 및 세포핵의 형태 변화가 apoptosis에 의한 것인지 확인하기 위하여 PC-3 세포에五味子 클로로포름 분획을 0, 30, 60, 120 µg/ml의 농도로 48 시간 동안 처리한 후 annexin-V/7-AAD double staining을 이용하여 조사하였다. annexin-V는 apoptosis 초기에 세포막 표면에 노출되는 phosphatidylserine과 결합하고, 7-AAD는 apoptosis 후기에 핵막이 파괴되면 핵을 염색하며, 각각의 시약이 염색하는 세포를 flow cytometry로 측정하였다.

annexin-V가 염색된 우측 아래는 초기 apoptosis 상태의 세포를 의미하며, annexin V와 7-AAD가 모두 염색된 우측 위는 후기 apoptosis 상태의 세포를 의미하므로 (Figure 4A), 우측 위와 아래에 있는 세포를 백분율로 나타내어 둘의 합을 그래프로 나타내었다 (Figure 4B). 그 결과五味子 클로로포름 분획의 처리한 농도에 비례하여 apoptosis가 유도된 세포 비율이 증가하였고, 120 µg/ml의 농도로 48 시간 동안 처리하였을 때 20.2%로 증가하였다.

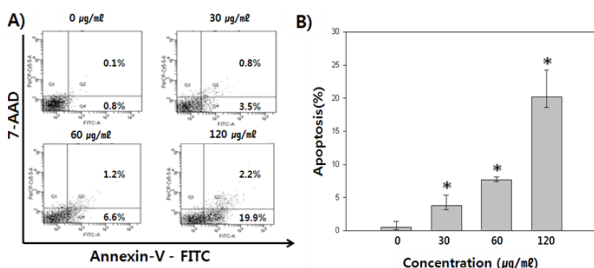


Figure 4. Induction of apoptosis by SF-chloroform fraction in PC-3 cells. PC-3 cells were treated with SF-chloroform fraction (30, 60, 120 µg/ml) for 48h. (A) Annexin-V/7-AAD double staining assay detected by flow cytometry. (B) The percentage of apoptotic cell for each treatment group. Values represent mean  $\pm$  SD of three independent experiments (significant as compared to control, \*  $p < 0.05$ ).

### 4.五味子 분획의 HPTLC 패턴 분석

五味子 메탄올 추출물과 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 증류수 분획의 HPTLC 패턴을 분석하기 위하

여 TLC plate (HPTLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>)에 검액을 점적하고 헥산:에틸아세테이트 = 2:3의 전개용매로 전개시켜 UV 254 nm에서 성분을 검출하였다.

분리정제된五味子 단일 성분들의 표준품과五味子 추출물의 HPTLC 패턴을 비교해 보았을 때 schizandrin의 band가 가장 굵고 선명하게 나타났으므로 schizandrin을 표준품으로 하여五味子 메탄올 추출물과 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 증류수 분획을 전개시킨 것을 나타내었다 (Figure 5). 그 결과 에틸아세테이트, 부탄올, 증류수 분획은 UV 254 nm에서 검출되는 성분이 거의 없었고,五味子 메탄올 추출물과 n-헥산, 클로로포름 분획은 schizandrin을 포함한 여러 성분을 포함하고 있었다. 특히 클로로포름 분획에서는五味子 메탄올 추출물보다 더 많은 schizandrin을 함유하고 있다는 것을 알 수 있었다.

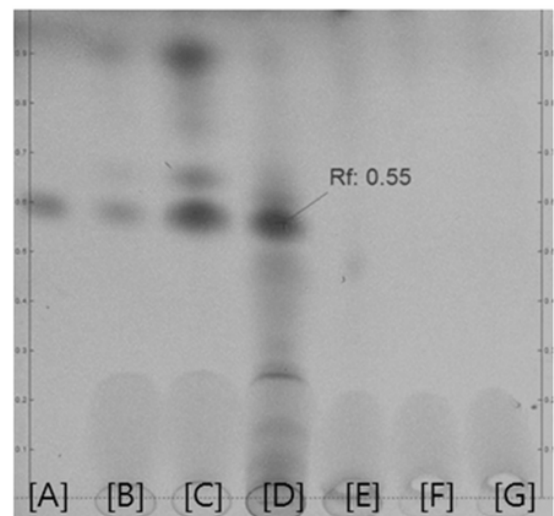


Figure 5. HPTLC chromatogram of Schisandrae Fructus extract. HPTLC plate was developed in hexane:ethyl acetate = 2:3 condition and visualized under UV 254 nm. (A) Schizandrin (30 µg). (B) SF-methanol extract (60 µg). (C) SF-hexane fraction (60 µg). (D) SF-chloroform fraction (60 µg). (E) SF-ethyl acetate fraction (60 µg). (F) SF-butanol fraction (60 µg). (G) SF-water fraction (60 µg).

### 5.五味子 추출물의 HPLC 패턴 분석 및 schizandrin의 정량

五味子 메탄올 추출물과 클로로포름 분획의 HPLC 패턴 분석 및 schizandrin의 정량을 위해 설정된 HPLC 분석 조건 하에서 peak를 확인하였다.

Schizandrin 표준품은 retention time 16.9 분에서 peak가 나타났으며 (Figure 7A), 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 µg/ml의 농도로 검량선을 작성하였다 (Figure 6).

五味子 메탄올 추출물 (Figure 7B)과 클로로포름 분획 (Figure 7C)의 HPLC 결과에서 16.9 분에 나타나는 schizandrin이五味子 추출물에 가장 많이 함유되어 있다는 것을 확인하였다.五味子 메탄올 추출물과 클로로포름 분획이 함유하고 있는 schizandrin의 peak area 평균은 각각 497.767, 3303.37 이었고, 검량선을 이용하여 schizandrin의 농도를 구한 결과는 각각 50.88 µg/ml, 357.25 µg/ml 이었다.五味子 메탄올 추출물보다 클로로포름 분획에 약 7배로

schizandrin이 많이 함유되어 있다는 것을 알 수 있었다.

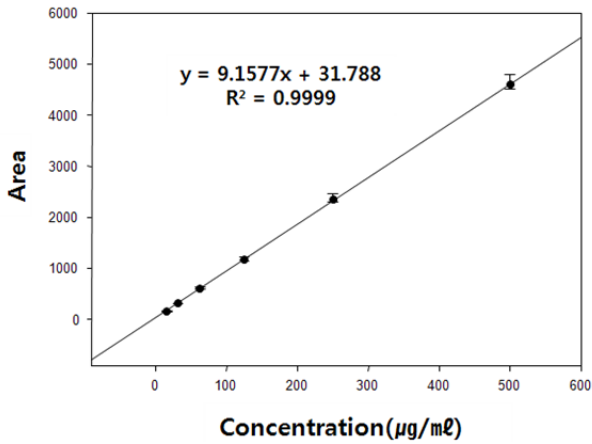


Figure 6. Calibration curve of Schizandrin.

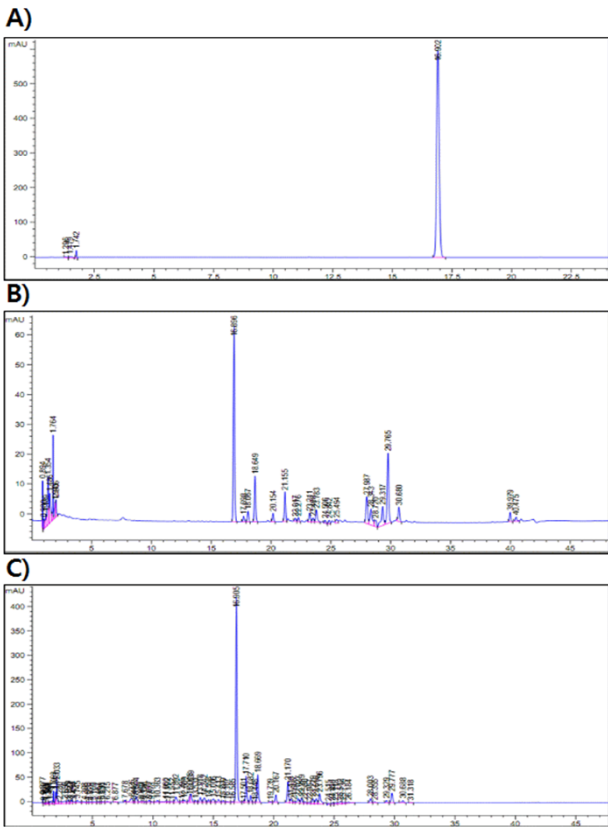


Figure 7. HPLC chromatogram of Schisandrae Fructus extract. (A) Schizandrin (2.5 µg). (B) SF-methanol extract (20 µg). (C) SF-chloroform fraction (20 µg).

## 고찰

五味子は 收斂固澁, 益氣生津, 補腎寧心 등의 효과가 있어 임상에서 久嗽虛喘, 夢遺滑精, 遺尿頻尿, 久瀉不止, 自汗, 盜汗, 津傷口渴, 心悸失眠 등의 증상에 사용된다<sup>2)</sup>. 최근에는五味子 추출물 또는 gomisin N, schizandrin 등과 같이五味子로부터 분리된 성분의 항암 효과에 대한 연구<sup>13-22)</sup>가 많이

보고되고 있다. 본 연구에서는五味子 메탄올 추출물로부터 얻은 용매분획에서 전립선암세포주 (PC-3)에 대한 성장 억제 효과를 나타내는 분획을 조사하여 활성이 있는 분획의 농도에 따른 apoptosis 유도 정도를 확인하였다. 또한 HPTLC와 HPLC를 이용하여 활성이 있는 분획이 함유하고 있는 성분의 정성 및 정량 분석을 하고자 하였다.

본 연구에서五味子 500 g을 메탄올 5 l로 24 시간 동안 추출하여 농축 및 동결 건조시킨 메탄올 추출물은 109.7 g을 얻어 수율이 21.94%로 나타났다. 이 중 100 g의 메탄올 추출물을 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 증류수 순으로 용매분획을 실시하여 농축하였을 때 클로로포름 분획의 수율이 가장 낮게 나타났다 (Figure 1).

五味子 용매분획을 PC-3 세포에 처리하여 세포생존율을 조사한 결과, 에틸아세테이트 분획은 처리한 농도와 세포생존율 사이에 상관관계가 없었으며, 부탄올 분획과 증류수 분획은 세포 증식 억제 효과가 거의 나타나지 않았다. n-헥산 분획과 클로로포름 분획의 세포 증식 억제 효과는 처리한 농도에 비례하여 뚜렷하게 나타났고, 특히 클로로포름 분획을 처리한 세포에서 생존율이 가장 많이 감소하였기 때문에 이 후 실험은五味子 클로로포름 분획을 이용하였다 (Figure 2).

세포에서 apoptosis가 일어날 때는 염색질이 응축되어 핵막을 따라 늘어지게 되고, 세포질이 응축된 후에는 핵이 단편화되며, 세포 표면이 돌출되어 떨어져 나오는 apoptotic body를 형성하게 된다<sup>27)</sup>. PC-3 세포핵의 형태는五味子 클로로포름 분획 60 µg/ml의 농도에서는 염색질이 응축되어 핵막을 따라 늘어서는 모습이 관찰되었으며 120 µg/ml의 농도에서는 핵이 단편화된 후 세포 내부 물질들이 포낭을 형성하여 만드는 apoptotic body가 관찰되었다 (Figure 3).五味子 클로로포름 분획의 농도가 높을수록 apoptosis 과정이 빠르게 진행된다는 것을 알 수 있다.

또한 apoptosis가 진행되면 초기에는 세포 내부의 phosphatidylserine이 바깥으로 노출되는데 annexin-V가 이것과 결합할 수 있다. 7-AAD는 DNA와 결합하는 물질이므로 후기 apoptosis에서 세포막의 투과성이 높아지면 7-AAD가 세포 내로 유입되어 핵의 염색이 가능하게 된다. 따라서 annexin-V/7-AAD double staining을 이용하면 초기 apoptosis와 후기 apoptosis가 유도된 정도를 판단할 수 있다<sup>28)</sup>. 본 연구에서 annexin-V/7-AAD double staining을 실시한 후 apoptosis가 유도된 세포수를 flow cytometry로 측정하여 조사한 결과五味子 클로로포름 분획의 농도에 비례하여 apoptosis가 유도된 세포가 증가하였다.五味子 클로로포름 분획 120 µg/ml의 농도에서 약 20%의 세포가 apoptosis가 유도됨을 확인하였다 (Figure 5).

HPTLC를 이용하여五味子 메탄올 추출물과 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 증류수 분획이 함유하고 있는 성분의 TLC 패턴을 분석하였을 때 가장 선명하고 굵은 band는 schizandrin 성분이었다. 같은 농도의五味子 메탄올 추출물의 성분들보다 n-헥산과 클로로포름 분획이 가지고 있는 각각의 성분의 양이 훨씬 많다는 것을 정성적으로 확인할 수 있었다 (Figure 6). n-헥산과 클로로포름 분획이 가장 많이 함유하고 있는 성분 또한 schizandrin이므로 PC-3 세포에 증식 억제 효과를 주로 나타내는 성분이 schizandrin이라고 짐작할 수 있다. 에틸아세테이트, 부탄올, 증류수 분획은

UV 254 nm에서 검출되는 성분이 거의 없는 것으로 보아 MTT assay에서 세포 증식 억제 효과가 거의 나타나지 않은 것과 상응하는 결과임을 알 수 있었다.

五味子の 리그난 성분은 schizandrin이 가장 많고, 그 다음으로 gomisin N, gomisin A의 순으로 함량이 높음으로 보고되어 있다<sup>29-30</sup>. 본 연구에서도 HPLC를 이용하여 schizandrin 표준품과五味子 추출물의 성분을 검출하였을 때 설정된 분석 조건 하에서 schizandrin은 16.9 분에서 peak가 확인되었고,五味子 메탄을 추출물과 클로로포름 분획 모두 schizandrin이 가장 많이 함유되어있음을 확인할 수 있었다. 또한 실험에 주로 이용한五味子 클로로포름 분획의 HPLC 패턴을五味子 메탄을 추출물과 비교해 보았을 때五味子 메탄을 추출물에서는 42 분 동안 모든 성분이 검출되었지만 (Figure 7B),五味子 클로로포름 분획에서는 32 분 이내에 모든 성분이 검출되었다 (Figure 7C). 따라서五味子 메탄을 추출물의 용매분획 과정에서 schizandrin보다 극성이 낮은 물질들은 n-헥산층으로 대부분 이행되었고,五味子 클로로포름 분획에는 주로 schizandrin을 포함한 보다 극성이 높은 물질들이 함유되어 있다는 것을 HPTLC와 HPLC를 이용한 패턴 분석 결과를 통해서 알 수 있었다.五味子 메탄을 추출물과 클로로포름 분획이 함유하고 있는 schizandrin의 농도를 검량선을 이용하여 구한 결과는五味子 클로로포름 분획이五味子 메탄을 추출물보다 schizandrin을 약 7배 정도 더 농축되어 함유하는 것으로 나타났다. 따라서五味子 메탄을 추출물보다五味子 클로로포름 분획이 MTT assay에서 세포 증식 억제 효과가 높게 나온 이유는 같은 농도에서 보다 많은 schizandrin을 함유하고 있기 때문이라고 할 수 있다. 또한 DAPI staining과 annexin-V/7-AAD double staining에서 확인했던 apoptosis는五味子 클로로포름 분획이 주로 함유하고 있는 schizandrin에 의해서 유도된다고 짐작할 수 있다.

Schizandrin과 gomisin N을 포함한五味子로부터 분리된 여러 성분들의 항암 효과에 대한 연구<sup>15-22</sup>가 보고되어 있으므로, schizandrin과 구조가 비슷한 다른 리그난 성분들도 PC-3세포에 항암 효과가 있을 가능성이 있지만,五味子에 가장 많이 함유되어 있으며 분리하기 쉬운 schizandrin이 PC-3 세포에 항암 효과를 가진다는 것이 의미가 있다고 할 수 있겠으며, apoptosis를 유도하는 기전에 대한 후속 연구가 더 필요할 것이다.

## 결론

본 연구에서 인간 전립선암 세포주인 PC-3 세포를 이용하여五味子 클로로포름 분획이 미치는 영향을 평가한 결과,五味子 메탄을 추출물 및 분획의 처리한 농도에 비례하여 세포 성장이 억제되었으며 특히 클로로포름 분획을 처리한 세포에서 세포생존율이 가장 많이 감소하였다.五味子 클로로포름 분획의 처리한 농도에 비례하여 apoptosis가 일어난 세포에서 관찰되는 염색질 응축에 의한 apoptotic body가 증가하였으며 apoptosis가 유도된 세포 비율도 증가하였다.五味子 클로로포름 분획의 주성분은 schizandrin이라는 것을 HPTLC 패턴 분석을 통해 알 수 있었으며五味子 클로로포름 분획은

五味子 메탄을 추출물보다 약 7배로 schizandrin이 많이 함유되어 있다는 것을 HPLC를 이용한 schizandrin의 정량을 통해 알 수 있었다.

이러한五味子 클로로포름 분획 및 주성분인 schizandrin의 인간 전립선암 세포주인 PC-3 세포에 대한 성장 억제 효과는五味子를 활용한 암의 예방 및 치료 약물의 개발 가능성을 의미한다.

## 참고문헌

1. Herbology Association of Korea's Colleges of Oriental Medicine. Textbook of Herbology. Younglimsa, 2011 ; 683-684.
2. Han JH, Oriental Pharmacology. Euisungdang, 2004 ; 529-532.
3. Kim JH, Jeong CH, Choi GN, Kwak JH, Choi SG, Heo HJ. Antioxidant and neuronal cell protective effects of methanol extract from *Schizandra chinensis* using an *in vitro* system. KOREAN J FOOD SCI TECHNOL, 2009 ; 41(6) : 712-716.
4. Choi SR, Kim CS, Kim JY, You DH, Kim JM, Kim YS, Song EJ, Kim YG, Ahn YS, Choi DG. Changes of antioxidant activity and lignan contents in *Schisandra chinensis* by harvesting times. Korean J Medicinal Crop Sci, 2011 ; 19(6) : 414-420.
5. Ryu IH, Kwon TO. The antioxidative effect and ingredients of oil extracted from *Schizandra chinensis* seed. Korean J Medicinal Crop Sci, 2012 ; 20(1) : 63-71.
6. Kim HC, An RB, Jeong GS, Bum JS, Oh SH, Lee HS, Kwon JW, Kwon TO, Kim YC. Hepatoprotective lignan compound from *Schizandrae Fructus* on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. Korean J Oriental Physiology & Pathology, 2006 ; 20(5) : 1282-1284.
7. Heo JH, Park JG, Cheon HJ, Kim YS, Kang SS, Hung TM, Bae KH, Lee SM. Hepatoprotective activities of gomisin A and gomisin N. Kor J Pharmacogn, 2006 ; 37(4) : 294-301.
8. Son IH, Lee KS. Protective effects of phenolic-rich fraction (PRF) from *Fructus Schisandrae* on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis of SH-SY5Y cells. Korean J Orient Int Med, 2007 ; 28(2) : 230-241.
9. Song JX, Lin X, Wong RN, Sze SC, Tong Y, Shaw PC, Zhang YB. Protective effects of dibenzocyclooctadiene lignans from *Schisandra chinensis* against beta-amyloid and homocysteine neurotoxicity in PC12 cells. Phytother Res, 2011 ; 25(3) : 435-43.
10. Doo IS, Lim KS, Hwang CY, Park MC, Kim NK. A study on the melanin synthesis inhibition and whitening effect of *Schizandrae Fructus*. The

- Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology, 2007 ; 20(3) : 51-62.
11. Chae HJ, Lee IS, Moon HY. Effects of *Schizandra chinensis* fruit extract on the hyperglycemia and hyperlipemia in streptozotocin-induced diabetic rats. Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal, 2011;26:126-130.
  12. Kim SR, Kim MR. Inhibition of foodborne pathogens and spoilage bacteria and their structural changes by ethanol extract of *Schizandra chinensis* Baillon. J East Asian Soc Dietary Life, 2012 ; 22(1) : 109-119.
  13. Rho SN, Oh HS. Effect of omija (*Schizandra Chinensis* Baillon) extracts on the growth of liver cancer cell line SNU-398. The Korean Nutrition Society, 2002 ; 35(2) : 201-206.
  14. Ryu MJ, Chung HS. Effects on hot water extract of *Schizandra chinensis* on colon cancer cell line. Food Engineering Progress, 2011 ; 15(1) : 64-69.
  15. Lin S, Fujii M, Hou DX. Molecular mechanism of apoptosis induced by schizandrae-derived lignans in human leukemia HL-60 cells. Food and Chemical Toxicology, 2008 ; 46(2) : 590-597.
  16. Min HY, Park EJ, Hong JY, Kang YJ, Kim SJ, Chung HJ, Woo ER, Hung TM, Youn UJ, Kim YS, Kang SS, Bae KH, Lee SK. Antiproliferative effects of dibenzocyclooctadiene lignans isolated from *Schisandra chinensis* in human cancer cells. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2008 ; 18(2) : 523-526.
  17. Park C, Choi YW, Hyun SK, Kwon HJ, Hwang HJ, Kim GY, Choi BT, Kim BW, Choi IW, Moon SK, Kim WJ, Choi YH. Induction of G1 arrest and apoptosis by schisandrin C isolated from *Schizandra chinensis* Baill in human leukemia U937 cells. International Journal of Molecular Medicine, 2009 ; 24(4) : 495-502.
  18. Yim SY, Lee YJ, Lee YK, Jung SE, Kim JH, Kim HJ, Son BG, Park YH, Lee YG, Choi YW, Hwang DY. Gomisins N isolated from *Schisandra chinensis* significantly induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects in hepatic carcinoma. Molecular Medicine Reports, 2009 ; 2(5) : 725-732.
  19. Park C, Hwang HJ, Choi BT, Choi TH, Kim BW, Choi YW, Choi YH. G1 arrest of the cell cycle by gomisins N, a dibenzocyclooctadiene lignan, isolated from *Schizandra chinensis* Baill in human leukemia U937 cells. Journal of Life Science, 2010 ; 20(7) : 977-982.
  20. Waiwut P, Shin MS, Inujima A, Zhou Y, Koizumi K, Saiki I, Sakurai H. Gomisins N enhances TNF- $\alpha$ -induced apoptosis via inhibition of the NF- $\kappa$ B and EGFR survival pathways. Mol Cell Biochem, 2011 ; 350(1-2) : 169-175.
  21. Kim SJ, Min HY, Lee EJ, Kim YS, Bae KH, Kang SS, Lee SK. Growth inhibition and cell cycle arrest in the G0/G1 by schizandrin, a dibenzocyclooctadiene lignan isolated from *Schisandra chinensis*, on T47D human breast cancer cells. Phytotherapy Research, 2010 ; 24(2) : 193-197.
  22. Hwang DS, Shin SY, Lee YG, Hyun JY, Yong YJ, Park JC, Lee YH, Lim YH. A compound isolated from *Schisandra chinensis* induces apoptosis. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2011 ; 21(20) : 6054-6057.
  23. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. A Cancer Journal for Clinicians, 2012 ; 62(1) : 10-29.
  24. Park SK, Sakoda LC, Kang DH, Chokkalingam AP, Lee ES, Shin HR, Ahn YO, Shin MH, Lee CW, Lee DH, Blair A, Devesa SS, Hsing AW. Rising prostate cancer rates in South Korea. The Prostate, 2006 ; 66(12) : 1285-1291.
  25. Denmeade SR, Isaacs JT. A history of prostate cancer treatment. Nature Reviews, Cancer, 2002 ; 2(5) : 389-396.
  26. Tang DG, Porter AT. Target to apoptosis : a hopeful weapon for prostate cancer. The Prostate, 1997 ; 32(4) : 284-293.
  27. Earnshaw WC. Nuclear changes in apoptosis. Current Opinion in Cell Biology, 1995 ; 7(3) : 337-343.
  28. Lecoecur H, Ledru E, Prevost MC, Gougeon ML. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. Journal of Immunological Methods, 1997 ; 209(2) : 111-123.
  29. Kim KS, Kang SS, Ryu SN. Quantitative analysis of lignans from fruits of *Schizandra chinensis*. Kor J Pharmacogn, 2002 ; 33(4) : 272-276.
  30. Koo DC, Suh WS, Baek SY, Shim SH. Quantitative determination of lignans from *Schizandra chinensis* by HPLC. Kor J Pharmacogn, 2011 ; 42(3) : 233-239.