NDSL
National Digital Science Library

우묵사스레피의 항암효과 및 작용기전

Anticancer effects and action mechanism of Eurya emarginata

주관연구기관	제주대학교
연구책임자	강희경
발행년월	2003-10
주관부처	과학기술부
사업관리기관	한국과학재단
NDSL URL	http://www.ndsl.kr/ndsl/search/detail/report/reportSearchResultDetail.do?cn=TRKO200800068244
IP/ID	14.49.138.138
이용시간	2017/11/03 15:14:47

저작권 안내

① NDSL에서 제공하는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, KISTI는 복제/배포/전송권을 확보하고 있습니다.

② NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 상업적 및 기타 영리목적으로 복제/배포/전송할 경우 사전에 KISTI의 허락을 받아야 합니다.

③ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 보도, 비평, 교육, 연구 등을 위하여 정당한 범위 안에서 공정한 관행에 합치되게 인용할 수 있습니다.

④ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 무단 복제, 전송, 배포 기타 저작권법에 위반되는 방법으로 이용할 경우 저작권법 제136조에 따라 5년 이하의 징역 또는 5천만 원 이하의 벌금에 처해질 수 있습니다.

KiSTi
www.kisti.re.kr

사 업 명	지역대학 우수과학자 지원연구
과제번호	R05-2000-000-00146-0

연구과제명(국문): 우묵사스레피의 항암효과 및 작용기전

연구과제명(영문): Anticancer effects and action mechanism of *Eurya emarginata*

2003. 10. 31.

총괄(주관)연구책임자 소속: 제주대학교 의학과 성명: 강희경

소속 성명

소속 성명

소속 성명

:

:

한 국 과 학 재 단

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47

간지

〈 목 차 〉

Ⅰ. 연구계획 요약문

1. 국문요약문 ---------- 1

Ⅱ. 연구결과 요약문

1. 국문요약문 ---------- 2
2. 영문요약문 ---------- 3

Ⅲ. 연구내용

1. 서론 ---------- 4
2. 연구방법 및 이론 ---------- 5
3. 결과 및 고찰 ----------10
4. 결론 ----------21
5. 인용문헌 ----------24

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47

양식 141a

〈 연구계획 요약문 〉

중심어	핵심중심어	관련중심어	
	우묵사스레피	apoptosis 유도	
	항암효과	분화유도	
	작용기전	항암성분의 분리	
연구목표	본 연구는 제주도에 자생하는 우묵사스레피의 항암효과를 검색하고, 항암효과를 나타내는 성분을 분리하여, 이 항암성분의 작용기전을 규명하는 것으로, 우묵사스레피의 항암성분을 새로운 항암제로 개발할 수 있는 근거를 마련하고자 수행되었다.		
연구내용	항암화학요법의 이용으로 암치료가 많이 개선된 것은 사실이나, 현재 사용되고 있는 항암제가 암세포와 정상세포에 대한 선별력이 부족하여 암세포의 완전제거를 위하여 대량 투여하였을 때 정상세포에 독성을 유발하는 항암화학요법의 한계성이 나타나고 있다. 그래서, 최근에는 발암 또는 전이와 관련된 extracellular, transmembrane 또는 intracellular process에 target을 한 새로운 항암제들이 민간에서 오랫동안 사용해 오던 천연물로부터 개발되고 있다. 본 연구에서 사용하려는 우묵사스레피는 제주도와 같은 도서지역에서만 자생하는 식물로, 그 성분 및 생리활성에 대한 연구가 매우 미진하다. 그런데, 제주자생 식물의 추출물을 이용한 예비 실험에서 우묵사스레피의 잎이 항암효과를 나타내는 것을 확인하였다. 이에 근거하여 암세포의 성장에 대한 우묵사스레피의 효과를 알아보고, 항암효과를 나타내는 성분을 분리하고자 한다. 그리고, 항암성분의 작용기전을 분화유도 및 apoptosis유도 측면에서 규명하여, 우묵사스레피의 항암성분을 새로운 항암치료제로 이용하는 계기를 마련하고자 한다. 암세포의 성장에 대한 우묵사스레피의 효과는 세포의 성장증식에 따른 대사활성을 MTT assay로 측정하여 알아본다. 암세포의 성장을 저해하는 생리활성 물질의 분리는 추출 및 용매극성을 이용한 분획화, column chromatography, HPLC 등을 이용한다. 여기서 분리·정제된 물질의 구조는 MS, IR, UV-Vis, NMR 등을 이용하여 규명한다. 우묵사스레피의 항암성분의 작용이 암세포의 분화유도에 의한 것인지, apoptosis 유도에 의한 것인지를 다음의 지표로 살펴본다. 분화유도에 의하여 암세포의 성장이 저해되는 지는 혈액종양세포인 HL-60의 분화를 검색하여 알아본다. 우묵사스레피의 항암성분 처리에 의하여 HL-60 세포가 정상 과립구 또는 단핵구로 분화하는지 세포표면 항원분석과 형태학적 변화 관찰을 수행한다. 그리고, 암세포의 성장저해가 apoptosis유도에 의한 것인지는 형태학적 변화 관찰, DNA ladder 관찰과 세포주기 분석을 행하여 알아본다. 더 나아가 분리된 항암성분의 종양세포 분화유도 기전이나 apoptosis 유도기전에 대한 연구를 수행한다.		
기대효과 (응용분야 및 활용범위 포함)	- 우묵사스레피의 항암작용이라는 새로운 생리활성에 대한 특허권 확보 - 생화학적·약리학적 연구결과를 바탕으로 암의 치료에 응용될 수 있는 치료전략 수립 - 제주도에 자생하는 생물자원에서 새로운 항암작용을 나타내는 물질을 분리하는데 기초자료 제공 - SAR 연구 등을 통한 새로운 항암제 개발의 자료제공 - 지역 자생식물의 활용기회를 제공함으로써 지역사회 발전에 기여 - SCI급 논문 게재 및 국내외 학술발표를 통한 학문적 교류		

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47

양식 141b

〈 연구결과 요약문 〉

중심어	핵심중심어	관련중심어	
	우묵사스레피	Bcl-2	c-Myc
	apoptosis	Bax	eutigoside B
	eutigosides	caspases	eutigoside C
연구목표	본 연구는 제주도에 자생하는 우묵사스레피의 항암효과를 검색하고, 항암효과를 나타내는 성분을 분리하여, 이 항암성분의 작용기전을 규명하는 것으로, 우묵사스레피의 항암성분을 새로운 항암제로 개발할 수 있는 근거를 마련하고자 수행되었다.		
연구내용	우묵사스레피는 HL-60 세포와 같은 혈액종양세포의 증식을 강하게 억제하였으며, HL-60세포의 oncogene인 c-Myc의 발현을 현저히 저해하였다. 우묵사스레피의 항암효과가 apoptosis유도에 의한 것임을 DNA fragmentation, sub-G1 hypodiploid cell population의 증가, chromatin condensation으로 확인하였다. 우묵사스레피에서부터 항암활성을 추적하면서 4개의 단일 성분을 분리하였다. 모두 알려져 있는 물질이나, cornoside, eutigoside B 및 eutigoside C는 우묵사스레피의 성분으로 보고된 바가 없다. 이들 중에서 강한 증식억제 효과를 나타내며, 항암활성에 대한 보고가 미미한 eutigoside C를 사용하여 apoptosis 유도기전에 대하여 살펴보았다. Eutigoside C는 Bcl-2의 down regulation과 미토콘드리아로부터의 cytochrome C의 유리에 의한 일련의 caspases를 활성화하여 HL-60 세포의 apotosis를 유도함을 알 수 있었다. 우묵사스레피에서 분리한 eutigoside B 및 C가 chemopreventive 효과가 있는지 염증과 관련된 pro-inflammatory cytokines (TNF-α 및 IL-6), COX-2, iNOS 및 NO 생성 등에 대한 효과를 검색하여 알아본 결과, eutigoside B 및 C가 TNF-α 및 IL-6 생성, iNOS와 COX-2의 단백질 발현 및 NO의 생성을 현저히 저해하였다. 우묵사스레피에서 분리한 eutigoside C는 apoptosis 및 염증을 억제하여 암의치료 및 예방에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.		
연구성과	- 우묵사스레피의 3개의 새로운 유효성분의 도출 - 우묵사스레피의 항암활성 기전을 규명 - 우묵사스레피의 eutigoside C를 암의치료 및 예방에 사용할 수 있는 근거를 제시 - 우묵사스레피의 항암활성에 대한 특허 출원 - 우묵사스레피의 항염활성에 대한 특허출원 - SCI급 학술지인 Cancer Letters에 “Induction of the apoptosis of HL-60 promyelocytic leukemia cells by Eurya emarginata” 논문이 게재승인을 받았음. - 국내 중앙 전문학술지인 약학회지에 “Eurya emarginata의 murine macrophage RAW 264.7 세포에서의 염증성 사이토카인 억제효과” 논문이 게재됨. - 국내・외 학술회의에서 우묵사스레피의 항암효과와 관련된 다수의 연구결과를 발표		

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47

양식 141c

〈 EXECUTIVE SUMMARY 〉

Keyword	Pointed Keyword	Related Keyword	
	Eurya emarginata	Bcl-2	c-Myc
	apoptosis	Bax	eutigoside B
	eutigosides	caspases	eutigoside C
Purpose of Research	The purpose of present study is to examine the effects and action mechanism of *Eurya emarginata* on the growth of cancer cells, and to develop anti-cancer agents using the constituents of the plant..		
Contents of Research	The crude extract of *E. emarginata* markedly inhibited the growth of leukemia cells such as HL-60. When the HL-60 cells were treated with the EtOAc fraction, DNA fragmentation, morphologic changes and sub-G1 hypodiploid cells were observed. Therefore, the inhibitory effect of *E. emarginata* on the growth of the HL-60 cells appears to arise from the induction of apoptosis. Moreover, the EtOAc fraction markedly reduced c-Myc in a time-dependent manner. We isolated four compounds, quercitrin, cornoside, eutigoside B and eutigoside C from *E. emarginata.* Eutigoside C reduced the Bcl-2 protein and mRNA levels in a time-dependent manner, whereas the Bax protein and mRNA expression levels were increased. The release of cytochrome c from mitochondria into the cytosol was observed. Also, the expressions of the active forms of caspase 9 and 3 were increased in a time-dependent manner compared to the control, and the activation of caspase 3 was demonstrated by the cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase, a vital substrate of effector caspase. These results indicate that eutigoside C from *E. emarginata* induces the apoptosis of HL-60 cells via the down-regulation of Bcl-2 expression and activation of caspases. And, eutigoside B and eutigoside C potentially inhibited the production of IL-6 and TNF-□, and reduced the iNOS and COX-2 protein levels.		
Effectiveness of Research	- Isolation of 3 biologically acive compounds from *Eurya emarginata* - Examination of anti-cancer action mechanism of *Eurya emarginata* - Proposition of the base for the use of eutigoside C as chemotherapeutic and chemopreventive agent - Patent applied for the anti-cancer activity of *Eurya emarginata* - Patent applied for the anti-inflammatory activity of *Eurya emarginata* - The manuscript entitled "Induction of the apoptosis of HL-60 promyelocytic cells by Eurya emarginata" has been accepted for publication in *Cancer Letters.* - The paper entitled "Suppression of pro-inflammatory cytokine production by *Eurya emarginata* in murine macrophage RAW264.7" has been published in *Yakhak Hoeji.*		

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47

양식 145a

〈 연구내용 및 결과 〉

1. 서론

1) 연구배경

암은 우리나라를 포함한 전세계에서 주요 사망원인이 되고 있으며 그 발생빈도가 계속 증가추세를 보이고 있어 효과적인 치료법이 절실히 요망되고 있는 실정에 있다. 암은 많은 환자에서 진단 당시 이미 전이(metastasis)가 일어난 상태에 있거나 또는 처음부터 전신적으로 발생(예, 백혈병)하므로 수술이나 방사선치료와 같은 국소적요법으로는 한계가 있으며 따라서 항암화학요법과 같은 전신요법이 필수적으로 요구되고 있다. 항암화학요법의 이용으로 암치료 효과가 많이 개선된 것은 사실이나 지금까지의 치료성적에 비추어 볼 때 만족할 만한 치료효과를 얻기에는 한계에 이르렀다고 할 수 있다. 항암화학요법 한계성의 주된 원인은 현재 사용되고 있는 모든 항암제가 암세포와 정상세포에 대한 선별력이 부족하여 암세포의 완전제거를 위하여 대량 투여하였을 때 정상세포에도 독성을 유발한다는 점이다. 그래서, 최근에는 발암 또는 전이와 관련된 extracellular, transmembrane 또는 intracellular process에 target을 한 새로운 항암제들이 민간에서 오랫동안 사용해 오던 천연물로부터 개발되고 있다 [1-3].

본 연구에 사용한 우묵사스레피는 제주도와 같은 도서지역의 해안산지에서만 자생하는 식물로, 민간에서는 그 잎을 거담 및 이뇨의 목적으로 사용하고 있다. 그러나, 그 잎의 성분이나 생리활성에 대한 보고는 거의 없는 실정이며[4], 국내의 우묵사스레피에 대한 연구는 전무하다. 그런데, 본 연구자가 제주도의 자생생물을 이용하여 종양세포의 증식억제 정도를 검색한 결과, 다른 어떤 생물의 추출물보다 우묵사스레피의 추출물 처리에 의하여 종양세포 증식이 현저히 억제되었다[5]. 그러므로 성분이나 생리활성에 대한 연구가 미흡한 우묵사스레피를 이용한 연구에서 많은 독창적인 연구결과를 낼 수 있을 것이라 사료되어 본 연구를 수행하였다.

2) 연구목적

본 연구는 제주도에 자생하는 우묵사스레피의 항암효과를 검색하고, 항암효과를 나타내는 성분을 분리하여, 이 항암성분의 작용기전을 규명하는 것으로, 우묵사스레피의 항암성분을 새로운 항암제로 개발할 수 있는 근거를 마련하고자 수행되었다.

3) 연구범위

① 우묵사스레피의 항암성분의 분리 및 구조규명

- 활성성분의 추출 및 용매극성을 이용한 분획화
- column chromatography 및 HPLC 등을 이용한 활성성분의 분리 정제

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47

- NMR, Mass spectroscopy, IR spectroscopy등을 이용한 구조규명

② HL-60을 비롯한 암세포의 성장에 대한 우묵사스레피의 효과 검색

- 암세포주의 배양 (HL-60, U937. Jurkat, SK-OV-3, MCF-7, SNU C5, A549 등 15종)
- 암세포 성장에 대한 효과 검색 : 대사활성 검색 (MTT assay)
- 암세포주가 아닌 정상 세포주 (CCD-25Lu 및 HEL-299)의 성장에 대한 우묵사스레피 추출물의 효과 검색

③ 우묵사스레피의 혈액종양 세포 증식억제 기전 규명

- Apoptosis 유도에 의한 종양 세포 증식억제
  : DNA fragmentation assay, DNA content 측정, morphologic changes 관찰
- 분화 유도에 의한 종양세포 성장저해
  : 세포표면 항원 변화, 형태변화 관찰

④ 우묵사스레피 항암성분의 혈액종양 세포 Apoptosis 유도기전 규명

- c-Myc mRNA 및 protein의 발현에 대한 효과
- Bcl-2의 mRNA 및 protein의 발현에 대한 효과
- Bax mRNA 및 protein의 발현에 대한 효과
- 미토콘드리아로부터 세포질로 cytochrome C의 유리
- caspase-9의 활성화
- caspase-3의 활성화 및 기질인 poly(ADP-ribose) polymerase의 절편화

⑤ 우묵사스레피 항암성분의 염증성 사이토카인 억제효과

- pro-inflammatory cytokine인 TNF-α 및 IL-6 생성에 대한 효과
- COX-2의 발현에 대한 효과
- iNOS의 발현에 대한 효과 및 nitric oxide 생성에 대한 효과

2. 연구방법 및 이론

1) 우묵사스레피의 항암성분의 분리 및 구조 규명

① 우묵사스레피의 추출

우묵사스레피를 잘게 부순 다음 80 % 메탄올에 24 시간 동안 침적하고, 그 후 상층액을 회수하여 진공건조 하였다. 우묵사스레피의 80 % 메탄올 추출물을 물에 현탁시킨 다음에 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올로 차례대로 추출하였으며, 진공건조 시켜서 우묵사스레피의 용매 분획으로 사용하였다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47

② 항암성분의 분리

우묵사스레피의 용매 분획 중에서 항암활성이 높은 에틸아세테이트 분획에 대하여 normal-phase column chromatography 및 reverse-phase column chromatography 등을 시행하여 여러 분획으로 나누면서 항암활성을 검색하여 항암성분이 있는 분획을 추적하였다. Normal-phase silica gel column chromatography에는 Silica gel 60(230-400mesh ASTM, Merck)이 사용되었으며, 분리과정에서 사용된 TLC(Thin-Layer Chromatography)는 precoated silica gel aluminium sheet(Silica gel 60 F_{254}. 2.0mm, Merck)를 사용하였다. TLC상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp를 사용하거나 TLC plate를 visualizing agent에 침적시킨 후 heat gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 3% $KMnO_4$, 20% K_2CO_3 및 0.25% NaOH를 혼합한 수용액을 사용하였다. HPLC(High Performance Liquid Chromatography)는 Waters 2487(Dual λ absorbance detector, Waters)를 사용하였고, ODS column(Prep Nova-Pak HR C18, 7.8×300mm column)을 장착하여 분리했다. 구조분석에 이용되는 NMR(Nuclear Magnetic Resonance)은 JNM-LA 400 (FT NMR system, JEOL)을 이용하였다.

2) 암세포의 성장에 대한 우묵사스레피 추출물 및 항암성분의 효과 검색

① 세포배양

여러 종류의 암세포주를 한국 세포주 은행(KCLB)으로부터 분양 받아 37℃, 5% CO_2 항온기에서 배양하였으며, 계대 배양은 3~4일에 한번씩 시행하였다. HL-60, MCF-7, HCT-15, SK-OV-3, SNU-16, SNU-C5, HEL-299, A549, KG-1, U937, K562, 및 Jurkat 암세포들의 배양에는 100 units/㎖의 penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum을 포함하는 RPMI 1640 배지를 사용하였다. 그리고, A-498, CCD-25Lu, MIA Paca-2, A431, HepG2, 및 SKN-SH 암세포의 배양에는 100 units/㎖의 penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum을 포함하는 Dulbecco's defined Eagle's medium (DMEM)을 사용하였다.

② 암세포의 성장에 대한 효과 검색 - 대사활성 검색 (MTT assay)

96-Well microplate 또는 24-well microplate에 암세포를 3×10^5 cells/㎖로 넣고, 우묵사스레피 추출물, 용매분획, 또는 분리된 성분을 100 ㎍/㎖의 농도로 처리한 다음 4일간 배양하였다. 여기에 2 ㎎/㎖의 3-(4,5-dimehtylthiazol-2-yl))-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 50 ㎕ 첨가하고 4시간 더 배양한 다음, 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 여기에 dimethylsulfoxide를 가하여 침전물을 용해시킨 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하여, MTT의 환원에 따른 formazan 침전물의 생성 정도로 세포의 대사활성을 검색하였다.

3) 우묵사스레피의 혈액종양 세포 증식억제 기전 규명

가) Apoptosis 유도에 의한 종양 세포 증식억제

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47

- DNA fragmentation assay

HL-60 세포 (3×10^6/㎖)에 100 ㎍/㎖의 농도로 시료를 가한 다음 12 시간 배양하였다. 세포를 수집한 후 Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit를 사용하여 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA를 1.5% agarose gel에서 4시간(50V)동안 전기영동을 한 다음 ethidium bromide로 염색하고 UV transilluminator하에서 DNA단편화 현상을 관찰하였다.

- 세포주기의 분석

HL-60 세포 (3×10^6/㎖)에 100 ㎍/㎖의 농도로 시료를 가한 다음 24 시간 배양하였다. HL-60 세포를 수확하여 PBS로 세척한 다음, -20 ℃에서 1시간동안 고정시킨 후, PBS로 세척하고, RNase를 처리하였다. 그 다음에 propidium iodide로 염색하고, FACScan flow cytometer로 세포주기를 분석하여 apoptois 유도를 조사하였다.

- Morphologic changes

HL-60 세포 (3×10^6/㎖)에 100 ㎍/㎖의 농도로 시료를 가한 다음 24 시간 배양하였다. HL-60 세포를 수확하여 PBS로 세척한 다음, 2 % paraformaldehyde로 고정시킨 후, PBS로 세척하였다. 그 다음에 세포를 4,6-diamidine-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)로 30분 동안 염색하고, 염색된 세포를 slide에 mount한 다음에 형광 현미경을 사용하여 관찰하였다.

나) 분화유도에 의한 종양 세포 증식억제

- Fluorescence-activated Cell Sorter Flow Cytometry

HL-60 세포가 분화의 어느 단계에서 멈춘 세포인가를 알아보기 위해서 세포표면 항원을 분석하였다. 그리고 우묵사스레피의 추출물의 처리에 의하여 세포표면 항원이 변화하는지를 분석하여 어떤 단계로 분화하는지 알아보았다. Hematopoietic cell의 분화단계를 알아보기에 적당한 CD antigen에 대한 monoclonal antibody(특히, mouse antihuman CD33, CD34, CD14, CD66b)를 사용하였다. 우묵사스레피의 추출물을 가하여 5일간 배양한 HL-60 세포를 수확하여 PBS로 세척하였다. Tube에 HL-60 세포 ($2x10^6$) 100㎕를 가하고, 여기에 monoclonal antibody를 각각 20 ㎕씩 가하여 vortex mixing한 다음, 빛을 차단한 후 4℃에서 30분간 반응시켰다. 다시 각 Tube를 vortex한 다음 1% paraformaldehyde 용액 500㎕을 가하여 세포를 고정시킨 후. COULTER®EPICS®XL™ Flow Cytometer(BECKMAN COULTER)를 시행하여 세포표면 항원을 분석하였다.

4) 우묵사스레피 항암성분의 혈액종양 세포 Apoptosis 유도기전 규명

① Western Blot Analysis

우묵사스레피의 항암성분의 apoptosis 유도기전을 Bcl-2 단백질의 발현, Bax 단백질의 발현, c-Myc 단백질의 발현, Caspase-9의 활성화, Caspase-3의 활성화 및 poly(ADP-ribose) polymerase

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47

(PARP)의 분절로 알아보았다. HL-60 세포 (2.5×10^5/㎖)에 우묵사스레피의 항암성분을 처리한 다음, 세포를 수확하여 PBS로 2~3회 세척 후, 500 ㎕의 lysis buffer를 첨가하여 1시간동안 lysis 시켰으며, 14,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 Bradford 방법을 이용하여 정량 하였다[6]. 40 ㎍의 lysate를 10 % 및 12 % mini gel SDS-PAGE로 변성분리하여, 이를 PVDF membrane(BIO-RAD)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 Membrane의 blocking은 5 % skim milk가 함유된 TTBS (TBS + 0.1 % Tween 20) 용액에서 상온에서 1시간 동안 실시하였다. c-Myc의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-human c-Myc (1:1000) (Santa-Cruz), Bcl-2의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-human Bcl-2 (1:1000) (Santa-Cruz), Bax의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-human Bax (1:1000) (SantaCruz), PARP의 발현 양을 검토하기 위한 항체로 anti-PARP (1:1000) (Santa-Cruz), caspase-9 활성형의 양을 검토하기 위한 항체로 cleaved Caspase-9 Ab(1:1000) (Cell Signaling) 와 caspase-3 활성형의 양을 검토하기 위한 항체로 cleaved Caspase-3 Ab (1:1000) (Cell Signaling)을 TTBS 용액에서 희석하여 사용하였으며 반응 상온에서 2시간 동안 진행하였다. 2차 항체로는 HRP (HorseRadish Peroxidase)가 결합된 anti-rabbit IgG(Amersham Co.)과 anti-mouse IgG (Amersham Co.)를 1: 5000으로 희석하여 이용하였으며, 반응은 상온에서 30분 동안 진행하였다. 그 후 membrane을 TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질(Amersham Co.)과 1~3분간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

② RT-PCR Analysis

HL-60 세포(2×10^6/㎖) 에 우묵사스레피의 항암성분을 처리한 다음 세포를 수집하였다. 세포를 2 ~ 3회 Phosphate Buffered Saline (PBS)로 세척한 다음, RNA를 TRI reagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH)를 이용하여 분리하였다. TRI reagent 1 ㎖를 첨가하고 상온에서 5분간 방치한 후, 0.2 ㎖의 chloroform을 넣고 잘 섞은 다음, 15분 후에 14,000 rpm으로 원심분리 하여 상층액을 취하였다. 여기에 0.5 ㎖의 isopropanol을 넣어 RNA를 침전시킨 다음, 75% ethanol로 세척하고 건조시켰다. Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)에 의한 cDNA 합성과 PCR amplification에 Table 1의 sequence를 갖는 primer를 이용하였다. 1 ㎍의 전체 RNA를 올리고(dT)18 primer, dNTP(0.5 ㎛M), 1 단위 RNase 저해제(inhibitor) 및 M-MuLV 역전사효소(reverse transcriptase, 2U)로 70℃에서 5분, 37℃에서 5분, 37℃에서 60분, 그리고 70℃에서 10분 동안 가열시킴으로서 반응을 중지시켰다. 유전자 증폭반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)은 합성된 cDNA로부터 Bax, Bcl-2, c-Myc, β-Actin을 증폭시키기 위하여, 2 ㎕ cDNA, 4㎛M의 5'과 3' primer, 10x 완충액 (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% 트리톤 X-100), 250 ㎛M dNTP, 25 mM $MgCl_2$, 및 1 Unit Taq polymerase(Promega)를 섞고 증류수로 전체를 25 ㎕로 맞춘 다음, 퍼킨-엘머 유전자 증폭기(Perkin-Elmer Thermal Cycler)를 이용하여 PCR을 실시하였다. 이때 PCR 조건은 94℃/45초, 55~60℃/45초, 72℃/60초, 35회이며, PCR에 의하여 생성된 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 특정 band를 확인하였다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47

Table 1. Sequences of primers and fragment sizes of the investigated genes in RT-PCR analysis

Gene		Primer sequences	Fragment size(bp)
Bcl-2	F	5′-TGCACCTGACGCCCTTCAC-3′	292
	R	5′-AGACAGCCAGGAGAAATCAAACAG-3′	
Bax	F	5′-ACCAAGAAGCTGAGCGAGTGT-3′	364
	R	5′-ACAAAGATGGTCACGGTCTGCC-3′	
C-myc	F	5′-TCTGGATCACCTTCTGCTGG-3′	397
	R	5′-GCTCCTCTGCTTGGACGGAC-3′	
β-Actin	F	5′-CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC-3′	324
	R	5′-AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC-3′	

5) 우묵사스레피의 염증성 사이토카인 억제효과

① 세포 및 시약

Murine macrophage cell line 인 RAW264.7 세포는 KCLB (Korean Cell Line Bank)로 부터 분양 받아 100 units/㎖ penicillin-streptomycin과 10 % fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37 ℃, 5 % CO_2 항온기에서 배양하였으며, 계대 배양은 3~4일에 한번씩 시행하였다. Lipopolysaccharide (LPS. E. coli serotype 0111:B4)는 Sigma로부터 구입하여 사용하였으며, Interferon-γ (mIFN-γ, recombinant E. coli)는 Roche로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

② *In vitro* 에서 pro-inflammatory cytokine 생성 및 정량

Murine macrophage cell line 인 RAW264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 1.0×10^6 cells/㎖로 조절한 후 24 well plate 에 접종하고, 5 % CO_2 항온기에서 18시간 전배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도 (1 mg/㎖)로 조제된 시험물질 50 ㎕와 450 ㎕의 LPS 최종농도 (1 ㎍/㎖)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 이전과 동일 조건에서 배양하였다. 6시간 후 TNF-α 와 IL-6의 정량은 배양 배지를 원심분리 (12,000 rpm, 3 min)하여 얻은 상층액에서 시행하였다. TNF-α 비롯한 cytokine 정량은 mouse ELISA kit를 이용하였으며 standard 에 대한 표준곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

③ Nitric oxide (NO) assay

RAW264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^5 cells/㎖로 조절한 후 24 well plate에 접종하고, 시료 농도 100 ㎍/㎖과 LPS 1 ㎍/㎖를 동시에 처리하여 48시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO_2^-의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 ㎕와 Griess 시약 [1% (w/v) sulfanilamide, 0.1 % (w/v) naphylethylenediamine in 2.5 % (v/v) phosphoric acid] 100 ㎕를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 540 nm는 ELISA reader를 이용하여 측정하였으며, sodium nitrite ($NaNO_2$)를 standard로 비교하였다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47

④ COX-2 및 iNOS의 발현 분석 : Western blot analysis

RAW264.7 세포 (1.0×10^6 cells/㎖)를 DMEM 배지를 이용하여 5 % CO_2 항온기에서 18시간 전배양하였다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도 (1 mg/㎖)로 조제된 시험물질과 LPS (1㎍/㎖)와 INF-γ (50 U/㎖)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전배양과 동일 조건에서 배양하였다. 세포를 2~3회 PBS (Phosphate Buffered Saline)로 세척 후 1 ㎖의 lysis buffer을 첨가, 30분~1시간동안 lysis 시킨 후 12,000 rpm에서 20분간 원심하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA (Bovine serum albumin)을 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다. 40 ㎍의 lysate를 8 % mini gel SDS-PAGE (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)로 변성 분리하여, 이를 PVDF membrane (BIO-RAD)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5 % skim milk가 함유된 TTBS (TBS + 0.1% Tween 20) 용액에서 상온에서 2시간동안 실시하였다. iNOS의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS (1: 1000) (Santa-Cruz) 을 COX-2의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-rabbit COX-2 (1: 1000) (Santa-Cruz)을 TTBS 용액에서 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP (Horse Radish Peroxidase)가 결합된 anti-mouse 또는 anti-rabbit IgG (Amersham Co.)를 1: 5000으로 희석하여 상온에서 30분 간 반응시킨 후, TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질 (Amersham Co.)과 1~3분 간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

3. 결과 및 고찰

1) 우묵사스레피의 항암성분의 분리 및 구조 규명

MTT assay를 이용하여 항암활성을 검색하면서 우묵사스레피의 성분을 Fig. 1 및 Fig. 2에 도식화한 과정으로 분리하여 4개의 단일성분의 구조를 확인하였다. Fig. 1의 분리과정으로 compound I인 quercitrin 및 compound II인 cornoside의 단일성분을 분리할 수 있었으며, compound III는 eutigoside B와 eutigoside C의 혼합물임을 예측할 수 있었다. Eutigoside B 와 C를 Fig. 2에 도식화한 과정으로 분리하여 JA-A는 eutigoside C, JA-C는 eutigoside B임을 확인하였다. Quercitrin은 우묵사스레피의 성분으로 이미 알려져 있는 물질이나, cornoside, eutigoside B 및 eutigoside C는 다른 식물의 성분으로는 보고되어 있으나[7,8], 우묵사스레피의 성분으로는 보고된 바가 없다. 4개의 단일 성분 중에서 quercitrin을 가장 많이 확보할 수 있었으나, 100 ㎍/㎖의 농도로 처리 시에 HL-60 세포증식 억제 효과가 45 %로 EtOAc 용매 분획물의 효과보다 감소 하였다. 그리고, cornoside는 HL-60 세포 증식억제효과를 나타내나 기전연구에 필요한 양을 확보하지 못하여, eutigosides를 사용하여 생리활성 연구를 수행하였다. 분리된 eutigoside B와 C의 HL-60 증식억제효과를 검색한 결과 (Fig. 7), eutigoside B에 비하여 eutigoside C의 HL-60 세포증식억제효과가 강하여 항암기전 연구에는 eutigoside C를 사용하였다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47

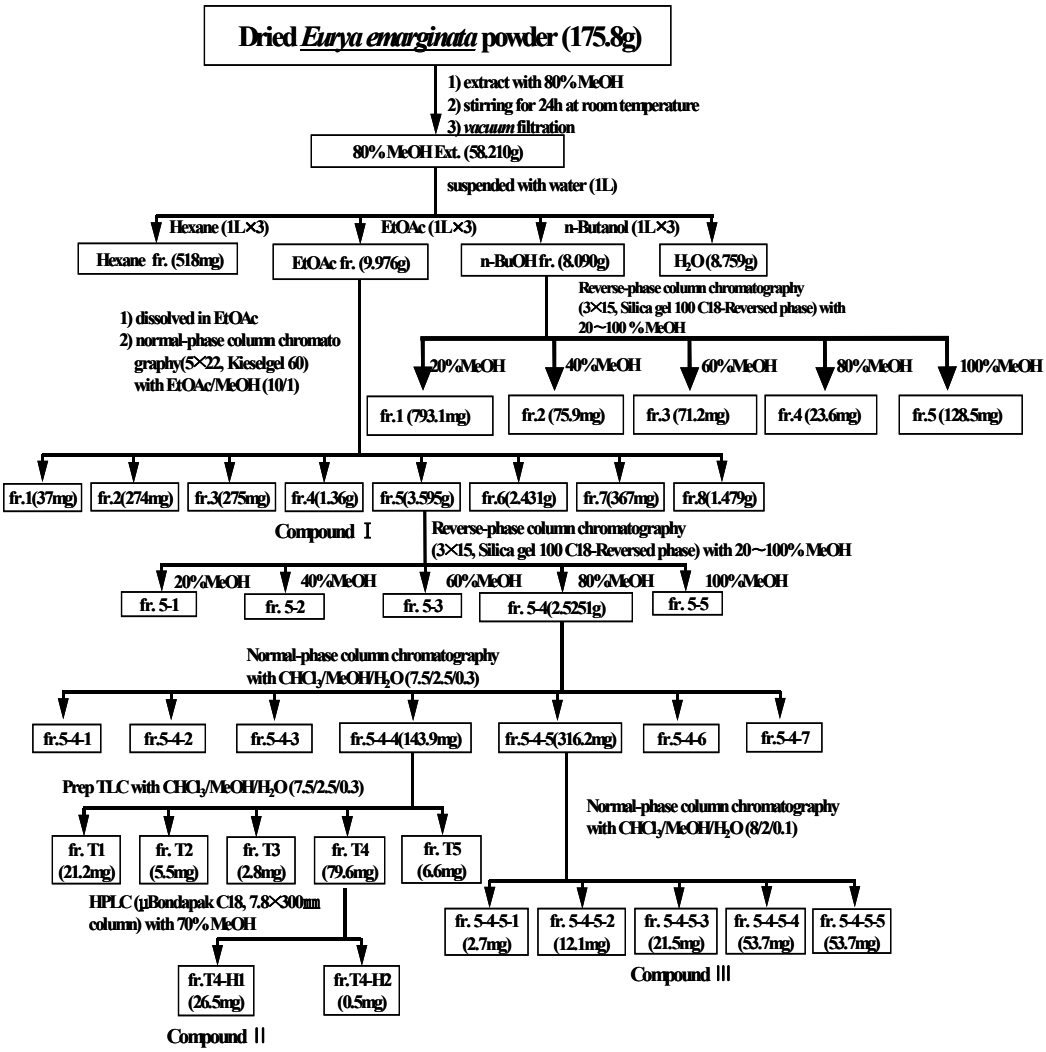

Fig. 1. Systematic purification using the solvent partitioning and column chromatography from *Eurya emarginata*.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47

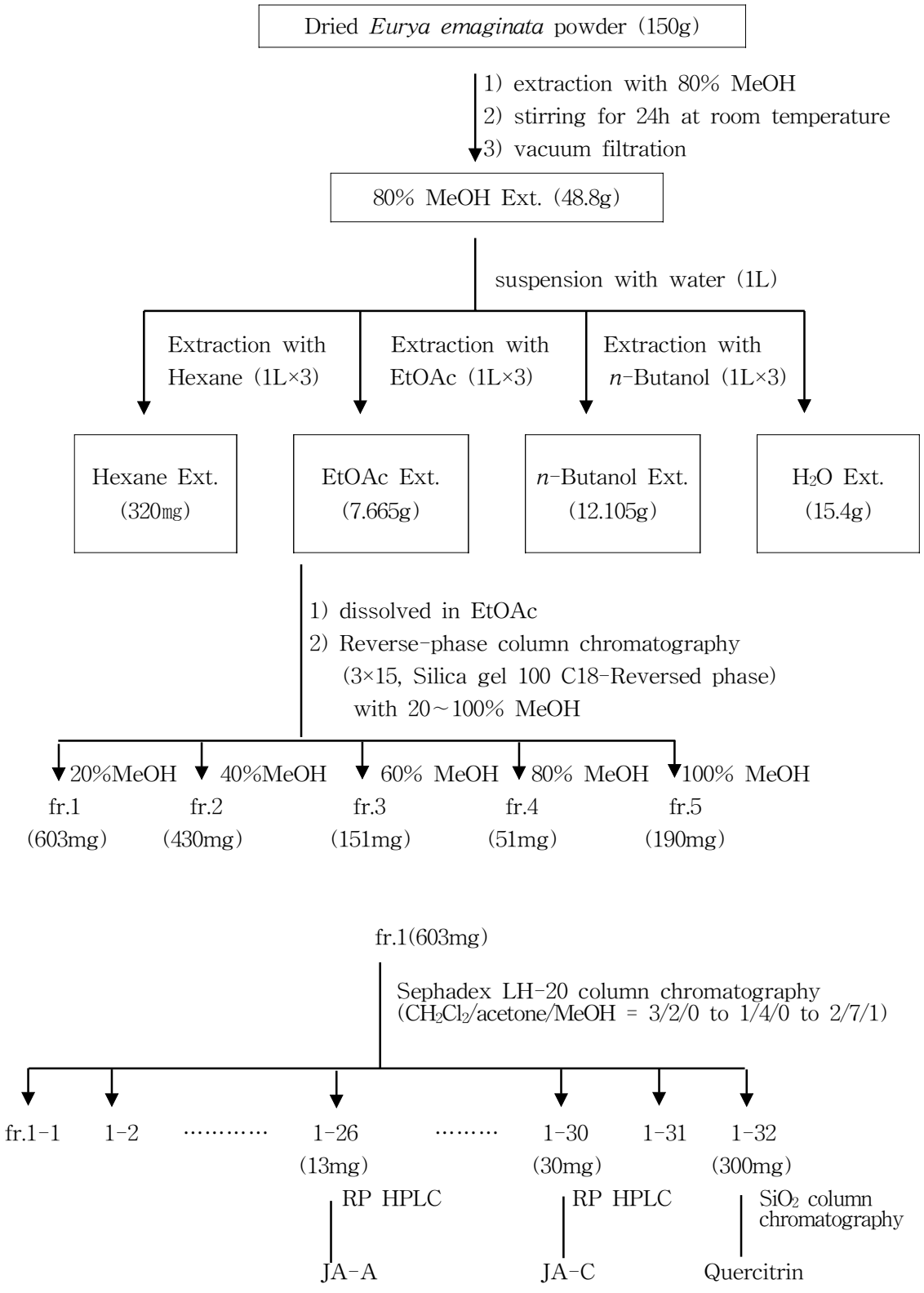

Fig. 2. Isolation procedure of eutigoside B and eutigoside C from *Eurya emaginata*

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47

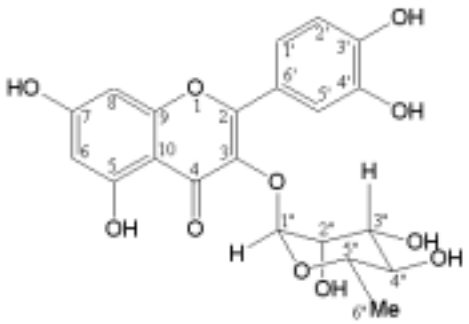

Fig. 3. The structure of isolated compound Ⅰ(Quercitrin)

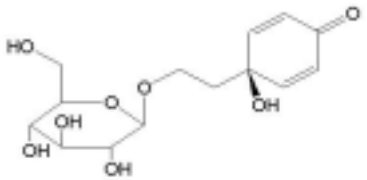

Fig. 4. The structure of isolated compound Ⅱ (Cornoside)

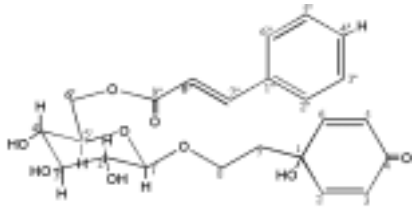

Fig. 5. The structure of isolated JA-A (Eutigoside C)

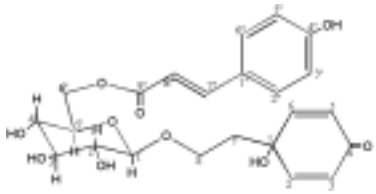

Fig. 6. The structure of isolated JA-C (Eutigoside B)

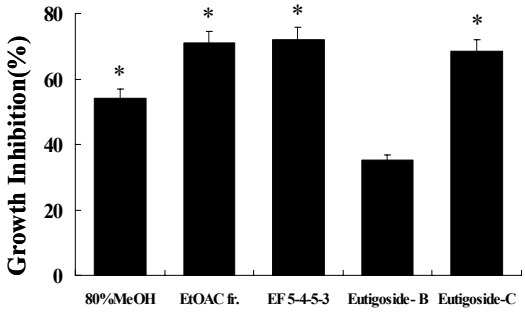

Figure 7. Inhibitory effect of *Eurya emarginata* on the growth of HL-60 cells.

The HL-60 cells were treated for 4 days with 100 ㎍/㎖ of components of *E. emarginata*.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47

2) 암세포의 성장에 대한 우묵사스레피 잎 추출물의 효과

여러 암 세포주를 사용하여 우묵사스레피 잎의 80 % 메탄올 추출물과 메탄올 추출물을 용매극성에 따라 계통 분리한 각 용매 분획의 효과를 살펴보았다. 우묵사스레피 잎의 메탄올 추출물 또는 용매 분획을 100 ㎍/㎖의 농도로 처리하였으며, 각종 암세포의 성장증식에 대한 추출물 또는 용매분획의 효과를 세포의 대사활성을 측정하여 알아보았다. 세포의 성장증식에 따른 대사활성은 tetrazolium salt의 하나인 MTT를 사용하여 MTT의 환원에 의해 생성되는 formazan의 흡광도로 측정하였다. 우묵사스레피의 활성을 검색한 암세포의 종류와 증식억제 효과(%)를 Table 2에 정리하였다.

우묵사스레피는 주로 HL-60, KG-1, U937, K562 및 Jurkat 와 같은 혈액종양 세포의 성장을 현저히 억제하였으나, 폐암, 대장암, 유방암, 자궁암, 위암 및 췌장암과 같은 고형암 세포에 대한 증식억제효과는 미미하였다. 또한, CCD-25Lu 및 HEL-299 같은 정상세포주의 성장도 거의 억제하지 못하였다. 이와 같은 결과는 민간에서 거담 및 이뇨의 목적으로 사용하고 있는 우묵사스레피의 잎의 추출물 및 활성성분을 백혈병의 치료에 이용할 수 있는 근거를 제시하는 것으로. 우묵사스레피의 혈액종양세포의 증식억제 기전을 HL-60 세포를 이용하여 분화유도 및 apoptosis 유도 측면에서 조사하였다.

3) 우묵사스레피의 HL-60 세포 증식 억제 기전

우묵사스레피의 HL-60 혈액종양세포 성장증식 억제효과가 apoptosis 유도에 의한 것인지 또는 분화유도에 의한 것인지 알아보았다.

우묵사스레피에 의한 분화유도효과는 세포표면 항원을 분석하여 알아보았다. HL-60의 세포표면 항원인 CD33, 과립구의 대표적인 세포표면 항원인 CD66b 및 단핵구의 대표적인 세포표면 항원인 CD 14의 항체를 이용하여 우묵사스레피 80% MeOH 추출물 처리에 의한 HL-60 세포표면 항원의 변화를 유세포분석기를 사용하여 조사하였다. 그 결과, 우묵사스레피의 MeOH 추물물을 처리한 세포군에서도 과립구의 세포표면 항원인 CD66b 또는 단핵구의 대표적인 세포표면 항원인 CD 14의 발현이 대조군에 비하여 증가하지 않았다 (Fig. 8). 이것으로 우묵사스레피의 HL-60 혈액종양세포 증식억제 효과가 분화유도에 의한 것은 아님을 알 수 있었다.

그래서, 우묵사스레피의 HL-60 혈액종양세포 성장증식 억제효과가 apoptosis 유도에 의한 것인지 endogenous Ca^{2+}/ Mg^{2+} 의존성 nuclear endonuclease 활성화에 따른 DNA 단편화 현상을 관찰하였다 (Fig. 9). 그 결과, 우묵사스레피의 80 % 메탄올 추출물에서 뚜렷한 DNA ladder를 관찰할 수 있었으며, 80 % 메탄올의 solvent partitioning에 따른 각 추출물 중에서는 ethylacetate 추출물 처리에 의한 DNA 단편화 현상이 가장 뚜렷하게 관찰되었다. 우묵사스레피의 추출물의 처리에 의하여 세포주기 분석에서 apoptotic peak인 sub-G1 hypodiploid cell population이 증가하는지 조사하였다. 그 결과, 우묵사스레피의 ethylacetate 분획물 및 eutigoside B와 C를 포함하는 분획물 fr. 5-4-5 처리에 의하여 apoptotic cell의 portion이 증가함을 확인할 수 있었다 (Fig. 10-I, Fig. 11-I). 이와 같은 결과는 세포막을 통과하여 DNA를 염색하는 DAPI를 이용한 핵의 형태학적 변화 관찰에 의해서도 확인

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47

되었다 (Fig. 10-II, Fig. 11-II). DNA의 단편화 현상이 명확히 관찰되었던 우묵사스레피의 ethylacetate 분획물 및 eutigoside B와 C를 포함하는 분획물 fr. 5-4-5 처리에 의하여 HL-60 세포핵의 condensed chromatin으로의 변화를 관찰할 수 있었다. 이와 같은 결과들로부터 제주 자생식물인 우묵사스레피의 잎은 강력하게 급성 전골수성 백혈병 세포인 HL-60 세포의 성장을 현저히 저해하여, 그와 같은 증식 억제효과는 HL-60 세포의 apoptosis 유도에 의한 것임을 알 수 있었다.

Table 2. Inhibitory effect of the several extracts from *Eurya emarginata* on the growth of tumor cells

Cell line	Tissue/ Tumor origin	Growth Inhibition (%)				
		80% MeOH	Hexane	EtOAc	n-BuOH	H_2O
HL-60	blood	53.46±1.645*	31.33±3.271*	70.11±3.683*	34.65±2.342*	11.78±2.251*
KG-1	blood	62.98±2.054*	40.48±3.196*	63.07±2.019*	64.78±3.007*	19.74±4.481*
U937	blood	23.45±3.801*	8.11±2.358*	72.25±3.188*	69.89±2.299*	37.40±4.957*
K562	blood	28.52±3.145*	17.96±4.614*	45.18±2.851*	16.96±3.828*	19.66±3.568*
JurKat	blood	65.87±4.102*	17.74±3.986*	66.34±2.814*	58.83±4.573*	45.16±4.259*
MCF-7	breast	2.49±1.135*	33.86±4.471*	12.34±3.483*	10.45±3.193*	17.28±4.636*
HCT-15	colon	25.14±2.045*	40.69±3.639*	- 18.37±6.560	12.20±2.384*	39.10±3.588*
SK-OV-3	ovary	8.07±3.789*	16.50±4.993*	- 8.76±4.245*	- 6.81±1.529*	- 2.71±1.601*
A498	kidney	3.47±1.234*	- 0.71±2.488*	4.29±2.156*	20.68±3.204*	- 8.35±2.845*
SNU-16	stomach	4.07±4.148*	28.70±3.203*	23.62±5.370	23.62±5.244	10.85±4.627*
SNU-C5	colon	19.12±2.546*	8.75±5.235	31.76±3.888*	49.46±3.705*	5.50±6.074
MIA PaCa-2	pancreas	1.92±1.255*	16.76±2.064*	9.33±2.254*	7.85±1.833*	0.51±4.602*
Hep-G2	liver	3.96±1.947*	2.98±3.198*	6.83±4.403*	4.13±4.415*	5.85±7.748
A431	skin	0.03±1.526*	10.31±8.188	1.47±3.539*	3.98±4.430*	4.33±4.837*
SKN-SH	brain	30.39±4.762*	65.77±1.457*	28.36±3.077*	5.45±2.718*	7.20±6.372

The cancer cells ($1.0 \sim 3.0 \times 10^5$/㎖) were treated for 4 days with 100 ㎍/㎖ of the extracts in 96-microwell plates. After incubation, 3-(4,5-dimehtylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was added and incubation was continued for further 4 hours. The formazan salt formed was dissolved in dimethylsulfoxide, and quantified using a microplate reader at 540 nm. The mean absorbance value for each extract was calculated. Results are expressed as the percentage inhibition that produced a reduction in the absorbance in extract-treated cells compared to the untreated controls. All the experiments were performed in triplicate. The data is presented as a mean ±SD. $*P < 0.05$ compared to the control.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47

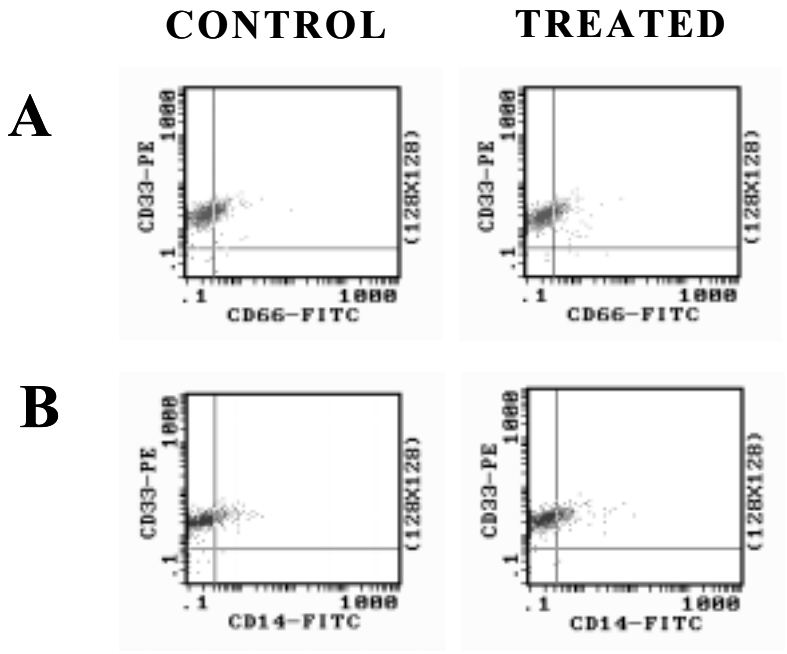

Fig. 8. Flow cytometric analysis of HL-60 cell surface antigens.
The cells were treated for 6 days with the 80% MeOH extract of *Eurya emarginata* (100㎍/㎖) and expressions of CD 6b(A) and CD 14(B) antigens were analyzed by FACS.

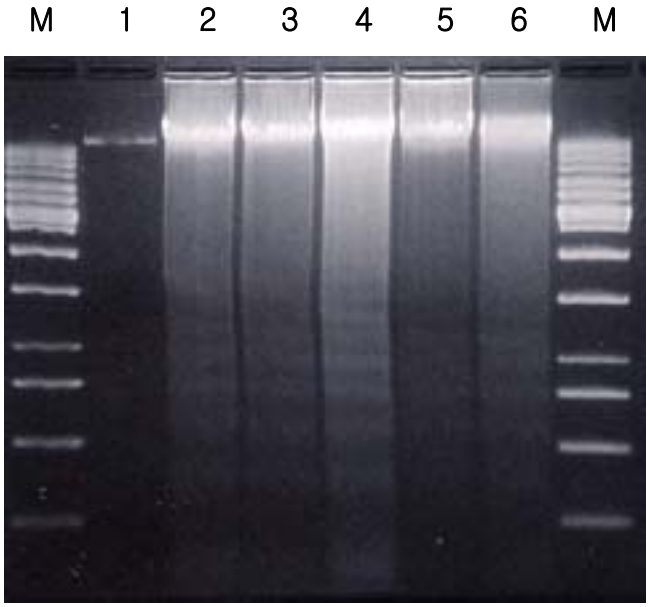

Fig. 9. DNA fragmentation by several extracts of *Eurya emarginata* in HL-60 cells.
HL-60 cells (3x106/㎖) were treated with several extracts for 12 hours. The DNA was isolated and subjected to 1.5 % agarose gel electrophoresis for staining with ethidium bromide. Lane M : 1 Kb DNA ladder size maker, Lane 1 : control, Lane 2 : 80% MeOH extract , Lane 3 : Hexane extract, Lane 4 : EtOAc extract, Lane 5 : n-Butanol extract, Lane 6 : Residue.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47

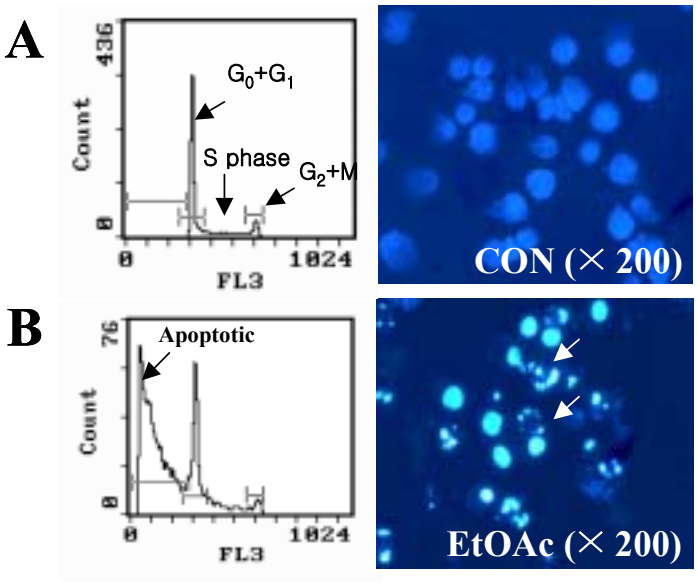

Fig. 10. The degree of apoptosis is represented as the DNA content measured by flow cytometric analysis (I) and the fluorescence micrographs of cells with highly condensed nuclei stained with 4.6-diamidino-2-pheny-lindole (DAPI) (II). The HL-60 cells (3.0×10^5 /㎖) were treated without (A) or with EtOAc fraction of *Eurya emarginata* (B) for 24 hours.

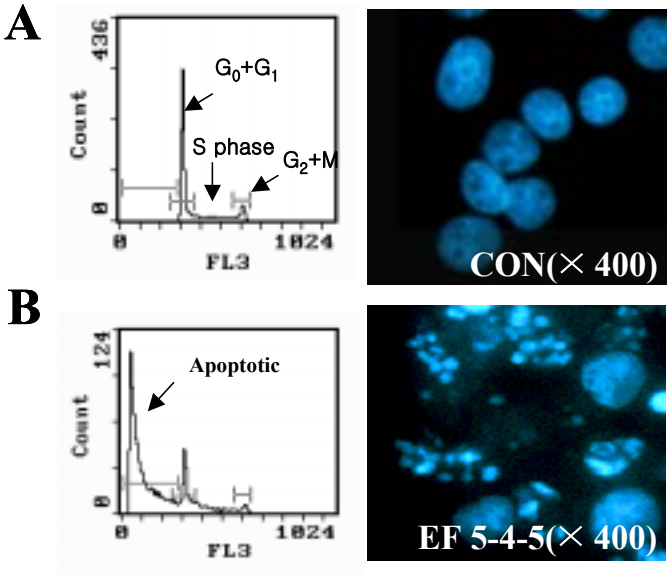

Fig. 11. The degree of apoptosis is represented as the DNA content measured by flow cytometric analysis (I) and the photographs showing cells with highly condensed nuclei stained with 4.6-diamidino-2-pheny-lindole (DAPI) (II). The cells (3.0×10^5/㎖) were treated without (A) or EF 5-4-5 of *Eurya emarginata* (B) for 24 hours.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47

4) 우묵사스레피 항암성분의 혈액종양 세포 Apoptosis 유도기전

우묵사스레피의 항암성분에 의한 HL-60의 apoptosis 유도 기전을 살펴보기 전에 우선 Hl-60 세포의 oncogene인 c-Myc의 발현에 대한 우묵사스레피 EtOAc 분획물의 효과를 살펴보았다. 이 유전자의 발현의 이상은 세포증식의 이상 및 미분화를 초래한다고 알려져 있다[9]. 우묵사스레피 EtOAc 분획물 처리에 의한 c-Myc mRNA 및 단백질의 발현정도를 조사한 결과, c-myc mRNA 및 단백질의 발현이 시간 의존적으로 감소됨을 확인할 수 있었다. (Fig. 12).

Apoptosis를 조절하는데 관여하는 여러 가지 유전자 산물 중에서 제일 먼저 알려진 암유발 유전자 산물의 하나인 Bcl-2는 다른 암 유전자 단백질과는 달리 세포증식에는 관여하지 않고 세포생존 조절, 즉 apoptosis를 억제하는 기능이 있다. 한편 Bcl-2 계에 속하는 Bax 단백질은 apoptosis를 촉진시키는 단백질로 밝혀졌으며 Bcl-2와의 hetero- 혹은 homodimer를 형성함으로써 apoptosis의 조절에 깊이 관여하고 있다[10]. 따라서 우묵사스레피에서 분리한 성분 중에서 eutigoside C에 의한 Bcl-2 및 Bax의 발현양상의 변화를 조사하였다. 그 결과, eutigoside C의 처리에 의하여 Bcl-2의 mRNA 및 단백질발현은 시간 의존적으로 감소하는 양상을 보였으며, apoptosis를 촉진시키는 기능을 수행하는 Bax mRNA 및 단백질의 발현은 시간 의존적으로 증가하는 양상을 나타내었다 (Fig. 13).

Apoptosis signalling 기전의 하나인 mitochondrial pathway를 살펴보면 Bcl-2 family 단백질의 발현 조절에 의하여 특히, Bax 단백질이 미토콘드리아 membrane의 pore 단백질에 작용하여 mitochondria로부터 cytochrome C가 세포질로 유리됨이 알려져 있다[11]. 그래서, eutigoside C에 의하여 mitochondria에서부터 세포질로 cytochrome C가 유리되는지 조사한 결과, 처리 후 30분부터 cytochrom C가 세포질로 유리됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 14).

특히 시스테인계의 단백질 분해 효소인 caspase가 발견되면서 apoptosis 기전의 중심적인 요소로 밝혀지고 있다[12, 13]. 현재까지 14종류의 caspase isoform들이 보고되었는데, 이들 중 caspase-3은 다양한 apoptosis 자극에 의해서 공통적으로 활성화될 수 있으며, 활성화된 caspase-3은 PARP와 같은 DNA 수복에 관여하는 여러 종류의 세포 내 단백질들을 절단함이 알려져 있다. Caspase-3이 활성화되기 위해서는 procaspase-3을 절단하는 caspase-9가 있어야하며, procaspase-9가 활성화되기 위해서는 미토콘드리아로부터 세포질내로 cytochrome C가 유리되어야 한다. Fig. 15에서 보는 바와 같이 Eutigoside C의 처리에 의하여 caspase-9 활성형 (35 kDa)와 caspase-3 활성형 (19 kDa)의 밴드를 확인할 수 있었으며, 또한 caspase-3의 활성화는 caspase-3의 기질인 PARP의 분절로 확인 할 수 있었다 (Fig. 16). Eutigoside C를 농도별로 처리하였을 때는 75 ㎍/㎖ 이상의 농도에서 뚜렷한 caspase-3의 할성화화 PARP의 절편화를 관찰할 수 있었다 (Fig. 17).

우묵사스레피에서 분리한 항암성분인 eutigoside C는 Bcl-2의 down regulation과 미토콘드리아로부터의 cytochrome C의 유리에 의한 일련의 caspases를 활성화하여 Hl-60 세포의 apotosis를 유도함을 알 수 있었다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47

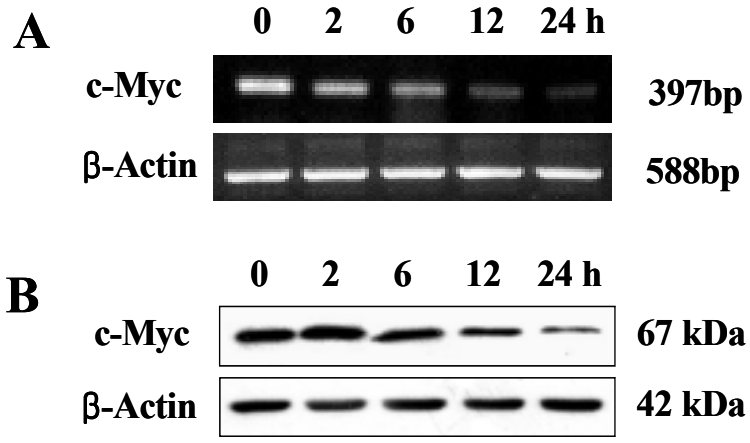

Fig. 12. c-Myc and β-Actin expression in the HL-60 cells after a treatment with 100㎍/㎖ of the EtOAc fraction of *Eurya emarginata* at the indicated times. (A) Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of c-Myc performed after synthesizing the cDNA as described in the method section. (B) Western blot analysis of c-Myc using its antibody (67 kDa).

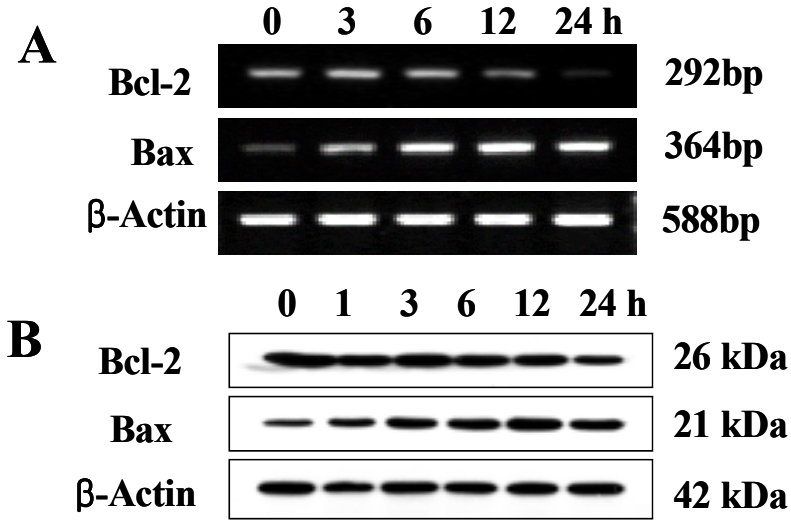

Fig. 13. Expression of Bcl-2, Bax and β-actin in HL-60 cells after a treatment with 100㎍/㎖ of the eutigoside C from *Eurya emarginata* at the indicated times. (A) Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of Bcl-2 and Bax were performed after synthesizing the cDNA as described in the method section. (B) Western blot analysis of Bcl-2 or Bax using the antibodies against Bcl-2 recognized a protein at 26 kDa and a 21 kDa protein for Bax

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47

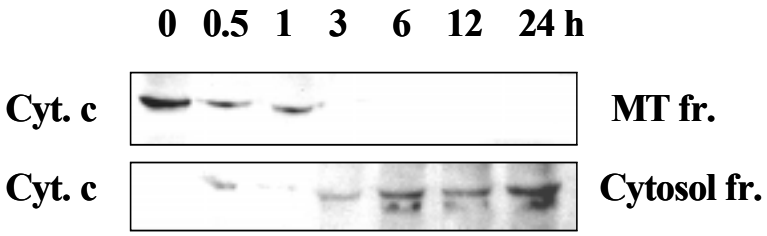

Fig. 14. Expression of cytochrome-c in the HL-60 cells after a treatment with 100㎍/㎖ of the eutigoside C from *Eurya emarginata* at the indicated times. Western blot analysis of cytochrome-c using its antibody (11 kDa).

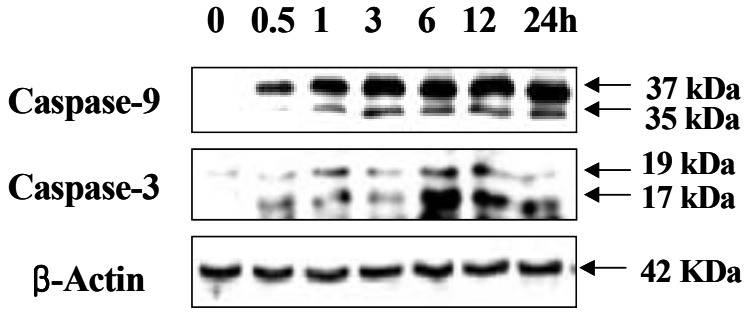

Fig. 15. Immunoblot analysis of caspase-9, caspase-3 and β-Actin in the HL-60 cells after a treatment with 100㎍/㎖ of the eutigoside C from *Eurya emarginata* at the indicated times.

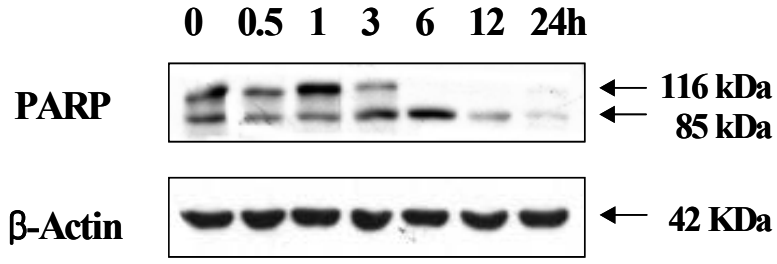

Fig. 16. Immunoblot analysis of PARP and β-Actin in the HL-60 cells after a treatment with the eutigoside C from *Eurya emarginata* at the indicated times.

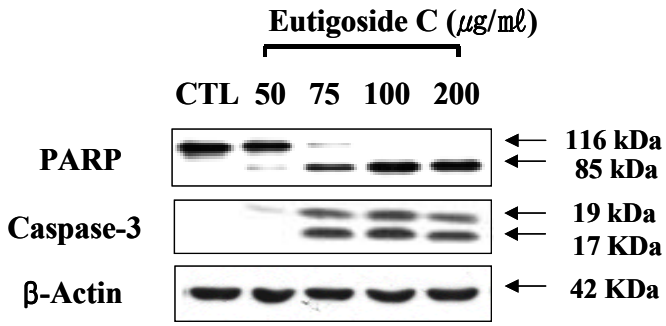

Fig. 17. Immunoblot analysis of PARP, caspase-3 and β-Actin in the HL-60 cells after a treatment with the eutigoside C from *Eurya emarginata*.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47

5) 우묵사스레피의 염증성 사이토카인 억제효과

항암과 관련하여 최근 apoptosis가 chemotherapeutic 모델뿐만 아니라 chemopreventive 모델로도 매우 이상적이라는 여겨지고 있다. 그래서, 많은 chemopreventive agents가 apotosis를 유도하여 발암과정을 억제한다고 보고되고 있다[14]. 또한, 지속적인 염증반응은 일부에서는 암 발생을 promotion 한다고 알려져 있다. 특히, precancer 및 early cancer에 대하여 염증반응 억제제가 chemopreventive 효과를 나타냄이 보고되고 있으며, chemopreventive agent의 개발과 관련된 molecular target으로 COX-2 및 iNOS 등의 이용되고 있다[15].

그래서, 우묵사스레피에서 분리한 eutigoside B 및 C가 chemopreventive 효과가 있는지 염증과 관련된 pro-inflammatory cytokines (TNF-α 및 IL-6), COX-2, iNOS 및 NO 생성 등에 대한 효과를 검색하여 알아보았다.

내독소로 잘 알려진 LPS는 그람음성균의 세포외막에 존재하며, RAW264.7와 같은 macrophage 또는 monocyte에서 TNF-α 및 IL-6와 같은 pro-inflammatory cytokine을 증가시키는 것으로 알려져 있다. Macrophage RAW 264.7 세포에서 염증성 cytokine 생성에 대한 eutigoside B 또는 C의 효과를 mouse ELISA kit를 이용하여 cytokine을 정량하여 조사하였다. 그 결과, LPS 자극에 의한 TNF-α 및 IL-6 생성이 eutigoside B 또는 C에 의하여 현저히 저해되었다 (Fig. 18, Fig. 19).

IFN-γ (50 unit) 및 LPS (1 ㎍/㎖)를 사용하여 RAW264.7 세포에서 iNOS와 COX-2의 생성을 유도한 후 eutigosides에 의한 발현 저해 정도를 Western blot를 통해 알아보았다. 그 결과, eutigoside B 또는 C에 의하여 iNOS와 COX-2의 단백질 발현이 현저히 저해되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 20, Fig. 21), Eutigosides의 처리에 의하여 iNOS의 발현이 감소됨을 eutigoside B 또는 C를 농도별로 처리하여 NO를 정량하여 확인하였다. 그 결과, eutigoside B 또는 C 모두 농도 의존적으로 LPS 자극에 의한 NO의 생성을 현저히 감소시켰다 (Fig. 22, Fig. 23).

4. 결론

본 연구는 제주도에 자생하는 우묵사스레피의 항암효과를 검색하고, 항암효과를 나타내는 성분을 분리하여, 이 항암성분의 작용기전을 규명하는 것으로, 우묵사스레피의 항암성분을 새로운 항암제로 개발할 수 있는 근거를 마련하고자 수행되었다.

우선, 여러 암세포주의 성장증식에 대한 우묵사스레피의 효과를 살펴본 결과, 주로 HL-60, KG-1, U937, K562 및 Jurkat 와 같은 혈액종양 세포의 성장을 현저히 억제하였다. 그러나, 폐암, 대장암, 유방암, 자궁암, 위암 및 췌장암과 같은 고형암 세포에 대한 증식 억제효과 와 CCD-25Lu 및 HEL-299 같은 정상세포주의 성장에 대한 억제효과는 미미하였다. 우묵사스레피 처리에 의하여 HL-60 혈액종양세포의 oncogene인 c-Myc mRNA 및 단백질의 발현이 시간 의존적으로 감소되는 것으로 우묵사스레피의 HL-60 세포에 대한 항암활성을 다시 확인 할 수 있었다. 이와 같은 우묵사스레피의 HL-60 혈액종양세포 성장증식 억제효과가 apoptosis 유도에 의한 것인지 또는 분화유도에 의한 것

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47

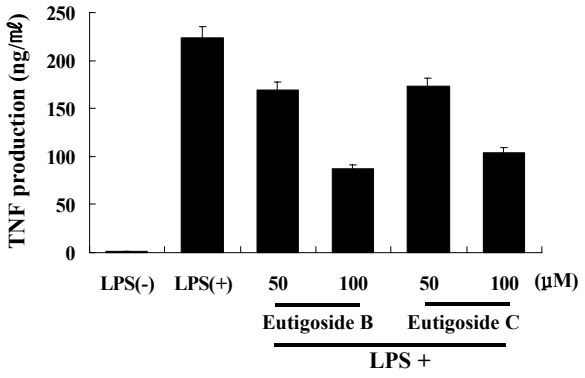

Fig. 18. Inhibitory effects of eutigosides on TNF-α production in RAW 264.7 cells. The productions of TNF-α determined by ELISA method from the culture of RAW264.7 cells (1.0×10^6 cells/mℓ) stimulated by LPS (1 μg/mℓ) in the presence of testing samples.

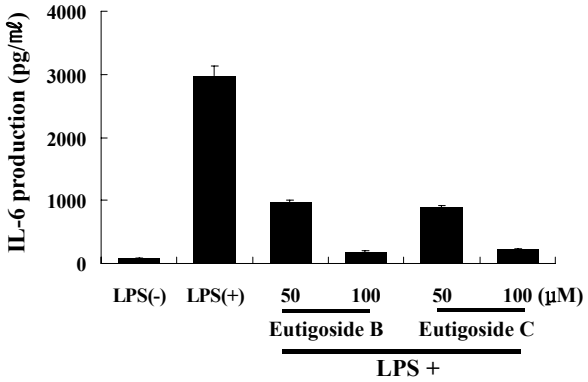

Fig. 19. Inhibitory effects of eutigosides on IL-6 production in RAW 264.7 cells. The productions of IL-6 determined by ELISA method from the culture of RAW264.7 cells (1.0×10^6 cells/mℓ) stimulated by LPS (1 μg/mℓ) in the presence of testing samples.

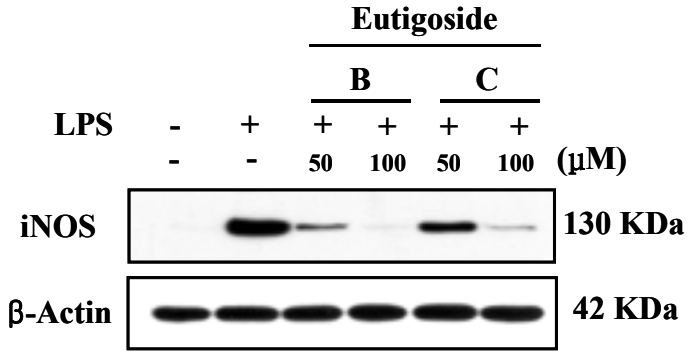

Fig. 20. Inhibitory effects of eutigosides on iNOS protein expression in activated macrophages. RAW264.7 macrophage (1.0×10^5 cells/mℓ) were pre-incubated for 18 hr, and then iNOS of production protein expression was determined from the 24 hr culture of stimulated by LPS (1 μg/mℓ) + IFN-γ (50 U/mℓ) in the presence of testing sample.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47

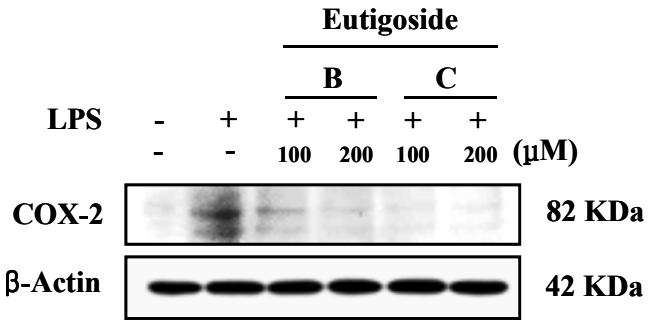

Fig. 21. Inhibitory effects of eutigosides on COX-2 protein expression in activated macrophages. RAW264.7 macrophage (1.0×10^5 cells/㎖) were pre-incubated for 18 hr, and then COX-2 of production protein expression was determined from the 24 hr culture of stimulated by LPS (1 ㎍/㎖) + IFN-γ (50 U/㎖) in the presence of testing sample.

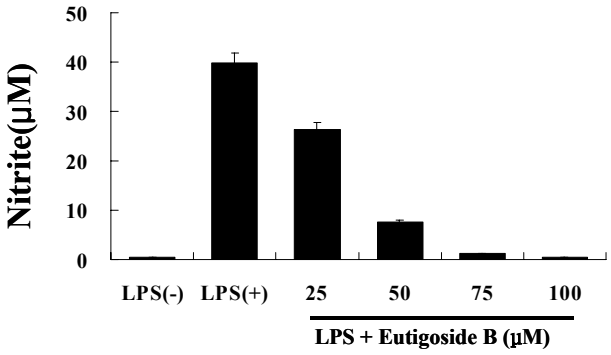

Fig. 22. Effect of the eutigoside B on nitrite accumulation in RAW264.7 Macrophages. The cells (1.5×10^5 cells/㎖) were pre-incubated for 24 hr, and then nitrite production was determined from the 24 hr culture of stimulated by LPS (1 ㎍/㎖) in the presence of eutigoside B.

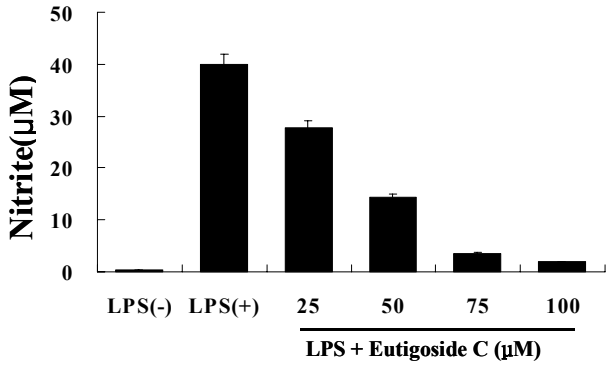

Fig. 23. Effect of the eutigoside C on nitrite accumulation in RAW264.7 Macrophages. The cells (1.5×10^5 cells/㎖) were pre-incubated for 24 hr, and then nitrite production was determined from the 24 hr culture of stimulated by LPS (1 ㎍/㎖) in the presence of eutigoside C.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47

인지 알아보았다. 우묵사스레피 처리에 의한 세포표면 항원의 변화를 분석한 결과, 우묵사스레피의 HL-60 혈액종양세포 증식억제 효과가 분화유도에 의한 것은 아님을 알 수 있었다. 그런데, 우묵사스레피 처리에 의하여 endogenous Ca^{2+}/ Mg^{2+} 의존성 nuclear endonuclease 활성화에 따른 DNA ladder, sub-G1 hypodiploid cell population이 증가, 형태학적 변화 관찰로 HL-60세포의 apoptosis가 유도됨을 확인할 수 있었다.

우묵사스레피 추출물로부터 항암활성을 추적하면서 4개의 단일 성분을 분리하고 그 구조를 규명하였다. 그중 quercitrin은 우묵사스레피의 성분으로 이미 알려져 있는 물질이나, cornoside, eutigoside B 및 eutigoside C는 우묵사스레피의 성분으로는 보고된 바가 없다. 우묵사스레피에서 분리된 성분인 eutigoside C는 강한 HL-60 세포 증식억제 효과를 나타내었다.

우묵사스레피의 항암성분인 eutigoside C에 의한 apotosis 유도 기전을 알아보았다. Eutigoside C의 처리에 의하여 Bcl-2의 mRNA 및 단백질발현은 시간 의존적으로 감소하는 양상을 보였으며, apoptosis를 촉진시키는 기능을 수행하는 Bax mRNA 및 단백질의 발현은 시간 의존적으로 증가하는 양상을 나타내었다. 또한 eutigoside C의 처리에 의하여 mitochondria에서부터 세포질로 cytochrome C가 유리되었으며, caspase-9 및 caspase-3의 활성형을 확인할 수 있었다. 또한 caspase-3의 활성화는 caspase-3의 기질인 PARP의 분절로도 확인 할 수 있었다.

지속적인 염증반응은 일부에서는 암 발생을 promotion한다고 알려져 있다. 특히, precancer 및 early cancer에 대하여 염증반응 억제제가 chemopreventive 효과를 나타냄이 보고되고 있으며, chemopreventive agent의 개발과 관련된 molecular target으로 COX-2 및 iNOS 등의 이용되고 있다. 그래서, 우묵사스레피에서 분리한 eutigoside B 및 C가 chemopreventive 효과가 있는지 염증과 관련된 pro-inflammatory cytokines (TNF-α 및 IL-6), COX-2, iNOS 및 NO 생성 등에 대한 효과를 검색하여 알아보았다. 그 결과, eutigoside B 및 C가 TNF-α 및 IL-6 생성을 현저히 저해하였으며, iNOS와 COX-2의 단백질 발현도 현저히 저해하였다. Eutigosides의 처리에 의한 iNOS 발현의 감소로 인하여 NO의 생성도 현저히 감소하였다.

앞의 결과들로부터 우묵사스레피에서 분리한 eutigoside C는 apoptosis 및 염증을 억제하여 암의 치료 및 예방에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

5. 인용문헌

1. Pezzuto, J. M. : Plant-derived anticancer agents. *Biochem Pharmacol.* **24**: 121-133, 1997.
2. Wattenberg, L.W. : Chemoprophylaxis of carcinogenesis: A review. *Cancer Res.* **26**: 1520 - 1526, 1996.
3. Sporn, M. B. : Chemoprevention of cancer. *Comment In Lancet.* **15**: 176-177, 1994.
4. Kahn IA, Erdelmeier CA, Sticher O, Rali T : New phenolic glucosides from the leaves of *Eurya tigang*. *J. Nat. Prod.* **55**:1270-1274,1992.
5. S.Y, Park and H.K, Kang, Effect of extracts of plants growing in Jeju on the growth of HL-60

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47

cells. *Cheju Journal of Life Science* 3:85-94, 2000.

6. Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.
7. Jensen, A. R., A, Kjaer. and B. J. Nielsen. : A Quinol Glucoside Isolated from Cornus Species. *Acta. Chem. Scand.* 27: 367-369, 1973.
8. Kahn, I. A., C. A. Erdelmeier, O, Sticher. and T. Rali. : New phenolic glucosides from the leaves of Eurya tigang. *J. Nat. Prod.* 55:1270-1274, 1992.
9. Henriksson, M. and Luscher, B. : Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res.* 68: 109-82, 1996.
10. Baff, G., T. Miyashita, J. R.Williamson and J. C. Reed. : Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3(IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *J. Biol. Chem.* 268: 6511-6519, 1993.
11. Narita, M., S. Shimizu, T. Ito, T. Chittenden, J. R. Lutz, H. Matsuda and Y. Tsujimoto. : Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome *c* release in isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14681-14686, 1998.
12. Nijhawan, P., D. Li, I. Bonavidjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad. : Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-489, 1997.
13. Salvesen, S. G. and M. V. Dixit. : Caspase: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91: 443-446, 1997.
14. Taraphdar, A. K., M. Roy and R. K. Bhattacharya. : Natural products as inducers of apoptosis: implication for cancer therapy and prevention. *Curr. Sci.*80: 1387 - 1396, 2001.
15. Kelloff, G. J., C. W. Boone, V. E. Steele, J. A. Crowell, R. A. Lubet, P. Greenwald, E. T. Hawk, J. R. Fay, C. and C. Sigman. : Mechanistic Considerations in the Evaluation of Chemopreventive Data, IARC Scientific Publication no. IARC, Lyon, 139: 203 - 219, 1996.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 15:14:47