J. Fd Hyg. Safety 11(1), 71 - 75(1996)

전통 약용 식물 권백(*Selaginella tamariscina*)의 항암효과에 대한 혈액 암세포주 U937의 감수성 및 그 작용기구에 대한 분자생물학적 연구

이인선* · 박성희 · 이인자†

계명대학교 자연과학대학 식품가공학과, 대구효성가톨릭대학교 약학대학*

Molecular-based sensitivity of human leukemia cell line U937 to antineoplastic activity in a traditional medicinal plants (*Selaginella tamariscina*)

In Seon Lee*, Sung Hee Park and In Ja Rhee†

**Dep. of Food Science and Technology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea*

College of Pharmacy, Taegu Hyosung Catholic University, Kyungsan 713-702, Korea

ABSTRACT — In order to study the antitumoral effect of Selaginella tamariscina extracts, the cytotoxicities to human histiocytic leukemia cells (U937) and lymphocyte were measured by MTT method. The water extract of *Selaginella tamariscina* was partitioned into chloroform ($CHCl_3$), ethylacetate (EtAc), n-butanol (BuOH) and water (H_2O), successively. $CHCl_3$, EtAc and BuOH fractions of *Selaginella tamariscina* showed the cytotoxicity to the U937 cells but they had no effect on the cytotoxicity of lymphocyte under the same conditions. The tumor-specific cytotoxicity of *Selaginella tamariscina* fractions might have been attributed to their genotoxic effect on actively proliferating cells. The expression of p53 tumor suppressor gene was then evaluated by northern blotting. The increased expression of p53 was induced by *Selaginella tamariscina* fraction V but no expression of p53 was induced by $CHCl_3$, EtAc, and BuOH fractions of *Selaginella tamariscina*. These results suggested that the increased expression of p53 induced by *Selaginella tamariscina* water extract (fraction V) should be required for the cytotoxicity on U937 and the other fractions of *Selaginella tamariscina* mediated the U937 disruption.

Key words □ *Selaginella tamariscina*, MTT assay, U937 leukemia cells, p53gene, Cytotoxicity

최근 수년동안 암은 특이한 유전자의 변이나, 암을 유발하는 virus에 감염되었을때 나타난다고 이해되고 있다.[1] 또 암치료에도 많은 항암제들이 개발되고 있지만, 암의 종류에 따라 다양한 약리작용을 나타내고[2-4] 항암제의 부작용 또한 심각하여 최근에는 항암제의 부작용을 최소화하기 위해 천연물을 이용한 항암제 개발이 시도되고 있다.[5] 권백은 동양에서 전통적으로 사용되어 온 항암약제로서 신농본초경에서 '주오장사기, 여자음중한열통, 혈폐, 절자'에 이용된다고 하였고 신농본초경집주에서 도홍경은 '지해역, 치탈항, 산임결, 두중풍현, 강은영정'에 이용되어 왔다. 이 등[5]이 murine tumor cell인 p388과 human solid tumor cell인 MKN 45에 amentoflavone이 항암효과를 나타낸다고 보고하였으며, 박 등[6]은 한국인의 종양에서 유래한 위암세포주 SNU-1에대한 antineoplastic activity가 보고된 바 있다. 또 박과 이 등[7]은 human histiocytic leukemia cell line인 U937에 대한 권백의 세포독성을 보고하였다. 이와같이 권백의 in vitro 항암효과에 관한 보고에 이어 항암작용 기전에 관한 연구를 하고자 한다. 변이에 의하여 암을 유발하는 유전자중의 하나인 p53 tumor suppressor gene은 사람의 암에서 자주 변이되는 것으로 알려져 있다.[8,9] p53는 방사선조사나 stress에 의해 p53의 발현이 증가하고, 증가된 p53이 WAF 1을 유도하여 cyclin-CDK complex가 억제된다. 그 결과 세포 주기가 차단되어 세포성장이 억제되는 것이다.[11,12] 또한 암세포에서의 p53증가는 apoptotic cell death를 유도한다는 보고도 있다.[12] 이상의 보고에서 p53와 암과는 밀접한 관계가 있다는 것을 알 수 있다. 그러므로 암세포에 권백을 투

† Author to whom correspondence should be addressed.

여한후 p53 발현의 변화를 관찰하여 권백의 항암작용을 규명하고 효과적인 항암치료법 개발에 도움이 되고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

재료의 추출 및 분획

본 실험에 사용한 권백은 *Selaginella tamariscina*로서 대구 약령시에서 구입하여 사용하였다. 권백 100 g을 분쇄하여 증류수 1 *l*로 환류하면서 3시간씩 2회 반복 추출하고 다시 $CHCl_3$로 추출한 후 계속하여 ethylacetate 추출액과 n-butanol 추출액으로 분획하였다(Fig. 1). 각 추출물을 감압하에서 농축한 후 동결건조시켜 건조분말로 만들어 4°C에 밀폐시켜 보관하였다. 시료는 건조분말을 적당한 농도로 증류수에 용해시킨후 0.22 μm membrane filter로 여과한 것을 사용하였다.

세포주 및 세포배양

세포주는 human histiocytic leukemia cell line 인 U 937(ATCC 1593)을 사용하였다. U937은 RPMI-1640배지에 10% FBS(Fetal bovine serum), 100 unit/m*l* penicillin, 100 μg/m*l* streptomycine을 첨가한 배양액으로 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다.

MTT assay[13,14]

약물을 처리하지 않은 대조군에서 MTT실험 종료시 OD_{540}값이 0.6~0.8을 나타내는 세포수로서 1×10^5 cell/m*l*을 정하였다. 준비된 1×10^5 cell/m*l* single cell suspension에 각 농도로 시료를 처리한 후 96 well plate 에 150 μl/well씩 넣고 37°C, 5% CO_2 하에서 8시간배양 후 MTT(3-(4,5-dimethyl thiazolyl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide)용액을 모든 well에 50 μl/well씩 가해 주고 다시 4시간 더 배양하였다. 배양종료시 배양기를 300 rpm에서 10분간 원심분리한 후 생성된 formazan 결정을 DMSO에 용해시켜 micro plate reader(Multiskan)로 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

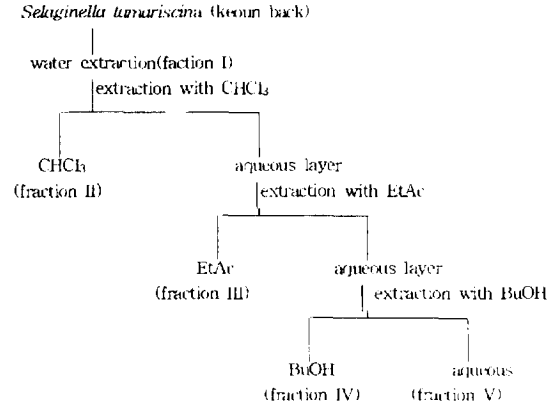

Fig. 1. Extraction and isolation of the fractions from *Selaginella tamariscina*.

결과 분석은 실험군의 평균 OD_{540}값을 구하여 대조군(100% 생존군)의 평균 OD_{540}값에 대한 백분율 값을 산출하였다. 이 값은 시험군의 세포생존율(survival percent, s.p.)에 해당하는 값이다.

임파구의 분리[15,16]

건강한 성인(20~25세)으로부터 혈액 20 m*l*을 heparin처리한 (20~50 unit/m*l*) 주사기로 말초혈액을 채혈한 후, PBS으로 3배 희석 하여 Ficoll-Hypaque(D=1.070)용액에 중첩시켰다. 1000×g로 10분간 원심분리하고 PBS-1640으로 1회 세척한 후 1×10^6 cell/m*l*되게 세포수를 조절하여 실험에 이용하였다. 세포수는 trypan blue염색과 혈구계산기를 이용하여 현미경하에서 계산하였다.

Northern blot analysis[17]

총 RNA는 acid guanidium thiocyanate phenol chloroform extraction법에 의하여 분리하였다. 분리된 RNA 10 μg을 formaldehyde agarose gel에서 20volt, 16시간 전기영동시킨 후 blotting을 실시하여 RNA를 nylon membrane (Genescreen Plus, Biotechnology systems, boston, MA, USA)로 이동시켰다. human p53 probes를 random primer labeling 방법에 의하여 ^{32}p-dCTP로 labeling 하였다. blotting 된 nylon membrane에 probe를 넣고 62°C에서 하룻밤 방치하여 hybridization을 실시하고 65°C에서 세척한후 X-선 필름에 감광시켜 결과를 얻었다.

결과 및 고찰

전통적으로 종양과 궤양의 치료제로서 민간에서 사용되어 온 권백을 대상으로 MTT assay를 수행하여 암세포 살해능을 검색하였다. MTT assay는 짧은 배양기간 때문에 암세포 성장억제 효과 보다는 암세포 살해능이 주로 측정되는 colorimetric tetrazolium assay로서 암의 기초연구에 이용되고 있다. 물과 3종의 유기용매로 추출한 권백분획이 U 937 leukemia세포에 미치는 세포독성을 MTT assay로 측정하여 Table 1에 나타내었다.

최초의 물 추출액인 fraction I은 1 mg/m*l*에서 54.7%의 생존율을 나타내었으며, 100 μg/m*l*에서는 91.3%의 생존율

Table 1. Cytotoxic effect of *Selaginella tamariscina* on human leukemia U937 cells by MTT assay

S. tamariscina	Conc. μg/ml	O.D.±S.D.	Survival percent(%)
Water extraction (fraction I)	1	0.6225±0.023	99.7
	10	0.6233±0.029	99.8
	100	0.5702±0.020	91.3[b]
	1000	0.3416±0.020	54.7[b]
$CHCl_3$ (fraction II)	1	0.5065±0.011	79.7[b]
	10	0.3605±0.023	53.7[b]
	100	0.3492±0.093	51.6[b]
EtAc (fraction III)	1	0.6223±0.041	100.3
	10	0.5699±0.037	95.1a
	100	0.4317±0.037	66.3b
BuOH (fraction IV)	1	0.6275±0.047	100.5
	10	0.5560±0.072	89.1
	100	0.5220±0.044	83.6[b]
	1000	0.3797±0.047	60.8[b]
H_2O (fraction V)	1	0.6190±0.010	99.1
	10	0.5908±0.024	94.6
	100	0.5782±0.028	92.6[a]
	1000	0.3294±0.026	52.8[b]
Control		0.6240±0.028	100

[a] $p<0.05$ $bp<0.01$: significant to the control

을 나타내어 암세포 살해능이 관찰되지 않았다.

그러나, $CHCl_3$분획에서는 100 μg/ml에서 51.6%의 생존율을 나타내었고 EtAc분획에서는 66.3%, 그리고 BuOH분획에서는 83.6%의 생존율을 나타내어 유의적인 세포살해능이 관찰되였다. $CHCl_3$, EtAc, 그리고 BuOH분획의 세포살해능이 암세포에 대하여 특이적인 작용인지를 검색하기 위하여 정상 성인의 혈액에서 분리한 임파구에 대하여 MTT assay를 수행하였다(Table 2).

Table 2의 결과에서 임파구의 경우, $CHCl_3$이 100 μg/ml에서 102.2%, EtAc분획에서는 98.1%, 그리고 BuOH분획에서는 90.9%의 생존율을 나타내었다. 이 결과로서 권백은 암세포에 특이적으로 작용하는 이상적인 항암제로서의 가능성을 확인하였다. 이에 권백의 작용기전을 검색하기 위하여 tumor suppressor gene인 p53 RNA를 northern blotting으로 확인하였다(Fig. 1).

Wu-J 등[8]은 recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor(rhGM-CSF)에의해 유도된 U937 세포 분화의 도입과 세포성장 억제에 p53의 증가가 요구된다고 보고하였다. 또한 Scott 등[12]이 계속 분화하는 세포에

Table 2. Cytotoxic effect of *Selaginella tamariscina* on human lymphocyte by MTT assay

S. tamariscina	Conc. μg/ml	O.D.±S.D.	Survival percent(%)
$CHCl_3$ (fraction II)	1	0.631±0.035	97.1
	10	0.636±0.013	97.9
	100	0.681±0.015	102.2
EtAc (fraction III)	1	0.623±0.045	95.9
	10	0.583±0.021	90.2
	100	0.637±0.032	98.1
BuOH (fraction IV)	1	0.647±0.020	99.5
	10	0.618±0.025	95.1
	100	0.591±0.028	90.9

[a] $p<0.05$ $bp<0.01$: significant to the control

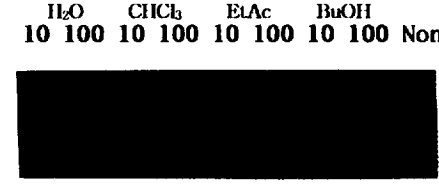

Fig. 2. Northern blot analysis of p53 expressing after treatment with *Selaginella tamariscina* fractions in U937 cells.

Total cellular RNA was extracted at 12hrs. after addition of *Selaginella tamariscina* fractions and hybridized to ^{32}p labeled human p53 probe. H_2O 10 (or 100): treatment with 10 μg/ml (or 100 μg/ml) water extraction (fraction V), $CHCl_3$ 10 (or 100): treatment with 10 μg/ml (or 100 μg/ml) chloroform extraction (fraction II), EtAc 10 (or 100): treatment with 10 μg/ml (or 100 μg/ml) ethylacetate extraction (fraction III), BuOH 10 (or 100): treatment with 10 μg/ml (or 100 μg/ml) n-butanol (fraction IV), None: treatment with PBS.

서 p53는 세포의 재생동안 세포성장을 억제하며 apoptosis를 촉진시킨다고 보고하였다. Fig. 2에 의하면 수층 분획(fraction V)은 10 μg/ml 일때 보다 100 μg/ml일때 p53 발현이 증가하였다. MTT assay에 의한 결과와 비교하여 보면 계속 분화하는 세포인 U937에 fraction V를 처리했을때 나타나는 세포독성은 p53 발현 증가에 의한 세포성장 억제로 사료되지만 p53 발현에 관여하는 fraction V의 작용기전은 계속적인 연구가 수행되어야 할것이다. Fig. 2에 의하면 BuOH, EtAc, 그리고 $CHCl_3$분획의 경우는 100 μg/ml 일때 10 μg/ml로 처리했을때 보다 p53 발현이 감소하였다.

MTT assay결과와 약제를 처리했을때의 세포 형태학적 변화를 비교할때 농도 의존적인 p53 발현의 감소는 cell disruption에의한 것으로 사려된다. 특히, $CHCl_3$ 분획의 경우 p53 발현을 관찰할 수 없으며 이는 MTT assay의 51%의 생존율과 비교할때 $CHCl_3$ fraction의 세포독성으로 인해 cell disruption이 일어나 p53 mRNA가 분해된 것으로 생각된다. p53는 tumor suppressor로서 transcription factor로 작용하며 세포 주기의 block에 관여한다. 이런 관점에서 권백 분획 fraction V 와 그외 유기용매($CHCl_3$, BuOH, 그리고 EtAc)에 따라 p53 발현이 서로 다른 양상을 나타내는 것을 권백의 항암작용 기전을 이해하는데 중요한 단서가 된다. 그러므로 권백을 처리했을 때 p53와 생존율과의 관계를 더 자세히 비교하고 관찰하는 것이 더욱 효과적인 항암치료법을 개발하는데 중요한 도움이 될 것으로 사료된다.

감사의 말씀

이 연구는 1994년도 산학협동재단의 학술연구비의 지원에 의하여 연구되었음을 감사드립니다.

국문요약

항암 화학요법제들의 부작용을 극복하는 새로운 항암제의 개발을 위하여 항암효과가 있는 천연물중 권백에 대하여 항암효과의 검색과 약리작용을 규명하고자 하였다. 권백의 항암효과를 탐색하기 위하여 암세포주인 U 937 human leukemia cell과 정상면역세포인 임파구에 대한 권백분획의 암세포 살해능을 MTT분석법을 이용하여 비교 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 권백을 유기용매로 추출한 $CHCl_3$, EtAc, 그리고 BuOH 분획에서 U 937세포에대한 세포살해능이 유의적으로 나타난 반면 정상 임파구에는 영향을 미치지 않았다. 이 결과를 바탕으로 권백의 임상응용의 가능성을 타진하고 그 작용기전을 관찰하기 위하여 tumor suppressor gene인 p53 발현을 northern blotting으로 검색하였다. 권백 물추출물인 fraction V를 100 μg/ml 투여시 U937에서 p53 발현이 증가하여 권백이 tumor suppressor에 관여함을 나타내었다. 그러나, $CHCl_3$, EtAc, 그리고 BuOH 분획은 100 μg/ml 투여시 p53 발현이 거의 나타나지 않은것으로 미루어 볼때 cell disruption이 일어난 것으로 사려된다. 권백이 암세포에만 독성을 나타내며 p53 발현 조절에 관여한다는 이상의 결과에서 앞으로 권백의 작용기전을 연구함으로서 새로운 항암물질 개발에 기여할 수 있으리라 사료된다.

참고문헌

1. Jonathan, D. O.: The role of p53 in cancer development. *Scientific American Science and Medicine*, September/October, 16(1994).
2. Gilman, A.G., Rall, T.W., Nies, A. and Taylor, P.: *Goodman & Gilman's The Phrmacological Basis of Thrapeutics*, Maxwell Macmillan, 18th. pp. 1202 (1991).
3. Hersh, E.M. and Ereish, E.J.: *In Methods in Cancer Research*, Academic Press, New York, pp. 335(1986).
4. Kawamura, H., Takemoto, N., Maruyama, H., Komatsu, Y., Aburada, M., and Hosoya, E.: *Recent Advances in the Pharmacology of Kampo Medicine*, Excerta Medica, pp. 291(1988).
5. 이인란, 송지영, 이윤실: 천연물로부터 항암물질의 분리. 생약학회지, **23**, 132 (1992).
6. 박재갑, 현진원, 임경화, 신진이, 원용진, 이영득, 신국현, 차의무, 우원식: 전통약용식물의 항암효과에 대한 연구. 생약학회지, **24**, 223 (1993).
7. 박성희, 이인자: 권백이 U937의 세포독성에 미치는 영향. 한국영양식량학회지, **23**, 799(1994).
8. Wu, J., Wang, Mi., Sheng, Y. and Zhu, D. X.: The role of p53 gene in the switch of U937 leukemic cells from growth into differentiation. *Shih-Yen-Sheng-Wu-Hsueh-Pao*, **25**, 311(1992).
9. Baker, S., Fearon, E., Nigro, J., Hanilton, S., Preisinger, A., MIlburn- Jessup, J., Van Tuinen, P., Ledbetter, D., Baker, D., Nakamura, Y., White, R. and Vogelsstein, B.: Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, **244**, 217(1989).
10. Monica, H.: p53 mutations in human cancers. *Science*, **253**, 49(1991).
11. Levine, A., Momand, J. and Finlay, C.: The p53 tumor suppressor gene. *Nature*, **351**, 453(1991).
12. Scott, W., Lowe, H., Earl, R., Tyler, J. and David, E. H. : p53- dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of

anticancer agents. *Cell,* **74**, 957(1993).

13. 유양석, 김정목, 정태준, 함경수, 조양자: Interleukin-2 활성의 측정 에 있어 ^{3}H-thymidine 흡수법과 Tetrazolium-based (MTT) Colorimetric assay의 비교. 대한면역학회지, **11**, 39(1989)
14. James, C., William, G. D., Adi, F., Gazder, J., Minna, D. and Mitchell, J.B.: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomatic colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res.,* **47**, 943(1987)
15. 김정목, 정태준, 정용훈, 조양자 : 마우스 비장 세포 임파구 및 사람 말초 혈액 임파구의 interleukin-2(IL-2) 생성 기전에 대한 연구. 대한 면역학회지, **11**, 79(1989)
16. 임대철, 김정목, 정태준, 정용훈, 조양자: 마이토젠 및 림포카인이 마우스 비장세포 임파구 및 사람 말초혈액 임파구 증식 반응에 미치는 영향. 대한면역학회지, **11**, 89(1989)
17. Chomczynski, P. and Sacchi, N.: Single step method of RNA isolation by acid guanidium thio cyanate phenol chloroform extraction. *Anal. Biochem.,* **62**, 156(1987).