

HL-60/MX2 세포에서 제주자생식물 8종의 화학 감작 효능

현재희, 부혜진, 홍지영, 강정일, 김상철, 유은숙, 강희경

제주대학교 의학전문대학원 약리학교실

Abstract

Chemosensitizing effects of 8 Jeju plants in HL-60/MX2 cell

Jae-Hee Hyun, Hye-Jin Boo, Ji-Young Hong, Jung-Il Kang, Sang-Cheol Kim, Eun-sook Yoo, Hee-Kyoung Kang

Department of Pharmacology, Jeju National University School of Medicine, Jeju, Korea

One of the major problems in chemotherapy is multidrug resistance (MDR) against anticancer drugs and MDR in cancer cells can lead to chemotherapeutic failure. To overcome MDR, in the study, we investigated the chemosensitizing effects of 8 Jeju plants in HL-60/MX2 cell, a human HL-60 leukemia cell line selected for resistance to mitoxantrone (MX). When HL-60/MX2 cells were treated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of eight plant extracts, *Amaranthus mangostanus*, *Osmanthus heterophylla*, *Staphylea bumalda* and *Vicia angustifolia* var. *segetilis* increased MX accumulation in HL-60/MX2 cells by 20.20 %, 19.56 %, 32.84 % and 24.67 %. The present results suggest promising indications for further development of these plant extracts as chemosensitizing agents. (J Med Life Sci 2010;7:122-125)

Key Words : HL-60/MX2, chemosensitizing effect, *Amaranthus mangostanus*, *Osmanthus heterophylla*, *Staphylea bumalda*, *Vicia angustifolia* var. *segetilis*

서론

암의 화학요법이 실패하는 가장 큰 원인은 항암제에 대한 내성의 출현으로 항암제가 제 역할을 하지 못하게 되면서 일어나게 된다¹⁾. 암 환자의 50%에 달하는 화학요법 대상 환자 중 90% 이상이 이러한 내성 출현으로 인해 사망하는 것으로 보고되고 있다²⁾. 항암제에 대한 내성은 장기적으로 항암제에 노출된 세포들이 항암제의 세포 내 축적을 감소시키거나, 해독 또는 배출 작용을 활성화하거나, 표적이 되는 단백질을 변형시키는 등의 여러 가지 기전을 통하여 일어나게 된다. 이러한 과정은 암 치료에 가장 큰 장애 요소일 뿐만 아니라 치료의 실패와도 깊은 관련이 있다³⁾. 항암제의 암세포로 전달이 감소되어 내성이 유발되는 기전을 통하여 한 개의 약제에 대한 내성을 획득한 이후 구조적으로나 작용 기전이 전혀 다른 약제들에 대한 교차 내성을 획득하는 것을 다약제 내성(MDR: Multidrug Resistance)이라고 한다⁴⁻⁸⁾. 항암제에 대한 내성을 억제하고 감수성을 증가시킬 수 있는 약물은 항암제에 대한 내성을 역전하여 결과적으로 항암제에 대해 감수성을 보이도록 감작한다고 하여 화학감작제

(chemosensitizer) 라고 하며, 다약물내성 조절제(MDR modulator) 또는 다약물내성 역전제(MDR reverter) 등으로도 불린다⁹⁾. 이러한 내성 억제 물질과 항암제를 동시에 투여함으로써 항암제에 대한 내성을 극복하고 암의 화학요법 치료 효능을 높이기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 연구에서는 제주에 자생하는 비름(*Amaranthus mangostanus*), 흑돌잎(*Lithophyllum okamurai*), 예덕나무(*Mallotus japonicus*), 연화바위솔(*Orostachys iwarenge* (Makino) Hara), 구골나무(*Osmanthus heterophylla*), 딱지꽃(위릉채)(*Potentilla chinensis*), 고추나무(*Staphylea bumalda*) 및 살갈퀴(*Vicia angustifolia* var. *segetilis*) 등 8종 식물의 화학 감작 효능을 조사하였다. 급성 전골수성 백혈병 세포인 HL-60를 모세포로 하면서 혈액암에 효과적으로 실제 많이 사용되고 있는 항암제 mitoxantrone(MX)에 내성을 지니고 있는 HL-60/MX2 세포를 사용하여 제주 자생식물 8종의 MX 축적 효과를 조사하여 화학 감작 효능을 평가하였다.

재료 및 방법

1) 시료

제주도 일대에서 비름(*Amaranthus mangostanus*), 흑돌잎(*Lithophyllum okamurai*), 예덕나무(*Mallotus japonicus*), 연화바위솔(*Orostachys iwarenge* (Makino) Hara), 구골나무

Address for correspondence : Hee-Kyoung Kang
Department of Pharmacology, Jeju National University School of Medicine, 66 Jejudaeakno, 690-756, Jeju, Korea
E-mail : pharmkhk@jejunu.ac.kr

(*Osmanthus heterophylla*), 딱지꽃(위릉채)(*Potentilla chinensis*), 고추나무(*Staphylea bumalda*) 및 살갈퀴(*Vicia angustifolia* var. *segetilis*)를 채집하여 상온 건조 시킨 후 80% MeOH로 추출하여 각각의 추출물을 얻어 실험에 사용하였다.

2) 세포 배양

HL-60 세포(ATCC CCL-240)를 모세포로 하여 항암제 MX에 의해 내성이 유도된 세포로 최대 190 nM MX 농도에서까지 세포 성장이 가능하며 etoposide, teniposide, daunorubicin 및 doxorubicin 등에 교차내성을 나타내는 HL-60/MX2 세포는 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 분양 받았다. HL-60/MX2 세포를 100 units/ml의 penicillin-streptomycin (GIBCO Inc, NY, USA)과 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; GIBCO Inc, NY, USA)이 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 계대배양은 3~4일에 한번씩 시행하였다.

3) 세포 내 약물 측정

세포 밖으로 약물을 배출함으로써 약물의 축적을 감소시키는 세포막 이동능을 유세포 분석기(Flow Cytometer, Coulter, Miami, FL, USA)를 이용하여 간접적으로 측정하였다. HL-60/MX2 세포(1.0 × 10⁶ cells/ml)를 무혈청 배지에 부유시킨 다음 각각의 식물 추출물을 10, 30, 75 및 100 µg/ml의 농도로 처리하였다. 37°C, 5 % CO₂ 항온기에서 3시간 동안 배양한 후 5 µM MX가 되도록 처리하고 3시간 동안 재배양 하였다. 세포를 차가운 PBS 용액으로 3번 세척한 후 500 µl PBS로 부유한 다음 유세포 분석기로 형광을 나타내는 세포를 측정하였다.

결과 및 고찰

내성이 생기는 대부분의 항암제들은 치료 초기에는 효과가 있으나 곧이어 내성이 출현하게 되고 결국 화학요법이 실패하는 결과를 초래하는데, 이러한 문제점을 극복하기 위한 방법으로 내성기전을 우회할 수 있는 항암제를 사용하거나, 항암제에 대한 내성을 억제하고 감수성을 증가시킬 수 있는 약물을 개발하려는 노력들이 이루어지고 있다.

본 연구에서는 제주도 일대에서 채집한 비름, 연화바위솔, 흑돌잎, 딱지꽃, 구골나무, 고추나무, 살갈퀴 및 예덕나무의 암세포에 대한 화학감작제 효능을 조사하였다. 비름(*Amaranthus mangostanus*), 흑돌잎(*Lithophyllum okamurai*), 예덕나무(*Mallotus japonicus*), 연화바위솔(*Orostachys iwarenge* (Makino) Hara), 구골나무(*Osmanthus heterophylla*), 딱지꽃(위릉채)(*Potentilla chinensis*), 고추나무(*Staphylea bumalda*) 및 살갈퀴(*Vicia angustifolia* var. *segetilis*)를 항암제 MX에 내성인 암세포주 HL-60/MX2에서의 항암제 MX의 세포 내 uptake 증가 효과를 나타내는지 세포내의 MX 축적을 유세포분석기로 측정하였다. 비름, 흑돌잎, 예덕나무, 연화바위솔, 구골나무, 딱지꽃(위

릉채), 고추나무 및 살갈퀴는 주로 아시아에 분포하고 있다 (Table 1). Fig 1에서 각각의 80% MeOH 추출물을 10, 30, 75 및 100 µg/ml의 농도로 처리하였을 때, HL-60/MX2에서의 MX 축적 증가를 조사하였다. 세포 밖으로 약물을 배출함으로써 세포 내 약물의 축적을 감소시키는 세포막 이동능을 유세포 분석기 (Flow Cytometer, Coulter, Miami, FL, USA)를 이용하여 간접적으로 측정하였고, 세포내로 MX 축적이 대조군에 비해 증가하는 정도를 백분율로 나타내었다. 비름 추출물을 처리하였을 때, Fig 1-A에 나타난 바와 같이, 12.10, 12.13, 20.08 및 20.20%로 MX 축적이 증가하였고 그래프에서 100 µg/ml 비름 추출물을 처리하였을 때, 대조군에 비해 세포내 MX 축적량이 증가하여 그래프가 오른쪽으로 이동하는 것을 확인할 수 있었다. 흑돌잎 추출물을 처리하였을 때 Fig 1-B에 나타난 바와 같이 약 9% 정도로 대조군에 비하여 MX 축적이 증가하지 않았으며, 예덕나무 추출물을 처리하였을 때 Fig 1-C에 나타난 바와 같이 10.3, 10.0, 11.3 및 11.8%로 대조군에 비하여 MX 축적이 증가하지 않았다. 또한, 연화바위솔의 경우 Fig 1-D에 나타난 바와 같이 9.4, 10.0, 10.1 및 10.1%로 MX 축적이 변하지 않았다. 구골나무 추출물을 처리하였을 때 Fig 1-E에 나타난 바와 같이, 10.3, 11.2, 16.8 및 19.5%로 MX 축적이 증가하였고 100 µg/ml 구골나무 추출물을 처리하였을 때 그래프에서 대조군에 비해 세포내 MX 축적량이 증가하여 그래프가 오른쪽으로 이동하는 것을 확인할 수 있었다. 딱지꽃(위릉채)의 경우 Fig 1-F에 나타난 바와 같이 11.3, 11.3, 14.7 및 14.8 %로 MX 축적이 약간 증가하는 것으로 나타났다. 고추나무와 살갈퀴 추출물을 처리하였을 때 Fig 1-G 및 H에 나타난 바와 같이 10.0, 15.3, 26.3 및 32.8%와 10.9, 13.7, 16.6 및 24.6%로 증가하였고, 100 µg/ml 고추나무와 살갈퀴 추출물을 처리하였을 때 대조군에 비해 세포내 MX 축적량이 증가하여 그래프가 오른쪽으로 이동하는 것을 확인할 수 있었다. 100 µg/ml 비름, 구골나무, 고추나무 및 살갈퀴 추출물을 처리하였을 때, 19.5 에서 32.8%로 MX 축적이 증가하는 것을 확인하였고, 흑돌잎, 예덕나무, 연화바위솔과 딱지

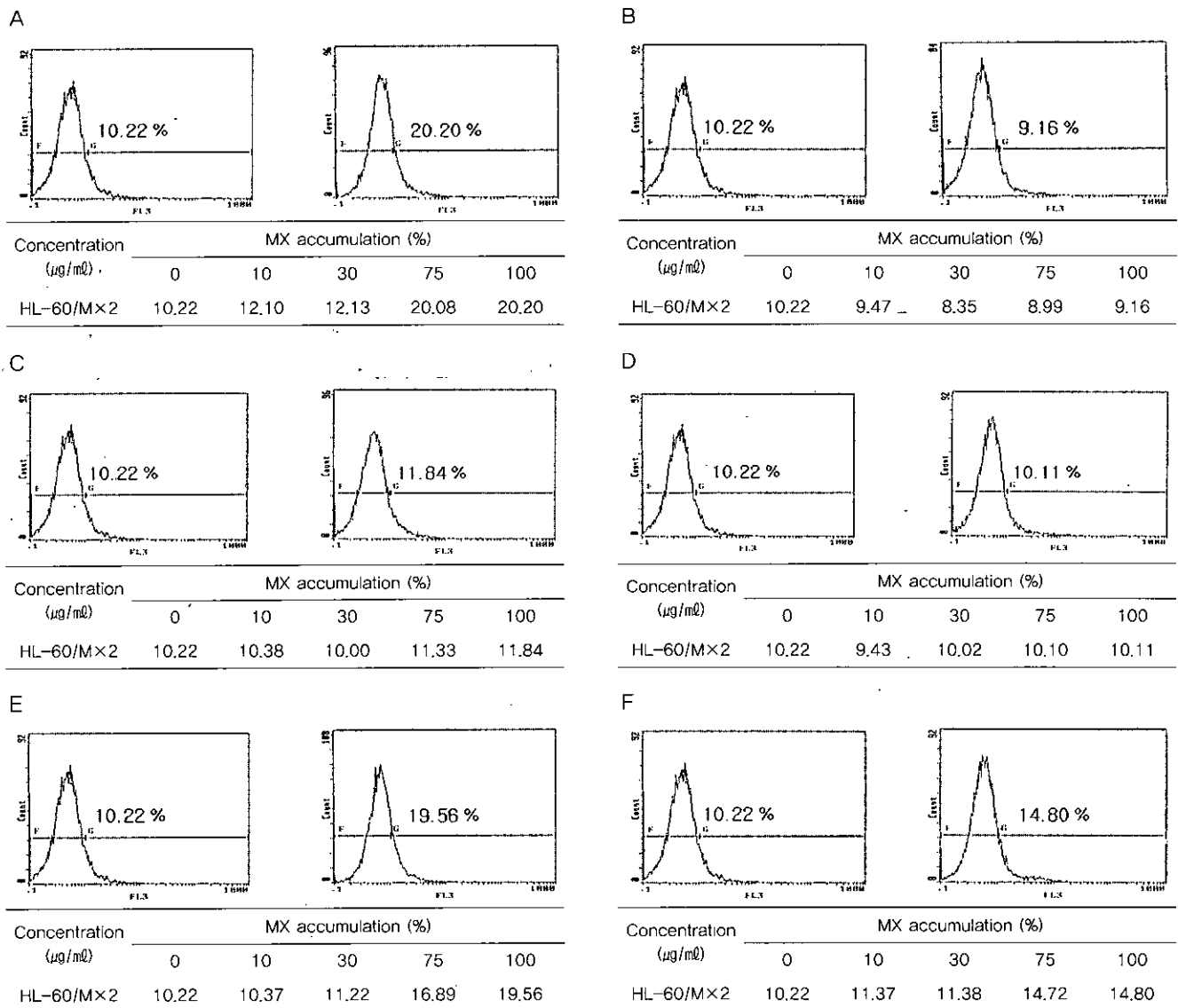
Table 1. List of the plants¹⁰⁾

Name	Scientific Name	Family	Place
비름	<i>Amaranthus mangostanus</i>	비름과	인도, 한국, 일본, 중국
흑돌잎	<i>Lithophyllum okamurai</i>	산호말과	한국
예덕나무	<i>Mallotus japonicus</i>	대극과	한국, 일본, 중국
연화바위솔	<i>Orostachys iwarenge</i> (Makino) Hara	돌나물과	한국
구골나무	<i>Osmanthus heterophylla</i>	물푸레 나무과	일본, 대만, 한국
딱지꽃 (위릉채)	<i>Potentilla chinensis</i>	장미과	한국, 중국, 러시아, 일본
고추나무	<i>Staphylea bumalda</i>	고추나무과	한국, 중국, 일본
살갈퀴	<i>Vicia angustifolia</i> var. <i>segetilis</i>	콩과	한국

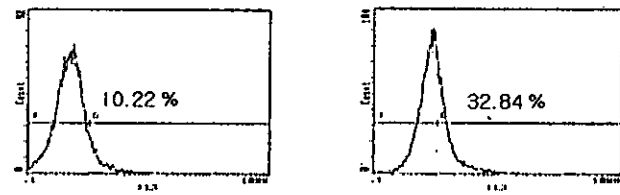
꽃(위릉채) 추출물을 처리하였을 때에는 9.4%에서 14.8%로 대조군에 비하여 MX 축적이 증가하지 않았다. MX 축적 증가를 보인 비름의 경우, 민간에서 안질, 이뇨제, 창종, 회충, 보익 등에 약재로 쓴다고 알려져 있고, 구골나무, 고추나무와 살갈퀴와 같이 어린 잎을 데쳐서 나물로 식용하고 있다¹⁰⁾.

비름, 구골나무, 고추나무 및 살갈퀴가 다약물내성 암세포에 대한 화학감작 효과가 유의적으로 나타나 항암제에 대한 내성을 극복하고 암의 화학요법 치료 효율을 높이는 데에 유용하게 활용될 가능성을 보였다.

Figure 1. Flow cytometry analyses of mitoxantrone(MX) accumulation in HL-60/MX2. HL-60/MX2 cells (1×10^6 /ml) were treated with 10, 30, 75 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of eight plant extracts. A) *Amaranthus mangostanus*, B) *Lithophyllum okamurai*, C) *Mallotus japonicas*, D) *Orostachys iwarenge* (Makino) Hara, E) *Osmanthus heterophylla*, F) *Potentilla chinensis*, G) *Staphylea bumalda*, H) *Vicia angustifolia* var. *segetilis* : MX accumulation was determined by flow cytometry as described in Materials and Methods.

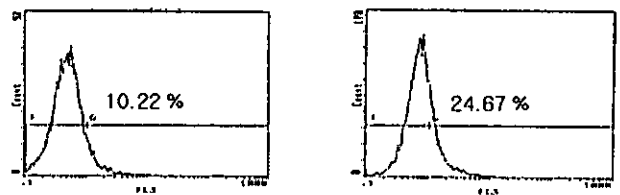


G



Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	MX accumulation (%)				
	0	10	30	75	100
HL-60/M \times 2	10.22	10.00	15.34	26.37	32.84

H



Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	MX accumulation (%)				
	0	10	30	75	100
HL-60/M \times 2	10.22	10.9	13.71	16.6	24.67

참 고 문 헌

- Hipfner DR, Deeley RG, Cole SP. Structural, mechanistic and clinical aspects of MDR1. *J Biol Chem* 1999;274(22):15420-6.
- Perez RP, Hamilton TC, Ozols RF, Young RC. Mechanisms and modulation of resistance to chemotherapy in ovarian cancer. *Cancer* 1993;71(4 Supp 1):1571-80.
- Shen DW, Fojo A, Chin JE, Roninson IB, Richert N, Pastan I, Gottesman MM. Human multidrug-resistant cell lines: increased mdr1 expression can precede gene amplification. *Science* 1986;232(4750): 643-5.
- Shen DW, Goldenberg S, Pastan I, Gottesman MM. Decreased accumulation of [^{14}C]carboplatin in human cisplatin-resistant cells results from reduced energy-dependent uptake. *J Cell Physiol* 2000;183(1):108-16.
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002;2(1):48-58.
- Schuetz EG, Beck WT, Schuetz JD. Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 1996;49(2):311-8.
- Goto S, Kamada K, Soh Y, Ihara Y, Kondo T. Significance of nuclear glutathione S-transferase pi in resistance to anti-cancer drugs. *Jpn J Cancer Res* 2002;93(9):1047-56.
- Urasaki Y, Laco GS, Pourquier P, Takebayashi Y, Kohlhagen G, Gioffre C, Zhang H, Chatterjee D, Pantazis P, Pommier Y. Characterization of a novel topoisomerase I mutation from a camptothecin-resistant human prostate cancer cell line. *Cancer Res* 2001;61(5):1964-9.
- Cheol-Hee Choi 다약물내성 기전으로서 ABC transporter와 화학감작제의개발. *생화학뉴스*. 2002.
- Tae-jung Kim wild flowers and resources plants in korea. 2009.