

사람 백혈병 암세포의 증식에 미치는 Berberine의 저해효과

김은영, 김광혁

고신대학교 의과대학 미생물학교실

Inhibitory Effects of Berberine on Proliferation of Human Leukemia Cells

Eun Young Kim, Kwang Hyuk Kim

Department of Microbiology, Kosin University College of Medicine, Busan 602-702, Korea

Abstract

Background : The isoquinoline alkaloid berberine is widely distributed in a variety of plants, especially in the genera *Berberis* and *Coptis*. The berberine, an alkaloid initially isolated from Chinese herbal medicine, has antibiotic activities against a variety of organisms including bacteria, viruses, fungi, protozoans, and chlamydia. Furthermore, berberine has shown a number of beneficial effects, including anti-tumor, anti-inflammation, and vasodilatory effects. Materials and **Methods :** In this work we have investigated the effects of berberine on cytotoxic activity against cancer cells. The direct cytotoxicity of berberine or berberine-combined chemotherapeutic agents for human leukemia cells K-562 was observed.

Results: The effect of growth inhibition for cancer cells, K-562 was shown in the cytotoxicity test of berberine or berberine-combined chemotherapeutic agents.

Conclusion: These findings suggest that berberine shows tumor cell growth inhibition. These results show the probability of its usefulness for cancer therapy if more research results were accumulated.

Key words : Berberine, K-562, Cytotoxicity

서론

Berberine은 황백(*Phellodendri cortex*) 및 황련(*Coptis rhizoma*)의 주성분인 isoquinoline 계 알칼로이드 물질로 전통적인 중의학에서 염증과 미생물감염 질환에 넓게 사용되었으며 혈압강화작용, 관동맥혈류증가작용, 지사작용, 건위, 정장, 지혈작용, 소염, 항암작용 등의 약리활성과 *Candida albicans* 등의 여러 가지 곰팡이, 박테리아, 원충, 바이러스, 기생충에 대하여 항균작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.¹⁻⁵⁾ Berberine을 많이 함유하고 있는 황련은 6가지의 식도암 세포주에서 증식의 저해를 보

였으며 세포주기 분석 결과 Go/G1기의 세포가 많아지고 S기의 세포가 상대적으로 감소하는 것으로 나타났다.⁶⁾ Chung 등⁷⁾은 berberine이 N-acetyltransferase 활성과 2-aminofluorene-DNA 형성이 저해됨을 사람 백혈병세포에서 관찰하여 보고하였다. Miura 등⁸⁾은 berberine이 쥐 흉선세포에서 아포프토시스를 유도함을, Kuo 등⁹⁾은 HL-60 백혈병세포에서도 같은 현상이 나타남을 보고하였다.

본 연구에서는 berberine의 항암작용을 보기위하여 사람 백혈병 암세포 K-562에 대한 직접적인 세포독성효과를 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구재료

교신저자 : 김 광 혁
주소: 602-703, 부산광역시 서구 압남동 34번지
고신대학교 의과대학 미생물학교실
TEL. 051-990-6422
E-mail: ghkim@ns.kosinmed.or.kr

1) 시약

Berberine과 mitomycin C 그리고 5-fluorouracil은 Sigma Co. (USA) 제품을 사용하였다.

2. 연구방법

1) 암세포에 대한 세포독성효과

사람 백혈병 유래의 세포주인 K-562세포(KCLB 10243)를 각각 25 cm² 플라스틱 플라스크(Falcon, Oxnard, USA)에서 10% 우태아혈청(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), 2 mM L-glutamine(Gibco, Grand Island, USA), 100 IU /ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 0.25 µg/ml amphotericin B(Gibco, Grand Island, USA)를 포함시킨 RPMI 1640 배지(Gibco, Grand Island, USA)로 부유 배양시켜 유지시켰다. 상기의 세포들을 96 wells plate에 well당 5,000개 (0.1 ml) 씩 분주하고 5% CO₂, 37°C에서 24시간 배양 후 berberine 단독처리의 경우 1, 10, 30 µg만을 투여하였으며 여기에 기존항암제인 mitomycin C 0.1 µg, 5-fluorouracil (이하 5-FU) 1.0 µg을 추가하여 복합작용의 효과를 보았다. 약제를 작용시킨 후 plate는 5% CO₂, 37°C 그리고 충분한 습도가 유지되고 있는 배양기에 2일 동안 배양하였다. 배양 후에 plate의 각 well에 Cell Counting Kit-8액(Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) 10 µl 씩을 적하하고 4시간 추가 배양하였다. Optical density (OD)는 microplate reader (Model 550 microplate reader, Bio-Rad, Richmond, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

2) 통계학적 분석

실험성적은 평균 또는 평균±표준편차로 나타냈으며 각 군 간의 통계학적 검정에는 Student's t-test를 사용하고 P값이 0.05 미만일 때 유의 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 암세포에 대한 세포독성효과

K562세포에 berberine을 노출시킨 후 나타나는 세포독성효과는 비 노출군인 대조군에 비하여 OD상의 감소를 보임으로서 in vitro에서의 시료노출에 의한 세포독성효과를 나타냈다. 즉, 세포독성은 K562세포(5x10³)에 ml당

시료를 1, 10, 30 µg 작용시켰을 때 각각 1.98, 1.78, 1.53을 나타낸 반면 대조군에서는 2.50을 나타냄으로서 통계학적 유의성을 보였다(P<0.01)(Fig. 1). K562세포에 항암제 mitomycin C를 작용시켰을 때는 2.23을 나타냈으며 mitomycin C와 함께 berberine을 상기와 동량 작용시켰을 때 1.68, 1.56, 1.11을 나타내어 berberine에 의한 세포독성의 상승효과를 보였다(Table 1). K562세포에 항암제 5-FU를 작용시켰을 때는 2.27을 나타냈으며 5-FU와 함께 berberine을 상기와 동량 작용시켰을 때 2.22, 1.69, 1.47를 나타내어 10 µg 이상 작용 군들에서 유의하게 세포독성의 상승효과를 보였다(Table 2).

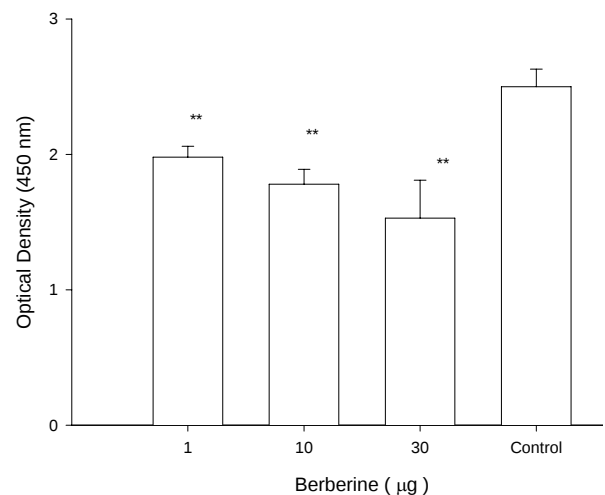


Fig1. Cytotoxic effect of berberine on K562 cells. Cytotoxicity was determined as described in Materials and Methods. Values are given as the mean±SD of triplicate cultures of one representative experiment **p<0.01 compared to the control.

Table 1. Cytotoxic effect of mitomycin C and berberine on K562 cells

Agents	Optical density(450 nm)
Mitomycin C, 0.1µg	2.23±0.14
Mitomycin C, 0.1µg + Berberine 1µg	1.68±0.12**
Mitomycin C, 0.1µg + Berberine 10µg	1.56±0.07**
Mitomycin C, 0.1µg + Berberine 30µg	1.11±0.03**
Control	2.50±0.13

K562 cells were exposed with chemotherapeutic agents and berberine for 48 hrs. Cytotoxicity was determined as described in Materials and Methods. Data are mean±SD. **p<0.01 compared to mitomycin C group.

Table 2. Cytotoxic effect of 5-fluorouracil and berberine on K562 cells

Agents	Optical density(450 nm)
5-fluorouracil, 1 μ g	2.27 $\pm$ 0.06
5-fluorouracil, 1 μ g + Berberine 1 μ g	2.22 $\pm$ 0.02
5-fluorouracil, 1 μ g + Berberine 10 μ g	1.69 $\pm$ 0.12**
5-fluorouracil, 1 μ g + Berberine 30 μ g	1.47 $\pm$ 0.02**
Control	2.50 $\pm$ 0.13

K562 cells were exposed with chemotherapeutic agents and berberine for 48 hrs. Cytotoxicity was determined as described in Materials and Methods. Data are mean $\pm$ SD. **p<0.01 compared to 5-fluorouracil group.

고찰

Berberine은 *Berberis aquifolium* (Oregon grape), *Berberis aristata* (tree tumeric), *Berberis vulgaris* (barberry), *Coptis chinensis* (coptis나 goldenthread), *Hydrastis canadensis* (goldseal) 등의 식물에서 생성되는 isoquinoline alkaloid이다.¹⁰⁾ Berberine은 중국의 경우에는 오랜기간 향생제로 이용하였으며 이 약제가 갖는 넓은 항균활성도와 낮은 독성 때문에 고농도로 사용되었다.¹¹⁾ 더불어 항암작용이 거론되면서 그 활성의 기전들이 보고 되고 있다.^{12,13)}

Fukuda 등¹⁴⁾은 결장암세포에서 cyclooxygenase-2(COX-2)가 대량으로 발현되고 이 효소가 결장암생성에 주요인자가 된다는 점에 착안하여 berberine이 결장암세포의 COX-2전사활성을 저해한다는 것을 발견함으로써 berberine의 항염증과 항암활성의 기전을 설명하였다. Mitani 등¹⁵⁾은 쥐 폐암세포의 림프전 전이에 미치는 berberine의 효과를 본 실험에서 berberine의 투여가 전이의 저해를 나타냈으며 기존 항암제인 CPT-11과 함께 작용시켰을 때 암세포성장을 크게 저하시킴을 발견하였다. 본 실험에서는 시험관내에서 사람 백혈병 암세포 K562에 대한 berberine의 직접적인 세포성장 저해 능력을 보기 위한 실험에서 유의성 있는 저해능을 보였으며 berberine의 농도에 의존적으로 성장저해를 나타냈다. 기존으로 항암요법에서 사용되고 있는 약제와 복합으로 berberine을 작용시켰을 때의 암세포 성장 억제능을 보기 위하여

K562세포에 mitomycin C와 berberine의 복합투여의 경우 1 μ g/ml 이상 농도의 berberine 투여군에서 mitomycin C 단독작용에 비하여 유의하게 성장 억제능을 나타냈다. 5-FU와 berberine의 복합투여의 경우 10 μ g/ml 이상 농도의 berberine 투여군에서 5-FU 단독 투여군에 비하여 억제능의 유의한 상승을 보였다. 이상의 결과는 타 항암제와 berberine의 복합 투여 시 치료효과를 위한 적정농도가 존재함을 알 수 있다.

결론

본 연구에서는 berberine의 항암작용을 보기위하여 암세포에 대한 직접적인 세포독성효과를 관찰하고자 하였다.

암세포인 K-562세포에 berberine을 단독으로 작용시켰을 때 암세포성장억제효과를, 기존항암제(mitomycin C, 5-fluorouracil)와 복합으로 작용시켰을 때에는 암세포성장억제효과의 상승효과를 보였다. 따라서 이러한 결과들은 앞으로의 추가적인 연구결과들이 있게 되면 임상에서의 암 치료에 berberine의 이용가능성을 시사한다 하겠다.

참고문헌

1. Chi CW, Chang YF, CHao TW, Chiang SH, Perg FK, Lui WY : Flowcytometric analysis of the effect of berberine on the expression of glucocorticoid receptors in human Hepatoma HepG2 cells. Life Sci 54: 2099-2107, 1994
2. Colombo ML, Bosisio E : Pharmacological activities of Chelidonium majus L. Pharmacol Res 33:127-134, 1996
3. Sun D, Abraham SN, Beachey EH : Influence of berberine sulfate on synthesis and expression of Pap fimbrial adhesion in uropathogenic Escherichia coli. Antimicrobial Agents Chemother 32 : 1274-1277, 1988
4. Sun D, Abraham SN, Beachey EH : Berberine sulfate blocks adherence of Streptococcus pyogenes to epithelial cells, fibronectin, and hexadecane. Antimicrobial Agents Chemother 32:1370-1374, 1988
5. Amin AH, Subbaiah TV, Abbasi KM : Berberine sulfate, antimicrobial activity, bioassay, and mode of action. Can J Microbiol 15:1067-1076, 1969
6. Okundae AL, Hufford CD, Richardson MD, Petterson JR, Clark AM : Antimicrobial properties of alkaloids from Xanthoriza simplicissima. J Pharm Sci 83:404-406, 1994
7. Chung JG, Chen GW, Hung CF, Lee JH, Ho CC, Ho HC : Effects of berberine on arylamine N-acetyltransferase activity

- and 2-aminofluorene-DNA adduct formation in human leukemia cells. *Am J Clin Med* 28:227-238, 2000
8. Miura N, Yamamoto M, Ueki T, Kitani T, Fukuda K, Komatsu Y : Inhibition of thymocyte apoptosis by berberine. *Biochem Pharmacol* 9, 1315-1322, 1997
 9. Kuo CL, Chou CC, Yung BYM : Berberine complexes with DNA in the berberine-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *Cancer Lett* 93:193-200, 1995
 10. Letasiova S, Jantoba S, Cipak L, Muckova M : Berberine-antiproliferative activity in vitro and induction of apoptosis/necrosis of the U937 and B16 cells. *Cancer Lett* 239:254-262, 2006
 11. Ghosh AK, Bhattacharyya FK, Ghosh DK : Amastigote inhibition and mode of action of berberine. *Exp Parasitol* 60:404-413, 1985
 12. Hano K : Pharmacological studies on metabolism of cancer tissues: Pharmacological studies on carcinostatic effects of some plant components and their derivatives (1). *Gann* 48:443-450, 1957
 13. Chang KSS, Gao C, Wang LC : Berberine-induced morphological differentiation and down-regulation of c-Ki-ras protooncogene expression in human teratocarcinoma cells. *Cancer Lett* 55:103-108, 1990
 14. Fukuda K, Hibiya Y, Mutoh M, Koshiji M, Akao S, Fujiwara H : Inhibition by berberine of cyclooxygenase-2 transcriptional activity in human colon cancer cells. *J Ethnopharmacol* 65:227-233, 1999
 15. Mitani N, Murakami K, Yamaura T, Ikeda T, Saiki I : Inhibitory effect of berberine on the mediastinal lymph node metastasis produced by orthotopic implantation of Lewis lung carcinoma. *Cancer Lett* 165:35-42, 2001