

## 왕지네(*Scolopendra subspinipes mutilans*)의 Bcl-xL 조절에 의한 HL-60 세포의 아폽토시스(Apoptosis) 유도

김길남<sup>1</sup> · 김상범<sup>2</sup> · 윤원종<sup>1</sup> · 양경식<sup>1</sup> · 박수영<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(재)제주하이테크산업진흥원 제주생물종다양성연구소  
<sup>2</sup>오현중학교

### Induction of Apoptosis by *Scolopendra subspinipes mutilans* in Human Leukemia HL-60 Cells through Bcl-xL Regulation

Kil-Nam Kim<sup>1</sup>, Sang-Bum Kim<sup>2</sup>, Weon-Jong Yoon<sup>1</sup>, Kyoung-Sik Yang<sup>1</sup>, and Soo-Yeong Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Jeju Biodiversity Research Institute, HIDI, Jeju 690-121, Korea

<sup>2</sup>Ohyun Middle School, Jeju 690-061, Korea

#### Abstract

The anticancer properties of *Scolopendra subspinipes mutilans* extract were investigated. The extract from *S. subspinipes mutilans* by 80% EtOH was fractionated with *n*-hexane, dichloromethan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), ethylacetate (EtOAc), and butanol (BuOH) in order. The EtOAc fraction showed the highest inhibitory activity (about 80%) against human leukemia (HL-60) cell growth at 50 µg/mL. To explore the mechanism of cytotoxicity, we used several measures of apoptosis to determine whether these processes were involved in EtOAc fraction-induced HL-60 cell death. Our results showed EtOAc fraction induced cell shrinkage, cell membrane blebbing, apoptotic body, and DNA fragmentation. The EtOAc fraction gradually decreased the expression of anti-apoptotic Bcl-xL and led to the activation of caspase-3, -9 and cleavage of PARP. These findings suggest that *S. subspinipes mutilans* exhibits potential anticancer properties.

**Key words:** *Scolopendra subspinipes mutilans*, anticancer, cytotoxicity, sub-G1 hypodiploid cell, apoptosis

#### 서 론

현재까지의 유용생물자원활용에 대한 관심이나 연구는 주로 한약재와 같은 식물군에 대하여 집중되어 왔으나, 동물군에 속하는 절지동물문(Arthropoda)의 이용개발에 대해서는 전 세계적으로 그 관심도가 아주 낮은 형편이었다. 그러나 최근에 들어 절지동물의 다양성과 활용성이 재인식됨과 동시에 농업과 생물 산업의 기술개발에 절지동물이 생물자원으로서 이용가능성이 높다는 확신을 갖게 되었다. 생물자원으로서의 이용이란 친적으로서의 활용, 생산적 이용, 약용 및 식용 등을 비롯하여 gene pool로서의 중요성 등이 강조될 수 있다. 특히 절지동물을 약용으로 사용했다는 기록은 동서양의학을 통해 잘 알려져 온 사실이며 우리나라에서도 오래 전부터 한방이나 민간요법에서 절지동물이 약용으로 쓰이고 있으나, 과거의 참고자료나 고서들에 있는 한방제로서의 효용이나 용법은 대부분이 과학적 분석결과가 없이 경험, 민간요법, 한의학의 시도에 의한 것들이다(1,2). 예로부터 한약제로 자주 이용되어 온 동물군으로는 주로 굼벵이, 누에,

동충하초, 지네 등 약 30여종이 유용동물군으로 이용되고 있다(3).

본 연구에 사용된 왕지네(*Scolopendra subspinipes mutilans*)는 분류학적으로 절지동물문(Arthropoda), 순각강(Chilopoda), 왕지네목(Scolopendromorpha), 왕지네과(Scolopendridae)에 위치한다(4). 오공(蜈蚣)은 왕지네과에 속한 지네류의 전충(全蟲)을 말린 것을 말하며, 천룡(天龍), 낭저(螂蛆), 무가천(無加天) 및 백족(百足) 등 많은 이명(異名)을 가지고 있는 동물성한약이다(5). 오공(蜈蚣)은 신농본초경(神農本草經)에 “蜈蚣味辛溫 主鬼注蟲毒 敢諸蛇蟲魚毒 殺鬼物 老精溫虐 去三蟲”라고 최초로 문헌에 기록된 이래, 본초강목(本草綱目)에서는 소아의 견풍, 전간, 경련, 단독, 독창(禿瘡), 나력(癩癧), 충사교상(虫蛇蛟傷) 등을 치료한다고 하였다(6,7). 또한 중국에서 발행된 중약대사전(中藥大辭典)에 따르면 약리학적으로 항종양작용, 진경작용, 항진균작용이 있다고 하며 결핵병의 치료, 백일해의 치료, 암증상의 치료에 관한 임상결과를 보고하고 있다(8).

2004년 통계청에 의하면 암은 우리나라 전체 사망원인의

\*Corresponding author. E-mail: user111@jejuhidi.or.kr  
Phone: 82-64-720-2820, Fax: 82-64-720-2301

26.3%를 차지하는 주된 사망원인이다(9). 이런 암은 현대 의학의 눈부신 발전으로 암을 진단하고 치료하는 다양한 방법들이 개발되어 인류의 건강 증진에 기여하였으나 아직도 해결해야 할 많은 문제점들이 남아있다. 특히 암 치료에 있어서 항암제 요법은 매우 중요한 부분을 차지하고 있지만 항암제 자체의 비특이성 및 독성으로 인한 정상세포의 손상은 해결해야 할 많은 과제에 남아있다. 그래서 오늘날 보다 안전한 천연항암제 개발이 활발히 이루어지고 있는 실정이다(10,11).

Apoptosis는 유전적으로 보존된 관련 유전자에 의해 이루어지며, 조절이 가능한 능동적 세포 죽음과정이다. 이 과정은 형태적으로 세포의 비중감소, 세포막의 파괴, 염색체의 응축 등과 더불어 세포내부의 물질들이 사멸체(apoptotic body)라는 포낭을 형성하고 형성된 사멸체들은 식세포 작용에 의해 제거됨으로써 염증을 유발하지 않는다(12). 반면 괴사(necrosis)는 직접적으로 독성이 있거나 물리적 상해 등 갑작스런 외부환경의 변화에 의해 유발되는 수동적 과정으로 염색사의 불규칙한 응집과 세포질의 팽창 과정을 거치게 되고 시간이 지나면 세포막이 파괴되면서 세포가 분해되고 이들은 염증을 유발하게 된다(13). 이에 apoptosis 유도에 의한 세포사멸은 종양이 항암치료에 의해 효과를 나타내는 중요한 기전으로 알려져 있다(14).

따라서 본 연구는 지금까지 많은 연구가 이루어져 있지 않은 약용동물 중에 외상, 종기, 종양, 결핵, 신경통, 관절통 등을 치료하는데 민간 약재로 사용해 왔다고 보고된 오공(蜈蚣) 중 왕지네(*Scolopendra subspinipes mutilans*)의 추출물을 이용하여 apoptosis로 암세포를 사멸시키는지 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 시료의 추출 및 용매분획

왕지네의 에탄올 추출물 및 순차적 분획물의 제조는 80% 에탄올(EtOH) 및 분획용 헥산(*n*-hexane), 디클로로메탄( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), 에틸아세테이트(EtOAc) 그리고 부탄올(BuOH)을 사용하여 용매의 극성을 이용한 순차적 추출법을 사용하였다. 즉 분말 건조된 시료에 80% 에탄올로 추출한 후 여과하여 얻어진 추출액을 감압 농축하여 동결건조기로 완전 건조시켰다. 상기의 과정을 3회 반복 추출하여 에탄올 추출물을 얻은 뒤, 건조된 에탄올 추출물에 10배량의 증류수와 동량의 헥산을 첨가하여 분획한 후 감압 농축하여 헥산 분획물을 얻었다. 동일한 방법으로 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 그리고 물 층을 분획하여 각각의 순차 분획물을 얻었으며, 모든 과정은 3회 반복 실시하였다.

### 세포배양

HL-60(human promyelocytic leukemia cells), B-16

(murine melanoma cells), CT-26(mouse colon cancer cells)과 A-549(human lung carcinoma cells) 세포주를 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)으로부터 분양 받아 100 units/mL의 penicillin-streptomycin(GIBCO, Grand Island, NY, USA)과 10%의 fetal bovine serum(FBS; GIBCO, Grand Island, NY, USA)이 함유된 RPMI 1640 또는 DMEM 배지(GIBCO, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  항온기에서 배양하였으며, 계대 배양은 3~4일에 한 번씩 시행하였다.

### 암세포 증식억제효과 측정(Cytotoxicity)

4종의 암세포(혈액암: HL-60, 피부암: B-16, 대장암: CT-26, 폐암: A-549)에 대한 왕지네의 80% 에탄올 추출물의 암세포 증식 억제 효과와 왕지네의 80% 에탄올 추출물의 순차적 분획물에 대한 HL-60 세포 증식억제 효과는 MTT 방법을 사용하여 행하였다. 이를 위해 암세포별로 3.0~5.0×10<sup>4</sup>/mL의 농도로 세포수를 조정하여 96-well plate의 각 well에 넣고, 시료를 농도별로 첨가하였다. 이를 3~4일간 배양한 다음, 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma, St. Louis, MO, USA) 100 µg을 첨가하고 4시간 동안 더 배양하였다. Plate를 1,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 조심스럽게 배지를 제거한 다음, dimethylsulfoxide(DMSO, Sigma, St. Louis, MO, USA) 150 µL를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후 microplate reader(Bio-TEK instrument, Inc., Winooski Vermont, WI, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 세포 증식억제 정도를 조사하였다.

### DNA 단편화 현상 측정

HL-60 세포(2.0×10<sup>5</sup>/mL)에 시료(100 µg/mL)를 처리하여 배양이 끝난 후 세포를 수집하여 Promega Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit(Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA를 1.0% agarose gel에서 20분(100 V) 동안 전기영동을 한 다음 ethidium bromide로 염색하고 UV transilluminator 하에서 DNA 단편화 현상을 관찰하였다.

### 세포주기 분석

HL-60 세포(2.0×10<sup>5</sup>/mL)에 시료 농도를 100 µg/mL로 처리하여 24시간 배양한 후, HL-60 세포를 수확하여 PBS(Phosphate Buffered Saline)로 세척하였다. HL-60 세포를 4°C에서 70% 에탄올로 30분 동안 고정시킨 후, PBS로 세척하고, RNase A를 처리한 다음 propidium iodide(PI, Sigma, St. Louis, MO, USA)로 염색하고, BD FACSCalibur™ Flow Cytometer(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)로 세포주기를 분석하였다.

### 핵의 형태학적 변화 측정

Apoptosis의 형태학적 특징 중의 하나인 핵의 변화를 관찰하기 위해 HL-60 세포( $2.0 \times 10^5$ /mL)에 시료를 처리(100 µg/mL)하여 배양이 끝나기 30분 전에 DNA 특이적으로 결합하는 생체 형광 염색액인 Hoechst 33342(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 DNA를 염색하고 형광현미경으로 관찰하였다.

### Immunoblotting

배양이 끝난 세포를 수집하여 2~3회 PBS(Phosphate Buffered Saline)로 세척한 후 1 mL의 lysis buffer를 첨가하여 30분간 lysis 시킨 후 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA(Bovine serum albumin)를 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay kit를 사용하여 정량하였다. 20~30 µg의 lysate를 8~12% mini gel SDS-PAGE(Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)로 변성 분리하여, 이를 PVDF 막(BIO-RAD)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 막의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS(TBS+0.1% Tween 20) 용액에서 상온에서 2시간동안 실시하였다. 단백질 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 Cell Signaling(Cell Signaling Inc., MA, USA)사의 Bcl-xL, Cleaved Caspase-3, -9와 PARP를 사용하였으며, TTBS 용액에서 1:1000 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP(Horse Radish Peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG(Amersham Pharmacia Biotech., NY)를 1:5000으로 희석하여 상온에서 30분간 반응시킨 후, TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질(Amersham Pharmacia Biotech., NY)과 1~3분간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

## 결과 및 고찰

### 에탄올 추출물 및 순차분획물의 수율

왕지네 시료(90.3 g)를 80% 에탄올로 추출한 후 여과하여 얻어진 추출액을 감압 농축하여 조추출물 19 g을 얻었다. 그리고 여기서 얻어진 에탄올 추출물(15 g)을 10배량의 증류수로 현탁시킨 후에 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트 그리고 부탄올 등으로 순차적으로 분획하여 헥산 층에서 1.35 g, 디클로로메탄 층에서 2.52 g, 에틸아세테이트 층에서 0.4 g, 부탄올 층에서 1.84 g 및 잔사인 물 층에서 8.33 g의 분획물을 얻었다(Fig. 1). 각 순차적 분획물의 수율은 Table 1에 나타내었으며, 추출에 사용한 왕지네 에탄올 추출물의 수율은 약 21.04%이었다. 에탄올 추출물에 대한 각 순차분획물 중 에틸아세테이트 분획물 수율이 2.67%로 가장 낮았고, 수용성 분획물이 55.53%로 가장 높은 수율을 보였다.

### 암세포 증식억제효과(Cytotoxicity)

왕지네 에탄올 추출물 및 순차적 용매분획물의 각종 암세

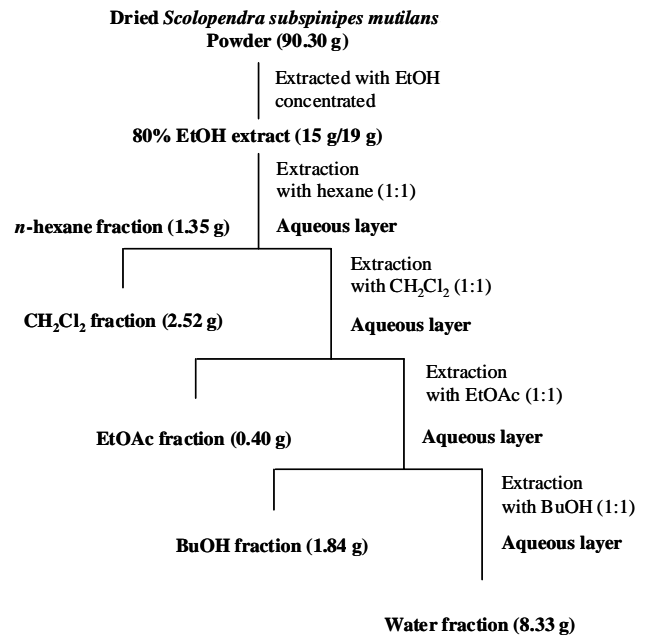


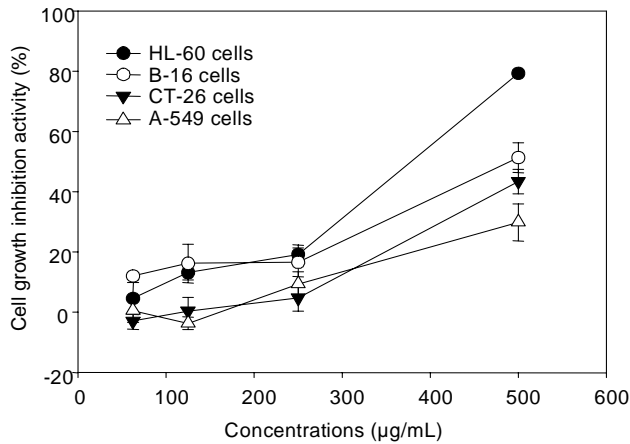
Fig. 1. Systematic purification of *Scolopendra subspinipes mutilans*.

Table 1. Yield of each fractions extracted from *Scolopendra subspinipes mutilans*

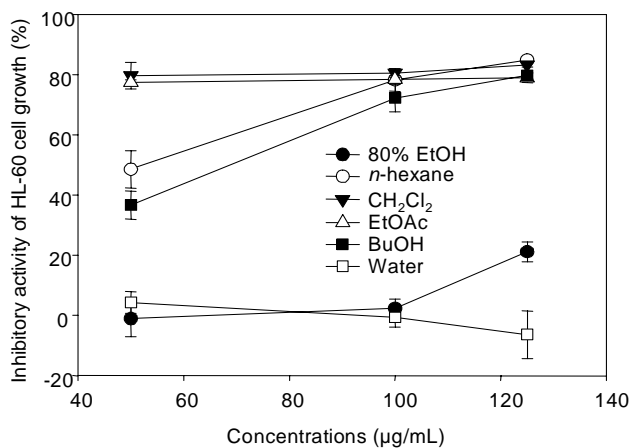
Solvent	Yield (% w/w) <sup>1)</sup>
EtOH extract	21.04
n-Hexane fraction	9.00
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> fraction	16.80
EtOAc fraction	2.67
BuOH fraction	12.27
Water fraction	55.53

<sup>1)</sup>Yield (%) = {solid extract or fraction (g) / raw material (dry weight)} × 100.

포(혈액암: HL-60, 피부암: B-16, 대장암: CT-26, 폐암: A-549)에서의 세포증식억제효과는 tetrazolium salt의 하나인 MTT를 사용하여 MTT의 환원에 의해 생성되는 formazan의 흡광도로 측정하였다. 그 결과 왕지네 80% 에탄올 추출물에서의 세포증식억제효과는 본 연구에 사용된 모든 암세포에서 농도 의존적으로 억제효과가 나타났지만 특히 혈액암 세포인 HL-60 세포에서 가장 우수한 세포증식억제효과를 보여주었다(Fig. 2). 이와 같은 결과는 지네의 에탄올 추출물이 HeLa(자궁경부암) 세포에 대한 증식억제효과가 있다는 결과와 일치하는 결과(15)로 지네가 항암효과가 있는 것으로 생각되어진다. 따라서 세포별 세포증식억제효과가 가장 높게 나타난 HL-60세포를 대상으로 순차적 용매분획물에 따른 세포증식억제효과 및 세포사멸 등의 생리기능 실험을 수행하였다. 그 결과 왕지네 에탄올 추출물 및 순차적 용매분획물에서의 세포증식억제는 HL-60 세포에 대해 낮은 농도에서도 디클로로메탄과 에틸아세테이트 분획물에서 아주 강한 세포성장 억제능을 보여주었으며, 헥산과 부탄올 분획물에서는 고농도에서 세포증식억제효과를 나타냈다.



**Fig. 2.** Inhibitory effect of *Scolopendra subspinipes mutilans* against growth of the tumor cells (HL-60, B-16, CT-26, and A-549 cells). Cells were treated with different concentrations (62.5, 125, 250, and 500 µg/mL) for 96 hours and measured for cell viability by MTT assay to determine cell growth inhibitory activity.

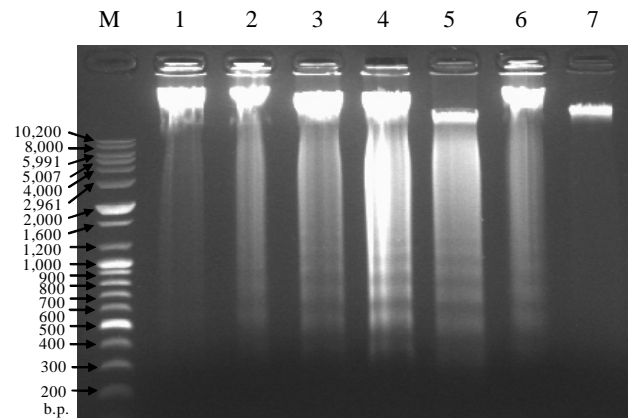


**Fig. 3.** Inhibitory effect of *Scolopendra subspinipes mutilans* against growth of HL-60 cells. Cells were treated with various concentrations (50, 100, and 125 µg/mL) of *Scolopendra subspinipes mutilans* and measured for viability by MTT assay at 96 hours after treatment of *Scolopendra subspinipes mutilans*.

그러나 잔사인 수용성분획물인 경우는 본 연구에 사용된 농도 범위에서는 세포증식억제효과가 나타나지 않았다(Fig. 3).

#### DNA 단편화 현상

왕지네 용매분획물의 세포독성효과에 의한 HL-60 세포에서의 세포증식 억제작용이 apoptosis 유도에 의한 것인지 그 기전을 알아보기 위하여, apoptosis 유도에 의하여 나타나는 DNA 단편화 현상을 전기영동을 통해 확인하였다. 왕지네 에탄올 추출물 및 순차적 용매분획물의 농도를 100 µg/mL로 하여 관찰한 결과 모든 분획물에서 DNA 단편화 현상이 나타났으나, 그 중 디클로로메탄과 에틸아세테이트 분획물에서 HL-60 세포에 대한 DNA 단편화 현상이 가장 두드러지게 나타났다(Fig. 4).

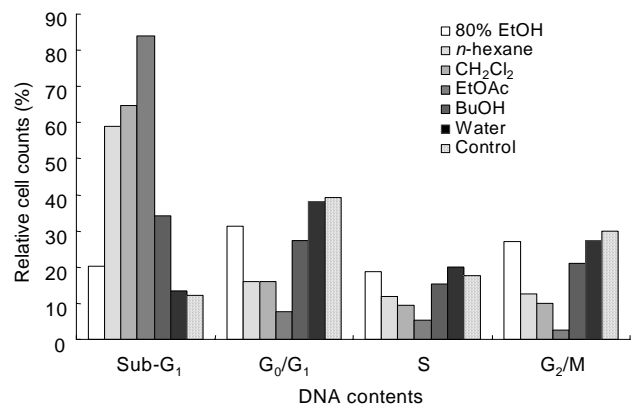


**Fig. 4.** DNA fragmentation by *Scolopendra subspinipes mutilans* extracts in HL-60 cells.

HL-60 cells ( $2 \times 10^5$ /mL) were treated with the *Scolopendra subspinipes mutilans* (100 µg/mL) for 24 hours. The DNA was isolated and subjected to 1.2% agarose gel electrophoresis for staining with ethidium bromide. Lane M: DNA maker, Lane 1: control, Lane 2: 80% EtOH ext., Lane 3: n-hexane fr., Lane 4: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fr., Lane 5: EtOAc fr., Lane 6: BuOH fr., Lane 7: water.

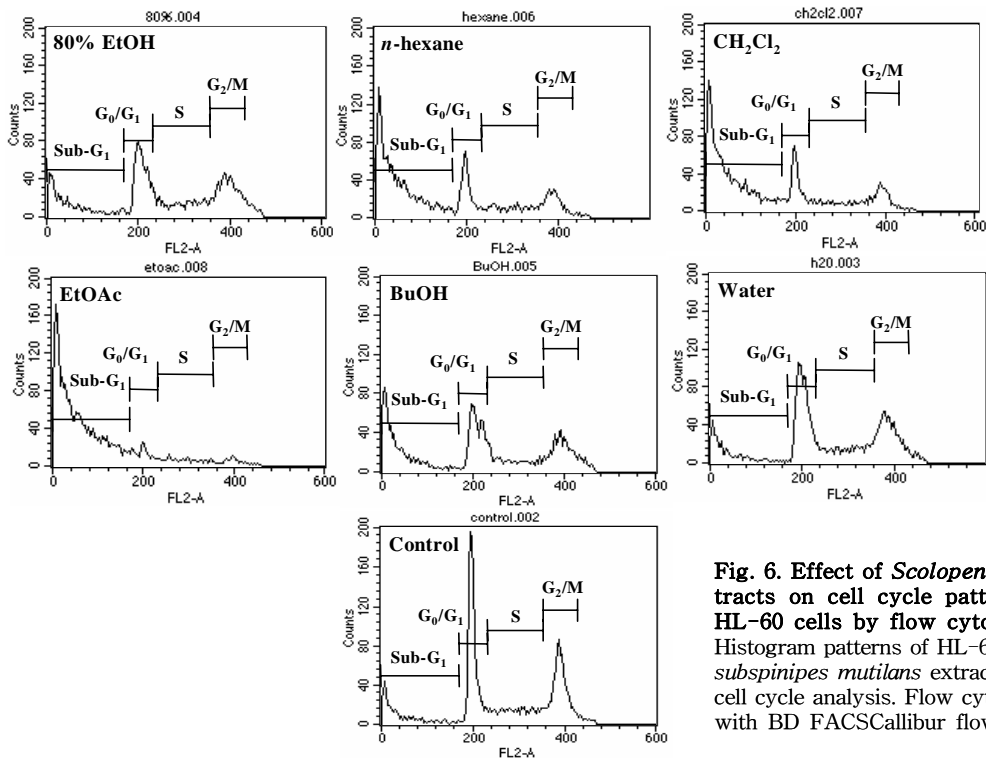
#### 세포주기 분석

왕지네 에탄올 추출물 및 순차적 분획물의 apoptosis 유도에 의하여 sub-G1 hypodiploid 세포가 증가하는지 알아보았다. 즉 DNA에 결합하여 형광을 나타내는 물질인 PI로 염색한 후 유동세포분석기(Flow Cytometry)를 이용하여 세포내 DNA 함량을 sub-G1 구간을 환산하여 apoptotic cell의 percentage로 측정하였다. 그 결과 핵산, 디클로로메탄과 에틸아세테이트 분획물에서 HL-60 세포에 100 µg/mL의 농도로 처리하여 control과 비교 관찰시, sub-G1 hypodiploid 세포가 control(12.2%)에 비해 에탄올 추출물은 20.28%, 핵산 분획물은 58.99%, 디클로로메탄 분획물은 64.63%, 에틸아세테이트 분획물은 84.14%, 부탄올 분획물은 34.19% 그리고 수



**Fig. 5.** Bar graph for cell cycle patterns of HL-60 cells treated by *Scolopendra subspinipes mutilans*.

HL-60 cells ( $3.5 \times 10^5$ /mL) were treated with 100 µg/mL of *Scolopendra subspinipes mutilans* extracts for indicated 24 hours. Flow cytometric analysis was performed with BD FACSCalibur flow cytometer (BD, USA).



**Fig. 6.** Effect of *Scolopendra subspinipes mutilans* extracts on cell cycle pattern and apoptotic portion in HL-60 cells by flow cytometric analysis.

Histogram patterns of HL-60 cells treated with *Scolopendra subspinipes mutilans* extracts (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 24 hours by cell cycle analysis. Flow cytometric analysis was performed with BD FACSCallibur flow cytometer (BD, USA).

용성 분획물은 13.37%로 나타났다. 특히 에틸아세테이트 분획물인 경우는 조추출물인 에탄올 분획물에 비하여 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 세포가 약 4배 정도 감소되었고 sub-G<sub>1</sub> hypodiploid 세포가 약 4.2배 이상 증가하였다(Fig. 5, 6).

세포는 성장 분열을 하기 위해서 G<sub>1</sub> 세포주기를 거쳐 S 세포주기로 이행되어야 한다(16). 대부분의 종말 분화 세포들은 거의 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 세포주기에 머물러 있다가 결국 세포의 자연사(apoptotic cell death)를 맞게 된다. 세포가 손상을 입게 되면 세포분열을 하기 전에 G<sub>1</sub> 세포주기에 머물면서 apoptosis 유도으로 갈 것인지, 혹은 손상을 수복한 후 재분열을 할 것인지를 결정하게 된다(17). 그래서 G<sub>1</sub> 세포주기는 세포의 항상성 유지에 필수적인 과정이라 할 수 있다.

따라서 왕지네의 핵산, 디클로로메탄 및 에틸아세테이트 분획물에 의해 G<sub>1</sub> 세포주기가 arrest 되면서 sub-G<sub>1</sub> hypodiploid 세포가 증가된다는 결과는 앞 실험결과인 암세포 증식 억제 현상이 apoptosis 유도에 의해 일어남을 간접적으로 뒷받침해줄 수 있는 결과라 할 수 있다.

#### 핵의 형태학적 변화

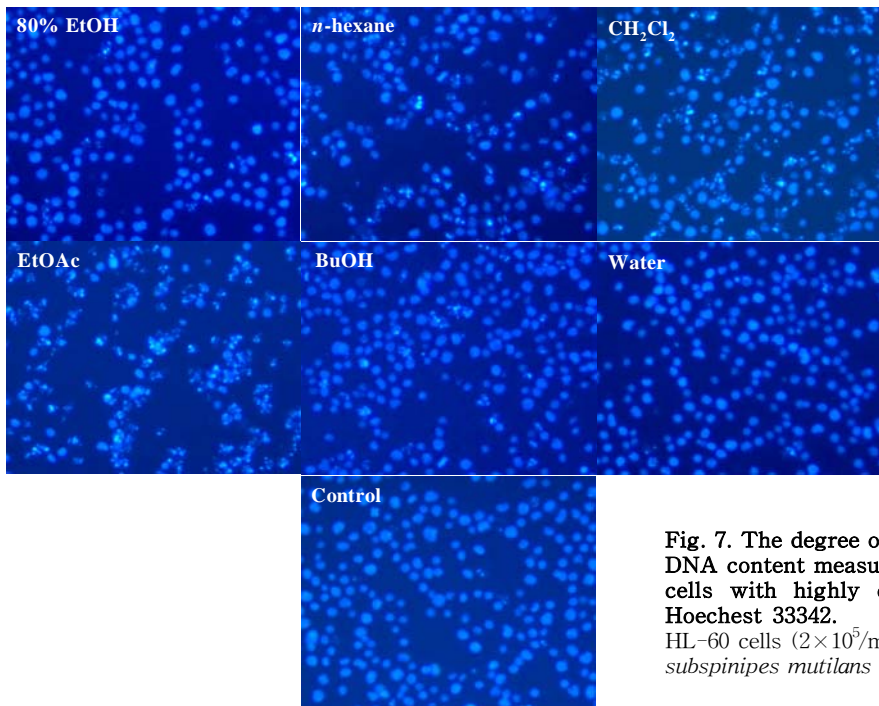
Apoptosis 유도 기전에 대하여는 확실하게 증명된 바는 없지만 세포질 내 칼슘치가 증가되어 칼슘의존성 endonuclease가 활성화되어 핵내 DNA 분절이 일어나며, transglutaminase가 활성화되어 세포질 내 단백질의 cross-linking이 일어나면서 세포질 농축이 일어나고 수액이 세포 밖으로 빠져나가면서 apoptotic bodies를 형성하는 것으로 알려져 있다(18-21). 이에 apoptosis 유도가 일어난 세포에서

볼 수 있는 가장 특징적인 변화인 형태학적 변화를 조사하였다. 그 결과 정상세포핵의 형태는 정상적인 둥근 형태이나 핵산, 디클로로메탄 그리고 에틸아세테이트 분획물에서 세포의 크기가 축소되며, 핵의 모양이 불규칙하고 부분적인 핵의 응집현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 7).

#### Apoptosis 관련 단백질 발현 변화

Apoptosis 유도의 분자적 기전을 밝히기 위해 anti-apoptosis 단백질로 알려진 Bcl 단백질군(Bcl-2와 Bcl-xL)과 pro-apoptosis 단백질인 Bax의 발현을 확인하여 보았다. Apoptosis 유도가 일어나는 경우에 Bcl-2 단백질의 감소 및 Bax 단백질의 증가가 관찰되는 경우가 많다. Bcl-2는 분자량 26-kDa의 단백질로서 chemoresistance에 중요한 역할을 담당하여 여러 종류의 자극에 대해 apoptosis 유도를 억제하는 특이기능을 가지고 있다고 알려져 있다. Bax는 이와는 반대로 apoptosis 유도를 유발하여 세포사멸을 촉진하는 기능이 있다. Bax는 Bcl-2와 heterodimer를 형성함으로써 Bcl-2의 anti-apoptotic 효과를 방해한다(22). Fig. 8에서 보는 바와 같이 왕지네 에탄올 추출물 및 순차적 분획물을 처리 시, 핵산, 디클로로메탄 그리고 에틸아세테이트 분획물에서 Bcl-xL 발현이 감소하였다. 그러나 Bax 단백질 발현은 아무런 변화가 없었다(data not shown). 이는 Bcl-xL의 작용기전에 의해 apoptosis 유도가 시작되는 것을 알 수 있다.

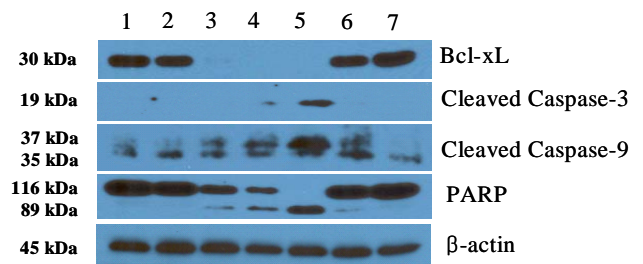
현재까지 수많은 apoptosis 유도 관련 유전자가 알려져 있는데, 그 중에서도 공통적인 경로는 단백질 분해 효소의 활성화와 관련이 깊음이 알려졌다. 특히 시스테인계의 단백질



**Fig. 7.** The degree of apoptosis is represented as the DNA content measured by the photographs showing cells with highly condensed nuclei stained with Hoechst 33342.

HL-60 cells ( $2 \times 10^5$ /mL) were treated with *Scolopendra subspinipes mutilans* extracts (100  $\mu$ g/mL) for 24 hours.

분해 효소인 caspase가 발견되면서 apoptosis 유도 기전의 중심적인 요소로 여겨지고 있다(23). Caspase는 tetrapeptide motif를 인식하여 기질을 절단하는 cystein protease이며, 그 인식 peptide의 특이성은 caspase isoform에 따라 차이를 나타낸다. 현재까지 14종류의 caspase isoform들이 보고되었는데, 이들 중 caspase-3이 세포사멸 분야에서 가장 보편적인 관심을 받아왔다. Caspase-3은 다양한 apoptosis 유도 자극에 의해서 공통적으로 활성화될 수 있으며, 활성화된 caspase-3은 여러 종류의 caspase와 PARP를 절단하거나 직접적으로 핵의 응축과 DNA 절단에 영향을 주어 apoptosis를 유도한다(24). Caspase-3이 활성화되기 위해서는 procaspase-3을 절단하는 caspase-9가 있어야하며, procaspase-9가 활성화되기 위해서는 미토콘드리아로부터 세포질내로 cytochrome c가 유리되어야 한다. Cytochrome c의 방출은 cytochrome c의 방출을 도와주는 Bax 단백질양의 증가하거나 cytochrome c의 방출을 억제하는 Bcl 단백질양의 감소에 의해 방출을 하게 된다. PARP는 핵 내에 존재하는 효소 중의 하나로서, 그 촉매부위는 caspase-3을 포함한 여러 caspase에 의해 절단되고 절단된 PARP는 DNA에 직접적으로 영향을 미쳐 apoptosis를 유도하게 된다(25). HL-60 세포에 왕지네의 에탄올 추출물 및 순차적 분획물을 각각 처리한 후 단백질을 분리하여 effector caspase의 하나인 caspase-3이 활성화되는지 조사하였다. 또한 손상된 DNA 복구에 관여된 단백질로서 apoptosis 과정 중 caspase에 의해서 절단되는 것으로 보고되어 있는(25) PARP가 caspase의 작용에 의하여 절단되는지 같은 조건하에 비교 분석하였다. 그 결과 Fig. 8에서 보는 바와 같이 왕지네 에탄



**Fig. 8.** Effect of *Scolopendra subspinipes mutilans* extract on apoptosis-related proteins in HL-60 cells by western blot analysis. Effect of *Scolopendra subspinipes mutilans* extract on the extract on the expressions of Bcl-xL, caspase-3, -9, and PARP in HL-60 cells. Lane 1: control, Lane 2: 80% EtOH ext., Lane 3: *n*-hexane fr., Lane 4:  $CH_2Cl_2$  fr., Lane 5: EtOAc fr., Lane 6: BuOH fr., Lane 7: water.

올 추출물 및 순차적 분획물을 처리하였을 때 핵산, 디클로로메탄 및 에틸아세테이트 분획물에서 caspase-3의 활성화형(19 kDa)의 밴드를 확인할 수 있었다. 또한 상위 기전인 caspase-9 역시 caspase-3의 발현 양상과 마찬가지로 핵산, 디클로로메탄 그리고 에틸아세테이트 분획물에서 단백질 발현이 대조구에 비해 증가되는 경향을 보였다. 그리고 이러한 결과는 caspase-3의 활성화에 의하여 기질인 PARP(116 kDa)가 절단되어 85 kDa의 밴드가 나타나는 처리구와 거의 일치함을 보였다. 이는 anti-apoptosis 단백질인 Bcl-xL에 의해 하위 기전인 caspase-9와 -3 단백질이 활성이 일어나고 apoptosis 유도에 직접적으로 관여하는 PARP 단백질을 활성화 시키면서 apoptosis로 유도되는 것을 알 수 있다.

## 요 약

왕지네 에탄올 추출물 및 순차적 분획물 중 디클로로메탄과 에틸아세테이트 분획물에서 HL-60 세포 성장이 강하게 억제되었다. 또한, 디클로로메탄과 에틸아세테이트 분획물을 처리하였을 때 apoptosis의 특징인 DNA 절편화, 핵의 응축과 apoptotic body가 관찰되었다. 이는 왕지네 분획물의 암세포성장 억제가 apoptosis에 의해 억제되는 것을 알 수 있었다. 디클로로메탄과 에틸아세테이트 분획물의 apoptosis 유도는 anti-apoptosis 단백질인 Bcl-xL의 억제를 통하여 apoptosis 유도가 시작되고 세포사멸에 직접적으로 영향을 미치는 caspase-3과 PARP의 활성을 일으켜 apoptosis를 유도하였다. 본 연구는 왕지네의 항암효과를 과학적 근거를 제시하고 기능성식품이나 항암제로 개발할 있는 가능성을 제시하였다. 향후 왕지네를 이용한 제품의 개발을 위해서는 유효성분의 동정 및 그 성분의 작용 기전에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 보인다.

## 감사의 글

본 연구는 지식경제부 지방기술혁신사업(RTI04-02-07) 지원으로 수행되었으며, 지원에 감사드립니다.

## 문 헌

- Park KT, Lee JS. 1998. Review on insect resources for medical use in Kangwon province. *Kor J Apiculture* 13: 79-92.
- Park JY, Heo JC, An SM, Yun EY, Hanl SM, Hwang JS, Kang SW, Yun CY, Lee SH. 2005. High throughput-compatible screening of anti-oxidative substances by insect extract library. *Korean J Food Preserv* 12: 482-488.
- Kang I, Kim H, Chung C, Kim S, Oh D. 2000. Effects of *Protactia orientalis* (Gory et Perchlon) larva on the lipid metabolism in ethanol administered rats. *J Korean Soc Food Nutr* 29: 479-484.
- Chang TH. 1996. The classification of Korean centipedes (class Chilopoda). *Thesis of MBE*. Kangreung University. p 80.
- Kim SN. 2005. Study on genetic analysis and extract cytotoxicity of *Scolopendra subspinipes multitalans* L. Koch. *MS Thesis*. Wonkwang University. p 37.
- Ro KW, Shim SD, Kim YC, Chin YW. 2005. A case of a centipede bite. *Korean J Dermatol* 43: 678-680.
- Choi JS. 1997. Studies on the purification, characterization and structure of antibiotics from Centipedes *Scolopendra subspinipes multitalans* L. KOCH. *MS Thesis*. Hanyang University. p 59.
- Oh CY, Deung MN, Kang BS, Shin MK, Lee JC. 2002. *Medicinal Animal Science*. Uisungdang, Seoul, Korea. p 217-220.
- Annual Report on the Cause of Death Statistics. 2004. National Statistical Office, Korea.
- Ronald RW, Siraj IM. 2000. A synopsis cause and prevention strategies. In *Nutrition and Cancer Prevention*. Ira W, ed. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA. p 1-12.
- Clifford C, Kramer B. 1993. Diet as risk and therapy for cancer. *Med Clin North Am* 77: 725-744.
- Clarke PG, Clarke S. 1995. Historic apoptosis. *Nature* 378: 230.
- Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, Dumont JE, Galand P. 1991. Tumor necrosis factor induces apoptosis in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol* 138: 447-453.
- Chresta CM, Arriola EL, Hickman JA. 1996. Apoptosis and cancer chemoterapy. *Behring Inst Mitt* 97: 232-240.
- Lee YK. 1992. (The) composition and activity of extracts from Korean herbal druga on cancer cells. *MS Thesis*. Dankook University. p 12.
- Sherr CJ. 1993. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73: 1059-1065.
- Hartwell LH, Weinert TA. 1989. Cherkpoints: controls that ensure the order of cell cycle event. *Science* 246: 629-634.
- Wyllie AH. 1992. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev* 11: 95-103.
- Fesus L, Davies PJA, Piacentini M. 1991. Apoptosis: molecular mechanisms in the programmed of cell death. *Eur J Cell Biol* 56: 170-177.
- Fesus L, Thomazy V, Autuori F, Ceru MP, Tarcsa E, Piacentini M. 1989. Apoptotic hepatocytes become insoluble in detergents and chaotropic agents as a result of transglutaminase action. *FEBS Lett* 245: 150-154.
- Piacentini M, Autuori F, Dini L, Farrace MG, Ghibelli L, Piredda L, Fesus L. 1991. Tissue transglutaminase is specifically expressed in neonatal rat liver cells undergoing apoptosis upon epidermal growth factor stimulation. *Cell Tissue Res* 263: 227-235.
- Kroemer G. 1997. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 3: 614-620.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171-176.
- Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. 1994. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371: 346-347.
- Hideki S, Masato E. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391: 96-99.

(2008년 9월 4일 접수; 2008년 10월 22일 채택)