

권백의 Caspase-3 활성화를 통한 HL-60 세포에서 세포사멸 유도효과

남항우¹ · 이성원¹ · 안병상¹ · 조원준 · 김영목 · 문연자¹ · 안성훈¹ · 우원홍^{1,2*}

원광대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 원광대학교 한의화 전문대학원, 2: 원광대학교 한의과대학 해부학교실

Effects of Selaginella Tamariscina on Apoptosis via the Activation of Caspase-3 in HL-60

Hang Woo Nam¹, Sung Won Lee¹, Byung Sang An¹, Won Joon Chough, Yeong Mok Kim, Yean Ja Mun¹, Seong Hun Ahn¹, Won Hong Woo^{1,2*}

Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine,

1: Department of Professional Graduate School of Oriental Medicine, 2. Department of Anatomy, College of Oriental Medicine

In our previous studies, we reported that Selaginella Tamariscina(ST) induced apoptotic cell death in HL-60 cells selectively. The cell viability after treatment with extract of ST was quantified by MTT assay and trypan bleu exclusion method. The results showed that application with ST in HL-60 induced 40% cell death at the concentration of 400 µg/ml. The cancericidal effect of Selaginella Tamariscina was mediated by apoptosis. Thus, HL-60 cells exposed to Selaginella Tamariscina displayed the DNA fragmentation ladder and nucleus chromatin condensation characteristic for apoptosis. The enzyme activity of caspase-3 and activated caspase-3 protein were markedly increased in HL-60 cells treated with the extract of Selaginella Tamariscina. In addition, the extract of Selaginella Tamariscina induced cleavage of PARP, a known substrate for caspase-3. The expression of Bcl-2, anti-apoptotic protein, was decreased by treatment of the aqueous extract of Selaginella Tamariscina in a dose-dependent manner. And the expression of pro-apoptotic Bax protein was increased. In conclusion, our results suggest that the extract of Selaginella Tamariscina may induce the apoptotic death of HL-60 cells via activation of caspase-3, cleavage of PARP protein, depletion of cellular ATP levels and Bcl-2 degradation.

Key words : Selaginella Tamariscina, apoptosis, HL-60, caspase-3, PARP, Bcl-2

서 론

암은 내적 요인인 유전적 요소와 외적 요인인 암발생 유발 요소로 작용되는 발암 화학물질, 방사선과 자외선, 지속적인 염증과 손상, 암유발 바이러스(oncogenic virus) 감염의 복합적 요소 등이 작용하여 숙주의 조절기구에서 벗어난 미분화 세포가 자율적으로 증식하는 질환이다¹⁻⁴). 이러한 암의 치료는 주로 암세포에 직접적으로 살상작용을 나타내는 치료방법으로서 수술요법 · 방사선요법 · 화학요법 등이 사용되어 왔으나, 정상세포에 대한 많은 부작용 때문에 최근 부작용이 적은 천연물에 대한 관심

이 고조되고 있으며, 특히 새로운 치료법으로서 면역요법이나, 세포분화유도법, 혈관형성저해법, apoptosis 등과 관련된 연구가 활발히 이루어지고 있다^{4,5}). 이 중 세포예정사 (programmed cell death)로 혼용되어지는 apoptosis⁶⁻⁷)는 세포막과 핵내에 특이한 형태학적 변화가 동반되는데 세포크기의 축소, 세포막으로부터 세포막용기가 돌출하는 현상, 여러 형태의 세포내용물이 세포로부터 떨어져 나온 apoptotic body라는 특수한 구조를 형성하는 특징, 핵 내에서의 염색사 응축, 핵 분절이나 DNA fragmentation 등과 같은 특이한 변화가 동반되는 현상으로, apoptosis가 일어난 세포는 주변의 세포들이나 macrophage 등의 식세포작용에 의해 제거되므로 부작용이 적어 이러한 특징을 활용하여 암의 치료에 apoptosis 기전을 응용하는 많은 연구가 진행되고 있다⁸⁻¹²). 한의학에서 암은 육음침습(六淫侵襲) · 칠정내상(七情內

* 교신저자 : 우원홍, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의화전문대학원
· E-mail : whwoo@wonkeang.ac.kr · Tel : 063-850-6845
· 접수 : 2003/03/25 · 수정 : 2003/04/26 · 채택 : 2003/05/28

傷)·음식노권(飮食勞倦) 등의 발생원인에 의하여 기혈어체(氣血瘀滯)·담습응취(痰濕凝聚)의 병기가 발생되고 기체혈어(氣滯血瘀)·진고담결(津枯痰結)의 병리적 현상이 발생되어 결국 암이 형성된다^{4,13-14)}. 따라서 암의 치료 또한 증형에 따라 건비익기(健脾益氣), 자보간신(滋補肝腎) 등의 부정법(扶正法)과 활혈화어(活血化瘀), 화담연경(化痰軟堅) 등의 거사법(祛邪法), 그리고 동시에 부정법과 거사법을 응용한 부정거사법(扶正祛邪法)이 이용된다. 이 중 활혈화어법은 적극적인 치료방식으로 어혈(瘀血)과 종양의 밀접한 관련성 때문에 많이 응용되는 치법이다¹⁵⁻¹⁸⁾. 활혈화어법을 응용한 일련의 항암 연구결과에서 우리는 권백(卷柏)의 혈액암세포에 대한 특이적 항암효과²²⁻²³⁾는 apoptosis과정에 의한 결과임을 알 수 있었다. 이어 진행된 연구는 apoptosis 유도기전, 즉 caspase-3, Bcl-2, Bax, PARP 등을 조사하여 다음과 같은 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시료의 제조

본 실험에 사용한 권백(*Selaginella tamariscina*)은 우리유통 약업사(서울)에서 구입하여 사용하였다. 권백 100 g에 증류수 1 l를 가하여 3 시간 끓여서 거즈로 여과하고 3,000 rpm으로 원심분리한 후, 농축기(rotary evaporator)로 감압 농축하였다. 이후 -70℃(deep freezer)에서 12 시간 이상 동결시킨 다음 freezer dryer로 동결건조 시켜 건조 분말 12.03 g (수득율; 약 12%)의 시료를 얻었으며, 시료는 적당한 농도로 증류수에 용해시킨 후 0.22 μm membrane filter로 여과한 것을 사용하였다.

2. 세포배양

HL-60 세포주(한국세포주은행)의 배양은 CO₂ 배양기(37℃, 5%)에서 10% 우태아혈청(fetal bovine serum)이 포함된 RPMI-1640(Gibco BRL, Life Technologies Inc., U.S.A.)배지에서 배양하였으며, 4 일 마다 3 ml의 trypsin-EDTA(Gibco BRL, Life Technologies Inc., U.S.A.) 용액을 사용하여 계대배양을 실시하면서 권백추출물을 처리한 뒤 세포의 apoptosis 현상과 이에 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

3. MTT assay

37℃, 5% CO₂ 하에서 배양후 Denizot와 Rita의 방법²⁴⁾을 따라 MTT [3-(4,5-dimethylthiazolyl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide]용액을 모든 well에 50 μl/well 씩 가해 주고 다시 4 시간 더 배양하였다. 배양종료시 배양기를 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 생성된 formazan 결정을 DMSO에 용해시켜 micro plate reader로 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 결과 분석은 실험군의 평균 OD540값을 구하여 대조군(100% 생존군)의 평균 OD540값에 대한 백분율로 환산하였다.

4. Lactate dehydrogenase(LDH)활성도 정량

LDH activity는 cytosol 내 존재하는 LDH (lactate-

dehydrogenase)에 의하여 lactate의 oxidation 과정을 측정하는 활성도 검사방법^{25,26)}으로 cytosol 내의 LDH activity를 관찰하기 위하여 최적화된 LDH/LD procedure (Sigma, Diagnostics)를 이용하였으며, 배양액의 일부를 사용하였다. 즉 phosphate buffer(pH 7.5)에 등몰농도의 NADH를 pyruvate로 환원시키는 반응을 이용한 것이다. 340 nm의 흡광도의 감소율은 배양액의 LDH 활성도에 비례하게 됨을 이용하여 LDH 활성도를 측정하였다.

5. Hoechst stain

Apoptosis과정에서 일어나는 DNA 분절화와 염색질 농축을 관찰하기 위하여 Hoechst 염색을 시행하였다. 권백추출물이 처리된 세포들을 4% formaldehyde 용액에서 고정시킨 후 PBS로 씻어주고 Hoechst 33342(Sigma Chemical Co., St. Louis, NY., U.S.A.) 염색시약을 PBS에 10 μM이 되게 희석하여 10 분 간 염색한 후 다시 PBS로 세척하고 형광현미경으로 관찰하였다.

6. DNA 추출 및 전기영동

DNA 분절현상을 확인 방법은 Miller 등의 방법²⁷⁻²⁹⁾에 준하여 실시하였다. 세포의 genomic DNA 추출은 Wizard genomic DNA purification kit (promega, Madison, WI, U.S.A.)를 이용하였으며, isopropan alcohol 침전에 의하여 응축된 DNA 70% 에탄올에 세척한 후 진공 건조시켰다. TE 완충 용액(50 mM HEPES pH, 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxy-chocolate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF)에 용해된 DNA 5 μg을 1.5% agarose gel에 50 V, 3 시간 동안 전기영동을 실시하여 ethidium bromide에 염색하여 UV하에서 관찰하였다.

7. Caspase-3 활성도 측정

권백추출물을 시간과 농도에 차이를 두고 HL-60 세포에 처리한 후 세포를 원심 분리하여 포집하였다. 포집된 세포를 생리식염수로 1회 세척후, 4℃에서 30 분 동안 추출완충용액(1% Triton X-100, 0.32 M sucrose, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml Leupeptin, 2 mM dithioereitol(DTT), 10 mM Tris/HCl, pH 8.0)으로 용해하여, 20 분 동안 13,000 rpm으로 원심분리시켰다. 원심분리하여 얻은 상층액은 Bradford (Bio-rad)법으로 정량하여 assay buffer(100 mM HEPES, pH 7.5, 10% sucrose, 0.1% chaps, 1 mM PMSF, 1 μg/ml Leupeptin, 2 mM DTT)에 희석시킨 후, caspase-3 활성도 측정은 형광을 나타내는 기질로서 100 μM의 7-amino-4 coumarin(AMC)-DEVD motif-specific peptide (Calbiochem. co. San Diego, CA)를 사용하였고, 대조군은 AMC화합물만을 용액에 넣어 반응시킨 후, 형광표지된 기질과 37℃에서 30 분 간 배양시킨 후 fluorometer로 측정하였다. 이때 caspase-3의 활성에 의해 발생하는 형광은 380 nm의 여기파장(excitation wavelength)과 460 nm의 방출파장(emission wavelength)을 사용하였다.

8. Western blot & image analysis

배양된 HL-60에 관백물추출물을 처리 후 48 시간 경과한 다음 HL-60 세포를 수거하여, cold Hank's balanced salt solution(HBSS)로 2 회 세척하였다. 포집된 세포는 lysis buffer (phosphate buffer, pH7.4, 1% Triton X-100, 1mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml apoptinin, 1 µg/ml leupeptin)로 얼음에서 용해하였다. 용해 세포 부유액에 2X sample buffer와 섞어서 100℃에서 3분 간 끓인 후, 10% sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 transfer한 후 blocking buffer(10% skim milk)로 상온에서 2 시간 동안 반응시킨 후, primary antibody등에 대한 항체를 Tris-buffered saline에 1:1,000으로 희석하여 반응시켰다. secondary anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxydase(TBST로 1:1,000으로 희석, Amersham, England)와 상온에서 1 시간 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence kit(ECL kit: Amersham, England)를 사용하여 필름에 노출시켰다. Image analysis의 경우 Vilber Lourmat Bio-1D로 측정하였다.

9. 통계분석

실험에서 얻은 결과는 one-way ANOVA test를 이용하여 통계 처리하였고, p<0.05, p<0.01 수준에서 유의성을 검정하였다.

실험결과

1. 관백물추출물이 혈액암세포 HL-60세포 생존율에 미치는 영향

관백물추출물이 혈액암세포인 HL-60세포의 생존율에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 먼저 관백물추출물의 농도를 50, 100, 200, 400 µg/ml로 처리한 후 24 시간, 48 시간 세포를 배양하여 세포 생존율의 변화를 MTT assay, trypan blue assay, LDH activity assay 방법을 통해 다각적으로 측정하였다 (실험방법 참조).

MTT assay를 통하여 세포생존율을 관찰한 결과 대조군을 100%로 환산하였을 경우, 88.86% (50 µg/ml), 87.92% (100 µg/ml), 69.76% (200 µg/ml), 64.95% (400 µg/ml)의 수치를 보여 세포생존율이 농도의존적으로 감소함을 알 수 있었다(Fig. 1A). Trypan blue assay를 실시한 경우는 먼저 24 시간 처리군에서는 대조군을 100%로 환산하였을 경우, Fig. 1A의 결과와 유사하게 96 % (50 µg/ml), 87 % (100 µg/ml), 81 % (200 µg/ml)과 75 % (400 µg/ml)를 나타내었다. 하지만 48 시간 처리군에서는 87 % (50 µg/ml), 85 % (100 µg/ml), 76 % (200 µg/ml), 55 % (400 µg/ml)을 나타내어 세포생존율이 약간 더 억제됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 1B). Apoptosis는 형태학적 소견에서 세포막은 파괴되지 않고 세포가 사멸됨을 특징(8-12)으로 하고 있다. 상기 실험에서 관찰된 실험결과는 살아있는 세포수를 토대로 관찰된 결과이므로 apoptosis와 necrosis를 분별하는데 어려움이 있다. 이번 실험결과인 LDH activity는 cytosol 내 존재하는 LDH (Lactate dehydrogenase)에 의하여 lactate의 oxidation 과정을 측정하는 활성도 검사방법²⁵⁻²⁶⁾으로 cytosol 내의 LDH activity를 관찰함

으로써 세포막의 파괴 유무를 추정하여 상기결과에서 관찰된 세포 생존율과 apoptosis와의 상관성을 추정하고자 하였다. 관백물추출물 50, 100, 200, 400 µg/ml의 농도로 세포에 처리한 후 24 시간과 48 시간 후에 실험방법에서와 같이 상층액을 분리하여 LDH activity를 측정하였다. 측정된 수치는 다시 대조군의 평균치로 나누어져 fold induction (%)으로 분석되었다. 먼저, 관백물추출물 0, 50, 100, 200, 400 µg/ml을 24 시간 처리 후에 나타난 LDH activity는 각각 100 ± 6.23, 100 ± 4.52, 102 ± 7.25, 90 ± 3.56과 92.7 ± 5.46 (%)으로 측정되어 다소 감소된 경향을 보였으나 유의성은 나타나지 않았다. 또한 관백물추출물을 처리 후 48 시간 후에 나타난 LDH activity는 100 ± 8.24, 102.8 ± 5.52, 103.31 ± 10.09, 103.98 ± 11.04, 124.04 ± 6.36 (%)으로 측정되어 고농도에서 다소 증가되는 현상을 나타내었다(Fig. 1C).

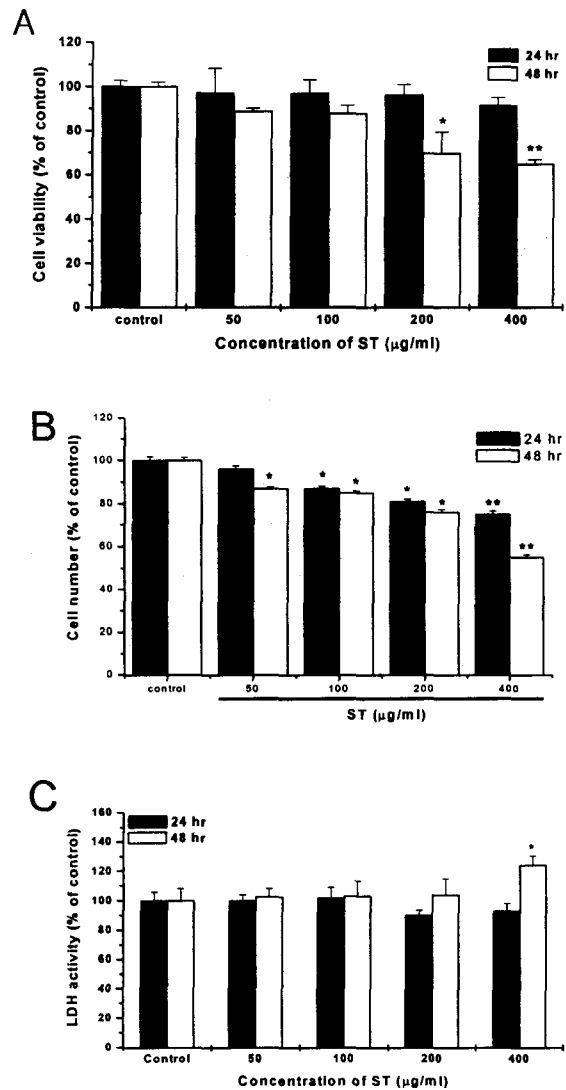


Fig. 1. The viability of HL-60 cells dependent on the concentration of ST. 1×10⁵ cells per well were seeded and cultured in CO₂ incubator for 24 hr without any treatment for stable condition. 24 hr and 48 hr were time duration for treatment of ST. Data as Mean ± S.D. A : MTT assay, B : Trypan blue assay, C : LDH activity assay. * : statistically significant value compared with control data (*p<0.05, **p<0.01)

2. 혈액암세포주에서 권백물추출물의 apoptotic body 관찰

Apoptosis의 또다른 형태학적 특징⁸⁻¹²⁾인 세포크기의 축소 (shrinkage of cell size) 현상을 관찰하기 위하여 광학현미경을 이용한 형태학적인 관찰을 시도하였다. Fig. 2C는 권백물추출물을 400 µg/ml을 처리한 후 48 시간 경과한 후 사진으로 촬영하였다(×400). 실험 결과에서와 같이 대조군의 세포크기(Fig. 2A)에 비하여 권백물추출물 처리군에서는 많은 세포의 세포크기가 거의 1/2 이상 작아졌으며, 다소 검게 보이는 듯한 죽은 세포와 잘게 부서진 세포가 관찰되었다. Hoechst 33342 stain에서 권백물추출물을 처리하지 않는 대조군에서는 Fig. 2B와 같이 핵의 모양이 권백물추출물처리군에 비해서 크고 또한 일정한 구형모양으로 관찰되었다. 그러나 Fig. 2D에서 권백물추출물 400 µg/ml 처리군에서 세포핵이 여러 개의 군으로 쪼개어지는 DNA fragmentation이 관찰되었다. 본 실험은 HL-60 세포의 특성상 원심분리기를 이용하여 세포를 조심스럽게 수집한 후 실험방법에서 설명한 것과 같이 4% formaldehyde 용액에서 고정시킨 다음 slide 위에서 Hoechst stain을 실시하여 관찰한 결과이다.

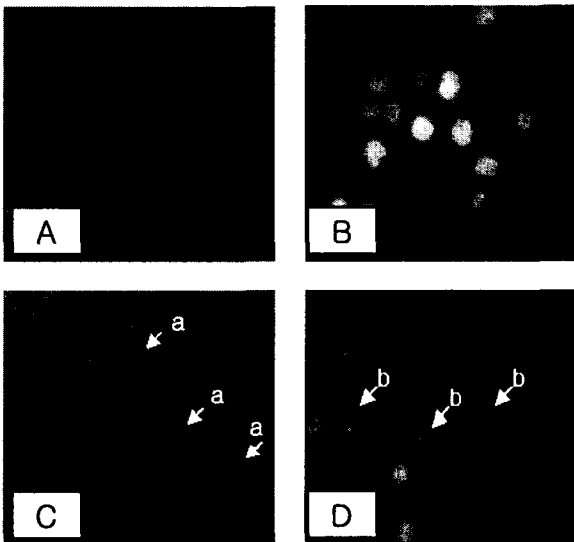


Fig. 2. ST induced apoptotic body, chromatin condensation and DNA fragmentation in dose-dependent manner. Cells were treated with ST in dose-dependent manner for 48 hr. A and C) control, B and D) 400 µg/ml of ST treat-group. Apoptotic bodies were observed in C (a) and Chromatin condensation(b) and DNA fragmentation(c) were observed in D in ST treat-group (×400).

3. 권백물추출물의 DNA fragmentation 유도효과

Fig. 2에서의 실험결과인 DNA fragmentation 현상을 확인하기 위하여 agarose gel electrophoresis법을 이용한 ladder형 DNA 분절 현상을 관찰하였다. Agarose electrophoresis에 의한 DNA분절 현상을 관찰하기 위해 권백물추출물 200 µg/ml, 400 µg/ml 농도를 HL-60 세포주에 24시간과 48 시간 처리한 후, 배양된 세포를 수집하여 DNA를 추출하였다. 이 DNA를 1.5% agarose gel에 전기영동하고 ethidium bromide 염색을 통하여 조사한 결과, ladder형의 DNA분절을 48 시간 처리군에서 확인할 수 있었다(Fig. 3).

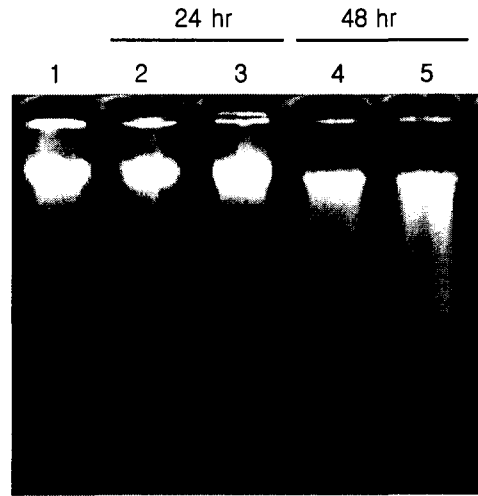


Fig. 3. The effects of ST on DNA fragmentation observed by electrophoresis in HL-60. Cells were seeded in Φ 10 cm dish and cultured for stable condition for 24 hr in CO₂ incubator(see material and methods). lane 1: control, lane 2: 200 µg/ml of ST for 24 hr, lane 3: 400 µg/ml of ST for 24 hr, lane 4: 200 µg/ml of ST for 48 hr, lane 5: 400 µg/ml of ST for 48 hr.

4. 권백물추출물이 caspase-3 활성화에 미치는 영향

Caspase-3는 Yama, Apopain 등으로 불리우는 유전자로 과발현 시킬 경우, apoptosis가 유도되고³⁰⁾, caspase-3 activity inhibitor를 사용하면 apoptosis 억제가 유도되는 등³²⁻³³⁾ apoptosis에서 중추적인 역할을 하고 있는 것으로 밝혀졌다. 따라서, caspase-3 activity를 관찰하여 권백이 유도하는 apoptosis 과정의 신호전달기전을 알아보려고 하였다. 권백물추출물 100, 200, 400 µg/ml을 HL-60 세포주에 시간과 농도에 차이를 두고 처리하여 관찰한 결과, 권백물추출물 100 µg/ml에서는 대조군을 기준 1로 보았을 경우 6, 12, 24, 36 시간을 처리한 군에서는 각각, 0.8, 2, 2.3, 4.4 배를 보였으며, 권백물추출물 48 시간 경과 시에는 약 5.5 배의 caspase-3 활성화 증가를 나타내었다.

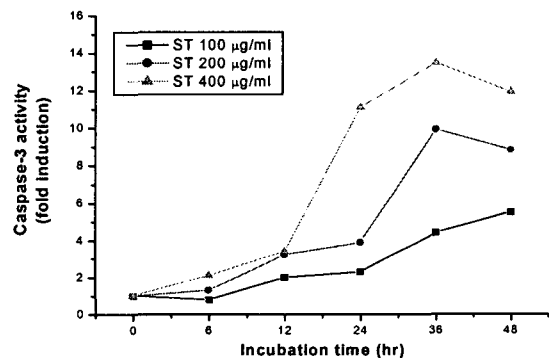


Fig. 4. The effects of ST on caspase-3 activity in cultured HL-60. Cells were seeded in Φ 10 cm dish and cultured for stable condition for 24 hr in CO₂ incubator. The effects of ST on caspase-3 were observed in various treatment time duration and concentration of ST.

권백물추출물 200 µg/ml에서는 대조군을 기준으로 시간별로 관찰한 결과 각각 1.3, 3.2, 3.9, 9.9, 8.8 배로 나타났으며, 36 시

간 경과시 가장 높은 약 9.9 배의 caspase-3 활성도의 증가를 나타내었다. 권백물추출물 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 각각 2.11, 3.39, 11.1, 13.46, 11.9 배의 caspase-3 활성도의 증가를 관찰하였는데, 이는 권백물추출물 200 $\mu\text{g/ml}$ 과 비슷한 양상으로 권백물추출물 처리 후 36 시간대에 가장 높은 약 13.46 배의 caspase-3 활성도 증가가 관찰되었다. 이상의 실험결과 권백물추출물은 시간과 농도의존적으로 caspase-3 활성도를 증가시키고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 4).

5. Caspase 활성화에 따른 PARP 단백질 절단 조사

Poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)는 DNA 수복과정에 관계되는 핵내에 존재하는 효소중의 하나로 최근 116 kDa의 PARP 단백질이 caspase-3에 의해 89 kDa와 24 kDa의 조각들로 쪼개지는 것으로 밝혀졌다³³⁾. 이에 caspase-3의 활성화에 따른 PARP 단백질 기질의 절단양상을 조사하기 위하여 권백물추출물 50, 100, 200과 400 $\mu\text{g/ml}$ 를 HL-60 세포에 48 시간 처리하고 Western blotting을 실시하였다. 권백물추출물을 농도별로 처리하고 48 시간 배양한 후 PARP 단백질 절단을 관찰하였다. 116 kDa의 PARP 단백질은 권백물추출물의 용량이 증가함에 따라 감소하여 400 $\mu\text{g/ml}$ 처리시 대조군 대비 약 75% 정도 감소하였고, 절단된 형태의 89 kDa PARP 단백질은 권백물추출물의 용량 의존적으로 증가하여 권백물추출물 400 $\mu\text{g/ml}$ 처리시 대조군 대비 약 13,000 배 정도 증가하였다. 이는 권백물추출물 처리시 caspase-3 활성 증가와 유사한 경향으로 절단된 PARP 단백질의 양이 시간에 따라 증가함을 알 수 있었다 (Fig. 5).

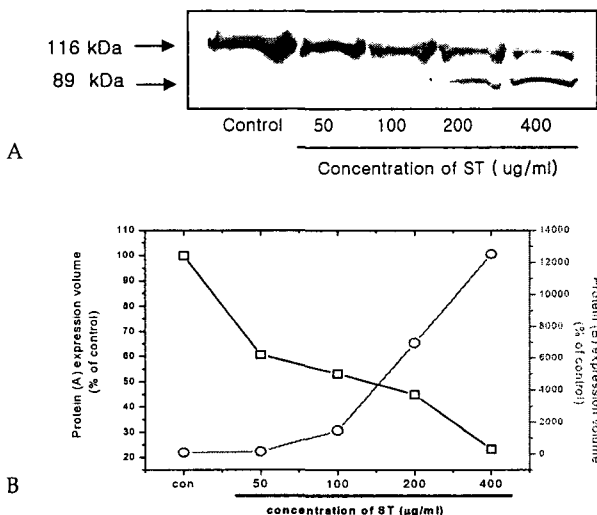


Fig. 5. The effects of ST on PARP expression in cultured HL-60. Cells were seed in ϕ 10 cm dish and cultured for stable condition for 24 hr in CO_2 incubator. Then various concentration of ST were treated for 48 hr. A : Western blotting data B : The data was extracted from image analysis system. Right curve (□) was the value of PARP 116 kDa and left curve (○) was the value of PARP 89 kDa.

6. 권백물추출물이 Bcl-2 단백질의 발현 양상에 미치는 영향

Bcl-2는 포유동물에서의 apoptosis를 조절하는데 관여하는 여러 가지의 유전자 중에서 제일 먼저 발견된 암유발유전자

(proto-oncogene)³⁴⁾로, Bcl-2는 apoptosis에 대하여 직접적인 억제작용이 있는 것으로 알려져 있다³⁵⁻³⁶⁾. 따라서, 본 실험은 apoptosis의 억제작용을 가지고 있는 유전자로 알려진 Bcl-2에 미치는 권백물추출물의 영향에 대해서 알아보았다. 권백물추출물을 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 를 HL-60 혈액암세포에 처리한 후 24 시간 배양하였다. 수집된 HL-60 세포를 Western blotting 방법으로 Bcl-2의 발현을 관찰하였으며, 관찰된 Bcl-2는 다시 이미지 분석하여 결과를 산출하였다 (실험방법 참조). 그 결과 Bcl-2의 발현은 권백물추출물의 처리 농도에 의존적으로 억제되었으며, 이미지 분석에서 대조군을 100으로 환산하면 권백물추출물 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각, 86.78%, 74.73%, 45.73%, 36.67%로 권백물추출물 400 $\mu\text{g/ml}$ 처리시 Bcl-2의 발현은 24시간 경과 후 대조군과 비교하여 약 60% 이상 감소함을 알 수 있었다(Fig. 6).

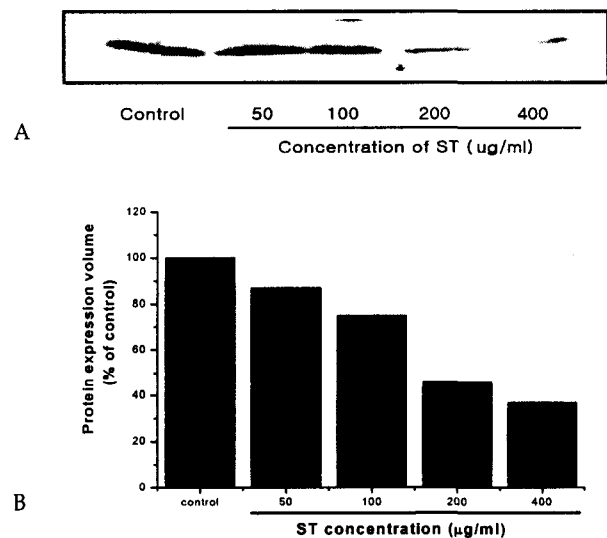


Fig. 6. The effects of ST on Bcl-2 expression in HL-60. 1×10^6 Cells were seeded in ϕ 10 cm dish and cultured for stable condition for 24 hr in CO_2 incubator. Cells were treated for 48 hr in various concentration of ST (50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$). A ; Bcl-2 protein dose was observed by Western blot. B ; The results was analyzed by image analyser system.

7. 권백물추출물이 Bax 단백질 발현 양상에 미치는 영향

다음은 Bcl-2 family 중 하나로 포유동물에서는 apoptosis 촉진단백질로 알려진 Bax의 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. 권백물추출물 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 를 HL-60 혈액암세포에 처리한 후 24시간 배양하였다. 수집된 HL-60 세포를 Western blotting 방법으로 Bax의 발현을 관찰하였고 다시 이미지 분석하여 결과를 산출하였다 (실험방법 참조). 그 결과 Bax의 발현은 권백물추출물의 농도에 의존적으로 증가되었다. 이미지 분석상 대조군을 100으로 환산하면 권백물추출물 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각, 113.96%, 126.78%, 143.47%, 154.32%로 권백물추출물 400 $\mu\text{g/ml}$ 처리시 Bax의 발현은 24시간 경과 후 대조군 대비 약 150% 이상 증가함을 알 수 있었다(Fig. 7).

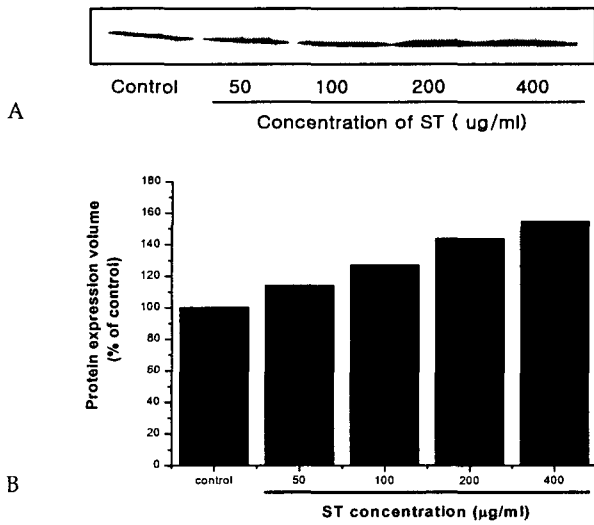


Fig. 7. The effects of ST on Bax expression in cultured HL-60. 1×10^6 Cells were seeded in ϕ 10 cm dish and cultured for stable condition for 24 hr in CO₂ incubator. Cells were treated for 48 hr in various concentration of ST A : Bax protein dose was observed by western blot. B : The results analyzed by image analyser system.

고찰 및 결론

암의 발생원인은 아직 정확하게 규명되고 있지 않으나, 발암성 화학물질, 방사선, 자외선, 계속적인 염증과 손상, 암유발 바이러스(oncogenic virus)감염의 복합적 요소 등 여러 가지 자극으로 인하여 유전적인 형질전환이 이루어져 세포의 형태학·생물학·화학·물리학·면역학적 행동이 변하고, 이것이 유전적으로 무절제하게 증식함으로써 주위의 정상조직들을 침범하고 파괴하여 인간의 건강과 생명에 위협을 주는 병증이다¹⁻⁵. 한의학에서 암은 육음침습(六淫侵襲)·칠정내상(七情內傷)·음식노권(飮食勞倦) 등의 발생원인에 의하여 개체의 장부기능과 기혈이 실조되어 기혈어체(氣血瘀滯)·담응응취(痰濕凝聚)의 병기가 발생되고 기체혈어(氣滯血瘀)·진고담결(津枯痰結)의 병리적 현상이 발생되어 결국 기기불통(氣機不通), 취집일구(聚集日久)하여 형성되는 것으로 이해할 수 있다^{4,13-14}. 특히 인체기능활동이 실조되어 형성된 병리적 산물인 어혈이 오랜시간 지속되면 종괴로 발전된다는 병리학적 특징에 주목할 수 있는데³⁸⁻³⁹, 최근 어혈의 병기에 관한 동서의학적인 연구에 의하면 혈액순환장애로 일어나는 결혈(缺血), 울혈(鬱血), 출혈(出血), 혈전형성(血栓形成) 및 수종(水腫) 등의 병리변화와 염증으로 인한 조직삼출, 변성, 괴사, 위축이나 증식 등과 같은 대사장애로 일어나는 조직병리반응, 조직의 무제한적 증식이나 세포분화불량 등이 모두 어혈의 범주에 속할 수 있는 것으로 인정되고 있다⁴⁰⁻⁴⁴. Apoptosis는 1980년대 후반기부터 중요 관심분야로 세포생물학 영역에 도입되면서 많은 분야에 혁명적인 변화를 가져 왔으며 특히 신경계와 면역계 세포의 생성, 분화 및 기능발현 등에 중요하게 작용하고 있음이 밝혀졌다. 그러나 이런 apoptosis의 기전에 장애가 발생하면 암의 발생이나 항암치료에 대한 내성발현, 자가면역질환, 퇴행성질환 및 HIV가 초래된다고 보고되었다⁴⁵⁻⁴⁶. 최근 연구에 의하면 양방에서 흔히 사

용되는 많은 항암제들, 특히 ara-c, cis-platinum, cyclophosphamide, adriamycin, etoposide, teniposide, vincristine, mitoxantrone, taxol, hydroxyurea 및 bleomycin 등은 다양한 세포주에서 apoptosis를 유도하고 있다고 밝혀졌고, 그 작용기전으로 Fas/Fas ligand system, sphingomyelin/ceramide경로, 즉 발현 초기유전자(early immediate gene)의 발현, apoptosis 관련 단백질효소인 caspase, DNA fragmentation을 일으키는 endonuclease 등이 관여하는 것으로 보고되고 있다^{8-12,45-46}. 따라서 항암제의 효율성은 apoptosis 유도능력과 밀접한 관련성이 있기 때문에 apoptosis의 정확한 생화화학적 기전을 밝혀 암치료과정을 도입하기 위한 연구가 빠르게 진행되고 있는 실정이다. 권백은 부처손과에 속하는 다년생 초본인 부처손의 전초로, 수렴지혈(收斂止血), 활혈거어(活血祛瘀)의 효능²¹을 가지고 있는 약재이다. 최근에 발표된 권백물추출물에 대한 본 실험실의 실험 연구결과에서 이 등²³은 권백 물추출물의 혈액암세포주에 대한 특이적인 항암작용을 발표하였고 남 등²²은 혈액암세포주에서 권백 물추출물의 항암작용은 apoptosis과정이라는 것을 발표하였다. 일련의 진행된 실험은 typan blue cell counting, LDH activity assay 방법을 통하여 다각적으로 cell viability를 관찰하였다. 관찰한 결과 MTT assay, typan blue cell counting에서는 용량의존적으로 세포 생존율이 감소하였고, LDH activity의 차이는 권백 물추출물 400 µg/ml의 농도에서 다소 증가하였지만 세포사멸과정의 특성상 necrosis와 apoptosis의 과정이 어느 정도 동시에 일어날 수 있음을 감안하면 크게 유의한 변화를 보이지 않았다고 판단할 수 있었다. 즉, 이 실험결과는 dish에 붙어있는 살아있는 세포의 수는 감소하였지만 세포막의 파괴에 의한 세포질의 분출은 적었다는 것을 의미한다고 사료되며, 이 과정에서 권백물추출물이 혈액암세포에서 세포생존율을 변화시키는 방법이 최소한 necrosis보다는 apoptosis에 근접하는 방법이라는 것을 짐작할 수 있어 남²²과 이²³ 등의 실험결과 유사하였다(Fig. 1). 권백물추출물이 혈액암세포에서 세포생존율을 감소시키고 또한 이 작용이 apoptosis 과정과 유사하므로 Fig. 2에서 보는 바와 같이 형태학적 관찰을 시도하였다. Apoptosis의 형태학적인 특징은 세포크기의 축소나 세포막으로부터 세포막용기가 돌출하는 현상 또는 여러 형태의 세포내용물이 세포막으로 쌓여져 세포로부터 떨어져 나온 apoptotic body를 형성하고, chromatin condensation이나 nuclear fragmentation 또는 DNA fragmentation 등의 현상이 일어난다⁸⁻¹²고 알려져 있다. 이를 관찰하기 위하여 현미경을 통한 형태학적인 관찰을 시도한 결과, 세포의 크기와 apoptotic body, nuclear fragmentation이 권백물추출물 처리군에서는 관찰할 수 있었으며, 또한 세포가 잘게 부서지는 것 같은 모양이 관찰되었다(Fig. 2). Apoptosis의 특징중 하나인 DNA fragmentation 현상을 정확하게 확인하기 위하여 권백물추출물 200 µg/ml, 400 µg/ml 농도를 HL-60 세포주에 24시간과 48시간 처리한 후 전기영동에 의해서 관찰되었다. 배양된 세포를 수집한 후 DNA를 추출하였으며 1.2% agarose gel에 전기영동하여 ethidium bromide 염색을 통하여 조사한 결과, ladder형의 DNA분절이 48 시간 처리군에서 발생되었음을 확인하였다(Fig. 3). Ellis 등이 C. elegans의 유

전화적인 연구를 통하여 apoptosis에 관여하는 최소한 14 개의 유전자를 보고하였다⁴⁷⁾. 이중 Ced-3의 중요성이 크게 부각되었으며 인간에서의 상응유전자의 발현에 많은 연구가 진행되었다. Caspase-3는 C. elegans의 Ced-3에 해당하는 유전자로 Yama, Apopain 등으로 불리우다 1996년 Alnemri 등⁴⁸⁾에 의하여 명명되어 지금까지 apoptosis에서 중추적인 역할을 하고 있는 것으로 밝혀졌다. 일례를 들면, caspase-3를 세포 내 과발현 시킬 경우, apoptosis가 유도되며⁴⁹⁾, caspase-3 활성 억제제를 사용하면 apoptosis 억제가 유도되는 사실⁵⁰⁻⁵¹⁾을 들 수 있다. 본 실험에서 밝혀진 권백물추출물의 caspase-3 활성에 미치는 영향은 100 µg/ml의 농도에서는 권백물추출물 처리 후 48 시간 시간의존적인 증가곡선을 나타내었으며, 200 µg/ml, 400 µg/ml의 농도에서는 권백물추출물 처리 후 36 시간에 최고조를 보인 후 작아지는 양상이 관찰되었다. 이는 세포개체수의 감소로 인하여 caspase-3의 활성이 작아진 결과라고 사료된다(Fig. 4). Poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)는 DNA 수복과정에 관계되는 핵내에 존재하는 효소중의 하나로 최근 116 kDa의 PARP 단백질이 caspase-3에 의해 89 kDa와 24 kDa의 조각들로 쪼개져 apoptosis의 작용에 관여하는 것으로 밝혀졌다⁵²⁾. 다음으로 진행된 PARP의 발현은 권백물추출물 100 µg/ml의 농도, 48 시간 처리 후에 발현된 caspase-3의 작용에 의해서 PARP의 절단양상이 시작됨을 알 수 있었다(Fig. 5). Fig. 5에서의 실험결과는 116 kDa의 PARP가 caspase-3의 활성이 증가됨에 따라 절단되어 그 양은 감소되고 89 kDa의 PARP가 증가되었다고 생각된다. Bcl-2는 포유동물에서의 apoptosis를 조절하는데 관여하는 여러 가지의 유전자 중에서 제일 먼저 발견된 암유발유전자 (proto-oncogene)이다. Bcl-2는 사람의 림프종의 발생과 밀접하게 관련된 유전자로서 단백질의 분자량은 26 KDa이며 미토콘드리아의 외막, 소포체나 핵막에 위치해 있고, 다른 암유발유전자와는 달리 세포증식에는 관여하지 않고 세포의 생존을 조절하는 것으로 밝혀졌다³⁴⁾. 즉 Bcl-2는 apoptosis의 직접적인 억제작용이 있으며 심지어 유도된 necrosis 작용에서도 세포의 죽음을 억제하는 작용이 있음이 알려졌다³⁵⁻³⁶⁾. 이러한 Bcl-2에 대하여 권백물추출물은 400 µg/ml의 농도로 처리한 다음 24 시간 경과 시 약 60 % 이상 감소함을 알 수 있었다. 또한 Bcl-2 family 중 하나로 포유동물에서는 세포사멸 촉진 단백질로 알려진 Bax의 발현에 미치는 영향에 대해서 권백물추출물 400 µg/ml 처리시 Bax의 발현은 24시간 경과후 대조군에 비하여 약 150 % 이상 증가함을 알 수 있었다. 이상의 실험결과로 권백은 혈액암세포 인 HL-60세포에서 apoptosis의 작용에 의한 세포사멸을 유도하며, 이러한 apoptosis의 기전으로는 최소한 caspase-3, caspase-3 activity 증가에 따른 절단 PARP 단백질의 증가, Bcl-2, Bax 등의 apoptosis 관여인자가 작용하고 있음을 확인하였기에 보고하는 바이다.

감사의 글

이 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업 HMP-99-O-01-0003에 의해 수행되었기에 감사드립니다.

참고문헌

1. 대한병리학회 : 병리학. 서울. 高文社. pp.201-222, 231-258. 1997.
2. 송계용외 : 핵심병리학 서울 고려의학 pp.147-189. 1998.
3. 서울대학교 의과대학편 : 종양학. 서울. 서울대학교출판부. pp.137-148, 1993-205. 1998.
4. 문구 외 : 암동서의결합치료1. 원광대학교출판국. pp.253-303, 383-460. 1999.
5. 東西醫學融合研九會編 : 臨床東西醫學. 서울. 영림사. pp. 538-546. 1997.
6. Wyllie. A.H. : Apoptosis. Br. J. Cancer 67. 205-208. 1993.
7. Thompson : Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 267. 1456-1462. 1995.
8. Custodio JB, Cardoso CM, Madeira VM, Almeida LM. : Mitochondrial permeability transition induced by the anticancer drug etoposide, Toxicology in Vitro: an International Journal Published in Association with BIBRA. 15: 265-270. 2001.
9. Shrivastava P, Sodhi A, Ranjan P. : Anticancer drug-induced apoptosis in human monocytic leukemic cell line U937 requires activation of endonuclease(s). Anticancer Drugs. Jan;11(1):39-48. 2000.
10. da Rocha AB, Lopes RM, Schwartzmann G. : Natural products in anticancer therapy. Curr Opin Pharmacol. Aug;1(4):364-9. 2001.
11. Tounekti O, Pron G, Belehradek J Jr, Mir LM. Bleomycin. : An apoptosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized. Cancer Res. Nov 15;53(22):5462-9. 1993.
12. el Alaoui S, Lawry J, Griffin M. : The cell cycle and induction of apoptosis in a hamster fibrosarcoma cell line treated with anti-cancer drugs: its importance to solid tumour chemotherapy. J Neurooncol. Jan;31(1-2):195-207. 1997.
13. 鄭遇悅 外: 韓方臨床病理學 서울. 永林社 pp.19-45. 1998.
14. 郁仁存 : 中醫腫瘤學 上冊. 北京. 科學出版社. pp.120-153. 1997.
15. 우원홍, 이승연, 김용수, 백은경, 정영목, 정우열 : '활혈화어'의 동서의학적 이해. 동의생리병리학회지. 15(6):833-836. 2001.
16. 우원홍, 김용수, 전병훈, 정우열 : 활혈화어법을 응용한 한방항암처방 개발에 관한 연구. 동의생리병리학회지. 16(3):409-420. 2002.
17. 이동훈, 김동희, 강인철, 박영미, 송규용, 김성훈 : 가미저당탕의 항암 및 항전이효과에 관한 연구. 동의생리병리학회지. 16(3): 472-478. 2002.
18. 송호철, 길재호, 김성훈 : 가미삼령백출산 용매 분획의 항전

- 이 및 항암활성에 대한 연구. 동의생리병리학회지. 15(6): 927-935. 2001.
19. 馬繼興 : 神農本草經輯注. 人民衛生出版社. pp 88-89. 1995.
 20. 陶弘景 : 名醫別錄(輯校本). 人民衛生出版社. pp34-35. 1986.
 21. 辛民敎 : 臨上本草學. 永林出版社. 서울. pp 448-449. 1988.
 22. 남향우, 이성원, 이병주, 권철용, 문연자, 안성훈, 우원홍 : 권백의 혈액암세포주에서 항암작용에 대한 연구. 한국전통의학지 12(1):79-90, 2002.
 23. 이성원, 안성훈, 곽근신, 곽섭, 이장천, 문연자, 우원홍 : 권백물추출물의 선별적인 항암작용에 대한 연구. 동의생리병리학회지 16(6):1190-1196, 2002.
 24. F.D. Denizot, L. Rita : Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, J. Immunol. Methods 22 271-277. 1986.
 25. Zimmerman HJ, Henry JB.: Clinical Enzymology. IN Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 16th ed, JB Henry, Editor, Saunders, Philadelphia. pp 365-368. 1979.
 26. Young DS, Pestaner LC, Gibberman V.: Effects of drugs on clinical laboratory tests. Clin Chem 21:1D, 1975;Supplement No. 1, 1991.
 27. Miller, S.A., Dykes, D.D. and Polesky, H.F.: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucl. Acids Res. 16, 1215. 1988.
 28. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration : Occupational exposure to bloodborne pathogens, final rule. Federal Register 56, 64175. 1991.
 29. Beutler, E., Gelbart, T. and Kuhl, W.: Interference of heparin with the polymerase chain reaction. BioTechniques 9, 166. 1990.
 30. Muzio, M. et al.: FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. Cell 85:817-827. 1996.
 31. Srinivasula, S.M. et al.: Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine protease. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A> 93:14486-14491. 1996.
 32. Zhou, Q. et al.: Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases, J. Biol. Chem 272 : 7797-7800. 1997.
 33. Cynthia M. Simbulan-Rosenthal, Deans S. Rosenthal, Sudha Iyer, A. Hamid Boulares: Transient Poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins and role of Poly(ADP-ribose) polymerase in the early stages of apoptosis. Journal of Biological Chemistry. 273(22):13703-13712. 1998.
 34. Bakhshi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L., and S.J. Korsmeyer.: Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphoma: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. Cell 41 : 899-906. 1985.
 35. Korsmeyer S.J.: Regulators of cell death. Trend Genet. 11 : 101-105. 1995.
 36. Hochenbery, D.M., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D., and S. J. Korsmeyer.: Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature 348:334-336. 1990.
 37. 崔善美 : 丹蔘의 抗癌活性和 apoptosis에 미치는 影響. 서울. 慶熙大學敎 博士學位論文. 2000.
 38. 白承學, 趙鍾寬 : 癌 治療에 있어서 扶正祛邪法의 運用에 관한 考察. 대한한방내과학회지. 16(2):30-5. 1995.
 39. 朴鐘鶴, 林樂哲, 趙鍾寬 : 活血化瘀法의 癌治療 活用に 관한 考察. 대한한의학회지. 16(2):195-209. 1995.
 40. 金完熙, 崔達永 : 臟腑辨證論治. 서울. 成輔社. pp.59, 371-375. 1985.
 41. 文禧典, 安圭錫, 崔昇勳 : 東醫病理學, 서울. 高文社. p74. 1993
 42. 崔昇勳 : 黃帝內經에서의 瘀血의 概念에 대한 理論的 研究. 대한동의병리학회지. 3 : pp.12-17. 1998.
 43. 中國中西醫結合學會活血化瘀研究學會 : 活血化瘀研究. 北京. 中國醫藥科技出版社. pp.55-90, 342-343. 1995.
 44. 陳可冀 : 血瘀證與活血化瘀研究, 上海, 上海科學技術出版社. pp.127-137. 1990.
 45. Thomson CB.: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science, 267: 1456-1462. 1995.
 46. Williams GT.: Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. Cell 65: 1097-1098. 1991.
 47. Ellis, R.E., Yuan, J. and Horvitz, H.R.: Mechanisms and functions of cell death. Annu. Rev. Cell. Biol. 7:663-698. 1991.
 48. Alnemri, E.S., Livingston D.J., Nocholson D.W., Salvesen G.: Thornbery N.A. Wong W.W. and Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. Cell 87 : 171. 1996.
 49. Muzio, M. et al.: FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. Cell 85:817-827. 1996.
 50. Srinivasula, S.M. et al.: Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine protease. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A> 93:14486-14491. 1996.
 51. Zhou, Q. et al.: Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases, J. Biol. Chem 272 : 7797-7800. 1997.