

# 혈액암 세포에서 附子 추출물의 Apoptosis 유도 효과

권강범 · 김은경 · 문형철<sup>1</sup> · 정택상<sup>2</sup> · 송용선<sup>2</sup> · 류도곤\*

원광대학교 한의과대학 한방생리학교실, 1: 침구학교실, 2: 재활의학교실

## Apoptosis-inducing Effects of Radix Aconiti Extract in HL-60 Cells

Kang Beom Kwon, Eun Kyung Kim, Hyung Cheal Moon<sup>1</sup>, Taek-Sang Jeong<sup>2</sup>, Yung Sun Song<sup>2</sup>, Do Gon Ryu\*

Department of Physiology, 1: Acupuncture & Moxibustion, 2: Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

The aim of this study was to investigate the apoptotic effect and its mechanism on Radix Aconiti (RA) extract in HL-60 human leukemia cell line. RA extract induced apoptosis as confirmed by discontinuous fragmentation of DNA. To clarify the mechanisms on RA extract-induced apoptosis, we examined the caspase-3, -8 enzyme activity and protein levels including Fas, FasL in HL-60 cells. Treatment with RA extracts resulted in the increase of caspase-3 enzyme activity in a time and dose-dependent manners, which was accompanied by the cleavage of poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP). This activation of caspase-3 enzyme resulted from cleavage of procaspase-8, which was followed by increases of FasL, Fas protein expression in RA extracts-treated HL-60 cells. In conclusion, RA extract induced apoptosis of HL-60 human leukemia cell line. This results suggest that the apoptotic mechanisms of RA extract on HL-60 cells involved in FasL, Fas activation, procaspase-8 cleavage, activation of caspase-3 and cleavage of PARP. Collectively, these results suggest that RA may be a valuable agent as a anti-cancer drug.

Key words : Radix Aconiti, aconitine, HL-60 human leukemia cell line, apoptosis, FasL, Fas, caspase-8, caspase-3, poly-(ADP-ribose) polymerase

### 서 론

附子(Radix Aconiti)는 毛茛科(미나리아재비과 ; Ranunculaceae)에 속한 다년생 草本인 栽培種 白芍(Aconitum carmichaeli DEBX)의 塊根에 附生한 子根으로, 回陽救逆, 補火助陽, 溫中止痛, 逐風寒濕邪의 효능으로 胸腹冷痛, 陽微欲絕, 周身骨節疼痛 등의 證에 사용되어 왔으며<sup>1-4)</sup>, 조 등<sup>5)</sup>은 세포에서 부자에 의한 이온 전류는 Cl<sup>-</sup>전류가 대부분을 차지하였으며 동시에 의미있는 Ca<sup>2+</sup>전류가 있음을 보고하였으며, 류 등<sup>6)</sup>은 附子 추출물이 부신 피질 및 신장기능, 혈장 renin 활성도에 미치는 영향에 대하여 보고하였다.

세포고사(apoptosis)란 apo(off: 분리되다)와 ptosis(falling: 떨어지다)의 합성어로 프로그램화된 세포의 죽음(programmed cell death)을 일컫는 말로서<sup>7)</sup>, 지나치게 증식된 세포의 제거를 통하여 조직의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다<sup>8)</sup>. 그러나 세

포고사신호전달 기전의 교란 혹은 세포고사의 소멸을 야기하는 유전적인 변화는 발암과정에서 중요하게 인식되고 있어<sup>9)</sup>, 암세포에서 세포고사를 유도시키는 약제의 개발이 암을 치료하는데 가치 있는 도구로서 이용되고 있다<sup>10)</sup>.

한의학에서 암은 積聚, 腫瘍, 腫瘤, 癥瘕, 痰癖, 腸覃, 痞塊, 石瘕, 血蠱, 反胃, 石疽, 石癰 등과 관련된 질환으로 인식되고 있으며<sup>11,12)</sup>, 치료법으로는 辨證施治에 근거하여 초기에는 行氣活血 軟堅消積法을, 중기에는 攻補兼施法을, 말기에는 扶正培本法을 사용하고 있다<sup>11)</sup>.

최근 동·서의 결합치료에 대한 관심이 증대되면서 항암제와 한약과의 병용에 의하여 항암효과를 높이거나, 정상세포에 대한 기존 항암제의 악영향 때문에 최근 부작용이 적은 천연물에 대한 관심이 고조되고 있으며, 특히 새로운 치료법으로서 면역요법이나, 세포분화 유도법, 혈관형성 저해법, 세포고사(apoptosis) 유도법 등과 한약재와의 관련된 연구가 활발히 이루어지고 있다<sup>6,13)</sup>.

이에 저자는 附子の 補陽과 止痛效果는 攻補兼施의 積聚治療法에 적합한 藥材로 사료되어, 인간 백혈병 세포인 HL-60 세포를 이용하여 附子 추출물의 세포고사 효과를 조사하고, 또한 그 기전을 규명하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

\* 교신저자 : 류도곤, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학

· E-mail : tkryu@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6846

· 접수 : 2005/04/01 · 수정 : 2005/04/30 · 채택 : 2005/05/27

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 연구에 사용한 附子는 원광대학교 익산한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다.

#### 2) 시약

세포배양에 사용한 세포배양 용기는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로부터 구입하였으며, caspase-3에 대한 형광기질(fluorogenic substrates)과 억제제(inhibitor), caspase-3, -8, Fas, FasL, Poly-(ADP-ribose) polymerase(PARP) 항체는 Santa Cruz사(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), Alkaline phosphatase-conjugated mouse and rabbit IgG secondary antibody 등은 Sigma사(Saint Louis, Missouri, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 세포배양액 RPMI, Fetal bovine serum(우태아혈청), 항생제 등은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 약재의 조제

附子(Radix Aconiti) 200g에 3차 증류수 1.8L를 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 3시간 동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 회전 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 건조하여 27.0g의 분말 시료를 얻었다.

#### 2) 세포배양

사람 백혈병으로부터 유래된 세포주인 HL-60(ATCC, USA)은 CO<sub>2</sub> 세포배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 10% fetal bovine serum이 포함된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 약 48시간 주기로 배양액을 교체하여 주며 log phase에 있는 세포에 附子 추출물을 처리한 뒤 세포고사 효과와 이와 관련된 신호전달 기전을 조사하였다.

#### 3) 세포생존율 측정

HL-60 세포를 96 well 세포배양 용기에  $1 \times 10^4$  cells/ml씩 분주하여 24시간 세포배양 용기에 부착시키고, 안정화된 HL-60 세포에 附子 추출물을 24시간 처리하여 MTT(0.5mg/ml)와 3시간 반응시켰다. 생존 세포가 MTT로부터 생성한 보라색 불용성 formazan은 DMSO로 용해하여 570nm 파장에서 ELISA reader(Molecular Device, E-max, USA)로 흡광도를 측정하였다. 측정된 formazan 생성 정도는 대조군 세포에 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

#### 4) DNA 분절(fragmentation) 조사

DNA 분절현상을 조사하기 위하여 genomic DNA 추출은 Wizard Genomic DNA purification kit(Promega, USA)를 이용하였다. 附子 추출물을 HL-60 세포에 24시간 동안 처리한 후 세포를 수확하여 nuclear lysis buffer를 첨가하여 세포를 파괴한 후 RNase를 37°C에서 5분 처리하여 RNA를 제거한 후 단백질 침전용 완충용액으로 단백질을 제거하고 isopropanol 침전에 의하여

응축된 DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 진공건조기로 건조하였다. 여기에 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0)을 가하여 DNA pellet을 용해한 후 260 nm와 280 nm의 Spectrophotometer하에서 OD값을 측정하여 DNA를 정량하였다. DNA 5 $\mu$ g을 2% agarose gel에서 전기영동(50 V, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV등 아래에서 DNA 분절을 관찰하였다.

#### 5) Caspase-3 활성도 측정

세포를 4°C에서 30분 세포파쇄용액(1% Triton X-100, 0.32M sucrose, 5mM ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA), 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 1 $\mu$ g/ml aprotinin, 1 $\mu$ g/ml leupeptin, 2mM dithiothreitol(DTT), 10mM Tris/HCl, pH 8.0)과 반응시킨 후, 14,000rpm으로 15분 원심분리하여 이 때 얻어진 상층액 30 $\mu$ g을 caspase assay buffer(100mM HEPES, 10% sucrose, 0.1% CHAPS, 1mM PMSF, 1 $\mu$ g/ml aprotinin, 1 $\mu$ g/ml leupeptin, 2mM DTT, pH 7.5)와 caspase-3의 형광기질인 Ac-DEVD-AFC와 37°C에서 60분 반응시킨 후 fluorometer (F2500, Hitachi, Japan)로 caspase-3의 활성도를 측정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength(400nm)와 emission wavelength(505nm)를 사용하였다.

#### 6) Western blotting

포집된 세포는 세포파쇄용액과 4°C에서 30분 반응시킨 후, 30 $\mu$ g의 단백질을 두 배의 sample buffer(5mM EDTA, 4% sodium dodecyl sulfate(SDS), 20% glycerol, 200mM Tris, pH 6.8, 0.06% bromophenol blue)와 혼합 후, 100°C에서 3분 가열하여 단백질 변성을 유도하고 10%(for PARP)와 15%(for caspase-3, -8, Fas, FasL) gel에서 전기영동을 시행하였다. 전기영동을 마친 gel의 단백질은 semi-dry electrotransfer system(0.8mA/cm<sup>2</sup>)을 이용하여 nitrocellulose membrane으로 이동시킨 다음, 5% skim milk와 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적인 항체반응을 억제시켰다. 일차항체(primary antibody)는 TBS-T에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 24시간 반응시키고 TBS-T로 10분 3번 세척한 후, 이차항체(secondary antibody)인 anti-mouse IgG conjugated alkaline phosphatase와 상온에서 1시간 반응시킨 후, NBT/BCIP 시약을 이용하여 노출시켰다.

#### 7) 단백질 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin을 기준으로 이용한 Bradford의 방법<sup>14)</sup>에 의거하여 정량하였다.

#### 8) 통계 처리

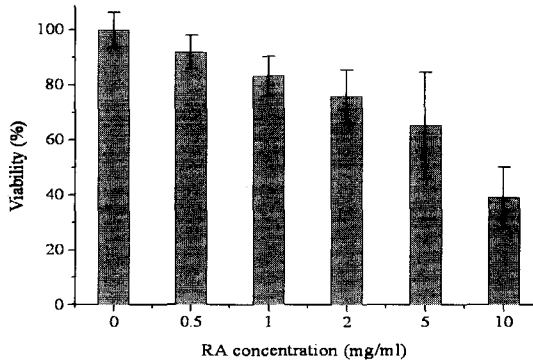
실험 결과는 mean $\pm$ S.E.M(standard error of mean)으로 표시하였으며 유의성의 검정은 ANOVA후에 Tukey-Kramer multiple comparison test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

## 결 과

### 1. HL-60 세포독성에 미치는 영향

HL-60 세포에 0.2~0.5mg/ml의 농도로 附子 추출물을 24시

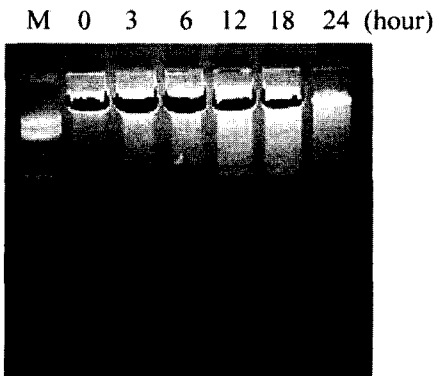
간 동안 처리한 후 MTT assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였다. 그 결과 0.5mg/ml, 1.0mg/ml 附子 추출물을 처리한 군의 생존율은 대조군(100%)에 비하여 각각 92.0%, 83.3%로 약간 감소하였다. 또한 2.0mg/ml, 5.0mg/ml 附子 추출물을 처리한 군에서는 각각 75.8%, 65.3%로 나타나 세포 생존율이 감소하였으며, 특히 10mg/ml의 농도로 처리한 군의 생존율은 대조군에 비하여 39.1%로 감소하였다(Fig. 1).



**Fig. 1. Effects of Radix Aconiti (RA) extract on cell viability in HL-60 cells** Cells were treated with various concentrations of RA extract for 24 hours. Cell viability was measured by MTT assay. The percentage of viable cells was calculated as a ratio of A570 of treated- to control cells (treated with 0.05% DMSO vehicle). Each value is the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments.

2. HL-60 세포고사에 미치는 영향

HL-60 세포에 대한 附子 추출물의 세포고사 효과를 관찰하기 위하여, 5.0mg/ml의 附子 추출물을 3, 6, 12, 18, 24시간 동안 세포에 노출시킨 후 세포고사의 특징적인 현상중의 하나인 DNA 분절(fragmentation) 현상을 조사하였다. 그 결과 附子 추출물을 HL-60 세포에 노출시킨 후 12시간부터 DNA 분절 현상이 나타났으며 이 현상은 24시간까지 지속되어 세포고사를 유도하였다(Fig. 2).

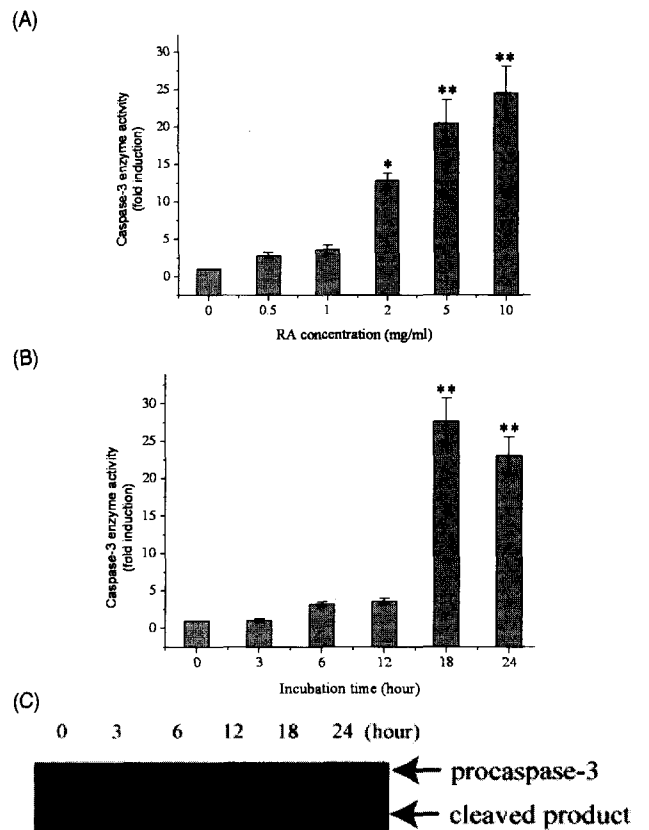


**Fig. 2. Effects of Radix Aconiti (RA) extract on DNA fragmentation on HL-60 cells** HL-60 cells were treated with 5.0mg/ml RA extract for 24 hours. DNA was extracted and analyzed by 2% agarose gel electrophoresis as described in Materials and Methods.

3. Caspase-3 활성도와 절단에 미치는 영향

附子 추출물에 의한 HL-60 세포의 고사과정에 caspase-3 활성도의 증가가 관여하는지를 확인하고자, 다양한 농도의 附子 추출물을 24시간 동안 세포에 노출시킨 후 caspase-3에 특정한 형

광 염료인 Ac-DEVD-AFC를 이용하여 활성도를 측정하였다. 그 결과 처리한 농도에 의존적으로 활성도가 증가하였으며, 특히 2.0, 5.0, 10.0mg/ml의 농도로 처리한 군은 대조군에 비하여 각각 12.8배(p<0.05), 20.5배(p<0.01), 24.5배(p<0.01)로 나타나 통계적으로 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 3A). 또한 5.0mg/ml 附子 추출물을 3, 6, 12, 18, 24시간 동안 처리한 후 caspase-3 활성도를 측정한 결과 6시간부터 활성도가 증가하기 시작하여 24시간까지 지속되었으며, 특히 18, 24시간 후에 활성도는 대조군에 비하여 각각 27.7배(p<0.01), 23.0배(p<0.01)로 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 3B). 이러한 증가는 Fig. 3C에서 보여주듯이 procaspase-3가 잘려서 활성형태의 caspase-3가 6시간부터 나타나 24시간까지 지속되는 것을 통하여 확인 할 수 있었다.

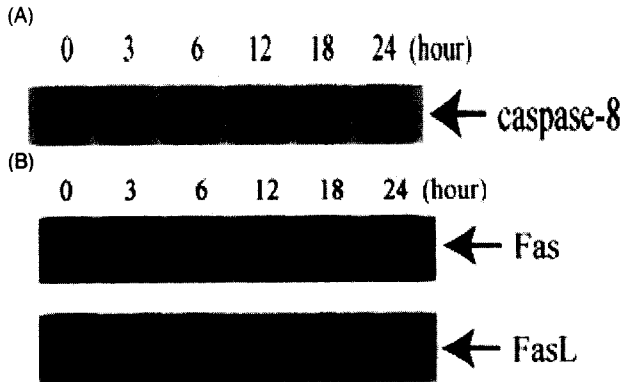


**Fig. 3. Effects of Radix Aconiti (RA) extract on caspase-3 enzyme activity and cleavage in HL-60 cells** (A) Cells were incubated with indicated concentrations of RA extracts for 24 hours. (B & C) Cells were treated with 5.0mg/ml RA extracts for indicated periods. Lysate from cells was used to measure the activity of caspase-3 using Ac-DEVD-AFC as fluorogenic substrate and caspase-3 cleavage using Western blotting. Data were represented as a relative fluorescence compared with the control value. Values are mean $\pm$ SEM from four experiments. \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs control

4. Caspase-8의 절단과 Fas, FasL 발현에 미치는 영향

附子 추출물에 의한 HL-60 세포의 고사과정에 caspase-8 활성도의 증가가 관여하는지를 확인하고자, 다양한 농도의 附子 추출물을 24시간 동안 세포에 노출시켜 procaspase-8의 절단된 활성형태의 caspase-8 단백질을 Western blotting을 이용하여 조사한 결과 3시간부터 활성형태의 caspase-8 단백질이 약간씩 증가하기 시작하여 24시간까지 지속되었다(Fig. 4A). 그리고 procaspase-8의 절단과 관련되어 세포고사의 유도에 관련된 단백질인 Fas,

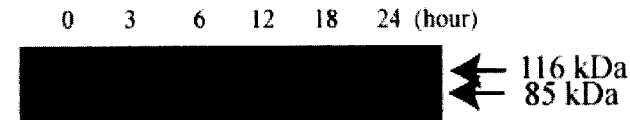
FasL의 발현을 조사한 결과, 附子 추출물을 처리한 군들은 대조군에 비하여 처리한 시간에 비례하여 증가하였다(Fig. 4B).



**Fig. 4. Dose- and time- response of Radix Aconiti (RA) extract on caspase-8 cleavage, Fas and FasL protein expression in HL-60 cells** Cells were treated with 5.0mg/ml RA extracts for indicated periods. Lysate from cells was used to measure caspase-8 cleavage, Fas, FasL expression using Western blotting as described in Material and Methods.

5. PARP 절단에 미치는 영향

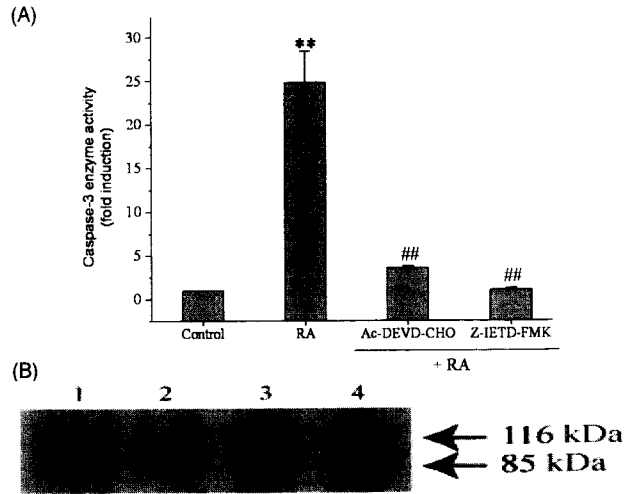
附子 추출물에 의한 HL-60 세포의 caspase-3 protease의 활성도의 증가를 확인하였으므로 caspase-3 protease의 세포내 기질인 poly-(ADP-ribose)-polymerase(PARP)의 절단에 대한 附子 추출물의 효과를 관찰하고자, PARP 1차 항체를 이용하여 Western blotting을 시행하였다. 附子 추출물의 처리 농도에 따른 PARP의 절단 효과를 관찰하고자, HL-60 세포에 3, 6, 12, 18, 24시간 동안 5.0mg/ml의 농도로 노출시킨 후 PARP의 절단 정도를 조사하였다. 그 결과 대조군에서는 85kDa의 절단된 PARP가 발견되지 않았다. 그러나 附子 추출물을 처리한 후 6시간부터 85kDa의 절단된 PARP가 나타나기 시작되어 그 효과가 24시간까지 지속되었으며 이에 상응하는 116kDa의 PARP가 감소하였다(Fig. 5).



**Fig. 5. Effects of Radix Aconiti (RA) extract on PARP cleavage in HL-60 cells** HL-60 cells were treated with various time intervals at a concentration of 5.0mg/ml RA extracts. Lysate from cells was separated on 10.0% SDS-PAGE. PARP on the nitrocellulose membrane was probed with anti-PARP antibody and the immunoreactive band was visualized by NBT/BCIP solution.

6. Caspase-3 활성도와 PARP 절단에 대한 caspases 억제제들의 영향

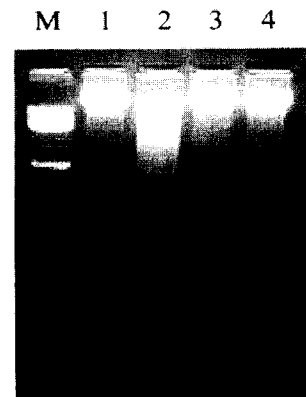
附子 추출물에 의한 caspase-3 활성도의 증가와 PARP 절단에 대한 caspase-3, caspase-8의 억제제의 효과를 관찰하기 위하여, 5.0mg/ml의 附子 추출물을 HL-60 세포에 24시간 동안 노출시키기 3시간 전에 25.0 μM Ac-DEVD-CHO(caspase-3 억제제)와 25.0μM Z-IETD-FMK(caspase-8 억제제)를 처리한 후 caspase-3 활성도와 PARP 절단을 조사하였다. 그 결과 Ac-DEVD-CHO와 Z-IETD-FMK를 전 처리한 군은 附子 추출물에 의해 유도된 caspase-3 활성도의 증가와 PARP의 절단을 억제하였다(Fig. 6A & 6B).



**Fig. 6. Protective effects of caspase inhibitors on Radix Aconiti (RA) extract-induced activation of caspase-3 and PARP cleavage in HL-60 cells** Cells were treated with 5.0mg/ml RA extracts for 24 hours. Lysate from cells was used to measure the activity of caspase-3 using Ac-DEVD-AFC as fluorogenic substrate (A) and PARP cleavage using Western blotting (B). Data were represented as a relative fluorescence compared with the control value. Values are mean±SEM from four experiments. \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs control. ##p<0.01 vs RA. Lane 1: Control, Lane 2: RA (5.0mg/ml), Lane 3: Ac-DEVD-CHO (25.0μM) + RA(5.0mg/ml), Lane 4: Z-IETD-FMK(25.0μM) + RA(5.0mg/ml)

7. DNA 분절에 대한 caspases 억제제들의 영향

附子 추출물에 의하여 유도된 DNA 분절에 대하여 caspase-3, caspase-8의 억제제들의 효과를 관찰하기 위하여, 5.0mg/ml의 附子 추출물을 HL-60 세포에 24시간 동안 노출시키기 3시간 전에 25.0μM Ac-DEVD-CHO(caspase-3 억제제)와 25.0μM Z-IETD-FMK(caspase-8 억제제)를 처리한 후 DNA 분절을 조사하였다. 그 결과 Ac-DEVD-CHO와 Z-IETD-FMK를 전 처리한 군은 附子 추출물에 의해 유도된 DNA 분절을 억제하였다(Fig. 7).



**Fig. 7. Protective effects of caspase inhibitors on Radix Aconiti (RA) extract-induced DNA fragmentation in HL-60 cells** Cells were treated with 5.0mg/ml RA extracts for 24 hours. DNA was extracted and analyzed by 2% agarose gel electrophoresis as described in Materials and Methods. M: 100bp size marker, Lane 1: Control, Lane 2: RA (5.0mg/ml), Lane 3: Ac-DEVD-CHO (25.0μM) + RA (5.0mg/ml), Lane 4: Z-IETD-FMK(25.0μM) + RA(5.0mg/ml)

고찰 및 결론

Apoptosis(세포고사)는 1980년대 후반기부터 중요 관심분야로 세포생물학 영역에 도입되면서 세포의 생성, 분화 및 기능발현 등에 중요하게 작용하고 있음이 밝혀졌고<sup>15,16)</sup>, 최근 연구를 통

하여 모든 항암제가 암세포에 세포고사를 유발한다는 것을 알게 되었다<sup>17)</sup>. 그러나 이들 항암제는 정상세포에도 거의 같은 정도로 세포고사를 일으켜 항암제 부작용의 큰 원인이 되고 있다. 그래서 선택적으로 암세포에만 작용하여 세포고사를 유도하는 것이 항암제 개발의 새로운 목표가 되었다<sup>18)</sup>. 실험적으로 세포고사는 빠른 세포 탈수현상에 의한 세포의 수축, 세포막의 기포화 현상, 세포질내의 칼슘농도 증가, 염색사 응축(chromatin condensation), 핵의 분절(nuclear fragmentation), endonuclease 활성화에 의한 DNA의 사다리 모양 분절(ladder pattern DNA fragmentation, 200 base pairs) 형성, transglutaminase의 활성화 및 세포고사 소체(apoptotic body) 형성 등과 같은 특징적인 현상을 수반하게 된다<sup>19,21)</sup>.

附子(Radix Aconiti)는 aconitine을 위주로 한 맹독성 alkaloid와 atisine을 대표로 하는 저독성 alkaloid를 함유하고 있어<sup>22)</sup>, 임상적으로 사용시 주의가 요구되는 한약재중의 하나로서 다양한 수치를 통하여 aconitine 등의 유독한 물질을 제거한 후 사용하고 있다.

韓醫學에서 附子는 回陽救逆, 補陽, 溫中止痛의 效能으로 四肢厥冷, 心腹冷痛, 陽微欲絕 등의 證에 사용되는 藥材<sup>14)</sup>로써 積聚, 腫瘍의 치료에 攻補兼施의 치료에 응용될 수 있으며<sup>11)</sup>, 본 연구는 인간 백혈병 세포인 HL-60에 대한 附子 추출물의 세포고사 유도효과와 그 기전을 규명하고자 시행하였다.

본 연구에서 附子 추출물이 HL-60 세포독성에 미치는 영향을 살펴본 결과, 附子 추출물이 HL-60 세포의 생존율을 처리한 농도에 따라 의존적으로 감소시켰으며, 이때 IC50 값은 약 5.0~10.0mg/ml인 것으로 나타났다(Fig. 1). 또한 이러한 세포 생존율의 감소가 세포고사에 의한 것인지 확인하고자 5.0mg/ml 附子 추출물을 사용하여 3, 6, 12, 18, 24시간의 다양한 시간 동안 처리한 후 세포고사시 나타나는 특징적인 현상중의 하나로 알려진 DNA 분절현상을 확인하였다. 그 결과는 附子 추출물을 처리한 후 12시간부터 사다리 모양의 분절 현상이 나타나 24시간까지 지속되었다(Fig. 2). 이러한 결과로 미루어보건데, 附子 추출물의 HL-60 세포에 대한 증식 억제효과는 세포고사 유도 효과에 의한 것임을 추측할 수 있었다. 최근 세포고사 유도 기전으로 중요시되고 있는 caspase(cystein aspartate specific proteinase) protease family는 정상적으로 세포 내에서 불활성화 형태로 존재하다가, 외부 자극에 의하여 활성화되어 세포의 구조와 기능 유지에 필요한 단백질인 poly-(ADP-ribose)-polymerase(PARP), inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease(ICAD), 그리고 actin, fodrin, lamin 등과 같은 단백질들을 절단하여 세포고사를 유도하는 것으로 알려져 있다<sup>23,32)</sup>. PARP는 DNA 복구 효소로서 정상세포에서 116kDa의 형태로 존재하다가 어떤 자극이 주어지면 85kDa로 절단되어 세포고사를 촉진하는 단백질로 알려져 있으며, 또한 14종류의 caspase family 중 caspase-3가 세포고사에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>23,30)</sup>.

본 연구에서 附子 추출물의 caspase-3 활성도와 절단에 미치는 영향을 알아본 결과, 附子 추출물은 HL-60 세포에 농도와 시간에 의존적으로 caspase-3 효소 활성도를 증가시키는 것으로 나

타났으며(Fig. 3A & 3B), 이러한 증가는 procaspase-3 단백질의 절단으로 활성형태의 caspase-3가 시간에 따라 형성됨을 통하여 확인하였다(Fig. 3C). 또한 附子 추출물에 의한 HL-60 세포의 caspase-3 protease의 활성도의 증가를 확인하였으므로 caspase-3 protease의 세포내 기질인 poly-(ADP-ribose)-polymerase (PARP)의 절단에 대한 附子 추출물의 효과를 관찰하고자, PARP 1차 항체를 이용하여 Western blotting을 시행한 결과, 附子 추출물에 의한 caspase-3 활성도의 증가는 116kDa의 DNA 복구 효소인 PARP를 85kDa로 절단 효과와 상응하였다(Fig. 5). 이러한 결과로 보건데 附子 추출물에 의한 HL-60세포의 고사 유도 효과는 caspase-3 활성도의 증가에 따른 PARP의 절단에 기인한 것을 알 수 있었다. Caspase-8 protease는 caspase-3를 활성화시키는 initiator caspase 중의 하나로서 Fas/FasL system에 의하여 활성화된다고 알려져 있다<sup>33-37)</sup>. APO-1 혹은 CD95라고도 알려져 있는 Fas 및 이의 ligand인 FasL은 세포고사 신호를 전달하는 activation-induced cell death(AICD)의 mediator라고 알려져 있는데, Fas TNF-receptor family중의 하나로서 FasL의 결합에 의하여 세포고사 활성 신호를 FADD(Fas Associated Death Domain)에 전달하고, FADD는 비활성화 형태인 initiator caspase인 caspase-8을 활성형으로 전환시킨다<sup>33-39)</sup>.

본 연구에서 附子 추출물에 의한 HL-60 세포고사 유도기전에 procaspase-8 protease의 활성도 증가와 이에 따른 Fas/FasL system의 관여 여부를 조사하였다. Fig. 4에서 나타났듯이 附子 추출물에 의하여 활성 형태의 caspase-8 단백질이 처리한 시간에 의존적으로 증가하였으며(Fig. 4A), procaspase-8의 절단을 유도하는 Fas, FasL의 발현도 증가하였다(Fig. 4B). 이러한 결과로 附子 추출물에 의한 세포고사 효과에 중요한 역할을 하는 caspase-3 활성도의 증가는 FasL/Fas/caspase-8의 증가에 의한 것임을 알 수 있었다.

마지막으로 附子 추출물에 의한 HL-60의 고사효과에 caspase-3, caspase-8의 관여 여부를 확인하고자 caspase-3에 대한 억제제인 Ac-DEVD-CHO와 caspase-8에 대한 억제제인 Z-IETD-FMK를 附子 추출물을 처리하기 3시간 전에 처리한 후 caspase-3 활성도와 PARP의 절단에 대한 영향 및 DNA 분절에 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 그 결과 Ac-DEVD-CHO와 Z-IEHD-FMK는 附子 추출물에 의한 caspase-3 활성도의 증가(Fig. 6A)와 PARP의 절단을 억제(Fig. 6B)하였고, 또한 附子 추출물에 의해 유도된 DNA 분절현상(Fig. 7)을 억제하였다. 이러한 결과로 미루어 보건데 附子 추출물에 의한 세포고사 유도효과에 caspase-3, caspase-8이 관여함을 확인하였다.

이상의 결과를 종합해보면 附子 추출물은 HL-60 세포에 고사효과를 나타냈으며, 세포고사 효과기전에 FasL/Fas 발현의 증가로 인한 caspase-8 활성도의 증가, caspase-3 활성도의 증가에 의한 PARP의 절단이 관여하는 것을 알 수 있었다.

앞으로 附子 추출물의 항암제로의 개발을 위하여 정확한 기전 연구와 in vivo 연구가 필요하리라 생각되며, 기존 항암제와의 병용투여시 그 작용을 상승시키거나 또는 부작용을 억제시키는지에 대한 연구도 필요하리라 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업(03-PJ9-PG3-20800-0006)에 의해 지원되었음.

## 참고문헌

1. 辛民敎. 原色臨床本草學. 서울, 南山堂. pp 263-265, 1986.
2. 李尙仁, 安德均, 辛民敎. 韓藥臨床應用. 서울, 成輔社. pp 225-229, 1982.
3. 許浚. 東醫寶鑑. 서울, 南山堂. p 384, 446, 732, 1980.
4. 中醫大辭典編輯委員會編. 中醫大辭典(中藥分冊). 北京, 人民衛生出版社. pp 189-190, 1980.
5. 조선혜, 김창주, 이충렬. 흰쥐 신경세포에서 맥문동과 부자에 의해 유발된 이온전류의 특성. 대한동의생리학회지 12(2): 155-164, 1997.
6. 류도곤, 강순수. 附子 전탕액이 가토의 부신피질 및 신장기능과 혈장 Renin 활성도에 미치는 영향. 대한동의생리학회지 3(2):25-48, 1989.
7. Kidd, V.J. Proteolytic activities that mediate apoptosis. Annu Rev Physiol. 60, 533-573, 1998.
8. Nayfield, S.G., Karp, J.E., Ford, L.G., Dorr, F.A., Kramer, B.S. Potential role of tamoxifen in prevention of breast cancer. J Natl Cancer Inst. 83(20):1450-1459, 1991.
9. Kastan, M.B., Canman, C.E., Leonard, C.J. P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. Cancer Metastasis Rev. 14(1):3-15, 1995.
10. Schulte-Hermann, R., Bursch, W., Low-Baselli, A., Wagner, A., Grasl-Kraupp, B. Apoptosis in the liver and its role in hepatocarcinogenesis. Cell Biol Toxicol. 13(4-5):339-348, 1997.
11. 문 구, 정병화, 김병주. 암 동서의 결합치료 1권. 익산, 원광대학교 출판국. pp 1-22, 255-258, 381-386, 413-419, 477, 448, 1998.
12. 하지용, 정병업, 이선구, 유병길. 大七氣湯이 항암, 면역조절 작용 및 apoptosis에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 15(1):111-124, 2001.
13. 진선두, 신상오, 양재하, 권영규, 김광중. 녹차의 주성분인 epigallocatechin gallate의 항암활성과 apoptosis기전에 관한 분자생물학적 연구. 동의생리병리학회지 15(4):611-620, 2001.
14. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72, 248-254, 1976.
15. Raff, M.C., Barres, B.A., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishizaki, Y., Jacobson, M.D. Programed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. Science 262(5134):695-700, 1993.
16. Thompson, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 267(5203):1456-1462, 1995.
17. Igney, F.H., Krammer, P.H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. Nat Rev Cancer 2(4):277-288, 2002.
18. Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., Lowe, S.W. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. Cell 108(2):153-164, 2002.
19. Wyllie, A.H., Kerr, J.F., Currie, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol. 68, 251-306, 1980.
20. Widmann, C., Gibson, S., Johnson, G.L. Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. J Biol Chem. 273(12):7141-7147, 1998.
21. Cohen, J.J. Apoptosis. Immunol Today. 14(3):126-130, 1993.
22. 落合英三. トリカプト根の腫瘍成分に就して. 日本東洋醫學會誌 19(2):1-11, 1968.
23. Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., Wang, X. Apaf-1, a human protein homologues to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. Cell 90(3):405-413, 1997.
24. Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Lane, B.R., Dixit, V.M. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. Science 275(5303):1122-1126, 1997.
25. Vaux, D.L. CED-4—the third horseman of apoptosis. Cell. 90(3):389-90, 1997.
26. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. Cell 91(4):479-489, 1997.
27. Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., Earnshaw, W.C. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. Nature. 371(6495):346-347, 1994.
28. Wang, Z.Q., Auer, B., Stingl, L., Berghammer, H., Haidacher, D., Schweiger, M., Wagner, E. F. Mice lacking ADPRT and poly (ADP-ribosyl)ation develop normally but are susceptible to skin disease. Genes Dev. 9(5):509-520, 1995.
29. Chang, L.C., Tsai, T.R., Wang, J.J., Lin, C.N., Kuo, K.W. The rhamnose moiety of solamargine plays a crucial role in triggering cell death by apoptosis. Biochem Biophys Res Commun. 242(1):21-25, 1998.
30. Mashima, T., Naito, M., Noguchi, K., Miller, D.K., Nicholson, D.W., Tsuruo, T. Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. Oncogene 14(9):1007-1012, 1997.
31. Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J., Williams, L.T. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. Science 278(5336):294-298, 1997.

32. Zhivotovsky, B., Burgess, D.H., Vanags, D.M., Orrenius, S. Involvement of cellular proteolytic machinery in apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 230(3):481-488, 1997.
33. Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., Dixit, V.M. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85(6):817-827, 1996.
34. Schneider, P., Bodmer, J.L., Holler, N., Mattmann, C., Scuderi, P., Terskikh, A., Peitsch, M.C., Tschopp, J. Characterization of Fas (Apo-1, CD95)-Fas ligand interaction. *J Biol Chem.* 272(30):18827-18833, 1997.
35. Guseva, N.V., Taghiyev, A.F., Rokhlin, O.W., Cohen, M.B. Contribution of death receptor and mitochondrial pathways to Fas-mediated apoptosis in the prostatic carcinoma cell line PC3. *Prostate.* 51(4):231-240, 2002.
36. Muller, M., Strand, S., Hug, H., Heinemann, E.M., Walczak, H., Hofmann, W.J., Stremmel, W., Krammer, P.H., Galle, P. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J Clin Invest.* 99(3):403-413, 1997.
37. Fulda, S., Sieverts, H., Friesen, C., Herr, I., Debatin, K.M. The CD95 (Apo-1/Fas) system mediated drug induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 57(17):3823-3829, 1997.
38. Fulda, S., Los, M., Friesen, C., Debatin, K.M. Chemosensitivity of solid tumor cells in vitro is related to activation of the CD95 system. *Int J Cancer.* 76(1):105-114, 1998.
39. Friesen, C., Fulda, S., Debatin, K.M. Deficient activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in drug-resistant cells. *Leukemia* 11(11):1833-1841, 1997.