

반지련으로부터 분리한 luteolin의 세포고사효과

이은옥 · 김진형 · 안규석¹ · 박영두² · 김성훈*

경희대학교 동서의학대학원 중앙학실험실, 1: 경희대학교 한의과대학 병리학교실, 2: 경희대학교 생명과학부

Apoptotic Effect of Luteolin Isolated from *Scutellaria barbata*

Eun Ok Lee, Jin Hyung Kim, Kyoo Seok Ahn¹, Young Doo Park², Sung Hoon Kim*

Department of Oncology, Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University,

1: Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Kyunghee University, 2: College of Life Science, Kyunghee University

We previously demonstrated that the methylene chloride fraction of *Scutellaria barbata* suppressed human leukemic U937 cell proliferation by inducing apoptosis. In the present study, we have isolated luteolin from *Scutellaria barbata* and evaluated its apoptotic mechanism in Lewis lung carcinoma cells. Luteolin inhibited the proliferation of Lewis lung carcinoma cells in a concentration-dependent manner. Luteolin effectively increased the portion of sub-G₁ DNA content (apoptotic portion) and apoptotic Annexin-V positive cells in a concentration-dependent manner by FACS analysis. Caspase 9 and caspase 3 were activated and PARP was effectively cleaved by luteolin. It also increased the ratio of Bax to Bcl-2 through the decrease of Bcl-2 expression by Western blotting and reduced mitochondrial membrane potential following TMRE staining. These results suggest that luteolin can induce apoptosis through the mitochondrial mediated pathway.

Key words : *Scutellaria barbata*, luteolin, apoptosis, Annexin V, bcl-2, mitochondrial membrane potential

서 론

반지련(半枝蓮)은 꿀풀과에 소속되는 다년생의 초본이며 학명은 *Scutellaria barbata*이다. 약의 성질은 신(辛), 고(苦), 한(寒)하고, 청열해독(淸熱解毒), 활혈(活血), 구어혈(驅瘀血), 화어이뇨(化痰利尿), 소종해독(消腫解毒), 항암(抗癌), 해열(解熱), 진통(鎮痛), 지혈(止血), 해독(解毒)작용을 하며 알칼로이드, 스테로이드, 플라보노이드 등을 함유하고 있다¹⁻². 플라보노이드는 생리적 활성을 갖는 폴리페놀화합물로 식물의 꽃, 과실, 줄기, 뿌리 등 거의 모든 부위에 분포하고 있는 것으로 알려져 있으며 flavones, flavonols, flavanones, flavan-3-ols 과 anthocyanidins로 분류된다³. 녹차의 EGCG², 적포도주의 resveratrol³, 브로컬리의 sulforaphane과 토마토의 lycopene은 이미 잘 알려진 플라보노이드이며 이외 많은 플라보노이드들은 항균, 항산화, 항암, 항바이러스, 항알레르기 및 항염증 활성을 나타낸다^{4,6}.

반지련에서 분리한 luteolin은 flavone류로 타임(thyme), 비

트, 양배추, 컬리플라워 등에도 존재하며^{7,8} low-density lipoprotein의 산화를 저해하여 산화적 스트레스를 제거하고⁹ peroxide radicals의 소거작용을 나타내며⁶, 항암활성을 갖는다고 알려져 있다¹⁰. 또한 luteolin이 세포고사(apoptosis)를 야기시킨다는 것은 보고^{11,12}된 바 있으나, 그 기작은 잘 알려져 있지 않다.

세포고사는 성장, 발달, 조직의 항상성 유지에 아주 중요한 과정이며, 이 과정이 제대로 작동되지 못하면 암, AIDS, 자가면역질환 등 병리적 현상이 일어나게 된다. 세포고사는 약물, UV, 환경적 스트레스 등의 외부 또는 내부의 자극에 의해 유도되며, 세포가 팽창되어 파괴되는 과사와는 달리 세포가 위축되고, 인접하는 세포 사이에 틈새가 생기고, 세포 내에서는 DNA가 규칙적으로 절단되어 단편화되고, 결국은 아포토시스 소체를 형성하고, 이는 가까이 있는 세포에게 먹혀버림으로써 죽음에 이르게 한다^{13,14}. 미토콘드리아는 세포고사의 과정에 중요한 역할을 하는데¹⁵, 여기에 bcl-2 family가 작용하게되고 결국은 caspases의 활성화를 통해 세포고사가 야기된다¹⁴.

이전의 연구에서 반지련이 U937세포의 세포고사를 유도한다는 보고²를 한 바 있고, 이에 반지련에서 분리된 luteolin도 Lewis lung carcinoma 세포고사를 유도함을 확인하여, 세포고사

* 교신저자 : 김성훈, 경기도 용인시 기흥읍 서천리1 경희대 동서의학대학원

· E-mail : sungkim7@khu.ac.kr, · Tel : 031-201-2179

· 접수 : 2005/05/30 · 수정 : 2005/07/01 · 채택 : 2005/08/04

유도 기전을 밝히기 위해 FACS analysis, Western blotting, mitochondrial membrane potential 측정 등의 방법을 이용하여 평가하였던 바 유의성 있는 결과를 얻어 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 세포배양

Lewis lung carcinoma 세포는 FBS가 10% 첨가된 RPMI 1640배지에서 37 °C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였으며 Trypsin-EDTA를 처리하여 플라스크에서 세포를 탈착하여 계대배양하였다.

2. 세포독성¹⁶⁾

LLC 세포주를 well당 1 × 10⁴ 으로 깔고 24시간 후 luteolin을 처리하였다. 24시간 더 배양후 PMS (sigma P-9625, 1.53 mg/ml) 10 ul와 XTT (sigma X-4251, 1 mg/ml) 1ml을 혼합하여 well당 50 ul를 첨가한 후 2시간 후에 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. Annexin-V staining

Luteolin을 처리한 cell을 수거하여 PBS로 세척하였다. Cell을 0.5 ml 1 × binding buffer 용액에 부유한 후 Annexin V-FITC conjugate를 5 ul씩 넣었다. 암실에서 15분간 반응시킨후 1 × binding buffer를 첨가하여 1시간 이내에 FACS로 분석하였다.

4. 세포주기분석¹⁷⁾

Luteolin을 처리한 cell을 수거하여 PBS로 세척한 후 75% cold ethanol을 넣고 -20°C에서 1시간이상 방치하였다. 원심분리한 후 상층액을 제거하고 PBS로 세척하였다. PBS 100 ul에 cell을 부유시킨 후 RNase A (20 mg/ml) 10 ul를 처리하고 37°C에서 30분간 방치하였다. PI (50 µg/ml) 400 ul를 첨가한 후 실온, 암실에서 30분간 방치후 FACS로 분석하였다.

5. Western blotting

Luteolin을 처리한 cell을 수거하여 PBS로 세척하였다. 100 ul lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 % Triton X-100, 0.1 % SDS, 1mM EDTA, protease inhibitor cocktail)를 넣고 얼음상에서 30분간 방치한 후 12,000 rpm, 4 °C에서 20분간 원심분리하였다. 상층액의 단백질을 Bio-Rad DC protein assay kit II를 이용하여 정량한 후 20 µg의 단백질을 4x SDS sample buffer와 혼합하여 5분간 끓였다. 얼음상에서 5분간 식힌후 살짝 원침하여 4-12% SDS-polyacrylamide gels에서 전기영동하였다 (gel running buffer : 25 mM Tris, 250 mM glycine, 0.1 % SDS). 이후 300 mA에서 90분간동안 nitrocellulose membrane (Amersham pharmacia biotech, UK)에 transfer하였다 (transfer buffer : 25 mM Tris, 250 mM glycine, 20% MeOH). Transfer된 membranes을 0.1% Tween 20 와 5% skim milk가 포함된 TBS buffer 로 실온에서 90분간 blocking시킨 후 rabbit anti-human cleaved caspase-3 and caspase 9 (Cell signaling, 1

: 1000 dilution), mouse anti-human PARP (Pharmingen, San Diego, CA, 1:1000 dilution), mouse anti-human bcl-2 and bax (Pharmingen, San Diego, CA, 1:1000 dilution) primary antibodies를 0.1% Tween 20 와 3% skim milk가 포함된 TBS buffer에 희석하여 4°C에서 overnight으로 반응시켰다. 0.1% Tween 20이 포함된 TBS buffer로 10분간 4회 세척후 1:2000 희석한 goat anti-mouse IgG Hoseradish peroxidase (HRP) conjugated secondary antibody (Zymed) 또는 goat anti-rabbit IgG Hoseradish peroxidase (HRP) conjugated secondary antibody를 실온에서 90분간 반응시켰다. 0.1% Tween 20이 포함된 TBS buffer로 10분간 4회 세척후 ECL western blotting detection kit (Amersham Pharmacia biotech, UK)로 발색시킨후 Agfa X ray films에 노출시켜 현상하였다.

6. Mitochondrial membrane potential

Luteolin을 처리한 세포를 PBS로 세척 후 TMRE (150 nM)를 처리하여 37 °C에서 10분간 염색하였다 염색 후 PBS로 세척하여 형광현미경으로 촬영하였다.

7. 통계처리

모든 실험결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었다.

결과 및 고찰

1. Luteolin의 세포독성 효과

LLC 세포에 대한 luteolin의 세포독성을 살펴보았다. Luteolin 5, 10, 20, 40 µM을 24시간과 48시간 처리한 결과 농도와 시간에 의존적으로 LLC세포의 생존율을 저하시킴을 확인하였다 (Fig. 1). 이는 luteolin이 LLC세포의 증식을 저해함과 동시에 강한 독성을 나타냄을 의미한다.

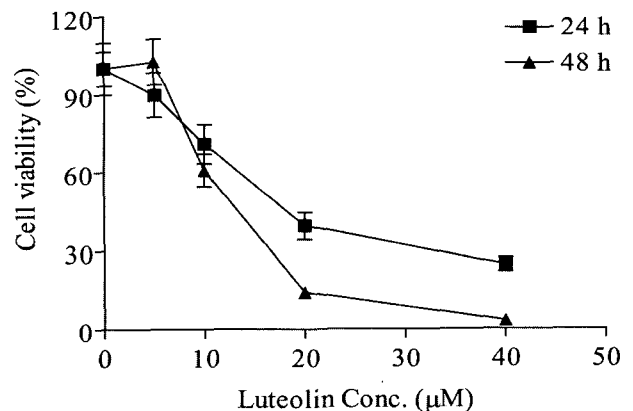


Fig. 1. Effect of luteolin on the proliferation of LLC cells. Cell viability were evaluated by XTT assay in luteolin-treated cells. Cells were treated with various concentrations luteolin for the indicated times. After incubation at 37 °C, 50 ul of XTT working solution was added to each well. Cell viability was then determined compared with control. All data are presented as means ± SD.

2. Luteolin의 membrane alteration 유도효과

Luteolin이 LLC세포에 대해 독성을 나타냄에 따라 세포고사

를 유도하는지를 확인하고자 Annexin V를 염색하였다. 세포고사가 유도되면 세포막에 변화가 일어나는데, 그 중 세포막의 phosphatidylserine (PS)이 세포막의 외부로 표출되고, 이에 phospholipid-binding protein인 Annexin V가 PS와 강하게 결합하게 된다¹⁸⁻²⁰. Annexin V에 FICT를 결합시킴으로써 초기에 고사가 유도된 세포에서는 밝은 형광을 나타내게 된다. 실험결과 luteolin은 농도에 의존적으로 Annexin V형광을 증가시켜 농도 20 μ M에서는 15.7%까지 세포막에 변화를 초래하였다 (Fig. 2).

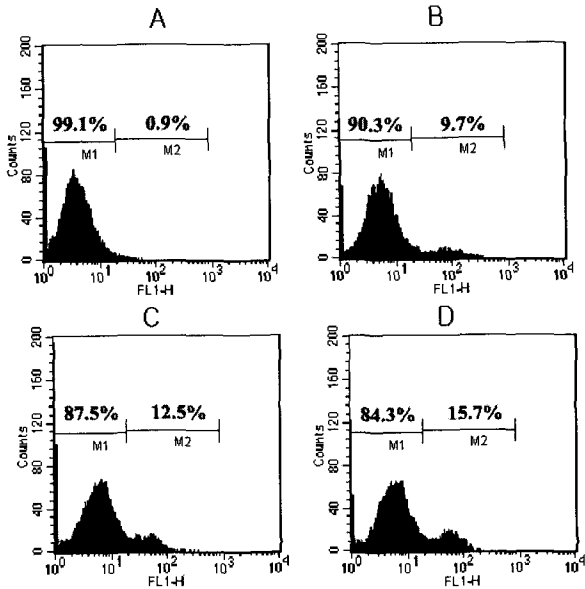


Fig. 2. Effect of luteolin on membrane alteration of LLC. Cells were treated with 0 (A), 5 (B), 10 (C) and 20 μ M (D) of luteolin for 24 h. Cells were stained with Annexin V and analyzed using CellQuest Software with a flow cytometry system.

3. Luteolin의 세포고사 유도효과

또한 luteolin이 세포고사를 유도함을 세포주기분석을 통하여 다시 한번 확인하였다. 세포주기는 DNA의 함량에 따라 G0/G1, S, G2/M 부분으로 이뤄지지만 때론 sub-G1 부분이 나타나는 경우도 있는데, 이는 세포가 괴사 (necrosis)가 아닌 고사로 사멸했다는 것을 의미한다²¹. LLC세포에 luteolin을 처리한 결과 sub-G1 부분이 3%에서 16%까지 증가하였다(Fig. 3). 따라서 luteolin이 LLC세포에서 세포고사를 유도함을 확인하였다.

4. Luteolin의 세포고사 관련인자에 미치는 영향

Luteolin이 유도하는 세포고사의 기전을 알아보기 위해 세포고사에 관여하는 관련인자를 western blot으로 확인하였다. Caspases의 활성화는 세포고사 유도 중요한 과정이다^{22,23}. Caspases는 initiator caspases (2, 8, 9, 10)와 effector caspases (3, 6, 7)로 나뉘지며 이들은 불활성 상태로 만들어진 후 어떠한 자극에 의해 활성화 된다^{13,14}. 특히 활성화된 caspase 3은 DNA repair효소인 PARP를 쪼갬으로써 세포고사를 나타내게 된다^{24,25}. 본 실험에서 luteolin은 세포고사를 유도하는 caspase 9과 3를 활성화 시키고 PARP를 절단 시키는 것을 확인하였다(Fig. 4).

또한 세포고사의 과정에 bcl-2 family들이 관여하는 것으로

알려져 있는데 이들 bcl-2 family는 미토콘드리아의 투과성을 조절함으로써 caspases활성에 관여하고 세포고사의 유도를 돕는다¹⁶. 본 실험에서 luteolin은 bax에는 영향을 미치지 않았으나 세포고사를 저해하는 bcl-2는 농도 의존적으로 감소시킴으로써 (Fig. 5) luteolin이 bcl-2 family에 영향을 미침을 확인하였다.

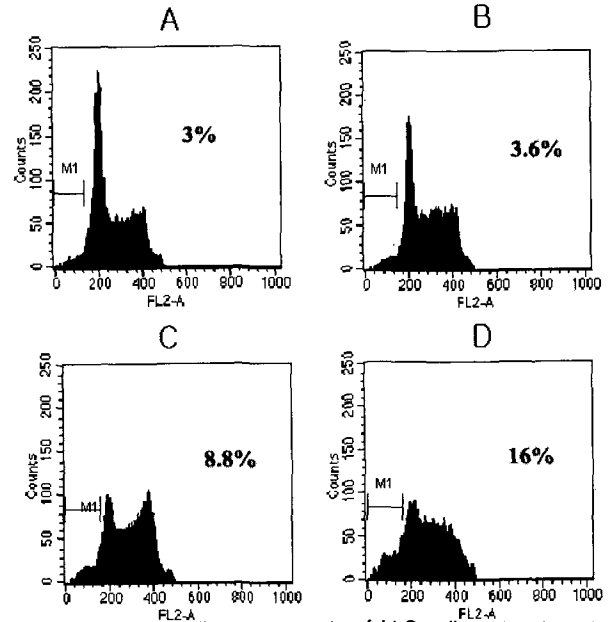


Fig. 3. Effect of luteolin on cell cycle of LLC cells. Cell cycle analysis was performed after propidium iodide staining by flow cytometry. Cells were treated with 0 μ M (A), 5 μ M (B), 10 μ M (C) and 20 μ M (D) of luteolin for 24 h. After fixing in 75% ethanol, cells were stained by adding propidium iodide. DNA contents were analyzed using CellQuest Software with a flow cytometry system.

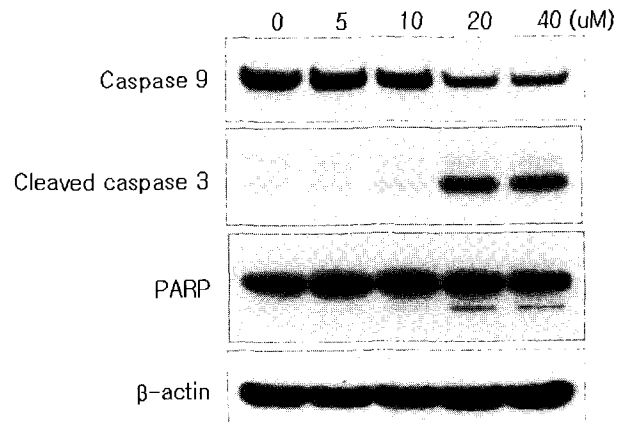


Fig. 4. Effect of luteolin on caspases and PARP. Expressions of apoptosis related proteins were investigated by western blotting. Cells were treated with various concentrations of luteolin for 24 h. The cell lysates containing 20 μ g of proteins were separated on 4-12% NuPAGE Bis-Tris gels, transferred to Hybond ECL transfer membrane and probed with specific antibodies. The proteins were developed using an ECL western blotting detection kit and exposed to X ray films.

5. Luteolin이 mitochondrial membrane potential에 미치는 영향

마지막으로, bcl-2 family와 관련하여 세포고사를 유도하는 luteolin이 미토콘드리아 막의 전위에 어떠한 영향을 미치는지 TMRE로 미토콘드리아 막을 염색하여 형광현미경으로 촬영하였

다. 결과, luteolin을 처리한 군에서 미토콘드리아 막의 전위가 감소됨을 관찰하였다(Fig. 6). 즉, luteolin은 미토콘드리아를 경유하여 세포고사를 유도한다는 것을 확인하였다.

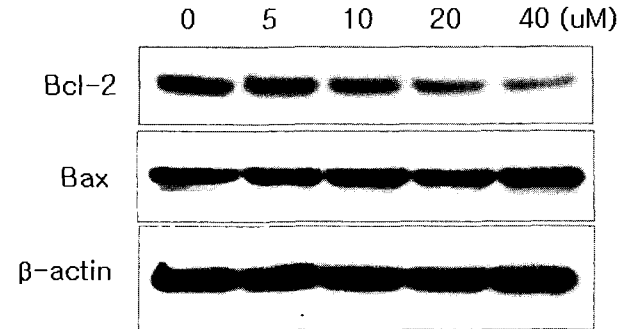


Fig. 5. Effect of luteolin on bcl-2 family. Expressions of apoptosis related proteins were investigated by western blotting. Cells were treated with various concentrations of luteolin for 24 h. The cell lysates containing 20 µg of proteins were separated on 4-12% NuPAGE Bis-Tris gels, transferred to Hybond ECL transfer membrane and probed with specific antibodies. The proteins were developed using an ECL western blotting detection kit and exposed to X ray films.

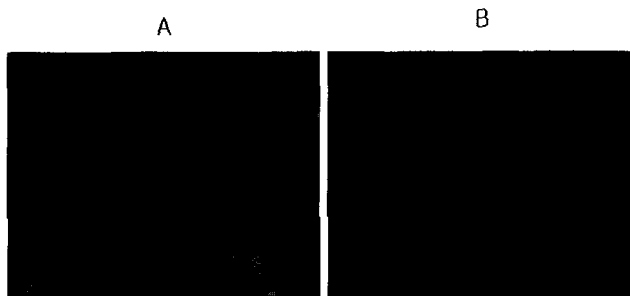


Fig. 6. Effect of luteolin on mitochondrial membrane potential. Cells were treated with 0 µM (A) and 10 µM (B) of luteolin for 24 h. After washing with PBS, cells were stained by adding TMRE solution (150 nM) for 30 min at 37 °C. Then, randomly chosen fields were photographed under a Axiovert S 100 microscope.

결론

플라보노이드의 일종인 luteolin이 세포고사를 유도한다는 보고는 있으나, 그 기작은 알려져 있지 않아 그 작용 기전을 살펴보고자 하였다. 본 실험에서 luteolin은 LLC세포에 농도와 시간에 의존적으로 세포독성을 나타내었으며, 이는 Annexin V염색과 세포주기 분석을 통하여 세포고사를 유도한다는 것을 확인하였다. 또한 luteolin은 세포고사와 관련된 단백질인 caspase 9와 3을 활성화 시키고 이에 PARP가 쪼개지는 것을 western blot 결과를 통해 알 수 있었다. 또한 bcl-2를 감소시킴으로써 bcl-2 family에 luteolin이 영향을 주어 미토콘드리아 세포막의 전위를 감소시킨다는 결과도 얻었다. 이는 luteolin이 bcl-2 family에 영향을 끼침으로써 세포막의 전위가 감소되고 이에 cytochrome c의 유출이 예상되며, caspases가 활성화되어 PARP를 쪼갬으로써 세포고사가 유도됨을 알 수 있다. 따라서, 과루인의 주요 물질인 luteolin은 미토콘드리아를 통해 세포고사를 유발함으로써 항암 효과를 나타내어 향후 암예방치료 물질로 활용 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 보건복지부 한방치료기술개발사업 (01-PJ9-PG1-01CO05-0004)의 지원에 의해 수행되었기에 감사드립니다.

참고문헌

1. 구 명, 서홍화. 항종류본초도보, 상무인서관, pp 30-32, 1990.
2. 차윤이, 이은옥, 이주령, 강인철, 박영두, 안규석, 김성훈. 반지련의 Methyl chloride 분획이 U937 단핵 세포 압주의 세포고사에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 17(3):629-632, 2003.
3. Crozier, A., Burns, J., Aziz, A.A., Stewart, A.J., Rabiasz, H.S., Jenkins, G.I., Edwards, C.A., Lean, M.E. Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability. Biol. Res. 33(2):79-88, 2000.
4. Henning, S.M., Niu, Y., Liu, Y., Lee, N.H., Hara, Y., Thames, G.D., Minutti, R.R., Carpenter, C.L., Wang, H., Heber, D. Bioavailability and antioxidant effect of epigallocatechin gallate administered in purified form versus as green tea extract in healthy individuals. J. Nutr. Biochem. Aug 1, 2005.
5. Bianchini, F., Vainio, H. Wine and resveratrol: mechanisms of cancer prevention? Eur. J. Cancer Prev. 12, 417-425, 2003.
6. Surh, Y.J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nat. Rev. Cancer 3, 768-780, 2003.
7. Duraj, J., Zazrivcova, K., Bodo, J., Sulikova, M., Sedlak, J. Flavonoid quercetin, but not apigenin or luteolin, induced apoptosis in human myeloid leukemia cells and their resistant variants. Neoplasma. 52(4):273-279, 2005.
8. Materska, M., Perucka, I. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (Capsicum annum L). J. Agric. Food Chem. 53(5):1750-1756, 2005.
9. Kim, D.I., Lee, T.K., Lim, I.S., Kim, H., Lee, Y.C., Kim, C.H. Regulation of IGF-I production and proliferation of human leiomyomal smooth muscle cells by Scutellaria barbata D. Don in vitro: isolation of flavonoids of apigenin and luteolin as acting compounds. Toxicol. Appl. Pharmacol. 205(3):213-224, 2005.
10. Eldridge, A.L., Haytowitz, D.B., Bhagwat, S., Gebhardt, S. E., Holden, J.M., Beecher, G.R., Peterson, J., Dwyer, J. Flavonoid Content of Vegetables: The USDA's Flavonoid Database. Human Nutrition Research Center, ARS, USDA. March 2003.
11. Garcia, F, Adzet, T., Canigual, S. Activity of artichoke leaf extract on reactive oxygen species in human leukocytes, Free Radic. Res. 33, 661-665, 2000.
12. Samejima, K., Kanazawa, K., Ashida, H., Danno, G. Luteolin: a strong antimutagen against dietary carcinogen,

- Trp-P-2, in peppermint, sage, and thyme, *J. Agric. Food Chem.* 43, 410-414, 1995.
13. Mitra, B., Saha, A., Chowdhury, A.R., Pal, C., Mandal, S., Mukhopadhyay, S., Bandyopadhyay, S., Majumder, H.K. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. *Mol. Med.* 6(6):527-541, 2000.
 14. Ko, W.G., Kang, T.H., Lee, S.J., Kim, Y.C., Lee, B.H. Effects of luteolin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human myeloid leukaemia cells. *Phytother. Res.* 16(3):295-298, 2002.
 15. Kaufmann, S.H., Hengartner, M.O. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends in Cell Biology* 11, 526-534, 2001.
 16. Reed, J.C. Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends in Molecular Medicine* 7, 314-319, 2001.
 17. Green, D.R. Reed, J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312, 2003.
 18. Jost, L.M., Kirkwood, J.M., Whiteside, T.L. Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells. *J. Immunol. Methods* 147, 153-165, 1992.
 19. Herrmann, M., Lorenz, H.M., Vollm R., Grünkem M., Woithm W., Kaldenm J.R. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic Acids Res.* 22, 5506-5507, 1994.
 20. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C.A. novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods.* 184(1):39-51, 1995.
 21. Haupt, Y., Rowan, S., Shaulian, E., Vowsden, K.H., Oren, M. Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev.* 9(17):2170-2183, 1995.
 22. Homburg, C.H., de Haas, M., von dem Borne, A.E., Verhoeven, A.J., Reutelingsperger, C.P., Roos, D. Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood* 85(2): 532-540, 1995.
 23. Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T., van Oers, M.H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84(5):1415-1420, 1994.
 24. Kolenko, V.M., Uzzo, R.G., Bukowski, R., Finke, J.H. Caspase-dependent and -independent death pathways in cancer therapy. *Apoptosis* 5, 17-20, 2000.
 25. Shi, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell* 9, 459-470, 2002.
 26. 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, 346-347, 1994.
 27. Soldani, C., Scovassi, A.I. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis* 7, 321-328, 2002.