骨碎補 부탄올 추출물의 U937 세포주 세포자멸사에 미치는 효과

조성연 · 정한솔*

우석대학교 한의과대학 병리학교실

Effects on the Apoptosis of U937 cell line by n-butanol Extracts of *Drynariae Rhizoma*

Sung Yeon Cho, Han Sol Jeong*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Woosuk University

To investigate the possible mechanism of *Drynariae Rhizoma* extracts as a candidate of anti-cancer drug, I examined the effects of *Drynariae Rhizoma* extracts on the apoptosis of U937 cell line. MTT assay, flow cytometric analysis, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, Western blot analysis, and RT-PCR were performed. *Drynariae Rhizoma* extracts treatment reduced the cell viablilty of U937 cells in a dose-dependent manner, which was associated with induction of apoptotic cell death. *Drynariae Rhizoma* extracts treatment also reduced the levels of Bcl-xL anti-apoptotic protein expression and increased the levels of caspase-3, p53, pro-apoptotic protein, in U937 cells. RT-PCR data revealed that the level of bcl-2, bcl-xL mRNA expressions decreased in a dose-dependent manner. These findings suggest that *Drynariae Rhizoma* extracts may have induction of apoptotic cell death via regulation of several growth regulatory gene products. The abbreviations used are: FBS, fetal bovine serum; PBS, phosphate buffered saline; PI, propidium iodide; OD, optical density; DiOC6, 3,3-dihexyloxa carbcyanine iodide; MTT, 3 [4-5-dimethylthiazol-2-yl] -2-diphenyltetrazolium bromide.

Key words : mitochondrial transmenbrane potential, RT-PCR

서 론

Apoptosis is an activer process of cell death and plays important roles in maintaining homeostasis in multicellular organism.

암이란 인체를 구성하는 정상세포가 여러 가지 발암인자에 노출되어 오랜 기간 동안 돌연변이가 된 후 과도한 증식으로 형성되는 신생물을 말한다[1]. 정상세포의 성장은 한 생명체 전체의 필요에 의해 정교하게 조절되는데 반해, 암세포는 스스로 계속 분열하여 결국 정상조직을 침범하고 기능을 방해한다[2]. 그러므로 정상세포가 암세포로 변환되면 정상세포생리에 중심적인 역할을 하는 조절기능이 혼란을 초래하는 것으로 생각할 수 있다. 사람에서 발생하는 암의 종류는 백가지 이상으로 알려져 있는데 이들 암의 대부분은 암종, 육종, 그리고 백혈병/림프종의 세 군으로 분류된다. 비록 암이 여러 다른 질환의 집합 질환이라고 생각되지만, 여러 가지 악성 종양은 공통적으로 주위조직을 침범하여 파괴하고, 혈액 혹은 림프선과 같은 순환기를 통하여 멀리 떨어져 있는 장기까지 전이되므로 부분적인 절제술과 같은 방법으로는 치료할 수 없다[2]. 현재 통용되고 있는 암의 치료법은 외과적 절제술, 화학약물요법, 방사선 치료법, 혈관형성억제법, 면역증강법, 혈액종양에 있어서 골수이식법 등이 있다.

암 치료의 성공여부를 결정하는 것은 조기 발견과 그에 따라 외과적 절제 혹은 방사선 치료를 통해 암을 치료할 수 있는가 여부이다. 불행히도 대부분의 암을 진단하는 시기에는 이미 전이가 일어나 있기 때문에 외과적 절제나 방사선요법 등만으로는 치료되지 않는다. 최근에는 세포분화유도법 등의 새로운 치료방법이 연구되고 있으며, 특히 화학물질과는 달리 부작용이 적은 천연물로부터 새로운 항암물질을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다[3].

한의학에서 암에 대한 기재는 《黃帝內經》[4,5]에서 腸覃, 石

* 교신저자 : 정한솔, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 한의과대학

· E-mail : hansol@woosuk.ac.kr, · Tel : 063-290-1539

· 접수 : 2006/03/02 · 수정 : 2006/03/30 · 채택 : 2006/04/07

瘕, 息賁, 癥病, 伏梁, 厥疝, 瘕聚 등으로,《諸病源候論》[6]에서 "留結不散"이라 하여 氣血이 체내에 留結된 결과로 발생된다고 하였고,《肘後備急方》[7]에서는 "돌과 같이 단단하고 통증이 극심하여 주야로 울 정도이며 치료하지 않으면 백일 내에 죽는다"고 하여 오늘날의 암과 유사한 증상을 기술하고 있다. 宋代의《衛濟寶書》[8]에서 최초로 암이라는 용어가 기술되었다. 이 외 문헌에 나타난 종양의 범위에 드는 病症으로는 反胃, 噎膈, 積聚, 痞塊, 癥瘕, 痃癖, 石瘤등 다양하게 기술하고 있다[9-11].

骨碎補는 성미가 苦溫하며 補腎强骨, 止痛續筋骨의 효능이 있어서 腎虛腰痛이나 跌打閃挫에 쓰이는 한약재[12]로 『本草綱目』[13]에는 "瘀血을 헤치고 피를 멈추며 부러진 것을 이어지게 하고 뼈 안의 毒氣, 風血惡疼痛, 五勞六極瘡, 上熱下冷, 惡瘡을 낫게 하고 蟲을 죽이며, 耳鳴, 腎虛久泄, 牙疼을 다스린다"고 하였다. 骨碎補에 대한 연구로는 정[14] 등은 骨碎補의 에탄올 추출물이 cathepsin K로 인한 뼈의 흡수를 막아주며 뼈의 아교질 단백분해를 억제한다고 보고하였고, Ma[15] 등은 骨碎補가 鷄胎兒의 뼈의 석회화를 촉진시킨다고 보고하였다. 또 Wang[16]은 骨碎補가 streptomycin으로 인한 골독성을 감소시킨다고, 趙[17] 등은 골성관절염에 있어서 연골세포기능을 개선시키고 세포의 퇴행성 변화를 지연시킴으로 관절병의 병변을 저하시키는 것으로, 王[18] 등은 동맥경화의 죽종형성을 예방하는 것으로 보고하였다.

본 연구에서는 골의 파괴를 예방하고 형성을 촉진시키며, 뼈의 퇴행성 변화를 지연시키고 항염증 기능이 있는 것으로 알려져 왔던 骨碎補가 U937 백혈병세포주의 세포자멸사에 어떠한 영향을 미치는지 보기 위하여 용매분획을 한 후 클로로포름층, 에탄올층, 부탄올층을 추출하여 여러 가지 apotosis기전을 관찰한 결과 부탄올 층에서 유의성 있는 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재 료

1) 한약재의 추출

본 실험에 사용한 骨碎補는 우석대학교 한방병원에서 정선하였고, 추출방법은 다음과 같다(Fig. 1).

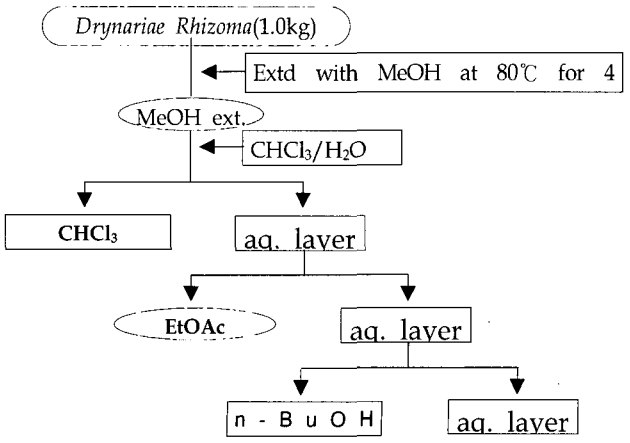

Fig. 1. 骨碎補 추출과정

2) 세포배양

한국 세포주은행(KCLB)에서 분양 받은 U937 세포(human histiocytic lymphoma cell line)[19]는 RPMI-1640 media에 10% fetal bovine serum을 첨가하여 습윤한 상태의 CO_2 incubator에서 5% CO_2 농도를 유지한 채 배양하였다.

3) 시약 및 항체

실험에 사용한 시약은 RPMI 1640 media, FBS(GIBCOBRL, Grand island, USA), PBS, PI, TEMED, Trizol(Life Technonogies ®, Grand island, USA), Taq DNA polymerase, M-MLV reverse transcriptase, Oligo(dT), PCR marker(Promega, Madison, USA), dNTP set(Amersham pharmarcia Biotech Inc., Piscataway, USA), prestained SDS-PAGE standard, sodium dodecyl sulfate(Bio-Rad, Hercules, USA), 기타 시약은 특급시약 및 세포배양용 시약을 사용하였다. 사용한 항체는 Monoclonal human anti-Bcl-xL antibody, Monoclonal Anti-human Caspase 3 antibody(이상 R&D system, Minneapolis, USA), anti-rabbit p53 antibody(Cell Signaling, Beverly, USA)를 사용하였다.

2. 방법

1) 세포생존율 측정(MTT assay)

계대배양한 U937 세포의 세포부유액을 조제(1×10^6cells/well)하고 骨碎補 부탄올 추출물을 농도별로(1~100 ㎍/㎖) 처리하여 48 시간 동안 37 ℃의 CO_2 배양기(5%-CO_2, 95%-air) 내에서 배양하였다. 배양 종료 4 시간 전에 5 ㎎/㎖농도로 DPBS-A(pH 7.4)에 희석된 MTT용액 20 ㎕를 각 well에 첨가하고, 0.1 N HCl에 녹인 10% SDS 100 ㎕로 용해시켜 18 시간 동안 은박지로 빛을 차단하였다. 발색된 각 well의 흡광도를 ELISA reader를 이용해서 570 ㎚에서 측정한 후 대조군의 흡광도와 비교하여 세포생존율을 백분율로 환산하였다.

2) 단백질 정량 및 Western blot analysis[20]

배양된 U937 세포에 骨碎補 부탄올 추출물을 1, 10, 100 ㎍/㎖의 농도로 24 시간 동안 처리한 후 수집하여 PBS로 세정하고 lysis buffer(50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 100 ㎍/㎖ PMSF, 10 ㎍/㎖ leupeptin, 1%NP-40)를 사용하여 30 분 가량 얼음에 둔 다음 pipetting으로 용해시켰다. 원심분리 후 상층액을 얻어서 Bradford reagent를 이용하여 단백질을 정량하였고[21], 전체 lysate 30 ㎍/lane을 기준으로 12% SDS PAGE gel에 loading하였다. 전기영동이 끝난 젤의 단백질들은 PVDF membrane으로 230 mA에서 1 시간 동안 transfer하였고, 5% skim milk를 이용하여 1 시간 동안 blocking하였다. 1차 항체는 anti-rabbit caspase 3 monoclonal antibody, anti-rabbit bcl-xL antibody, anti-rabbit p53 antibody를 각각 1: 1000, 1: 1000, 1: 500으로 3% BSA in PBS에 희석, 4℃에서 overnight 하여 반응시켰다. 2차 항체는 horseradish peroxidase(HRP)가 결합된 anti-goat IgG를 1: 10000으로 5% skim milk에 희석하여, 실온에서 1 시간 동안 반응시키고 ECL을 이용하여 band를 확인하였다.

3) Propidium Iodide (PI) 염색에 의한 DNA 함량 분석

Nicoletti 등의 방법[22]으로 계대배양 중인 U937 세포에 1, 10

㎍/㎖의 骨碎補 부탄올 추출물을 첨가한 후, 24 시간 및 48 시간 동안 배양한 다음, 세포를 수집, 세정(×3회, 1,500 rpm, 5분)한 후, 침전시킨 세포분획에 PI(10 ㎍/㎖)를 20 ㎕/1×10^{6}cells의 농도로 염색 (4℃, 30 분간 반응)한 다음 flow cytometer(Coulter, EPICS XL; excitation: 488 nm emission: 620 nm)를 이용해서 DNA fragmentation(sub-G1 peak)을 정량하였다.

4) Mitochondrial transmembrane potential(ΔΨm) 측정

계대배양 중인 U937 세포에 1, 10 및 100 ㎍/㎖의 骨碎補 부탄올 추출물을 첨가한 후, 24 시간 동안 배양한 다음, 세포를 수집하여 세정(×3회, 1,500 rpm, 5분)한 후, 1×10^{6}cells/well이 되도록 세포를 조정해서 원심분리(250 g, 10 분)하고 침전시킨 세포분획에 DiOC6(최종농도: 40 nM)로 염색시켜 37 ℃에서 15 분간 반응시킨 다음 laser flow cytometer(excitation: 488 nm emission: 525 nm)에서 mitochondrial transmembrane potential(ΔΨm)을 측정하였다[23].

5) RT-PCR

骨碎補 부탄올 추출물을 각각 1, 10 및 100 ㎍/㎖의 농도로 처리한 후, 24 시간 동안 37 ℃의 CO_2 배양기 내에서 배양한 U937 세포로부터 RNA를 분리하였다. Total RNA는 Trizol reagent를 이용하였으며 제조회사의 방법에 준하였다. cDNA는 M-MLV reverse transcriptase와 random hexamer를 primer로 이용하여 합성하였고, Taq DNA polymerase를 이용하여 Perkin Elmer 2400 thermocycler에서 30 cycle 동안 증폭하였다. 각각의 cycle은 95 ℃에서 30 초간 denaturation 시킨 후, 55 ℃에서 30 초간 annealing 시키고, 72 ℃에서 30 초간 extension시켰다. PCR product는 1% agarose gel에서 전기영동하였고, ethidium bromide로 염색을 하였다24. PCR에 사용된 primer는 다음과 같다.

Table 1. Sequence of primer used for RT-PCR.

Gene		Oligonucleotide sequence
GAPDH	sense	5'-CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA-3'
	antisense	5'-CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT-3'
bcl-2	sense	5'-CGA CGA CTT CTC CCG CCG CTA CCG C-3'
	antisense	5'-CCG CAT GCT GGG GCC GTA CAG TTC C-3'
bcl-xL	sense	5'-TTG GAC AAT GGA CTG GTG GA-3'
	antisense	5'-GTA GAG TGG ATG GTC AGT G-3'

6) 통계처리

통계처리는 Student's t-test로 하였으며, $p<0.05$이하를 유의성이 있는 것으로 판정하였다[25].

결 과

1. 세포 생존율에 미치는 영향

계대배양한 백혈병세포주인 U937 세포에 1, 10 및 100 ㎍/㎖ 농도의 骨碎補 부탄올 추출물을 첨가해서 48 시간 동안 배양하고, MTT assay로 세포증식반응을 측정한 결과, 미처리군을 100%로 하였을 때, 1, 10 및 100 ㎍/㎖ 의 농도 투여군에서는 각각 85.5±3.7%, 66.7±3.9%, 59.8±3.8%로 유의성 있는 억제를 보였다(Table 2).

Table 2. Effect of n-butanol extracts of Drynariae Rhizoma on the proliferation of cultured U937 leukemia cells.

(㎍/ml) \ Cell Type	U937
0	100±3.6
1.0	85.5±3.7*
10	66.7±3.9**
100	59.8±3.8**

n-butanol extracts of *Drynariae Rhizoma*(1~100 ㎍/ml) was treated with cultured U937 leukemia cells, and incubated for 48 hours, and the cells assayed by MTT method. The OD of each well was measured at 570 nm with a microplate reader. The data represents the mean±SE of 3 experiments. *: Significantly different from control group(*p<0.05, **p<0.01).

2. 세포자멸사 유관 단백질 발현

계대배양한 U937 세포에 骨碎補 부탄올 추출물을 농도별(1~100 ㎍/㎖)로 24 시간동안 처리한 후 단백질을 추출하여 western blotting을 통해 세포자멸사를 유도하거나 억제하는 단백질의 발현을 관찰한 결과 세포자멸사를 억제하는 단백질로 알려진 Bcl-xL의 발현은 농도의존적으로 점차 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 세포자멸사를 유발하는 중요한 단백질인 caspase-3와 p53 단백질의 발현은 농도의존적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

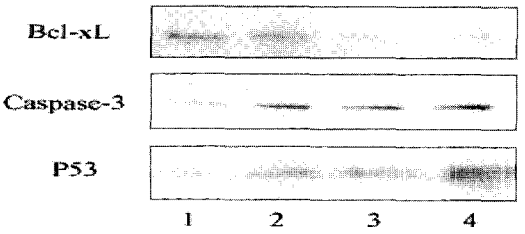

Fig. 2. Western blot analysis of Bcl-xL, caspase-3, p53. The cells were treated with n-butanol extracts of *Drynariae Rhizoma* for 24 hours, and lysates were collected for immunoblotting analysis. Total protein were isolated from untreated cells(lane 1) and cells treated with 1 ㎍/ml(lane 2), 10 ㎍/ml(lane 3), or 100 ㎍/ml(lane 4) for 24 hours.

3. Sub G1 peak

骨碎補 부탄올 추출물을 농도별로(1~100 ㎍/㎖) 24 시간 동안 처리한 U937 세포를 PI로 염색하여 flow cytometer로 세포주기의 분포도를 분석한 결과 미처리군과 비교하여 1, 10 및 100 ㎍/㎖ 의 처리군에서 각각 34.7±2.0%, 36.2±3.3%, 38.9±0.9%로 세포자멸사를 나타내는 sub G1 peak가 유의성 있게 증가하였다(Table 3).

Table 3. Effect of n-butanol extracts of *Drynariae Rhizoma* on the apoptosis of cultured U937 cells.

(㎍/ml) \ Cell Type	U937
0	26.7±2.7
1.0	34.7±2.0*
10	36.2±3.3*
100	38.9±0.9**

n-butanol extracts of Drynariae Rhizoma(1~100 ㎍/ml) was treated to cultured U937 cells, and incubated for 24 hours, and then cells were collected and the sub-G1 peak was measured by a flow cytometer staining with propidium iodide. The data represents the mean±S.E of 3 experiments. *: Significantly different from control group(*p<0.05, **p<0.01).

4. Mitochondrial transmembrane potential(ΔΨm)

骨碎補 부탄올 추출물을 농도별(1, 10 ㎍/㎖)로 24시간 동안 처리한 U937 세포를 DiOC6로 염색하여 flow cytometer로 mitochondria의 membrane potential을 분석한 결과 미처리군에 비해 1 ㎍/㎖의 농도에서 현저한 membrane potential의 감소를 보였고 10 ㎍/㎖의 농도에서도 미처리군에 비해 감소를 보였으나 1 ㎍/㎖의 농도보다는 덜하였다(Fig. 3).

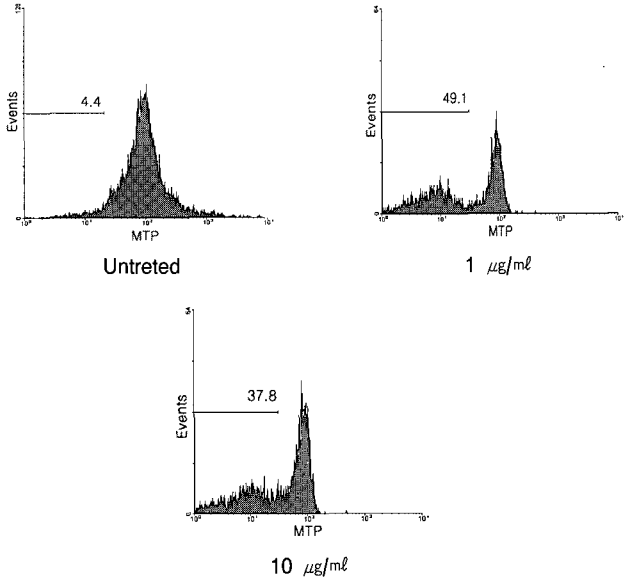

Fig. 3. Alteration of ΔΨm induced by n-butanol extracts of *Drynariae Rhizoma*. Determination of DiOC6 incorporation into untreated U937 cells or treated with n-butanol extracts of Drynariae Rhizoma(1, 10 ㎍/㎖) for 24 hours. Cells were stained with DiOC6 in the presence of a buffer containing either 140 mM NaCl or 140 mM KCl. Results are representative of three independent experiments.

5. RT-PCR에 의한 bcl-2, bcl-xL mRNA의 발현양상

骨碎補 부탄올 추출물을 농도별로 투여(1~100 ㎍/㎖)하고 24 시간 동안 배양한 U937 세포에서 RNA를 추출한 후 cDNA를 합성하여 PCR을 시행하였고, 1% agarose gel에서 전기영동한 결과, 미처리군(lane 1)에 비하여 실험군(lane 2, 3, 4)에서 apoptosis 억제유전자인 bcl-2, bcl-xL의 mRNA 발현이 전반적으로 감소하고 있음을 관찰하였다(Fig. 4).

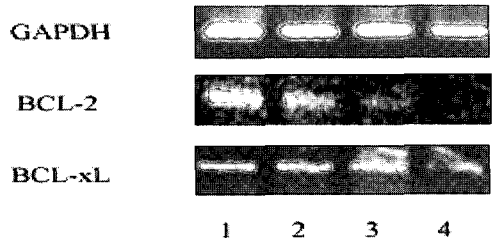

Fig. 4. Expression of anti-apoptotic genes(bcl-2, bcl-xL). Treatment of n-butanol extracts of *Drynariae Rhizoma* for 24 hours decrease the expression of Bcl-2, Bcl-xL in U937 cells in a dose dependent manner. Poly(A+)RNA isolated from untreated cells(lane 1) and cells treated with 1 ㎍/㎖ (lane 2), 10 ㎍/㎖ (lane 3), or 100 ㎍/㎖ (lane 4) of n-butanol extracts of *Drynariae Rhizoma* for 24 hours.

고 찰

종양이란 인체를 구성하고 있는 어떤 정상 세포가 어떤 자극에 의하여 유전자의 형질전환이 발생하고 그 결과 세포의 형태학, 생물학, 화학, 물리학, 면역학적 행동이 변한 변형세포가 유전적으로 대를 이어 무절제한 증식을 함으로써 형성된 변형세포의 집단, 즉 새로이 생긴 종괴로 정의할 수 있으며, 모든 악성종양을 통속적으로 암이라고 부른다[26].

통계청의 발표나 보고에 의하면, 우리나라 인구 10만 명당 매년 160여명 꼴로 새로운 암환자가 발생하며, 전국적으로 매년 약 7~8만 명 정도의 암환자가 발생하는 것으로 추정되고 있다[27]. 평균수명의 연장, 급격한 공업화에 따른 환경오염, 과도한 흡연과 음주, 무절제한 생활양식 등으로 인하여 암사망률은 점차 높아져 우리나라에서 질병으로 인한 사망률 1위를 차지하고 있는 실정이다.

암 치료의 성공여부를 결정하는 것은 조기 발견과 그에 따라 외과적 절제 혹은 방사선 치료를 통해 암을 치료할 수 있는가 여부이다. 불행히도 대부분의 암을 진단하는 시기에는 이미 전이가 일어나 있기 때문에 외과적 절제나 방사선요법 만으로는 치료되지 않는다. 최근에는 면역요법이나 세포분화유도법 및 혈관형성저해법 등 새로운 방법의 치료법이 연구되고 있으며, 특히 화학물질과는 달리 부작용이 덜한 천연물로부터 새로운 항암물질을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다[28].

韓醫學 문헌에서 암이라는 용어는 송대의 東軒居士가 지은 《衛濟寶書》[8]에서 최초로 기록되었으나, 《黃帝內經》[4,5]에는 "腸覃", "石瘕", "膈中"등 惡性腫瘤의 증후에 대한 기록이 있으며, 《難經》의 "積聚", 《諸病源候論》의 "癥瘕", "石疽", "石癰" 및 後世의 "失榮", "石疔", "腎岩" 등은 胃腸管, 子宮, 肝, 膵臟등 臟器의 腫瘤를 표현하고 있다[29,30].

歷代醫家들은 대부분 그 원인을 濕痰瘀滯에 두고 있는데 가령 《靈樞·百病始生篇》[31]에서는 "汁沫與血相搏 則幷合凝聚不得散 而積成矣"라 하였고, 《丹溪心法》[32]에서는 "凡人上中下有塊者, 多是痰"이라 하였다. 또한 惡性腫瘍과 毒邪는 관련이 있는데 《中藏經》[33]에서는 "夫癰疽瘡腫之所作也, 皆五臟六腑蓄毒不流則生矣"라 하였다. 郁[34]은 癌을 外感六淫, 內傷七情, 飮食不節 및 邪毒 등으로 개체의 장부기능이 실조되어 氣滯血瘀, 痰結濕聚, 熱毒蘊結, 經絡瘀疽 등의 기전으로 腫塊가 형성되고 변화되며, 이러한 변화가 진행되면서 氣機의 유통이 막히고 얽힘이 오래되어 발생하는 만성질환으로 인식하였다.

癌의 치료는 환자의 정기상태 및 질병의 정도에 따라 크게 益氣養血, 養陰生津, 健脾益氣, 補肝益腎, 健脾益腎 등 인체 항병능력을 증진시키는 扶正培本법과 淸熱解毒, 活血祛瘀, 化痰消瘀, 理氣消腫 등 직접 암세포를 살상하는 祛邪法 및 이 두 가지 방법을 배합한 扶正祛邪法 등이 활용되고 있다[35,36].

骨碎補는 性味가 苦, 溫하고 補腎强骨하고 止痛하는 효능이 있어[12]腎虛腰痛이나 齒痛, 跌打閃挫에 쓰이는 한약재로서 『本草綱目』[13]에서는 "瘀血을 헤치고 피를 멈추며 부러진 것을 이어지게 하고 뼈 안의 毒氣, 風血惡疼痛, 五勞六極瘡, 上熱下冷, 惡瘡을 낫게 하

고 蟲을 죽이며, 耳鳴, 腎虛久泄, 牙疼을 다스린다"고 하였다.

세포자멸사는 생명체의 생명유지에 불필요하거나 위험한 세포를 스스로 죽게 하는 유전자의 제어에 의해 조절되는 계획된 세포사로서 1972년 Kerr 등[37]이 처음 언급한 이래 현재까지 다양한 생리적, 병적 상태를 연구하는데 이용되고 있다.

세포자멸사는 조직의 발생과 항상성 유지 및 손상되거나 원하지 않는 세포의 사멸에 있어서 매우 중요한 역할을 한다[38,39]. 생리적인 상황하에서 조직이나 개체의 발생, 분화, 면역기전에 깊이 관여하고 있고[40,41], 불필요하고 위해를 끼칠 수 있는 세포들을 제거하는데 중요한 역할을 하며 병리적으로도 수복의 한계를 벗어난 손상 특히 cancer를 유도시킬 가능성이 있는 DNA의 손상시 이러한 세포들을 제거해 주는데 중요한 역할을 한다[42]. 현재 종양세포를 제거하기 위한 많은 치료제들은 세포자멸사를 유도하는 기전을 택하고 있으며 세포자멸사를 조절하는 기전은 많은 질병의 예방과 치료, 특히 암의 치료에 있어서 매우 중요하다고 볼 수 있다.

이런 형태의 세포사는 여러 가지 유전적인 프로그램에 의해 조절되어지는 것으로 보여지는데[43] 방대한 연구의 결과 세포자멸사를 유도하거나 억제하는 여러 가지 유전자들이 발견되었다. 그 중 대표적인 bcl-2유전자는 비호츠킨성 B세포 림프종에서 일어나는 14번 염색체와 18번 염색체 사이의 유전자 전위의 breakpoint에서 발견되었다[44]. Bcl-2는 여러 가지 자극 즉, 바이러스감염, 저산소증, 이온화방사선, 화학적 자극 등으로 말미암아 유도되는 apoptosis을 억제시키는 것으로 알려져 있다[45].

최근 연구에 따르면 Bcl-2는 이온채널에 작용을 하여 미토콘드리아로부터 cytochrome c의 분비를 조절하는 것으로 보고되었으며[46], cytochrome c의 분비는 Apaf1과 procaspase-9를 가지고 있는 복합체의 형성을 유도하며, 결과적으로 caspase-9를 활성화시키는 것으로 알려져 있으며[47], 한번 활성화된 caspase는 차례로 caspase-3, caspase-7과 같은 effector caspase들을 활성화시키며, effector caspase들은 세포내의 기질들을 조각냄으로써 apoptosis를 촉진시키는 것으로 알려져 있다[48].

Bcl-2 family를 구성하는 단백질로 Bcl-2, Bcl-xL 등이 있는데 Bcl-2와 Bcl-xL이 과다 발현되었을 때는 apoptosis가 억제됨으로써 세포의 생존이 증진된다[49].

Caspase-3은 apoptosis를 억제하는 기능을 가진 Bcl-2와 Bcl-xL을 분해하며, apoptosis를 야기시키는 C-말단 조각을 유리시키며[50,51] ICAD/DFF45를 분해함으로써 ICAD에 부착된 CAD를 핵안으로 끌어들여 DNA를 자르도록 유도한다[52-54]. 또한 actin의 운동성을 조절하는 단백질인 Gelsolin을 활성화시킴으로써 DNA단편화 등 apoptosis를 촉진시킨다고 보고되었다[55]. 17번 염색체 단완에 있는 종양억제 유전자인 p53 유전자의 산물인 p53 단백질은 손상된 DNA의 수복과 세포성장조절의 전사인자로서 세포주기 중 G1 조절점에 작용하는 종양억제유전자이다[56,57] p53은 전사인자로 작용하여 CDK 억제 단백질인 p21의 발현을 증가시킴으로써[58] 세포주기의 진행을 막는 한편, 세포자멸사를 일으켜 손상된 DNA가 복제되지 않도록 하여 손상된 세포의 성장을 G1기에서 정지시켜 S기로 진행하는 것을 막는다[59].

본 연구에서 세포자멸사는 MTT assay를 통한 생존율 측정, 세포자멸사 유도 단백질에 대한 Western blott, DNA의 분절화 분석을 위한 sub G1 peak 관찰, mitochondria의 transmembrane potential 측정, RT-PCR을 통한 세포자멸사와 연관된 유전자의 mRNA 발현 측정을 통해 관찰하였다. 본 실험에서는 계대배양한 백혈병세포주인 U937 세포에 1, 10 및 100 ㎍/㎖ 농도의 骨碎補 부탄올 추출물을 첨가해서 48 시간 동안 배양하고, MTT assay로 세포증식반응을 측정한 결과, 대조군을 100%로 하였을 때, 1, 10 및 100 ㎍/㎖ 의 농도투여군에서는 각각 85.5±3.7%, 66.7±3.9%, 59.8±3.8%로 유의성 있는 억제를 보임으로 세포 생존율 감소를 관찰할 수 있었고, 이것이 세포자멸사의 기전에 의한 것인지를 확인하기 위하여 western blotting을 실시한 결과 세포자멸사를 억제하는 단백질인 Bcl-xL의 발현은 농도의존적으로 점차 감소했으며, 세포자멸사를 유발하는 중요한 단백질인 caspase-3와 p53 단백질의 발현은 농도의존적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 DNA 저이배체 유도를 보고자 骨碎補의 부탄올 추출물을 농도별로 처리하여 PI로 염색한 후 flow cytometer로 세포주기의 분포도를 분석한 결과 미처리군과 비교하여 각 농도처리 군에서 세포자멸사를 나타내는 sub G1 peak가 증가하였으며, 1, 10, 100 ㎍/㎖ 모든 농도에서 유의성 있는 증가를 보였다. 농도별로 처리한 후 24 시간 동안 배양한 U937 세포에서 RNA를 추출하고 cDNA를 합성하여 PCR을 시행한 결과 세포자멸사 억제유전자인 bcl-2 및 bcl-xL의 mRNA 발현이 전반적으로 감소하고 있음을 관찰하였다.

이러한 실험결과 骨碎補 부탄올 추출물은 U937 세포에서 세포자멸사의 과정을 진행시킴으로써 암세포의 증식억제 및 조절에 일정한 역할을 할 것으로 생각되며, 이에 대한 세포유전학 및 동물학적 연구가 깊이 진행되길 기대한다.

결 론

骨碎補 부탄올 추출물의 U937 세포에 대한 세포자멸사 유도에 미치는 효과를 관찰한 결과는 다음과 같다.

骨碎補 부탄올 추출분획은 U937 세포의 생존율을 농도 의존적으로 억제시켰다. 骨碎補 부탄올 추출분획은 U937 세포에서 세포자멸사를 억제하는 Bcl-xL의 발현을 감소시켰고, 세포자멸사를 유도하는 caspase-3과 p53단백질의 발현을 증가시켰다. 骨碎補 부탄올 추출분획은 U937 세포에서 농도 의존적으로 sub-G1 peak를 증가시켰다. 骨碎補 부탄올 추출분획은 U937 세포의 mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi m$)을 감소시켰다. 骨碎補 부탄올 추출분획은 계대배양한 U937 세포에서 bcl-2 및 bcl-xL의 mRNA 발현을 감소시켰다.

이상의 실험 결과, 骨碎補 부탄올 추출물은 U937 백혈병 세포주에 대해 유의성 있게 세포자멸사를 유도하였다.

참고문헌

1. 郁仁存 外. 癌症診治康復 350問. 北京: 金盾出版社; pp

98-100, 1989.
2. 백문기, 홍경만 역. 암유전자(G.M. Cooper). 서울: 월드사이언스. pp 3-4, 2000.
3. 이진우, 정우열. 활혈화어약물을 응용한 새로운 암치료제 개발 연구. 대한 동의병리학회지. 14(1):45-50, 2000.
4. 河北醫學院. 靈樞經校釋. 北京: 人民衛生出版社. 上卷 p 78, 219, 下卷 p 37, 48, 142, 255, 326, 391, 1982.
5. 王洪圖. 黃帝內經素問. 春秋出版社. p 71, 237, 271, 1988.
6. 巢元方. 諸病源候論. 臺北: 文化圖書有限公司. pp 1-17, 129, 1979.
7. 葛洪. 肘後備急方. 北京: 人民衛生出版社. p 203-210, 1987.
8. 余桂淸. 歷代中醫腫瘤案論選粹. 北京: 北京出版社. p 1-2, 1988.
9. 買堃. 癌瘤防治研究. 서울: 成輔社. p 25-28, 1984.
10. 史宇廣 等. 當代名醫臨證精華 腫瘤全集. 北京: 中醫古籍出版社; p 1-25, 1992.
11. 薛己. 薛氏醫案. 上海: 上海古籍出版社. p 315, 1980.
12. 顔正華. 中藥學. 北京: 人民衛生出版社. p 794, 1991.
13. 明・李時珍 著. 本草綱目(上). 서울: 一中社, p 1385, 1991.
14. Jeong, C., Yoon, C.H., Jeong, C.W., Lee, Y.C., Chang, Y.C., Kim, C.H. Inhibitory activity of Drynariae rhizoma extracts on cathepsin having bone resorption activity. Immunopharmacol Immunotoxicol 26(3):373-385, 2004.
15. Ma, K., Zhu, T., Liu, X., Liu, W. Promoting effects of rhizoma Drynariae on the calcification of cultivated chick embryo bone primordium. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 20(3):178-180, 1995.
16. Wang, Z. Experimental study of Rhizoma drynariae (Gusuibu) in the treatment of streptomycin cytotoxicity. Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi 24(2):79-81, 127, 1989.
17. 趙湘洪 等. 骨碎補對實驗性骨性關節炎的治療作用. 中藥通報 12(10):41, 1987.
18. 王維信 等. 中藥骨碎補降血脂及防止主動脈粥樣硬化斑塊的形成. 藥學通報 16(5):60, 1981.
19. Ralph, P., Moore, M.A., Nilsson, K. Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. J Exp Med 143:1528-1533, 1976.
20. Burnette, W.N. Western blotting- Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal. Biochem 112:195-203, 1981.
21. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quatitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254, 1976.
22. Nicoletti, I., Migliorati, G,, Pagliacci, M.C., Grignani, G., Riccardi, C.A. Rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J Immunol Methods 139:271-279, 1991.
23. Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, J.L., Petit, P.X., Kroemer, G. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. J. Exp Med 181:1661-1672,1995.
24. Birch, D.E., Kolmodin, L., Laird, W.J., McKinney, N., Wong, J., Young, K.K.Y., Zangenberg, G.A., Zoccoli, M.A. Simplified Hot-Start PCR. Nature 381:445-446, 1996.
25. Dowdy, S., Weardon, S. Statistics for research. New York: Wiley; p 262, 1983.
26. 대한병리학회. 병리학. 5th ed. 서울: 고문사; p 144, 2003.
27. 김광호, 강탁림, 남철현, 이기남, 소경순, 황귀서, 이선동. 양방예방의학. 서울: 계축문화사; p 196, 2004.
28. Richardson, M.A., Sanders, T., Palmer, J.L., Greisinger, A., Singletary, S.E. Complementary/alternative medicine use in a comprehensive cancer center and the implications for oncology. J. Clin. Oncol. 18:2505-2514, 2000.
29. 李佩文. 如何正確選用抗癌中成藥. 中醫雜誌 9:46-48, 1989.
30. 紀 鈞, 曹杰. 中醫治癌經驗精華. 江蘇科學技術出版社. p 6-7, 1988.
31. 金達鎬, 李鍾聲. 注解 補注 黃帝內經靈樞. 서울: 醫聖堂. p 1174, 2001.
32. 元・朱震亨 撰. 丹溪醫集, 北京: 人民衛生出版社. p 246, 1993.
33. 漢・華陀 撰. 中藏經 卷中. 江蘇科學技術出版社. p 45, 1985.
34. 郁仁存. 中醫腫瘤學. 上海: 上海科學技術出版社. p 1-22, 41-44, 384-391, 1991.
35. 儲水鑫. 惡性腫瘤中醫調理四法. 上海中醫藥雜誌 7:33-34, 1992.
36. 趙健斌. 吳一純教授治療晩期惡性腫瘤的經驗. 陝西醫學 14:451-453, 1993.
37. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 26:239, 1972.
38. Wyllie, A.H. Apoptosis. Br. J. Cancer 67:205-208, 1993.
39. Thompson, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 267:1456-1462, 1995.
40. Dumvall, E., Wyllie, E. Death and the cell. Immunol Today 7:115-119, 1986.
41. Cohen, J.J. Apoptosis. Immunol Today 14:126-130, 1993.
42. Williams, G.T. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. Cell 65:1097-1098, 1991.
43. White, E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. Genes Dev 10:1-15, 1996.
44. Tsujimoto, Y., Jaffe, E., Cossman, J., Gorham, J., Nowell, P.C., Croce, C.M. Clustering of breakpoints on chromosome II in human B-cell neoplasms with the t(11;14) chromosome translocation. Nature 315:340-343, 1985.
45. Lawrence, M.S., Ho, D.Y., Sun, G.H., Steinberg, G.K. and Sapolsky, R.M. Overexpression of bcl-2 with herpes simplex virus vectors protects CNS neurons against

neurological insults in vitro and in vivo. J. Neurosci 16:486-496, 1996.

46. Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R. and Newmeyer, D.D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. Science 275:1132-1136, 1997.
47. Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T. and Alnemri, E.S. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. Mol. Cell 1:949-957, 1998.
48. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. and Wang, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. Cell 91:479-489, 1997.
49. Yang, E. Korsmeyer SJ. Molecular Thanatopsis: A Discourse on the BCL2 Family and Cell Death. Blood 88:386-401, 1996.
50. Cheng, E.H., Kirsch, D.G., Clem, R.J., Ravi, R., Kastan, M.B., Bedi, A., Ueno, K., Hardwick, J.M. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like Death Effector by Caspases. Science 278:1966-1968, 1997.
51. Clem, R.J., Cheng, E.H., Karp, C.L., Kirsch, D.G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M.B., Griffin, D.E., Earnshaw, W.C., Veliuona, M.A., Hardwick, J.M. Modulation of cell death by Bcl-xL through caspase interaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:554-559, 1998.
52. Sakahira, H., Enari, M., Nagata, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. Nature 391:96-99, 1998.
53. Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. Cell 89:175-184, 1997.
54. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. Nature 391:43-50, 1998.
55. Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Koths, K., Kwiatkowski, D.J., Williams, L.T. Caspase-3-Generated Fragment of Gelsolin: Effector of Morphological Change in Apoptosis. Science 278:294-298, 1997.
56. Kastan, M.B., Zhan, Q. et al. A mammalian cell cycle check point pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. Cell 71:587-597, 1992.
57. Fields, S., Jang, S.K. Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. Science 249:1046-1049, 1990.
58. Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M., Harris, C.C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene; clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Res 54:4855-4878, 1994.
59. Levine, A.J., Momand, J., Finlay, C.A. The p53 tumor suppressor gene. Nature 351:453-456, 1991.