

독활 유래 Continentalic Acid가 인간 백혈병 HL-60 세포의 성장억제와 아포토시스 유도에 미치는 영향

김선영 · 정승일¹ · 김성주 · 심재석² · 장선일^{3,4*}

전북대학교 의학전문대학 헬스케어사업단 생리학교실, 1: 전주생물소재연구소, 2: 임실생약영농조합, 3: 전주대학교 대체의학대학 대체건강관리학부 건강관리전공, 4: 전주대학교 아토피·건강전문연구소

Effects of Continentalic from *Aralia Continentalis* on Growth Inhibition and Apoptosis Induction in Human Leukemia HL-60 Cells

Sun Young Kim, Seung Il Jeong¹, Sung Zoo Kim, Jae Suk Shim², Seon Il Jang^{3,4*}

Department of Physiology, Center for Healthcare Technology Development, Chonbuk National University Medical School, 1: Jeonju Biomaterials Institute, 2: Imsilsangyak Farming Association, 3: Jeonju University Atopy & Health Research Institute, 4: School of Alternative Medicine & Health Science, College of Alternative Medicine, Jeonju University

In previous study, we have shown that continentalic acid (CA) isolated from *Aralia continentalis* induced the growth inhibition and apoptosis in HepG2 cells. In this study, we examine the effects of CA from *A. continentalis* on growth inhibition and apoptosis induction in human leukemia HL-60 and mouse fibroblast NIH 3T3 cell lines. The results demonstrated that CA decreased cell growth of leukemia HL-60 cells but not human HaCaT keratinocytes, assessed with the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] and LDH (lactate dehydrogenase) assay. Flow cytometric analysis of mouse fibroblast cell lines exposed to CA showed that apoptotic cells increased in a time- and dose-dependent manner. Treatment with CA decreased the number of normal cells and increased the number of early apoptotic and late apoptotic cells in a dose-dependent manner. The induction of apoptosis in mouse cell lines by CA was mediated through the activation of caspase-3, Bak, and Bax and the down-regulation of Bcl-2. Our results suggest that CA efficiently induces apoptosis in human leukemia cells.

Key words : continentalic acid, *Aralia continentalis*, apoptosis, mouse fibroblast cell lines

서 론

아포토시스(apoptosis, programmed cell death)는 생체에 필요 없거나, 암세포와 같이 생체의 건강을 위협하는 등 여러 가지 세포신호 전달 체계에서 나타나는 일련의 생체 항상성에 필요한 세포 사멸이다^{1,2)}. 아포토시스는 성숙한 개체의 일상을 유지하는데 필요할 뿐 아니라 태아기의 발생과정에도 필수적이다. 부적절한 시기에 아포토시스가 일어나거나, 필요한 아포토시스가 억제되면 암 등 여러 질병이 발생할 수 있다³⁻⁵⁾.

종양(tumor)은 비정상적인 세포증식(cell proliferation)과 아포토시스 장애에 의해 일어나 생체에 심각한 질병을 야기한다.

* 교신저자 : 장선일, 전주시 완산구 효자동 3가 전주대학교 대체의학대학

· E-mail : sonjjang@jj.ac.kr, · Tel : 063-220-3124

· 접수 : 2009/11/18 · 수정 : 2009/11/28 · 채택 : 2009/12/11

그러므로 아포토시스의 유도는 악성 종양인 암(cancer)을 치료하는 효과적인 전략이라 할 수 있다⁶⁾. 지금까지 알려진 세포 신호 전달체계에 알려진 분자들은 아포토시스가 일어날 때 활성화되거나 억제되는 반응을 보이는데, Caspase-3, Bak 및 Bax는 아포토시스 유도인자로 알려진 반면, Bcl-2는 억제분자로 알려졌다^{6,7)}.

생체에서 아포토시스가 진행되면, 세포 내 endonuclease가 활성화되어 DNA가 180-200bp로 절편화되고, 주위의 대식세포나 상피세포에 의해서 섭취되므로 주위의 정상세포에 아무런 영향을 주지 않고 사라진다⁸⁾. 따라서 암을 치료하기 위한 약물을 개발하기 위해서는 아포토시스를 효과적으로 유도하고 정상적인 세포에 영향을 미치지 않는 효과를 발휘해야 한다.

독활(*Aralia continentalis* Kitagawa)은 무통(analgesia), 류마티즘(rheumatism), anti-rheumatic, 신경통(neuralgia), 관절통(arthralgia), 및 요통(lumbago)에 사용되어온 약재제로 알려져

있다⁸⁾. 또한 진통 및 항염증 작용과 같은 약리작용이 보고되었다⁹⁾. 최근에 우리는 독활로부터 diterpene계의 continentalic acid (CA)를 분리하여 항박테리아효과(anti-bacterial activity)를 보고¹⁰⁾했을 뿐만 아니라, 간암세포주인 HepG2 세포를 대상으로 CA가 유도하는 세포성장 억제와 아포토시스에 대한 약리 기전을 밝혀 보고하였다¹¹⁾. 그러나 인간의 백혈병과 관련된 세포주에서는 항암효과에 대한 보고는 없는 실정이다.

따라서 우리는 인간의 백혈병 세포주로 알려진 HL-60 세포주와 각질형성 세포주로 알려진 HaCaT 세포주를 대상으로 독활 유래 CA를 처리하고, 세포 성장억제 및 아포토시스 유도에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과 HL-60 세포주에서는 효과적으로 세포성장 억제와 아포토시스를 유도하였으나, HaCaT 세포주에서는 큰 영향을 미치지 않는 흥미로운 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

MTT dye [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide], propidium iodide, ribonuclease, 등은 Sigma사((St. Louis, MO, USA))로부터 구입하였다. Annexin V-FITC, anti-caspase-3, anti-Bak, anti-Bax, anti-Bcl, anti- α -actin antibodies 및 anti-rabbit secondary horseradish peroxidase antibodies 등은 Santa Cruz Biotechnology사(USA)로부터 구입하여 사용하였다. Caspase-3 activity assay kit는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)로부터 구입하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), bovine calf serum, and antibiotic mixture (penicillin-streptomycin) 등은 Gibco BRL사 (Grand Island, NY)에서 구입하였으며, 기타 시약은 reagent grade급 이상을 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다.

2. CA의 분리

CA는 건조된 독활(*S. miltiorrhiza*) 뿌리로부터 Jeung 등¹⁵⁾의 방법에 따라 분리하였다. 간단히 설명하면, 액체크로마토그래피를 통해 95% 이상의 순도를 확인하였으며, CA의 구조는 ¹H-NMR, ¹³C-NMR와 MS spectra 자료를 얻고 Han 등¹⁶⁾의 결과와 비교하여 동정하였다(Fig. 1).

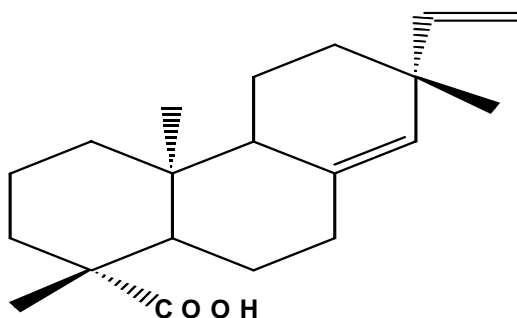


Fig. 1. Chemical structure of continentalic acid (CA) isolated from *Aralia continentalis*.

3. 세포배양

인간의 백혈병 세포주인 HL-60과 각질형성 세포주인 HaCaT는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. HL-60 세포의 배양은 10% FBS, 0.15% sodium bicarbonate와 1% penicillin-streptomycin이 함유된 RPMI1640 배지를 사용하였고, HaCaT 세포의 배양은 10% FBS, 0.15% sodium bicarbonate와 1% penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C에서 5% CO₂ 유지되는 배양기에서 배양하면서 실험에 사용하였다.

4. MTT 분석

MTT 분석은 Mosmann¹²⁾의 방법을 변형하여 수행하였다. 간단히 설명하면, HL-60 세포는 well 당 5×10⁴개를 24 well plate에 접종하여 0-50 μ M CA를 처리하고 24, 48 및 72시간 동안 배양하였다. HaCaT 세포는 well 당 1×10⁴개를 24 well plate에 접종하고, 12 시간 후에 0-50 μ M CA 함유된 배지를 1 ml씩 주입한 후, 24, 48 및 72시간 동안 배양하였다. 이때 CA의 용매인 dimethyl sulfate (DMSO)의 농도는 최종적으로 0.01%이하로 적정하였다. 각 시간에 적합하게 배양된 세포를 MTT 분석에 사용하였다. MTT 용액은 5 mg/ml의 농도로 인산완충용액 (phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.4)에 녹여 0.45 μ m 필터를 이용하여 통과시켜 사용하였다. 각 well의 배양액을 제거하고, 새로운 배양액 90 μ l을 주입하고, 10 μ l의 MTT 용액(0.5 mg/ml 최종농도)을 주입하여, 5시간 배양 후, 잔여 MTT 용액을 제거하였다. Crystal formazan은 DMSO로 용해하여 570 nm microplate readers (Molecular devices, USA)로 흡광도를 측정하였다.

5. LDH 유리능 측정

Lactate dehydrogenase (LDH) 유리능은 통상적으로 이용되는 kit (BioVision, CA, USA)을 활용하여 측정하였다. HL-60과 HaCaT 세포는 MTT 분석에서의와 같은 조건으로 CA를 처리하여 배양하였다. 배양이 종료된 well에서 상층액을 얻어 LDH 유리능을 측정하였다. 측정 방법은 Sigma사가 제시한 방법에 준하여 수행하였다.

6. PI 염색에 의한 flow cytometry

세포의 아포토시스는 Takada¹³⁾의 propidium iodide (PI) 염색방법에 따라 측정하였다. 간단히 설명하면, HL-60 세포는 24시간 동안 각각 0-50 μ M CA로 자극하였다. HL-60 세포를 부유시켜 수확한 후 PBS로 2회 세척하여 4°C에서 30분간 80% 에탄올로 고정하였다. 고정된 세포는 실온에서 15분 동안 40 mg/ml PI 용액으로 염색한 후 FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems USA, San Jose, CA)을 이용하여 DNA량을 분석하였다. 약 10,000개의 세포의 정보를 얻어 세포 아포토시스 비율을 CELL Quest software로 분석하였다.

7. Annexin V-FITC/PI 염색에 의한 flow cytometry

Annexin V-FITC/PI 염색은 Annexin V-FITC kit (Santa Cruz Biotechnology, USA)을 이용하였다. CA에 의해 유도된 초기와 후기 아포토시스 및 괴사 비율을 측정하기 위해서 HL-60 세포는 (5×10^4 cells/dish) 6 cm dish에 접종하고 CA의 최종농도를 0-50 μM 까지 다양하게 처리하여 24시간 배양 후 FITC-conjugated Annexin V-FITC/PI 염색을 하였다. FITC-conjugated Annexin V-FITC/PI 용액을 주입하여 실온에서 10분 동안 염색한 다음 FACSscan flow cytometer를 이용하여 분석하였다. Annexin V-FITC and PI 여기파장은 525와 575 nm 여기필터를 활용하여 FACSscan flow cytometer의 FL 1 and FL 2 channels에서 분석하였다. 각 실험군 당 약 10,000개 세포를 대상으로 분석하였다. 초기와 후기 아포토시스 및 괴사 비율은 CELL Quest software로 분석하였다.

8. Caspase-3 활성 측정

Caspase-3 활성의 측정은 R&D Systems사에서 제공하는 caspase-3 activity assay kit을 이용하여 측정하였다. 간단히 설명하면, CA 처리 후 HL-60 세포는 PBS로 세척하여 lysis buffer (1% Triton X-100, 0.32 M sucrose, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8, 2 mM dithiothione, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pepstatin A, 2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin)를 주입하고 4°C에서 20분간 방치한 다음 30분간 10,000 g로 원심하여 상층액의 세포 용해물을 얻었다. 얻어진 세포 용해물은 caspase-3 activity assay kit을 활용하여 R&D Systems사가 제공하는 방법에 준하여 수행하였으며, 405 nm microplate readers (Molecular devices, USA)로 흡광도를 측정하였다.

9. Western blot

HL-60 세포는 CA (0-50 μM)을 처리하고 20시간동안 배양하였다. 약물처리가 종료된 세포는 냉각 lysis buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM EDTA, 500 μM sodium orthovanadate, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 10 mM NaF, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin, and 1 mM PMSF]를 주입하여 용해하였다. 세포용해물의 단백질의 정량은 Bio-Rad DC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 각 실험군의 단백질은 30 μg 으로 적정하고, 12% polyacrylamide gel [sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)]의 각 well에 주입하여 분리하였다. 겔에 전개된 단백질은 PVDF membrane에 전사시킨 후, PBS에 5% skim milk (0.05% v/v Tween-20, pH 7.2)로 1시간 동안 blocking하였다. Membrane에 각 1차 항체(1:5000)를 주입하고, 4°C에서 약 12시간 방치한 후, 2차 항체(1:5000)를 주입하여 1시간 동안 방치하였다. 각 단계마다 PBST (PBS/Triton X-100)으로 3번씩 세척하였다. 단백질 발현에 대한 시그널은 Amersham ECL system (Amersham-Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL)으로 감광하여 측정하였다.

10. 통계처리

모든 실험값은 평균±표준오차(mean±SD)로 표시했으며, 통계분석은 ANOVA와 Student's t-test로 처리했으며, 유의성 한계는 $P < 0.05$ 로 정하였다.

결 과

1. HL-60 세포성장 억제에 미치는 CA의 영향

CA가 인간 유래 백혈병 세포주인 HL-60과 인간 유래 각질형성세포주인 HaCaT의 성장억제에 미치는 영향을 알아보기 위해서, 여러 가지 농도의 CA(0-50 μM)을 24-72 h까지 처리하고, MTT 분석과 LDH 유리능을 측정하였다. 그 결과 Fig. 2A와 같이 HL-60 세포는 CA의 농도와 시간에 의존적으로 유의하게 억제 ($p < 0.05$)되었으며, 72시간 배양 시 IC50은 8.5 μM 이었다. 또한 배지 내로 유리되는 LDH의 활성을 조사한 결과 Fig. 2B와 같이 CA의 세포독성은 시간과 농도에 의존적으로 억제되었다 ($p < 0.05$). 흥미롭게도 각질형성 세포주인 HaCaT 세포의 경우, HL-60과 같은 농도와 시간으로 CA를 처리하였으나, Fig. 2B와 Fig. 3B에서 보여준 바와 같이 세포의 성장과 독성에 큰 영향을 주지 않았다. 이러한 CA의 선택적인 세포성장의 억제와 독성에 대한 효과는 HL-60과 같은 암세포주를 특이하게 공격하는 약리학적 반응으로 보여준 것이라 사료된다. 따라서 아포토시스에 미치는 CA의 효과에 대한 실험은 각질형성세포주인 HaCaT 세포가 아닌 HL-60 세포를 대상으로 수행했다.

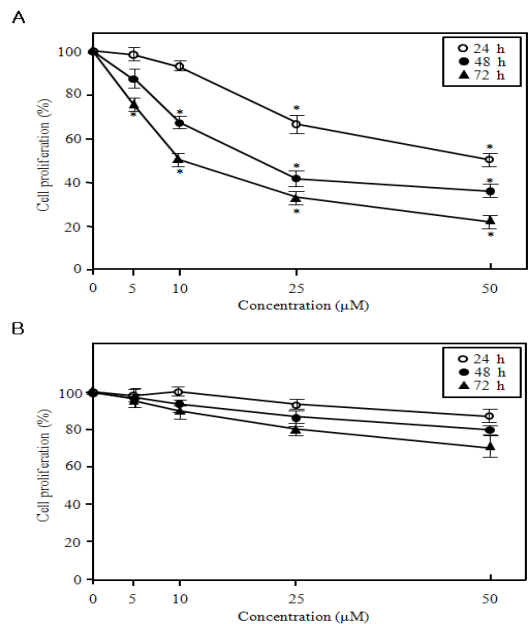


Fig. 2. Effect of CA on the cell growth. (A) Effect of CA on the inhibition of cell growth in human leukemia HL-60 cells. (B) Effect of CA on the cell growth in human HaCaT keratinocytes. Cells were treated with 0-50 μM CA for 24, 48, and 72 h. The cell population growth was measured by MTT assay. The data are presented as the means \pm S.D. of three independent experiments. * $p < 0.05$ vs. control.

2. HL-60 세포의 아포토시스 유도에 미치는 CA의 영향

CA가 HL-60 세포의 아포토시스 유도에 미치는 영향을 알아

보기 위해서 CA(10-50 μ M)를 24시간과 48시간 동안 처리하고 PI와 Annexin V-FITC로 염색하고 flow cytometer로 분석하여 아포토시스 활성을 측정하였다. PI 염색에 의한 sub-G1시기의 DNA량을 분석한 결과 Fig. 4A와 아포토시스 유도는 CA의 농도와 시간에 유의하게 의존적이었다($p < 0.05$). 또한 Annexin V-FITC로 염색하여 아포토시스 세포를 분석한 결과 PI 분석결과와 유사하게 CA의 농도와 시간에 의존적으로 초기 아포토시스가 유도되었다(Fig. 4B). 이러한 결과는 CA가 HL-60 세포의 아포토시스를 효과적으로 유도하는 것을 제시해 주었다.

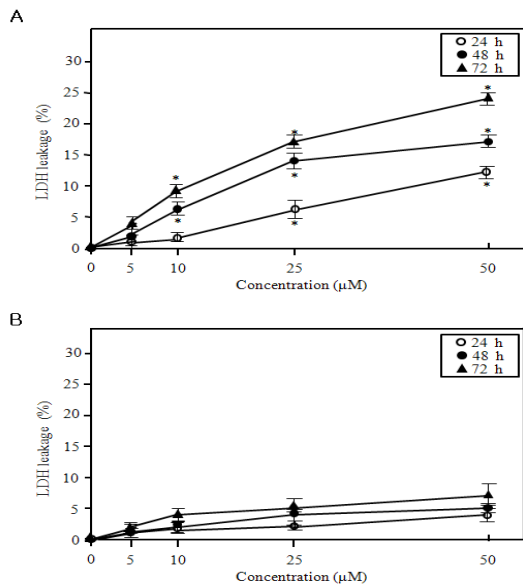


Fig. 3. Effect of CA on the cell cytotoxicity. (A) Effect of CA on the induction of cytotoxicity in human leukemia HL-60 cells. (B) Effect of CA on the cytotoxicity in human HaCaT keratinocytes. Cells were treated with 0-50 μ M CA for 24, 48, and 72 h. The cytotoxicity was measured by LDH leakage assay. The data are presented as the means \pm S.D. of three independent experiments.* $p < 0.05$ vs. control.

방법으로 분석하였다. 아포토시스가 유도될 때 중요한 분자로 알려진 caspase-3의 활성을 측정된 결과 Fig. 5A와 같이 CA의 농도와 시간에 의존적으로 caspase-3의 활성이 증가되었다. 더불어 CA(10-50 μ M)를 20시간 동안 처리하고 caspase-3 mRNA의 발현을 조사한 결과 단백질의 활성과 유사하게 농도가 높을수록 증가했다(Fig. 5B). 이러한 결과는 CA가 HL-60 세포의 아포토시스 유도에 caspase-3가 관여된다는 사실을 제공해 주었다. 또한 CA가 유도하는 아포토시스에 있어서, 다른 관련 분자들의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해서 아포토시스 유도 중요분자인 Bak와 Bax mRNA 발현을 조사하였다. 그 결과 Fig. 5B와 같이 Bak mRNA의 발현은 CA의 농도에 의존적으로 유의하게 증가되었고, Bax mRNA의 발현은 25 μ M과 50 μ M 농도에서 증가되는 경향을 보였다. 그러나 Bcl-2 mRNA 발현의 경우는 대조군에 비해 CA의 농도에 의존적으로 유의하게 억제되었다. 이러한 결과는 CA가 아포토시스 관련 분자를 발현 또는 억제시켜 HL-60 세포의 아포토시스를 유도한다는 것을 제시해주었다.

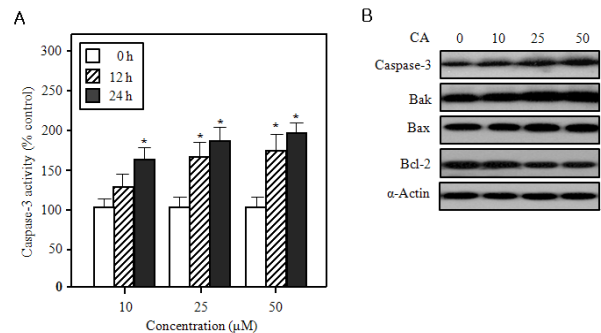


Fig. 5. Effect of CA on caspase-3 activity (A) and apoptotic protein levels (B) in human leukemia HL-60 cells. Cells were treated with 0-50 μ M tanshinone IIA for 12 and 24 h. Caspase-3 activity levels were measured by ELISA. Protein levels were analyzed by Western blot analysis. The data are presented as the means \pm S.D. of three independent experiments.* $p < 0.05$ vs. control.

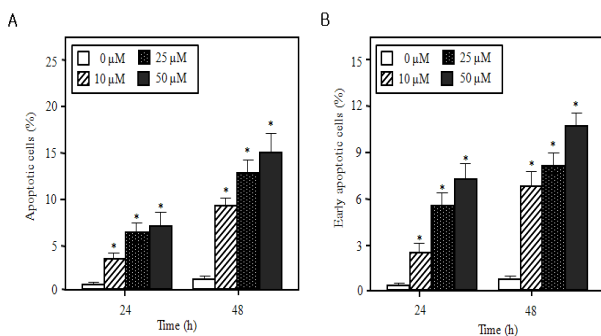


Fig. 4. Flow cytometric analysis of CA-mediated cell apoptosis in human leukemia HL-60 cells. Cells were treated with 0-50 μ M CA for 24, 48, and 72 h. The percentage of apoptotic cells was calculated by CELL Quest software. (A) PI data. (B) Annexin V-FITC data. The data are presented as the means \pm S.D. of three independent experiments.* $p < 0.05$ vs. control.

3. 아포토시스 유도 관련 분자발현에 미치는 CA의 영향

CA가 HL-60 세포의 아포토시스 유도 관련 단백질들의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해서 CA(10-50 μ M)를 12시간 또는 24시간 처리하고 단백질의 활성과 발현은 ELISA와 Western blot

고 찰

독활 유래 CA는 우리나라에서 전통적으로 신경통, 관절통 및 요통에 진통제의 효과를 나타내는 약재로 사용되어 왔다⁸⁾. 또한 류마티스 관절염 및 골관절에도 빈번히 이용되어 왔다. 최근에 Lim 등⁹⁾은 독활의 뿌리로부터 ent-pimara-8(14), 15-diene-19-oic acid (continentalic acid, pimaradienoic acid, compound I), 7 β -hydroxy-ent-pimara-8(14), 15-diene-19-oic acid(compound II), 7-oxo-ent-pimara-8(14),15-diene-19-oic acid (compound III), 15 α ,16 α -epoxy-17-hydroxy-ent-kauran-19-oic acid (compound IV) 및 ent-kaura-16-en-19-oic acid (kaurenoic acid, compound V) 등 유용성분을 분리하고 구조를 규명하여, 설치류 유래 RAW 264.7 세포에서 nitric oxide (NO), cyclooxygenase (COX)-2 및 prostaglandin(PG) E2와 같은 염증 매개물을 효과적으로 억제한다는 것을 밝혀 독활의 항염증 작용을 설명하였다. 또한 Park 등¹⁴⁾은 Sprague-Dawley계 쥐를 대상으로 관절염을 유도한 후 독활의 추출물을 처리하여 항염효과를 보고하였다.

최근에 우리는 독활의 뿌리로부터 diterpene계의 continentalic acid (CA)를 분리하여 항박테리효과(anti-bacterial activity)를 보고¹⁰⁾했을 뿐만 아니라, 간암세포주인 HepG2 세포를 대상으로 CA가 유도하는 세포성장 억제와 아포토시스에 대한 약리 기전을 밝혀 보고하였다¹¹⁾. Oh 등¹⁵⁾은 독활에서 HY253라는 새로운 물질을 분리하고 HaLa 세포에서 미토콘드리아의 cytochrome C와 관련된 기전과 Bax와 Bak와 같은 pro-apoptotic Bcl-2 분자의 기전을 밝힌바 있다. 그러나 인간의 백혈병 세포주인 HL-60 세포를 대상으로 독활 유래 CA의 효과에 대한 아포토시스 기전을 규명한 연구는 없다.

따라서 우리는 이 논문에서 독활 유래 CA를 분리하여 HL-60 세포와 인간의 각질형성세포주인 HaCaT 세포에 미치는 아포토시스 유도 기전을 알아보았다. Fig. 2와 Fig. 3과 같이 CA는 HL-60 세포의 성장억제와 독성을 나타내었으나, HaCaT 세포에서는 큰 영향을 주지 않았다. 이와 같이 CA는 선택적으로 HL-60 세포에 선택적으로 작용하는 흥미로운 약리작용을 나타내었다. 그러므로 우리는 CA가 HL-60 세포의 아포토시스를 유도할 수 있다는 가정 하에 CA가 처리된 HL-60 세포를 대상으로 PI 염색을 하여 flow cytometer로 분석한 결과 Fig. 4A와 같이 농도에 의존적으로 아포토시스를 유도하는 사실을 확인할 수 있었다. 또한 Annexin V-FITC는 phosphatidylserine과 결합하는데, 이러한 현상은 아포토시스 초기에 발견된다고 알려졌다¹⁶⁾. 따라서 CA 처리가 HL-60 세포의 초기에 아포토시스를 유도할 수 있는 약리적 효과가 있는지 조사하였다. 그 결과 CA의 농도가 증가될수록 phosphatidylserine과 Annexin V-FITC의 결합이 증가됨을 확인할 수 있었다(Fig. 4B). 이와 같이 CA가 HL-60 세포의 성장을 억제하는 방향은 초기의 아포토시스를 유도함으로써 약리효과를 나타낸다는 사실을 알 수 있었다.

CA가 HL-60 세포의 아포토시스를 유도하는데 관여하는 분자적 기전을 알아보기 위해서 우리는 아포토시스 유도과 관련된 단백질의 활성 및 발현을 조사하였다. 그 결과 caspase-3의 활성은 CA가 처리된 농도에 의존적으로 그 활성이 유의하게 증가되었다(Fig. 5A). 더불어 caspase-3 단백질 발현을 조사한 결과 Fig. 5B와 같이 CA의 농도가 증가할수록 caspase-3의 발현이 증가함을 할 수 있었다. 일련의 Caspase family는 세포 내 여러 가지 신호전달 분자를 조절하여 아포토시스를 유도하는 것으로 잘 알려져 있는데, Caspase-3은 PARP를 절단하여 세포사멸을 유도하는 중요한 단백질 효소 중의 하나이다¹⁷⁾. 아포토시스는 철저하게 세포 내 유전자 발현을 조절함으로써 일어나는데, Bak와 Bax 같은 초기 아포토시스를 유도하는 분자는 아포토시스를 억제하는 Bcl-2의 발현을 단절시키는 작용을 하는 것으로 알려졌다^{18,19)}. 따라서 우리는 Bak와 Bax의 발현을 조사한 결과 Fig. 5B와 같이 CA의 처리농도가 높을수록 그 발현이 증가됨을 확인할 수 있었다. 그러나 Bcl-2의 발현은 CA의 농도가 높을수록 억제되는 사실을 알 수 있었다. 이와 같은 CA에 의한 HL-60 세포의 아포토시스 분자 기전은 caspase-3, Bak 및 Bax의 발현을 유도하고 Bcl-2의 분자의 발현을 억제함으로써 이루어짐을 확인할 수 있었다. 그러나 CA가 인간의 백혈병 치료에 사용될 수 있는 후보 물질임을 증명하

기 위해서는 또 다른 아포토시스 기전과 임상연구를 더 진행되어야 할 것으로 사료된다.

본 연구의 결과를 요약하면, CA는 HaCaT 세포가 아닌 HL-60 세포에서 성장억제와 독성을 나타내는 효과가 있었고, 이러한 효과는 caspase-3, Bak 및 Bax의 활성을 유도하고 Bcl-2의 발현을 억제하는 약리적 효과가 있었다. 따라서 독활 유래 CA는 인간의 백혈병 치료에 활용될 수 있는 약물이라 사료된다.

결 론

우리는 선행연구에서 독활(*Aralia continentalis*) 유래 continentalic acid (CA)가 간암 세포주인 HepG2 세포의 성장과 아포토시스를 유도하는 효과를 밝혔다. 이 연구에서 우리는 인간 유래 백혈병 세포주인 HL-60과 인간의 각질형성세포주인 HaCaT 세포를 대상으로 세포의 성장억제와 아포토시스 유도에 독활 유래 CA가 미치는 영향을 조사하였다. CA가 HL-60과 HaCaT 세포의 성장에 미치는 영향을 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]와 LDH (lactate dehydrogenase) 유리능을 분석한 HaCaT 세포가 아닌 HL-60 세포에서 농도와 시간에 의존적으로 유의하게 감소되었다. 또한 HL-60 세포에 CA를 처리하여 flow cytometer로 분석한 결과 시간과 농도에 의존적으로 아포토시스가 유도되었다. 이러한 CA의 아포토시스 유도에 대한 분자기전을 조사한 결과 caspase-3, Bak와 Bax의 활성 또는 발현을 증가시키고 Bcl-2의 발현을 억제함으로써 이루어짐을 확인할 수 있었다. 이상의 결과는 CA가 인간 유래 HL-60 세포의 아포토시스 유도를 효과적으로 일으킴을 알 수 있었고, 백혈병과 같은 인간의 암 치료에 유용한 물질로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문 또는 저서는 2000년 교육과학기술부(지역거점연구단육성사업/헬스케어기술개발사업단)로부터 지원받아 수행된 연구입니다.

참고문헌

- Hidalgo, A. and Ffrench-Constant, C. The control of cell number during central nervous system development in flies and mice. *Mech. Dev.* 120: 1311-1325, 2003.
- Vaux, D.L. and Korsmeyer, S.J. Cell death in development. *Cell* 96: 245-254, 1999.
- Kucharzszak, J., Simmons, M., Fan, Y. and Gelinas, C. To be, or not to be: NF- κ B is the answer-role of Rel/NF- κ B in the regulation of apoptosis. *Oncogene* 22: 8961-8982, 2003.
- Cory, S., Huang, D.C. and Adams, J.M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22: 8590-8607, 2003.

5. Reed, J.C. Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends Mol. Med.* 7: 314-319, 2001.
6. Hu, W. and Kavanagh, J.J. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *Lancet Oncol.* 4: 721-729, 2003.
7. Degli Esposti, M. and Dive, C. Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304: 455-461, 2003.
8. Kim, J.S. and Kang, S.S. Saponin from the aerial parts of *Aralia continentalis*. *Nat Prod Sci.* 4: 45-50, 1998.
9. Lim, H., Jung, H.A., Choi, J.S., Kim, Y.S., Kang S.S. and Kim, H.P. Anti-inflammatory activity of the constituents of the roots of *Aralia continentalis*. *Arch Pharm Res.* 32: 1237-1243, 2009.
10. Jeong, S.I., Han, W.S., Yun, Y.H., Kim, K.J. Continentalic acid from *Aralia continentalis* shows activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytother Res.* 20: 511-514, 2006.
11. Kwon, T.O., Jeong, S.I., Kwon, J.W., Kim, Y.C. and Jang, S.I. Continentalic acid from *Aralia continentalis* induces growth inhibition and apoptosis in HepG2 cells. *Arch Pharm Res.* 31: 1172-1178, 2008.
12. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63, 1983.
13. Takada, E., Toyota, H., Suzuki, J., Mizuguchi, J. Prevention of anti-IgM-induced apoptosis accompanying G1 arrest in B lymphoma cells overexpressing dominant-negative mutant form of c-Jun N-terminal kinase 1. *J Immunol.* 166: 1641-1649, 2001.
14. Park, H.J., Hong, M.S., Lee, J.S., Leem, K.H., Kim, C.J., Kim, J.W. and Lim, S. Effects of *Aralia continentalis* on hyperalgesia with peripheral inflammation. *Phytother Res.* 9: 511-513, 2005.
15. Oh, H.L., Lim, H., Park, Y., Lim, Y., Koh, H.C., Cho, Y.H. and Lee, C.H. HY253, a novel compound isolated from *Aralia continentalis*, induces apoptosis via cytochrome c-mediated intrinsic pathway in HeLa cells. *Bioorg Med Chem Lett.* 19: 797-799, 2007.
16. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-nakken, H., Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptosis cell using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol.Methods* 184: 39-51, 1995.
17. Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirer, G.G., Earnshaw, W.C. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371: 346-347, 1994.
18. Nakagawa, H., Tsuta, K., Kiuchi, K., Senzaki, H. and Tanaka, et al., Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human breast cancer cell lines, *Carcinogenesis* 22: 891-897, 2001.
19. Farrow, S.N. and Brown, R. New members of the Bcl-2 family and their protein partners. *Curr Opin Genet Dev.* 6: 45-49, 1996.