

A549 인체 폐암세포에서 상백피 메틸렌클로라이드 추출물에 의한 Apoptosis 및 Autophagy 유발

박신형 · 지규용 · 최영현^{1,2} · 엄현섭*

동의대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 생화학교실 및 한의학연구소, 2: 대학원 바이오물질제어학과 및 블루바이오 소재개발센터

Apoptosis and Autophagy Induction of A549 Human Lung Cancer Cells by Methylene Chloride Extracts of Morus alba L.

Shin Hyoung Park, Gyoo Yong Chi, Yung Hyun Choi^{1,2}, Hyun Sup Eom*

Departments of Pathology, College of Oriental Medicine,

1: Biochemistry, College of Oriental Medicine and Research Institute of Oriental Medicine,

2: Department of Biomaterial Control (BK21 program), Graduate School and Blue-Bio Industry Regional Innovation Center, Donggeui University

Morus alba L., a kind of Oriental medicinal herbs, has been traditionally used to treat pulmonary asthma and congestion. According to recent studies, extracts of M. alba L. have showed anti-inflammatory, anti-oxidant, anti-tumor and hypoglycemic effects. However, the molecular mechanisms on how it acts as a death-inducer in cancer cells have not been fully understood. In this study, we investigated the cell death effects of methylene chloride extracts of M. alba L. (MEMA) in A549 human lung carcinoma cells. It was shown that MEMA induced the apoptotic cell death proved by increased sub-G1 phase cell population, apoptotic body formation and chromatin condensation. MEMA treatment induced the expression of death receptor-related proteins such as death receptor (DR) 4, DR5, Fas and FasL, which further triggered the activation of caspase-8 and the cleavage of Bid in a concentration-dependent manner. However, MEMA reduced anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-xL expression which contributed to the loss of mitochondrial membrane potential (MMP), and the activations of caspase-9 and caspase-3. Meanwhile, the morphological study indicated a characteristic finding of autophagy, such as the formation of autophagosomes in MEMA-treated cells. Furthermore, markers of autophagy, namely, the increased MDC-positive cells, conversion of microtubule-associated protein light chain 3 (LC3)-I to LC3-II and increased beclin-1 accumulation, were observed. Taken together, these findings demonstrated that MEMA triggered both autophagy and apoptosis in A549 cancer cells. They might suggest that M. alba L. could be a prospective clinical application to treat human lung cancers.

Key words : Morus alba L., autophagy, apoptosis

서 론

상백피는 뽕나무과(Moraceae)에 속하는 다년생 식물인 뽕나무(Morus alba L.)의 根皮를 건조한 것으로 甘寒하며 폐로 歸經하는 성질을 가져 예로부터 肺熱로 인한 해수, 천식 및 이뇨 촉진에 사용되어 왔다.¹⁾ 최근 연구에 따르면 상백피의 혈당강하작

용^{2,3)}을 필두로 항암작용^{4,5)}, 항산화작용³⁾, 항염증작용⁷⁻⁹⁾ 및 신경보호작용¹⁰⁾ 등이 보고되어 있고, 항균 및 미백 효과가 있는 것으로 보고되어 기능성 화장품의 원료로서도 각광받고 있다^{11,12)}. 또한 상백피의 항알러지 작용은 상백피가 기관지 천식에 널리 사용되는 근거가 되고 있다^{13,14)}. 한편 유기용매 추출법은 열수 추출법에 비해 다양한 성분들을 분리해내는데 효과적이므로, 그동안 상백피의 유기용매 추출물이 다양하게 실험에 응용되어왔다. 유기용매로 추출한 상백피의 phenolic compounds는 혈압강화작용 및 cyclic AMP phosphodiesterase 억제효과를 보였으며^{15,16)}, 상

* 교신저자 : 엄현섭, 부산시 부산진구 양정동 45-1 동의대학교 한의과대학

· E-mail : hseom@deu.ac.kr, · Tel : 053-850-8644

· 접수 : 2010/10/28 · 수정 : 2010/11/11 · 채택 : 2010/11/30

백피의 다양한 flavonoids가 항균작용을 가진다는 보고가 있었다¹⁷⁾. 특히 최근에는 유기용매로 추출한 상백피의 항암작용에 대해 다양한 연구가 이루어져 상백피 메탄올 추출물이 암세포 독성을 가지며, 선천면역 활성을 통해 암의 전이와 성장을 막는다는 보고 등이 있었으나^{18,19)} 상백피의 항암효과에 대한 분자생물학적 기전 연구는 여전히 미비한 실정이다.

한편 apoptosis는 준비된 프로그램에 따라 세포가 능동적으로 죽는 과정으로서 type I programmed cell death (PCD)로 분류되며, 세포막의 blebbing 현상, 세포질의 응축, DNA의 절편화 등을 특징으로 한다²⁰⁾. 예기치 않은 외부의 자극으로 인해 세포가 급팽창해 파괴되면서 주변 조직에 염증을 일으키는 necrosis와 달리 apoptosis는 정해진 프로그램을 따라 질서정연하게 세포질 및 염색질이 수축하여 식세포의 식작용에 의해 제거되므로 주위에 염증 반응을 일으키지 않는다. 따라서 암세포에 효율적으로 apoptosis를 일으키는 물질을 탐색하고 그 기전을 밝히는 것이 새로운 암 치료제를 개발하는 데 기본적인 과정이 되어 왔다. 그러나 현재 사용되고 있는 항암제들은 인체에 대한 독성과 다양한 부작용들을 내포하고 있어 사용하는데 한계가 있으므로 새로운 항암제를 찾으려는 노력이 계속되고 있으며, 그 대안으로서 식용 식물이나 한약재에서 추출한 물질들이 새로이 각광받고 있다.

프로그램화된 세포죽음의 또 다른 형태로서 type II PCD라고 불리는 autophagy가 있다. Autophagy는 autophagosome이라는 특이한 형태의 소낭을 형성하여 오래된 세포내 기관들을 둘러싸게 되고, 이 autophagosome이 lysosome과 결합하면서 내부의 가수분해효소에 의해 세포 내 기관들이 분해된다²¹⁾.

본 연구에서는 상백피 메틸렌클로라이드 추출물을 사용하여 A549 인체 폐암세포에 대한 항암활성을 조사해본 결과, 상백피 메틸렌클로라이드 추출물이 A549 세포에 apoptosis를 일으켜 강력한 증식 억제능을 보였으며, 동시에 autophagy를 유발하는 것을 관찰하였다. 아울러 이 과정에서 나타나는 다양한 유전자들의 발현 변화에 대한 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용된 상백피(*M. alba* L.)는 경북 영주약초시장에서 구입하고 동의대학교 한의과대학 본초학교실에서 표준품 확인을 받은 것으로, 흐르는 물에 수회 세척하여 그늘에서 하루 동안 건조시킨 후 잘게 분쇄하였다. 상백피의 에탄올(ethanol extract of *M. alba* L., EEMA) 및 메틸렌클로라이드 추출물(methylene chloride extract of *M. alba* L., MEMA)을 얻기 위하여 건조된 상백피 200 g에 에탄올 및 메틸렌클로라이드를 각각 1.5 L씩 첨가하여 에탄올은 100 rpm, 60°C에, 메틸렌클로라이드는 100 rpm, 35°C 조건에서 5일간 교반하였다. 그 후 상층액만 분리하여 건조하고, 분말을 200 µg/ml 농도로 dimethylsulfoxide (DMSO)에 용해시켰다. 세포 배양에 사용된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin은 모두 Gibco (Grand Island, NY)에서

구입하였다. 단백질 분석을 위한 모든 1차 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, anti-rabbit 및 anti-mouse 2차 항체는 Amersham Life Science Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다. 별도 표기하지 않은 모든 시약은 Sigma (St. Louis, MO)에서 구입하였다.

2. 세포 배양

본 연구에 사용된 A549 인체 폐암세포는 한국생명공학연구소(Daejeon, Korea)에서 분양받았다. 세포의 배양을 위해 90%의 DMEM에 10% FBS와 1% penicillin streptomycin 을 첨가하여 사용하였으며, 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

3. MTT assay를 통한 세포 생존율 조사

A549 세포에 EEMA와 MEMA를 각각 제시된 농도별로 처리하여 24시간 처리한 후, 배지를 모두 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT)를 0.5 µg/ml 농도가 되게 배지로 희석하여 분주하고 2시간동안 다시 배양시켰다. 그 후 상층액을 모두 제거하고 DMSO로 각 well의 formazin을 녹인 후 96 well plate에 200 µl씩 분주하여 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)에서 540 nm로 흡광도를 측정하였다.

4. DAPI staining을 통한 핵의 관찰

MEMA를 24시간 처리한 세포들을 모아서 3.7% paraformaldehyde로 상온에서 10분 동안 고정하였다. 그 후 상층액을 제거하고 PBS 200 µl로 suspension하여 cytospin으로 세포를 slide glass 위에 부착시킨 후, PBS와 DW에 번갈아 세척하여 건조시켰다. 그 후 2.5 µg/ml로 희석시킨 DAPI solution으로 약 30분간 염색시켜 형광현미경(Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 400배의 배율로 핵의 형태를 관찰하였다.

5. Flow cytometry를 통한 세포주기 및 MMP의 정량적 분석

MEMA를 제시된 농도로 24시간 처리한 세포들을 모아 Cycle TEST PLUS (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) solution A, B를 상온에서 차례로 10분씩 처리한 후, Cycle TEST PLUS solution C를 처리하여 4°C에서 10분간 염색하였다. 그 후 DNA flow cytometer (BD FACSCalibur)를 사용하여 세포주기 분포도를 histogram으로 분석하였다. Mitochondrial membrane potential (MMP) 변화의 분석을 위해서는 MEMA를 처리한 세포들에 10 µM로 희석한 JC-1 dye (Calbiochem)를 30분간 처리한 DNA flow cytometer를 이용하여 MMP를 측정하였다.

6. Caspase activity 측정

MEMA를 처리한 세포들을 모아 Colorimetric Assay Kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)의 사용방법에 따라 단백질을 추출 및 정량하여 150 µg의 단백질을 먼저 96 well plate에 주입하였다. 그 후 caspase activity kit 2 X reaction buffer 50 µl에 1 M DTT를 10 µl/ml이 되도록 섞어 96 well plate에 첨가하고, 여기에 4 mM 기질을 5 µl씩 첨가하였다. 이 때 caspase-3

의 기질은 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-p-nitroaniline (pNA), caspase-8의 기질은 Ile-Glu-His-Asp (IETD)-pNA, caspase-9의 기질은 Leu-Glu-His-Asp (LEHD)-pNA였다. 그 후 96 well plate의 거품을 제거하고 37°C에서 2시간 동안 처리한 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. 형광현미경과 Flow cytometer를 통한 ROS 생성 변화 관찰

A549 세포에 일정 시간동안 MEMA (75 µg/ml)를 처리한 후, 배양액에 5-(and 6)-carboxy-2'7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA)를 10 µM 농도가 되게 분주하여 20분간 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양시켰다. 그 후 세포들을 모아 PBS로 세척 후 DNA flow cytometer를 이용하여 상대적인 reactive oxygen species (ROS)의 생성 변화를 관찰하였다. 또한 형광현미경적 관찰을 위해 MEMA 및 DCFDA를 동일한 방식으로 처리한 세포들을 모아 cytospin으로 세포를 slide glass 위에 부착시킨 후, PBS에 두 차례 세척하여 건조시켰다. 그 후 형광현미경을 이용하여 400배의 배율로 관찰하였다.

8. MDC 염색을 통한 autophagosome의 관찰

MEMA를 24시간 처리한 세포들을 모아 3.7% paraformaldehyde로 상온에서 30분 동안 고정하였다. 그 후 상층액을 제거하고 PBS 200 µl로 suspension하여 cytospin으로 세포를 slide glass 위에 부착시킨 후, 0.05 mM 농도로 희석시킨 MDC으로 약 30분간 염색시켰다. 시약을 모두 제거한 후 PBS와 DW에 번갈아 세척하여 건조시키고, 형광현미경을 이용하여 400배의 배율로 염색된 autophagosome을 관찰하였다.

9. 단백질의 분리, 전기영동 및 Western blotting

준비된 세포들을 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]에 1시간 가량 lysis시킨 후 Bio-rad 단백질 정량 시약과 그 사용방법에 따라 정량하였다. 그 후 Laemmli sample buffer (Bio-rad)를 동량으로 섞어 SDS-polyacrylamide gel에 loading하여 전기영동시켰다. 이 acrylamide gel을 electroblotting을 통해 2시간 동안 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)에 옮긴 후 5% skim milk로 1시간 동안 blocking하고 1차 항체를 붙여 4°C에서 overnight하였다. 그 후 PBS-T로 세척하고 상온에서 1시간 가량 2차 항체를 붙인 후 다시 세척하고 Enhanced Chemiluminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Height, IL, USA)을 뿌린 다음 암실에서 Kodak X-ray에 감광시켰다.

결 과

1. EEMA 및 MEMA가 A549 세포의 증식 및 형태에 미치는 영향

A549 인체 폐암세포의 생존율에 EEMA 및 MEMA가 어떤 영향을 미치는지 조사하기 위해 EEMA와 MEMA를 각각 농도별

로 처리하여 24시간 배양 후 MTT assay를 시행하였다. 그 결과 Fig. 1A에 나타난 바와 같이 EEMA와 MEMA 처리군 모두 농도 의존적으로 세포생존율을 감소시키는 것을 확인하였다. 증식억제 효과는 MEMA 처리군에서 더욱 현저하여, 75 µg/ml 처리군에서 EEMA는 약 92%의 세포생존율을 보였으나 MEMA는 약 41%까지 세포생존율이 감소하였다. 상백피의 열수 추출물이 6 mg/ml의 농도에서 A549 인체 폐암세포주에 약 40%의 세포생존율을 보였다는 보고²²⁾와 비교해보면, 상백피의 EEMA 및 MEMA가 열수 추출물에 비해 저농도에서 매우 효과적으로 암세포의 증식을 억제하였음을 알 수 있다. 현미경 관찰 결과 역시 Fig. 1B에 나타내었듯이 EEMA 처리군에 비해 MEMA 처리군에서 더욱 현저하게 농도 의존적으로 세포의 밀집도가 감소하였고, 부유하는 세포의 수가 증가하였으므로 MEMA가 A549 세포의 증식억제에 더욱 효과적이었음을 확인할 수 있었다. 따라서 이후의 실험은 상대적으로 암세포 증식 효과가 탁월한 MEMA를 선택하여 진행하였다.

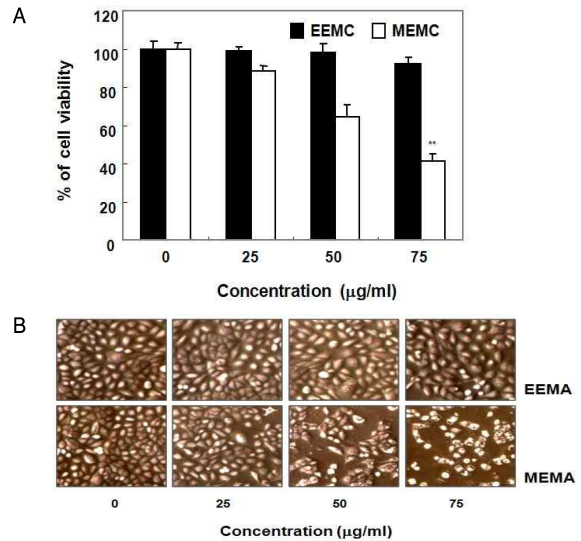


Fig. 1. Anti-proliferative effects of EEMA and MEMA in A549 human lung cancer cells. A549 cells were seeded in the 6 well plate at a density of 2.5×10^5 cells per well. After 24 h of stabilization, the cells were treated with EEMA and MEMA at different concentrations for 24 h. (A) Then MTT assay was performed. Each point represents the mean \pm SD of three independent experiments. ** $p < 0.01$ is significantly different from the value in control cells. (B) Cellular morphology was visualized by microscope (Original magnification, 50X).

2. MEMA 처리에 의한 A549 세포의 apoptotic body 형성 및 Sub-G1 상승

MEMA가 A549 세포에 유발하는 죽음의 형태가 apoptosis 인지를 확인하기 위하여 핵에 특이적으로 염색되는 DAPI staining을 시행한 결과는 Fig. 2A에 나타난 바와 같다. 제시된 결과에서 알 수 있듯이 DNA 단편화에 의한 apoptotic body가 MEMA 처리 농도 의존적으로 증가하는 것을 관찰하였다. Apoptotic body는 MEMA 50 µg/ml 처리군에서부터 나타나기 시작하여 75 µg/ml 처리군에서는 현저히 줄어든 세포의 밀집도와 함께 apoptotic body는 더욱 증가하였다. 또한 세포주기 분포

에서 sub-G1기에 있는 세포는 곧 apoptosis를 일으킨 세포를 의미하므로, MEMA 처리에 의해 apoptosis가 일어난 정도를 정량적으로 분석하기 위하여 MEMA를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후 DNA flow cytometry로 분석하였다. Fig. 2B에 나타난 결과에서 알 수 있듯이 sub-G1기의 빈도가 MEMA 농도 의존적으로 증가하여 75 µg/ml 처리군에서 약 21%까지 증가하는 것을 확인하였다. 이상의 결과는 MEMA에 의한 A549 세포의 죽음이 apoptosis 유도 및 밀접하게 연관되어 있음을 보여준다.

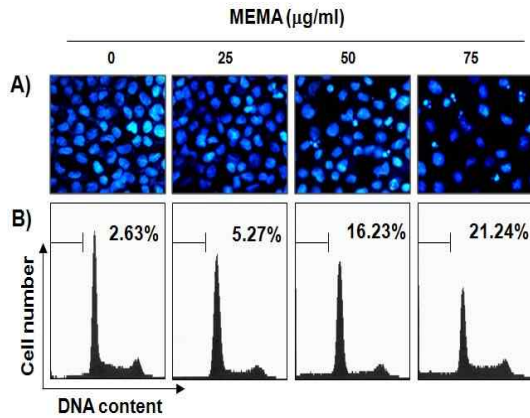


Fig. 2. Increase of apoptotic bodies and sub-G1 phase DNA contents by MEMA treatment in A549 human lung cancer cells. A549 cells were treated with MEMA at different concentrations for 24 h. (A) To observe the changes of nuclear morphology, untreated control and MEMA-treated cells were harvested and spin down. After 10 minutes' fixing, the cells were stained with DAPI solution. Stained nuclei were then observed under fluorescent microscope using blue filter (Original magnification, 400X). (B) To quantify the apoptotic cells, untreated control and MEMA-treated cells were collected and sub-G1 DNA content was evaluated using a flow cytometer.

3. MEMA 처리가 죽음수용체 경로에 미치는 영향

MEMA 처리에 의해 유발되는 A549 세포의 apoptosis가 어떤 경로의 단백질 변화를 통해 나타나는지 확인하기 위하여 Western blotting을 이용하여 외인성 경로라고 불리는 죽음수용체 경로를 구성하는 단백질들의 발현 변화를 먼저 조사하였다. 죽음수용체 경로는 죽음 신호를 전달하는 ligand와 막수용체가 결합하면서 개시되는데, FasL과 TRAIL은 대표적인 ligand이며 Fas와 DR4, DR5는 잘 알려진 막수용체이다. 일단 ligand가 수용체와 결합하면 세포질 내의 Fas-associated death domain (FADD)와 같은 adapter protein이 결합하여 death inducing signaling complex (DISC)를 형성하고 procaspase-8을 자가분해시켜 활성화시킨다²³⁾. Western blotting 관찰 결과 Fig. 4A에서 나타나듯 FasL과 같은 ligand의 발현이 증가하고, Fas, DR4 및 DR5와 같은 수용체 역시 발현이 증가하였다. 이를 통해, MEMA가 A549 세포에 유도하는 apoptosis는 죽음수용체 경로와 밀접한 관련이 있음을 확인하였다.

4. MEMA가 미토콘드리아 경로 및 미토콘드리아 막전위에 미치는 영향

다음으로 내인성 경로라고 불리는 미토콘드리아 경로를 구성하는 단백질들의 발현 변화를 조사하였다. 성장인자나 산소의

결핍, 방사선 혹은 free radicals 등이 미토콘드리아 경로를 유발시키는 자극원으로서, 이러한 자극이 미토콘드리아 막전위 (mitochondria membrane potential, MMP)를 저하시키면서 미토콘드리아 내부에 존재하는 apoptosis 전구 단백질들을 세포질로 방출시키게 된다²⁴⁾. 이 때 방출된 cytochrome c는 procaspase-9과 결합하여 caspase-9을 활성화시켜 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있으며, inhibitors of apoptosis proteins (IAP) family 단백질들은 이 과정을 억제하여 apoptosis를 막는 역할을 한다²⁵⁾. 미토콘드리아 막전위를 유지하는 데 중요한 역할을 하는 단백질로서 Bcl-2 family가 있는데²⁶⁾, Bcl-2 및 Bcl-xL과 같은 pro-apoptosis 단백질은 미토콘드리아 막의 안정화에 기여하며, Bax와 같은 anti-apoptosis 단백질은 이합체를 형성하여 미토콘드리아 막전위를 감소시키는 역할을 한다. 또 다른 Bcl-2 family인 Bid는 caspase-8이 활성화되면서 절단되어 tBid (truncated Bid)의 형태로 미토콘드리아 막에 삽입되어 미토콘드리아 막의 투과성을 증가시키는 등 죽음수용체 경로와 미토콘드리아 경로를 연결시키는 핵심적인 역할을 한다²⁷⁾. Fig. 3B에서 나타나듯이 A549 세포에 MEMA를 24시간 처리한 결과 Bcl-2와 Bcl-xL의 단백질 발현이 감소하였고, pro-Bid가 잘려 감소하는 것을 관찰하였다. 이와 함께 미토콘드리아 막전위의 소실도 농도 의존적으로 증가하여 75 µg/ml 처리군에서 33.28%까지 상승하였으며(Fig. 3D), apoptosis를 저해하는 IAP family 인자인 XIAP 및 cIAP-2의 발현은 모두 감소하였다(Fig. 3C).

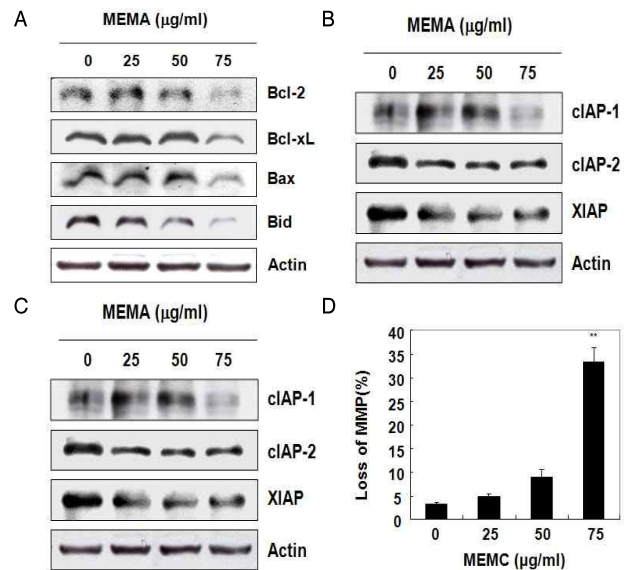


Fig. 3. Effects of MEMA on the levels of extrinsic and intrinsic pathway-related proteins in A549 cells. A549 cells were treated with MEMA at different concentrations for 24 h, and pelleted. (A and B) Cells were lysed and the cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels, and then transferred onto nitrocellulose membranes. And, the proteins related with (A) extrinsic pathway or (B) intrinsic pathway of apoptosis were detected by the indicated antibodies. (C) IAP family proteins were also detected. The proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as the internal control. (D) MEMA treated cells were incubated with JC-1 dye (10 µM) for 30 min in the dark, and the loss of MMP was measured by flow cytometer. Each point represents the mean ± SD of three independent experiments. **p<0.01 is significantly different from the value in control cells.

한편 미토콘드리아는 호흡사슬을 통해 세포 내 reactive oxygen species (ROS)의 항상성을 유지시키는데 중요한 역할을 하며, 호흡연쇄사슬을 통해 운반되던 전자가 이탈되면서 다양한 ROS를 발생시키므로 미토콘드리아는 생체 내 ROS의 주요 발생원이 된다. Fig. 4에 나타나듯이 MEMA (75 $\mu\text{g/ml}$) 처리에 의해 ROS가 증가하는 것을 관찰할 수 있었는데, 이는 미토콘드리아 막전위가 소실되면서 막에 존재하는 호흡사슬이 제 기능을 못하기 때문으로 보인다. 이들 결과를 통해 MEMA가 A549 세포에 유도하는 apoptosis는 죽음수용체 경로뿐만 아니라 미토콘드리아 경로도 거치며, Bid의 절단을 통해 두 경로가 밀접하게 연관됨을 유추할 수 있었다.

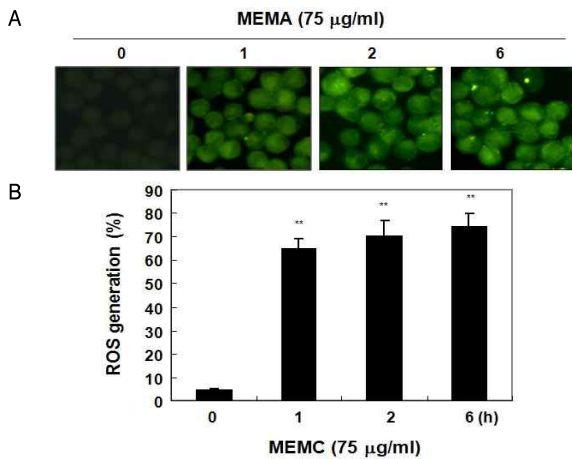


Fig. 4. Effects of MEMA on ROS generation in A549 cells. Untreated control and MEMA-treated cells were incubated with H2DCFDA dye (10 μM) for 20 min in the dark. (A) Stained cells were fixed for 10 min and observed under fluorescent microscope (original magnification, 400X). (B) MEMA-treated cells were collected, washed, and the relative ROS generation was measured by flow cytometer. Each point represents the mean \pm SD of three independent experiments. ** $p < 0.01$ is significantly different from the value in control cells.

5. MEMA가 caspases 활성화에 미치는 영향

MEMA 처리에 의해 A549 세포에서 죽음수용체 경로와 미토콘드리아 경로를 모두 활성화시키는 것을 관찰하였으므로(Fig. 3), 이들 경로를 통해 최종적으로 caspases가 활성화되는지 여부를 확인하였다. 그 결과 Fig. 5A에 나타난 바와 같이 비활성상태인 procaspase-8과 procaspase-9이 농도 의존적으로 감소하였으며, procaspase-3 역시 현저히 감소하였다. Fig. 5B에서 *in vitro* caspases 활성도를 정량화한 결과 또한 농도 의존적으로 caspase-3, -8 및 -9의 활성도가 3배 가량 상승하였으며, 이 중 caspase-3 활성도의 상승폭이 가장 크게 나타났다. 이들 결과를 통해 MEMA 처리에 의한 A549 세포의 apoptosis는 caspases의 활성화와 밀접한 관련이 있음을 확인하였다.

한편 caspase-3의 기질 단백질로 알려져 있는 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)는 apoptosis 유발 시 활성화된 caspase-3에 의해 분해되어 정상세포의 DNA 수복이나 유전자 안정성을 유지하는 본래의 기능을 상실하게 되는데²⁸⁾, Fig. 5A에 나타나듯이 PARP의 단편화가 MEMA 처리 농도 의존적으로 증가한 것으로 보아 MEMA가 A549 세포에 유발한

apoptosis는 caspases의 활성화와 그 기질단백질의 단편화에 의한 것임을 알 수 있었다.

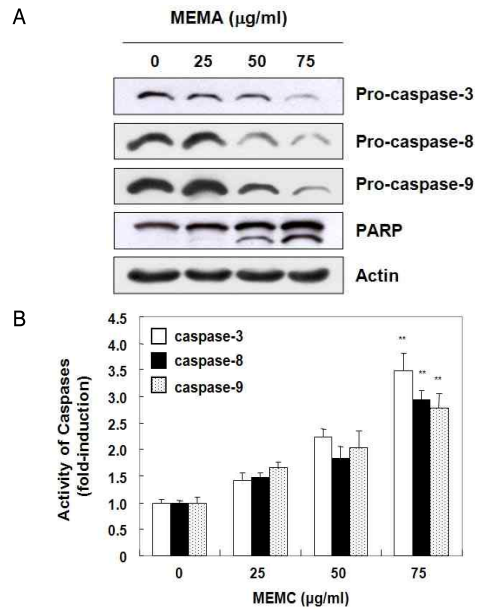


Fig. 5. Effects of MEMA on the activation of caspases and degradation of PARP in A549 cells. (A) A549 cells were treated with MEMA at different concentrations for 24 h, and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. And then membranes were probed with the indicated antibodies. The proteins were visualized using ECL solution. Actin was used as a loading control. (B) After 24 h treatment with MEMA, the cells were harvested and incubated for 2 h with substrates, DEVD-pNA, IETD-pNA and LEHD-pNA, for caspase-3, -8 and -9 activities, respectively. Then released fluorescent products were measured using ELISA reader. Each point represents the mean \pm SD of three independent experiments. ** $p < 0.01$ is significantly different from the value in control cells.

6. MEMA 처리에 의한 autophagy 유발

Fig. 6A에 제시한 MEMA 처리 24 시간 후 현미경 관찰 결과, 흥미롭게도 일반적인 apoptosis에서는 나타나지 않는 작은 소낭들이 형성되는 것을 관찰할 수 있었다. 이 소낭들은 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서부터 나타나기 시작하여 75 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 현저히 증가하였다. 프로그램화된 세포 죽음의 또 다른 형태인 autophagy가 일어날 시 이러한 소낭들이 발견되는 것이 알려져 있으므로, MEMA 처리에 의해 나타나는 소낭들이 autophagosome인지 확인하기 위하여 autophagosome을 특이하게 염색하는 MDC dye를 이용해 세포를 염색한 후 형광현미경을 통해 관찰하였다. Fig. 6B에 제시하였듯이 MEMA 처리 농도 의존적으로 MDC dye에 염색된 작은 점들이 증가하였으며, 이를 통해 현미경상 나타난 소낭들이 autophagosome임을 알 수 있었다. 다음은 MEMA 처리에 의해 autophagy가 유발되었음을 단백질 수준에서 확인하기 위하여 autophagy와 관련된 단백질들을 Western blotting을 통해 관찰하였다. Autophagy 시 발현이 증가하는 단백질로서 Beclin-1과 LC3가 있는데, Beclin-1은 autophagosome을 형성하는 데 중요한 역할을 하며, LC3는 autophagy가 일어나면 LC3의 두 가지 형태 중에서 LC3 I form이 LC3 II form으로 전환되면서 autophagosome의 막에 결합하

기 때문에 autophagosome의 직접적인 지표가 된다^{29,30}. Beclin-1과 LC3의 발현 변화를 관찰한 결과 Fig. 6C에 나타나듯이 Beclin-1과 LC3II form 모두 농도 의존적으로 발현이 증가하였다. 이들 결과는 A549 세포에서 MEMA 처리에 의해 apoptosis뿐만 아니라 autophagy가 동시에 유발됨을 보여주는 것이다.

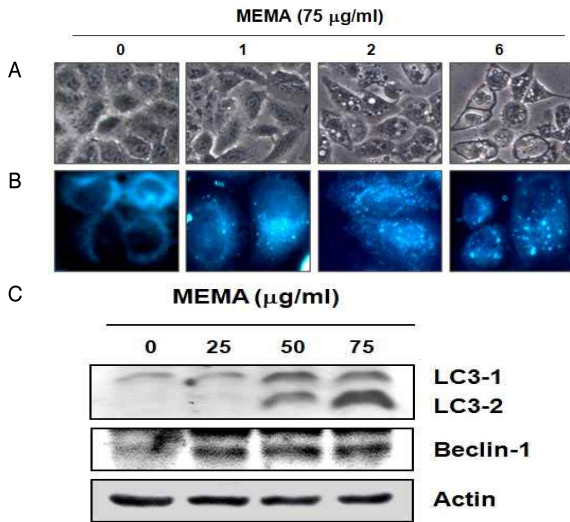


Fig. 6. Induction of autophagy by MEMA treatment. A549 cells were treated with MEMA at different concentrations for 24 h. (A) Cellular morphology was visualized by microscope (Original magnification, 200X). (B) For the visualization of autophagosomes, the untreated control and MEMA-treated cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde for 30 min and incubated with MDC dye (0.05 mM) for 30 min at room temperature. The cells were then washed twice with PBS and immediately observed under a fluorescence microscope (Original magnification, 400X). (C) MEMA treated cells were lysed and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. And then membranes were probed with the indicated antibodies. The proteins were visualized using ECL solution. Actin was used as a loading control.

고찰 및 결론

암은 세포주기 조절에 장애가 생겨 세포가 과증식하거나 적절한 시기에 비정상적인 세포가 죽지 않아 발생한다고 알려져 있다³¹. 실제로 암세포 내에는 apoptosis 저해 단백질인 Bcl-2의 과발현과 apoptosis 전구 단백질인 Bax의 저발현³², 면역 세포가 암세포를 제거하기 위해 분비하는 FasL에 대한 수용체인 Fas가 저발현되는 등³³ apoptosis를 저해하는 기전이 다양하게 존재한다. 따라서 암세포의 apoptosis를 조절하는 것이 그동안 암 치료의 주요 타겟이 되어 왔다. 그러나 지난 수 십년 동안 암 치료를 위한 다양한 시도가 이루어졌음에도 불구하고 여전히 암은 주요한 사망원인을 차지하며, 특히 폐암은 5년 이상 생존률이 15% 미만으로 효과적인 치료 전략이 필요한 실정이다³⁴. 현재 개발되어 있는 항암치료에 대해서도 여러 가지 부작용이 보고됨에 따라 인체 부작용이 적은 식용식물이나 한약재에서 새로운 물질을 추출하려는 노력이 활발해지고 있다.

본 연구에서는 甘寒하며 폐로 歸經하는 성질을 가진 상백피의 메틸렌클로라이드 추출물(MEMA)을 이용하여 A549 인체 폐

암 세포주에 대한 항암활성을 조사하였다. 그 결과 MEMA가 처리된 A549 세포의 생존율이 농도 의존적으로 감소하였으며, 세포막의 특이적 blebbing 현상, apoptotic body 형성, sub-G1기 세포의 증가 등을 통해 MEMA에 의한 A549 세포의 증식 억제가 apoptosis에 의한 것임을 알 수 있었다. 흔히 apoptosis의 경로는 크게 두 가지로 나누어지는데, DISC를 형성하여 caspase-8을 활성화시키는 죽음수용체 경로와 미토콘드리아 막전위가 감소하면서 cytochrome c가 세포질로 방출되어 caspase-9과 복합체를 형성하는 미토콘드리아 경로가 그것이다. 미토콘드리아 경로는 Bcl-2를 포함한 anti-apoptotic 단백질과 Bax를 포함한 pro-apoptotic 단백질의 상대적 비율에 의해 조절받으며, 활성화된 caspase-8 및 -9에 의해 최종적으로 caspase-3이 활성화되고 그 기질인 PARP 단백질이 잘리면서 apoptosis가 일어나게 된다³⁵⁻³⁷. MEMA 처리에 의해 유도된 apoptosis가 어떤 경로의 단백질을 통해 유발되었는지 Western blotting으로 확인해본 결과, MEMA는 죽음수용체 경로와 미토콘드리아 각각 경유하는 caspase-8과 -9를 활성화 시켰으며, 두 경로는 caspase-8의 기질 단백질인 Bid가 잘려 tBid의 형태로 미토콘드리아에 삽입되어 미토콘드리아 막전위(MMP)의 소실을 이끌면서 서로 연결될 것임을 유추할 수 있었다. 아울러 caspase-8 및 -9의 활성화를 통해 마지막으로 caspase-3이 활성화되었으며, 그 기질 단백질인 PARP도 단편화되었을 것으로 추정된다.

한편 MEMA 처리 시 apoptosis 뿐만 아니라 autophagy가 유발되는 것을 관찰할 수 있었는데, 이는 현미경 관찰 시 나타나는 작은 소낭이 autophagosome을 특이적으로 염색하는 MDC dye에 의해 염색되었으며, autophagy와 관련된 대표적 단백질인 Beclin-1과 LC3II form이 현저히 증가하는 것을 통해 알 수 있었다. 흥미롭게도 Beclin-1은 25 µg/ml 처리군부터 발현이 증가하기 시작하여 75 µg/ml 처리군까지 유지되었으며, LC3II form은 25 µg/ml 처리군에서는 변화가 없었으나 50 µg/ml 처리군부터 발현이 증가하여 75 µg/ml 처리군에서는 현저히 증가하였다. 이것은 Beclin-1이 autophagosome을 형성하기에 앞서 필요한 Beclin-1/class III phosphoinositide-3-kinase (PI3K) 전구 복합체를 만든다는 보고^{38,39}와 같이 autophagy가 일어나는 데 있어서 Beclin-1이 LC3보다 먼저 작용함을 보여주는 것이다. 또한 LC3 II form은 autophagosome의 막에 결합하여 autophagosome 형성의 직접적인 지표가 된다는 점에서, LC3II form이 50 µg/ml 처리군에 이르러서야 증가하는 것은 현미경상 25 µg/ml 처리군에서는 autophagosome이 거의 관찰되지 않았으나 50 µg/ml 처리군부터 autophagosome이 늘어나기 시작한 것과 동일한 경향성을 보여주었다.

한편 autophagy를 유발하는데 있어서 미토콘드리아의 역할은 최근 주목 받고 있는 연구 분야로서 다양한 실험 결과가 보고되어 왔다. 미토콘드리아는 전자전달계를 통해 세포 내 중요한 대사과정들이 일어나는 장소가 되며, ROS의 항상성 유지에 핵심적인 역할을 한다. Chen et al.⁴⁰과 Kim et al.⁴¹은 각각 미토콘드리아 전자전달계 저해제 혹은 selenite 처리에 의해 ROS가 생성되면서 autophagy가 유발된다고 보고하였으며, 최근에는 미토콘

드리아 선택적 autophagy인 mitophagy라는 개념도 제시되고 있다⁴²⁾. 본 연구에서도 MEMA 처리에 의해 농도 의존적으로 미토콘드리아의 막전위가 소실되었으며(Fig. 3D) 이와 함께 ROS가 증가하였으므로(Fig. 4) MEMA에 의해 유발되는 autophagy가 미토콘드리아 손상 및 ROS 발생과 연관되어 있을 가능성을 보여주었다.

최근 항암 치료 중에 암세포가 apoptosis에 저항성을 나타내는 경우가 늘어나면서 다른 형태의 세포사를 연구하는 것이 중요한 과제가 됨으로써, 상백피 메틸렌클로라이드 추출물이 apoptosis 뿐만 아니라 autophagy를 동시에 일으킨 것은 매우 의미 있는 결과라 할 수 있다. Autophagy는 스트레스나 노화에 대한 생리적인 반응의 일부이기도 하지만, 이러한 자가분해과정이 과도하게 활성화되면 세포를 죽음으로 이끌게 되어 autophagy가 암세포의 운명을 결정짓는데 있어서 어떤 역할을 하는지는 논란이 분분한 상태이다^{43,44)}. 예컨대 Song et al.⁴⁵⁾은 autophagy가 초기에는 암세포의 생존기작으로서 작용하지만, 지속적인 스트레스 시에는 autophagy의 과도한 자가분해 및 apoptosis 유도도 결국 세포사멸에 이르게 된다고 보고하였다. 이렇듯 암세포의 생존과 사멸에 있어서 다양한 역할을 하는 autophagy가 그 기능과 조절 기작이 세밀하게 밝혀진다면 암 치료에 효과적인 도구가 될 수 있을 것이다.

결론적으로 본 연구에서는 상백피 메틸렌클로라이드 추출물이 A549 인체 폐암세포주에 apoptosis를 일으켜 암세포의 증식을 효과적으로 억제시키는 것을 통해 암을 치료하는 새로운 대안 물질로서 상백피의 가능성을 제시하였다. 그러나 상백피 메틸렌클로라이드 추출물 중에서 과연 어떤 성분이 apoptosis를 일으키는 데에 주요한 작용을 했는지, 더불어 MEMA 처리에 의해 유발된 autophagy가 A549 암세포의 사멸 기작으로서 작용했는지 혹은 생존 기작으로서 작용했는지 여부에 대해서는 더욱 심도 있는 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2009학년도 동의대학교 교내연구비에 의해 연구되었음(2009AA116).

참고문헌

1. Kang, B.S., et al. *Herbology*, Younglim Sa, Seoul, p 244, 1998.
2. Kim, Y.Y., et al. Anti-hyperglycemic effect of Cortex Mori radics in db/db mice, *Korean J Food Sci Technol* 31: 1057-1064, 1999.
3. Yoon, S.H., et al. Hypoglycemic and enzyme effects of the water extract of Mori Rodicis Cortex in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Hygienic Sciences* 7: 119-123, 2001.
4. Park, S.W., et al. Cell Growth Inhibition of Mori Cortex on HTB 176 Lymphoblastoma. *J Basic Sci* 9: 105-115, 1996.
5. Kang Sung-Yong. The Effect of Mori Cortex Radicis on Anti-cancer and Immunocytes. *J. of Hebiology*. 12(2):73-89, 1997.
6. Sun-Ok Jee. Antioxidant Activities and Whitening Effect of the Mulberry (*Morus alba* L.) Root Bark Extracts. *Korean J Plant Res* 22(2):145-151, 2009.
7. Hyun Gug Cho, et al. Mori Cortex decreases the acute lung injury induced by skin burn. *Korean J of Herbology* 18(3):195-202, 2003.
8. Jong Yeop Yoo, et al. A clinical study on the effect of a cream containing Ramulus Mori extract and tea tree oil on Acne Vulgaris and aerobic skin flora. *Kor J of Dermatology* 41(9):1136-1141, 2003.
9. Yoon, C.Y., et al. The suppressive effects of Cortex mori on No, TNF- α and IL-1 production by macrophage. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.* 22: 281-292, 1998.
10. Hyun-Jung Kim, et al. Neuroprotective Effect of Extracts from Root Bark of *Morus alba* on Glutamate-induced Cytotoxicity in Neuronal Cells. *Journal of Life Science* 19(7):963-967, 2009.
11. Park, J.C., et al. Effects of the fractions from the leaves, fruits, stems and roots of *Cudrania tricuspidata* and flavonoids on lipid peroxidation. *Kor J Pharmacogn* 26: 377-384, 1995.
12. Yoo, J.Y., et al. A clinical study on the effect of a cream cotaining Ramulus Mori extract and tea tree oil on Acne Vulgaris and aerobic skin flora. *Korean J Dermatol* 41: 1136-1141, 2003.
13. Eun Ju Lee, et al. Purification of Anti-allergic Compound from Mori Cortex Radics Extract. *Yakhak Hoeji* 42(4):395-402, 1998.
14. Lim Hong Jin, et al. The Inhibitory Effects of Cortex Mori Water Extract in a Mouse Model of Allergic Asthma. *The Journal of Traditional Korean Medicine* 14(1):79-99, 2004.
15. Nomura, T., et al. A new flavone derivatives form the root barks of the cultivated mulberry tree (*Morus alba* L.). *Chem.Pharm. Bull.* 28: 2524, 1980.
16. Kimura, Y., et al. Effects of flavonoids and related compounds from mulberry tree on arachidonate metabolism in rat platelet homogenates. *Chem Pharm Bull* 34: 1223, 1986.
17. Fukai, T., et al. Constituents of the cultivated mulberry tree. XXV. Structures of two natural hypotensive Diels-Alder type adducts. mulberofurans F and G from the cultivated mulberry tree (*Morus ihou* Koidz). *Chem Pharm Bull* 33: 3195, 1985.
18. Jae-Hyuk Jeong, et al. Anti-tumor Metastatic Effect and

- Activation of Innate Immunity by Extract of Mori Radicis Cortex. *The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology* 22(1):31-40, 2009.
19. Park, I.K., et al. Cytotoxic activity of Bombyx mori and Morus alba derived materials against human tumor cell lines. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 41: 187-190, 1998.
 20. Norbury, C.J., et al. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 367-401, 2001.
 21. Schulze-Osthoff, K., et al. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 254: 439-459, 1998.
 22. Saelens, X., et al. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23: 2861-2874, 2004.
 23. Kim, R., et al. Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Cancer* 103: 1551-1560, 2005.
 24. Meijer, A.J., et al. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36(12):2445-2462, 2004.
 25. Lum, J.J., et al. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120: 237-224, 2005.
 26. Gozuacik, D., et al. Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol* 78: 217-245, 2007.
 27. Oh Sung Bae, et al. Pro-Apoptotic Effect of Mori Cortex Radicis in A549 Lung Cancer Cells. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 19(6):1563-1567, 2005.
 28. Kischkel, F.C., et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14: 5579-5588, 1995.
 29. Saelens, X., et al. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23: 2861-2874, 2004.
 30. Schimmer, A.D. Inhibitor of apoptosis proteins : translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res* 64: 7183-7190, 2004.
 31. Cory, S., Adams, J.M. The Bcl2 family : regulators of the cellular life-of-death switch. *Nat Rev Cancer* 2: 647-656, 2002.
 32. Esposti, M.D., et al. The roles of Bid. *Apoptosis* 7: 277-288, 2002.
 33. Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355-365, 1997.
 34. S. sinha, et al. The autophagy effector Beclin1 : a novel BH3-only pretein. *Oncogene* 24: 137-148, 2008.
 35. Cheol-Hee Choi, et al. Selective induction of catalase-mediated autophagy by dihydrocapsaicin in lung cell lines. *Free Radical Biology & Medicine* 49: 245-257, 2010.
 36. King, K.L., Cidlowski, J.A. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 60: 601-617, 1998.
 37. Miyashita, T., et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9: 1799-1805, 1994.
 38. Elnemr, A., et al. Human pancreatic cancer cells express non-functional Fas receptors and counterattack lymphocytes by expressing Fas ligand; a potential mechanism of immune escape. *Int J Oncol* 18: 33-39, 2001.
 39. E. Brambilla, et al. Pathogenesis of lung cancer signaling pathways: roadmap for therapies. *Eur Respir J* 33(6):1485-1497, 2009.
 40. Aita, V.M., et al. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* 59(1):59-65, 1999.
 41. Kihara, A., et al. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep* 2(4):330-335, 2001.
 42. Chen, Y., et al. Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species. *J Cell Sci* 230: 4155-4166, 2007.
 43. Kim, E.H., et al. Sodium selenite induces superoxide-mediated mitochondrial damage and subsequent autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer Res* 292: 5617-5624, 2007.
 44. Kim, I., et al. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* 462: 245-253, 2007.
 45. Song, K.S., et al. Rottlerin induces autophagy and apoptotic cell death through a PKC-delta-independent pathway in HT1080 human fibrosarcoma cells: the protective role of autophagy in apoptosis. *Autophagy* 4: 650-658, 2008.