

# 대장암세포주에서 적양 추출물의 미토콘드리아/Caspases 경로를 통한 Apoptosis 유도 작용

전병국<sup>1</sup> · 백순기<sup>2</sup> · 우원홍<sup>1,4</sup> · 문연자<sup>3,5\*</sup>

1: 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, 2: 동신대학교 공과대학 환경학과, 3: 원광대학교 한의과대학 해부학교실, 4: 원광대학교 한국전통의학연구소, 5: 원광대학교 환경과학연구소

## Extract of *Alnus japonica* Induces Apoptosis of Human Colon Adenocarcinoma Cells through the Mitochondria/Caspase Pathway

Byoung Kook Jeon<sup>1</sup>, Soon Ki Baik<sup>2</sup>, Won Hong Woo<sup>1,4</sup>, Yeun Ja Mun<sup>3,5\*</sup>

1: Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, 2: Department of Environmental Engineering, Dongshin University, 3: Department of of Anatomy, College of Oriental Medicine, 4: Research Center of Traditional Korean Medicine, 5: Institute of Environmental Science, Wonkwang University

An extract of *Alnus japonica* (Betulaceae) cortex has been traditionally used for purifying blood, and curing feces containing blood, enteritis, diarrhea, alcoholism and cut wounds. In the present study, we demonstrated that the ethanol extract of *Alnus japonica* (EAJ) exhibited significantly cytotoxicity in human colon adenocarcinoma HT-29 cells. The results showed that the induction of apoptosis in HT-29 cells by EAJ was characterized by chromatin condensation and activation of caspase-3. EAJ-induced activation of caspase-9 and -3 caused the cleavage of poly ADP-ribose polymerase (PARP) and the release of cytochrome c. The expressions of Bcl-2 and Bid were reduced by EAJ in HT-29 cells, whereas pro-apoptotic protein Bak was increased in the cells. EAJ-induced, dose-dependent induction of apoptosis was accompanied by sustained phosphorylation of MAP kinases (JNK and p38 MAPK), ASK1, and p53. NAC administration, a scavenger of ROS, reversed EAJ-induced cell death. In conclusion, these results indicated that EAJ can cause apoptosis through a ROS-mitochondria-caspases-dependent pathway in human HT-29 cells.

Key words : *Alnus japonica*, reactive oxygen species, mitochondria, caspase, apoptosis

### 서 론

대장암은 미국 등 서구사회에서 암 발병률과 이로 인한 사망률에서 2위를 차지하고 있으며 최근 우리나라에서도 식생활 문화의 서구화로 대장암의 발생률과 사망률이 현저하게 증가하여 암으로 인한 전체 사망률 중 4위를 차지하고 있다. 1980년대 말에는 대장암에 의한 사망률이 3.1%이었으나 2008년에는 13.9%로 4 배 이상 증가하였고 현재에도 증가 추세에 있다. 대장은 소화 및 흡수되고 남은 음식물이 머무르는 곳으로 많은 종류의 세균이 번식하고 있고 대장점막이 있는 곳이면 어디서나 암이 생기지만, S

상 결장과 직장에서는 주로 암이 발생하며, 서구화 되는 식생활과 과도한 스트레스, 불규칙적인 생활습관으로 인하여 대장암 발생률이 증가하고 있는 추세이다. 치료방법으로는 외과적 수술, 방사선요법, 면역요법, 화학요법이 있으며, 이중 화학요법이 주로 사용되고 있지만 화학물질의 독성으로 인한 부작용으로 치료에 많은 어려움을 겪고 있다. 특히 대장암은 다른 암들보다 증상이 늦게 나타나기 때문에 통증을 느낄 때에는 거의 말기에 접어든 상태이므로 발병에 앞서 예방이 필요한 것으로 사료된다<sup>1-3)</sup>.

Apoptosis는 내·외부적인 신호전달에 의해 일어나는 과정이다. 미토콘드리아의 막전위 소실로 방출된 cytochrome c는 caspase-9을 활성화시키고, caspase-9은 하위 신호인 caspase-3, -6, -7의 활성을 유도한다. 한편으로 Death receptor인 Fas, TNF receptor를 경유하여 Fas-associated death domain

\* 교신저자 : 문연자, 전북 익산시 신용동 원광대학교 한의과대학 해부학교실

· E-mail : yjmun@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6942

· 접수 : 2012/02/21 · 수정 : 2012/04/16 · 채택 : 2012/04/18

protein(FADD), caspase-8의 활성을 일으키는 경로가 있다<sup>4,5)</sup>. TNF- $\alpha$ , Fas/FasL, ROS 등의 자극에 의해 활성화되는 Apoptosis signal regulating kinase 1(ASK1)은 apoptosis 및 세포분화와 관련 있는 JNK/SAPK와 p38 MAPK를 활성화 시키는 것으로 보고 되어져 있으며<sup>6)</sup>, 이러한 MAPK의 활성화는 미토콘드리아를 경유한 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있다<sup>7)</sup>.

적양(赤楊)은 우리나라 및 일본의 각 처에 분포하는 자작나무과의 낙엽교목인 오리나무(*alnus japonica steude*)의 수피이다. 한방에서는 청열 강화 작용으로 비출혈, 설사, 외상, 출혈 등에 쓰이며 민간에서는 숙취해소에 사용하였고, 그 외에 수렴약이나 염료로 사용되어 왔다. 현재 우리나라에 자생하는 오리나무의 동속 식물로는 산 오리나무(*A. birsuta*), 사방 오리나무(*A. firma*), 두메오리나무(*A. maximowiczii*), 물갯나무(*A. birsuta* var *sibirica*) 등이 있다<sup>8)</sup>. 성분으로는 lupenone, L-amyrin, glutenol, taraxerol, betulinic acid 등 여러 종류의 triterpenoid 외에  $\beta$ -sitosterol, heptacosane 지방족 알코올, pyrocatechol계 tannin 등을 함유한다<sup>9)</sup>.

적양에 대한 연구에는 항염 및 여러 암세포 주에서 강한 독성이 있다고 알려져 있지만 아직까지 인간 대장암 세포주인 HT-29세포에 대한 정확한 세포사멸 기전이 알려진 바가 없기에 HT-29 세포에 대한 apoptosis 효과와 그 신호기전을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료 추출

적양 200 g에 에탄올 2 L를 가하여 실온에서 sonication 시킨 후 3일간 추출한 것을 일차로 거즈 여과 한 다음 filter paper로 vacuum pump를 이용하여 여과하였다. 여과된 적양 추출물을 rotary evaporator로 감압 농축하여 4.49 g(수득율 : 2.25%)의 건조된 추출물을 얻어 시료로 사용하였다. 적양 에탄올추출물 시료는 DMSO에 녹여 사용하였으며, DMSO는 최종 0.01% 이하의 농도 범위에서 사용하였다.

### 2. 세포배양

분양받은 HT-29 세포는 10% FBS, 100 units/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin, 0.25  $\mu$ g/mL amphotericin B를 첨가한 RPMI 1640을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 그리고 48시간 주기로 배양액을 교체하여 주었으며 0.25% trypsin EDTA로 세포를 떼어내어 계대 배양하였다.

### 3. 세포 생존율 측정

HT-29세포를 24-well 배양용기에  $2 \times 10^4$  cell/well의 밀도로 분주하여 24 시간 배양 후 적양 에탄올추출물을 처리하고 24, 48 시간 배양하였다. 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyletetrazolium bromide(MT-T) 용액을 0.5 mg/mL이 되도록 처리하고 3시간 배양하였다. MTT 용액을 처리한 배지를 제거하고 실온에서 건조시킨 후 DMSO로 용해시켜 ELISA reader(Bio-TEK, Winooski, USA)를 이용하여 540 nm파장의 흡

광도를 측정하였다.

### 4. Hoechst 33258 염색

HT-29 세포를 6-well 배양용기에  $3 \times 10^5$  cell/well의 밀도로 분주하고 24시간 배양하여 세포를 부착시킨 후, 적양 에탄올추출물을 처리하고 24시간 배양하였다. PBS로 세포단층을 씻어낸 후 4% formaldehyde로 실온에서 30분 동안 세포를 고정하고 PBS로 3회 세척하였다. Hoechst 33258의 최종 농도가 2  $\mu$ g/mL이 되도록 PBS에 희석하여 세포에 첨가하고 30분 동안 어두운 곳에서 염색한 후 형광 현미경으로 관찰하였다.

### 5. Western blot 분석

HT-29 세포를 10 cm 배양용기에  $1 \times 10^6$  개씩 부착시키고 적양 에탄올추출물을 처리하여 24시간 배양하였다. 배양된 세포를 모두 수거하여 lysis buffer(50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM EGTA, 100 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM PMSF, 10  $\mu$ g/mL leupeptin, 10  $\mu$ g/mL aprotinin)로 4°C에서 60분간 용해시킨 후, 13,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 얻은 세포 용해액은 Bradford 방법을 이용하여 단백질량을 하였다. 동량의 세포 용해액(단백질 100  $\mu$ g)은 2×sample buffer와 혼합하여 95°C에서 5분간 끓인 후 12% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하여 단백질을 분리하였다. 전기영동이 끝난 후 polyvinylidene difluoride membrane(Millipore, Bedford, MA, USA)에 전이시켰다. Membrane은 5% skim milk-TBST(20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에서 1시간 동안 blocking하고, Bcl-2, Bax, Bak, Bid, pro-caspase-3, pro-caspase-8, pro-caspase-9, pro-caspase-10, cytochrome c, PARP, ASK-1, p-38, SAPK/JNK 등의 측정하고자 하는 1차 항체를 각각 첨가하여 4°C에서 16시간 또는 실온에서 2시간 반응시켰다. TBST로 3회 세척한 후 이차항체 anti-rabbit, anti-mouse IgG conjugated horse-radish peroxidase와 1시간 반응시켰다. TBST로 3회 세척 후 WEST-ZOL®(plus) Western blot detection system(iNtRON, Korea)을 사용하여 ChemiDoc으로 촬영하였다.

### 6. 통계 처리

모든 실험은 3회 반복하였으며, 분석 수치는 mean  $\pm$  S.D로 나타내었고, 통계분석은 ANOVA Test에 의해 분석되었다. 통계적 유의성은  $p \leq 0.05$ 로 판정하였다.

## 결 과

### 1. 적양의 세포독성 및 핵의 변화

적양 에탄올추출물이 인간의 대장암 세포주인 HT-29 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 배양액에 적양 에탄올추출물을 0, 12.5, 25, 50, 100, 200  $\mu$ g/mL 농도로 처리하고 24, 48시간 배양 하였다. 배양 후 MTT를 3시간 처리하였으며 세포내에 형성된 formazan은 DMSO로 용해하여 측정하였다. 실험 결과 적양 에탄올추출물에 의한 세포증식은 0, 12.5, 25, 50, 100,

200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 24시간 후 89% 85% 64% 41% 36%, 48시간 후 85% 76% 52% 33% 30%로 나타났다(Fig. 1). Apoptosis가 일어났을 때 관찰할 수 있는 대표적인 특징으로 세포의 수축, 세포막 박리, 포스파티딜 세린의 외부로의 노출, 핵의 응축과 분절 등이 있다. 적양 에탄올추출물을 처리 하였을 때 핵의 응축과 분절이 일어났는지 확인하기 위하여 Hoechst 33258 염색을 실시하였다. HT-29 세포에 적양 에탄올 추출물을 각각 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리하고 24시간 배양한 후 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다. 대조군에서는 apoptosis의 특징적인 형태가 관찰되지 않았으나(Fig. 2A) 적양 에탄올추출물 처리군에서 농도 의존적으로 핵이 응축 및 분절된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2B-D).

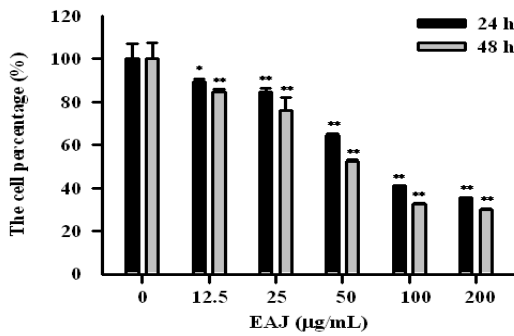


Fig. 1. Effect of EAJ on the cell viability of HT-29 cells. HT-29 cells were treated with EAJ at 37°C for 24, 48 hours. The proportion of survival cells was measured by MTT assay. The experiments were performed in triplicate. Data presented as means  $\pm$  S.D. of three independent experiments.

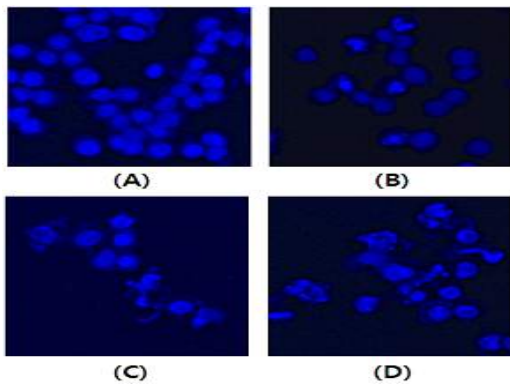


Fig. 2. Effects of EAJ on the chromatin condensation and fragmentation in HT-29 cells. Cells were treated with EAJ or without EAJ for 24 h at 37°C. HT-29 cells were stained with hoechst 33258 and then were observed under a fluorescence microscope. A: Control, B: 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EAJ, C: 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EAJ, D: 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EAJ.

## 2. Caspase 단백질 발현에 미치는 영향

Caspase는 cystein protease로 cell repair 효소들을 분해시키고 여러 가지 apoptotic 단백질을 활성화 시켜 apoptosis를 일으키는 것으로 알려져 있다. 짧은 전구 부위를 가진 caspase-3는 세포 내에서 32 kDa의 비활성형(pro-caspase-3)으로 존재하고 apoptosis 신호 전달에 의해 활성화 되며 DNA 수복에 관여하는 poly ADP ribose polymerase(PARP)를 분해한다. Caspase-8과

-10은 apoptosis의 조절단계 활성화 경로에 관련된 대표적인 개시 인자로 Fas, TNF, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL) 등에 의해 매개되어 apoptosis 과정 초기에 관여한다. 또한 Caspase-9은 개시 caspase에 속하며 미토콘드리아를 경유한 apoptosis와 연관 있고 cytochrome c 방출로 인하여 보조인자인 Apaf-1과의 결합에 의해 활성화 된다. 이렇게 활성화된 caspase의 연쇄 활성화로 인해 세포 내에서 32 kDa인 비활성형으로 존재하던 pro-caspase-3를 활성화하게 된다. 적양 에탄올추출물을 각각의 농도로 처리하고 배양한 후 western blot을 이용하여 확인하였다. 실험 결과 적양 에탄올추출물에 의한 pro-caspase-3, -8, -9이 농도 의존적으로 감소된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3A-B).

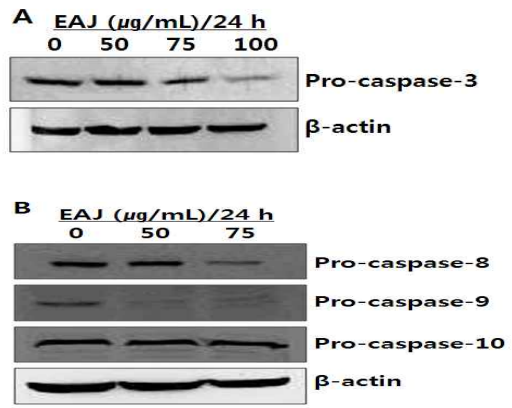


Fig. 3. Dose-dependent effect of EAJ on the protein expression level of pro-caspase-3(A), -8(B), -9(B), 10(B) in HT-29 cells. Cells were incubated for 24 h at 37°C with the respective concentration of EAJ. Equal protein of the total lysates were analyzed by gradient 12% SDS-PAGE. The reduction of pro-caspase-3, -8, -9 were detected by Western blot.

## 3. Bcl-2 family 단백질 발현에 미치는 영향

Bcl-2 family 단백질은 pro-survival에 속하는 Bcl-2 subfamily(Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w)와 pro-apoptosis에 속하는 Bax sub-family(Bax, Bak), BH3 sub-family(Bid, Bad, Noxa, PUMA, Hrk)로 나눌 수 있다. Apoptosis 신호가 전달되면 세포질에 존재 하던 Bid가 truncation되어 tBid로 변하여 미토콘드리아로 유입 된다. 또한 Bax, Bak이 활성화 되고 미토콘드리아막에 pore을 형성하여 cytochrome c의 방출을 일으켜 apoptosis를 유도한다. 적양 에탄올추출물을 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리하고 24시간 배양한 후 western blot을 이용하여 확인하였다. 실험 결과 Bcl-2, Bid는 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 단백질 발현이 감소하였다. 반면, Bak 발현은 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 증가하였다. 그러나 Bax의 발현은 변화가 없었다(Fig. 4).

## 4. Cytochrome c의 유리에 미치는 영향

전자전달계 효소인 cytochrome c는 세포의 에너지 생산에 필수적이며 미토콘드리아 내막에 존재한다. 미토콘드리아로부터 방출된 cytochrome c는 apoptosis protease activating factor(Apaf-1)과 결합하고 dATP에 의해 pro-caspase-9와

apoptosome을 형성하게 된다. 이후 caspase-9이 활성화 되어 하위 caspase인 caspase-3, -6, -7을 활성화 시킴으로써 apoptosis를 일으킨다. 적양 에탄올추출물을 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리하고 24시간 배양한 후 western blot을 이용하여 확인하였다. 실험결과 cytochrome c의 발출이 농도 의존적으로 증가된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

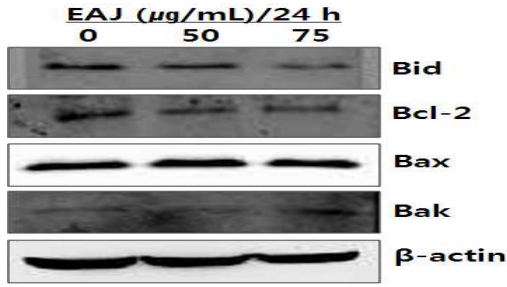


Fig. 4. Effect of EAJ on the protein expression levels of Bcl-2 family in HT-29 cells. Cells were incubated for 24 h at 37°C with the 50, 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of EAJ. Equal protein of the total lysates were analyzed by gradient 12% SDS-PAGE. The reduction of Bid, Bcl-2 and expression of Bak were detected by Western blot.

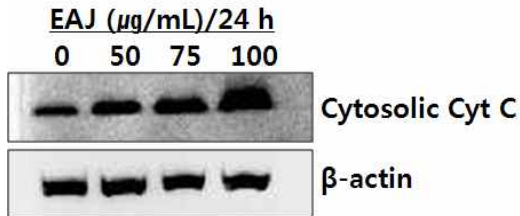


Fig. 5. Effect of EAJ on the release of cytochrome c in HT-29 cells. Cells were incubated for 24h at 37°C with the 50, 75, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of EAJ. Equal protein of the total lysates were analyzed by gradient 12% SDS-PAGE. The release of cytochrome c were detected by Western blot.

### 5. PARP 분절

Poly ADP ribose polymerase(PARP)는 DNA 수복에 관여하는 효소로 활성화된 caspase-3에 의해 PARP의 분절이 일어나게 된다. 이렇게 분절된 PARP는 DNA에 수복에 관여할 수 없게 되므로 apoptosis가 일어나게 된다. 적양 에탄올추출물을 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리하고 24시간 세포를 배양한 후 western blot을 이용하여 확인하였다. 실험 결과 116 kDa의 PARP 단백질이 적양 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 89 kDa으로 분절화 현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 6).

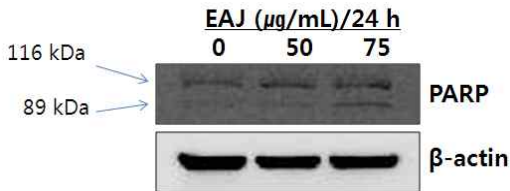


Fig. 6. Effect of EAJ on the cleavage of PARP in HT-29 cells. Cells were incubated for 24h at 37°C with the 50, 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of EAJ. Equal protein of the total lysates were analyzed by gradient 12% SDS-PAGE. The cleavage of PARP were detected by Western blot.

### 6. ASK1과 p38, JNK의 활성화

Apoptosis signal-regulating kinase 1(ASK1)은 serine/threonine kinase로 세포 분화, 사멸등 여러 가지 기능을 하는 효소이며 ROS, TNF alpha, endoplasmic reticulum stress등에 의해 활성화 된다. 이렇게 활성화된 ASK1은 세포사멸과 연관된 하위 신호인 JNK와 p38의 인산화를 유도하는 것으로 알려져 있다. Mitogen activated protein kinases(MAPK) pathway는 세포의 자극을 세포막에서 핵까지 전달하는 대표적인 신호전달 경로로 세포의 성장, 분열, 분화, 사멸 등에 관여한다. MAPKs는 p38 MAPK, c-Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase(JNK/SAPK), extracellular signal regulated kinase 1/2(ERK1/2또는 p44/p42) 등으로 나눌 수 있다. Stress kinase로 분류되는 JNK와 p38 MAPK는 세포사멸 등을 일으키는 것으로 알려져 있다. 적양 에탄올추출물을 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리하고 시간별로 수거하여 western blot을 이용하여 확인하였다. 실험결과 적양 에탄올추출물 처리 후 30분 부터 ASK1이 발현되는 것을 관찰할 수 있었으며 4시간부터 p-p38, p-JNK 발현을 관찰할 수 있었다(Fig. 7A-B).

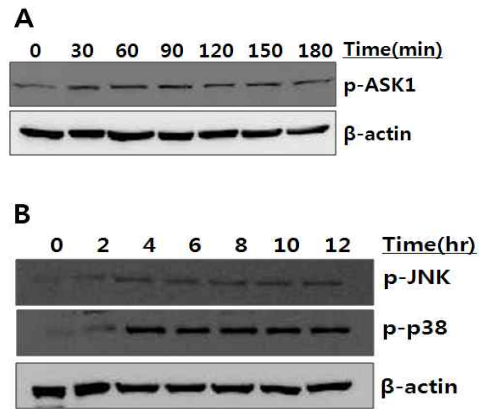


Fig. 7. Effect of EAJ on the protein expression level of ASK1(A), MAPKs(B) in HT-29 cells. Cells were incubated for time-dependent at 37°C with the 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of EAJ. Equal protein of the total lysates were analyzed by gradient 12% SDS-PAGE. The expression of p-ASK1, p-JNK, p-38 were detected by Western blot.

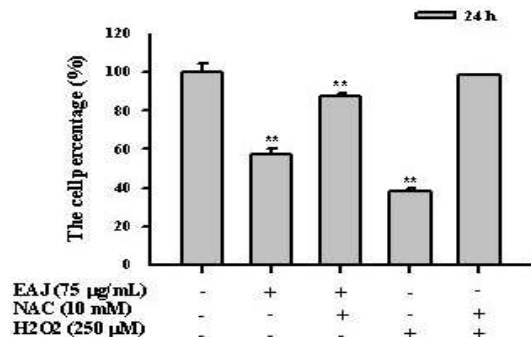


Fig. 8. The recovery effect of NAC on EAJ-induced cytotoxicity in HT-29 cells. The cells were treated with 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of EAJ for 24 hours in either the presence or absence of 10 mM NAC pretreatment for 2 hours. The proportion of survival cells was measured by MTT assay. The experiments were performed in triplicate. Data presented as means $\pm$ S.D. of three independent experiments.

## 7. NAC에 의한 세포독성 억제 효과

본 실험결과 적양 추출물은 HT-29세포의 apoptosis를 유도하였다. 따라서 적양추출물에 의한 세포사멸이 ROS와 관련되어 있는지 ROS 차단제인 N-acetyl-cysteine (NAC)을 이용하여 조사하였다. 적양 에탄올추출물 50, 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 24시간 후 세포생존율은 각각 67%, 57% 였다. 그러나 NAC(10 mM)을 2시간 전 처리한 후 적양 에탄올추출물 50, 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리군은 각각 102%, 88%로 생존률이 회복 되었다(Fig. 8).

## 고 찰

대장암은 결장과 직장에 생기는 악성종양을 말하며, 암이 발생하는 위치에 따라 결장에 생기는 암을 결장암, 직장에 생기는 암을 직장암이라 하고, 이를 통칭하여 대장암이라 한다. 대장암 치료는 수술적 요법과 방사선 치료 및 화학요법을 병행하여 사용되고 있으나, 이러한 방법들은 정상세포에 강한 독성과 쇠약감, 구토, 설사 등 다양한 부작용을 나타낼 수 있다. 따라서 독성과 부작용이 적으면서 효과적으로 암세포를 죽일 수 있는 치료제의 개발이 시급한 실정이다. 최근 천연물 또는 전통적으로 사용되던 한약재 등에서 항암효과를 나타내는 성분이 포함되어 있다는 보고가 되면서 전 세계적으로 천연물을 이용한 항암제 개발에 관심이 집중되고 있다<sup>10,11)</sup>.

적양(*Alnus japonica*)은 자작나무 과에 속하는 낙엽교목인 오리나무의 수피이며, 한국, 일본, 중국에서 습기가 많은 저지대에 자생한다. 한방에서는 멧지 않는 비출혈, 설사, 외출혈 등에 쓰이며, 민간에서는 숙취 해소에 사용하였고, 수피와 과실은 수렴약이나 염료로 사용해왔다<sup>12,13)</sup>. 오리나무 수피가 조류 인플루엔자 바이러스(KBNP-0028)에 대한 항바이러스 효과와<sup>14)</sup> Rat에서 아세트아미노펜으로 유발된 간 손상으로 부터의 간 보호와 항산화효과가 있다고 보고되어 있으며<sup>15)</sup> 그리고 오리나무 수피로부터 분리된 hirsutenone 성분이 T cell 발현 억제를 통한 아토피 피부염의 치료효과가 있는 것으로 밝혀졌다<sup>16)</sup>. 오리나무로부터 분리된 diarylheptanoid 계열의 성분들은 nitric oxide와 prostaglandin E2 합성 억제 효과<sup>17)</sup>, 인체 유래 암 세포(A549, AGS, HCT15, SKOV3, HEP3B)에 대한 세포독성 실험결과 유의성 있는 활성을 나타내었다는 보고도 발표 되어있다<sup>18)</sup>.

본 실험에서 적양 에탄올추출물을 대장암 세포주인 HT-29에 처리시 apoptosis를 유도하는 것으로 나타났다. MTT assay를 통한 세포독성 실험에서 적양 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 HT-29의 세포 생존율을 현저히 감소시켰고(Fig. 1), 이러한 생존율의 변화가 apoptosis와 관련되어 있는지 알아보기 위하여 Hoechst 염색을 실시하여 세포의 형태학적 관찰을 확인한 결과 적양 에탄올추출물이 apoptosis의 형태학적 특징인 세포 수축, 세포막의 박리, 핵의 응축 및 분절을 유도하고 있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 따라서 적양 에탄올추출물에 의한 세포독성은 apoptosis를 통한 세포사멸 때문일 것이라 예상할 수 있었다. 적양 에탄올추출물에 의한 HT-29의 세포 독성이 apoptosis의 기전에 의한 것임을 알아보기 위하여 caspase, Bcl-2 family,

cytochrome c, PARP, ASK-1, JNK와 p38MAPK 단백질을 western blot을 이용하여 확인 하였다. cysteine aspartic acid proteases인 caspase는 세포사멸을 조절하는 주요한 조절인자로 세포내에서 불활성 형태인 proenzyme으로 존재하며, 스스로 또는 다른 caspase에 의해 분절되어 활성화된다. Caspase는 initiator caspase와 effector caspase로 구분되며, initiator caspase는 death-inducing signal에 의해 활성화되어 effector caspase를 활성화하고 활성화된 effector caspase는 lamin A, DNA fragmentation factor, a-fodrin과 PARP 등의 단백질의 분해를 유도하여 세포사멸을 유도한다<sup>19)</sup>. 본 실험에서 적양 에탄올추출물은 불활성형 pro-caspase-3의 발현을 효과적으로 감소시켰다. caspase-3의 활성은 initiator caspase인 caspase-8과 -9에 의해 활성화 되는 것으로 잘 알려져 있고, caspase-8은 세포막에 존재하는 Fas receptor에 ligand가 결합하면 활성화되는 외적 경로를 통해 활성화되는 반면 caspase-9은 미토콘드리아 막 투과성 증가에 의해 방출된 cytochrome c에 의한 내적 경로에 의해 활성화된다<sup>20)</sup>. 적양 에탄올추출물에 의해 유도된 caspase-3를 활성화 하는 조절자를 확인해 본 결과 pro-caspase-8, -9의 발현을 농도 의존적으로 감소시켰지만 caspase-9의 활성정도가 더 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig 3). Poly ADP ribose polymerase(PARP)는 활성화된 caspase-3의 표적 단백질로 DNA repair에 중요한 역할을 하고 있으며 PARP의 분절은 apoptosis로 인한 세포사멸을 확인할 수 있는 지표가 된다<sup>21)</sup>. 본 실험에서 적양 에탄올추출물에 의한 PARP의 분절 현상이 관찰되었고(Fig. 6), 이러한 결과로 볼 때 적양 에탄올추출물은 Fas를 경유한 caspase-8과 미토콘드리아를 경유한 caspase-9에 의해 활성화된 caspase-3가 PARP의 cleavage를 유도함으로써 apoptosis를 일으키는 것으로 보인다. 위의 결과에서 caspase-9의 활성화에 영향을 주는 Bcl-2 family 단백질과 cytochrome c 방출의 발현 변화를 확인해 본 결과 anti-apoptotic protein인 Bcl-2 단백질의 발현은 감소하였고, pro-apoptotic protein인 Bak 단백질의 발현은 증가하였지만 Bax 단백질의 발현은 변화가 없었다(Fig. 4). 그리고 비록 본 실험에서 truncation된 tBid 단백질의 발현은 관찰하지 않았지만, 총 Bid 단백질의 발현은 감소되었기 때문에 Bid가 tBid로 전환된 것으로 볼 수 있다(Fig. 4).

Bcl-2 family는 미토콘드리아 막 투과성을 조절하는 단백질로 미토콘드리아 막에 존재하거나 세포사멸 유도신호에 의해 미토콘드리아 막으로 이동하여 세포사멸을 조절하는 중요한 역할을 한다. Bcl-2 family 단백질은 anti-apoptotic protein(Bcl-2 and Bcl-xL), pro-apoptotic protein(Bak and Bax), Bcl-2 homology domain(BH)3-only protein(Bid, Bad, Noxa, PUMA, Hrk)으로 구분된다. Bax, Bak 단백질은 anti-apoptotic protein인 Bcl-2에 의해 그 작용이 억제된다<sup>22)</sup>. 또한 Bcl-2 family에 속하는 단백질들의 발현 변화는 미토콘드리아 외막에서 Bcl-2 family간의 dimer 형성에 이상을 초래하여 cytochrome c, Apaf-1, Smac/Diablo, AIF등 미토콘드리아 내부물질들의 방출을 유도함으로써 apoptosis를 일으키게 된다<sup>23)</sup>. 위의 실험결과에서 Bcl-2 family 단백질들의 발현 변화는 미토콘드리아 막 투과성의 이상

을 야기하여 cytochrome c의 방출을 유도하였음을 알 수 있다 (Fig. 5).

ASK1은 170 kD의 단백질로 산화적 스트레스, TNF alpha, endoplasmic reticulum stress 등에 의해 활성화 되어 하위 신호인 p38, JNK의 인산화를 유도 한다고 알려져 있다<sup>24</sup>. Mitogen activated protein kinases (MAPKs)는 세포증식과 분화, 세포사멸과 생존 등에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며 그중 JNK/SAPK, p38 MAPK는 염증성 cytokine, 산화적 스트레스에 의해 발현되며 세포 성장을 억제하고 apoptosis 신호로서 작용한다고 알려져 있다<sup>25-27</sup>. 본 실험 결과에서도 ASK1, JNK, p38 MAPK가 활성화 되었으며(Fig. 7), 적양 에탄올추출물에 의한 JNK, p38 MAPK의 활성화가 Bcl-2 family 발현에 영향을 주어 HT-29 세포의 apoptosis가 유도되는 것으로 볼 수 있다.

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 프리 라디칼로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, γ-ray 또는 ultra violet(UV) 등에 의해 세포내 ROS의 양이 급격히 증가하여 산화적 스트레스(oxidative stress)를 일으키게 된다. 이러한 산화적 스트레스에 의한 세포사멸이 apoptosis와 연관 있다고 보고되고 있다<sup>28</sup>. N-acetyl-cysteine (NAC)을 사용하여 세포 생존율을 측정하였다. 실험 결과 적양 에탄올추출물 처리에 의한 세포독성이 NAC 병용처리군에서 회복되었으며, 양성 대조군으로 사용한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의한 세포독성도 NAC 병용처리로 회복되었다(Fig. 8).

이상의 결과 적양 에탄올추출물은 HT-29 세포증식을 현저히 억제하였으며 형태학적인 관찰에서도 핵의 응축 및 분절화를 유도하였다. 그리고 이러한 세포독성은 적양 에탄올추출물에 의해 유도된 ROS가 ASK1, JNK와 p38 MAPK의 활성화를 일으켜 미토콘드리아를 경유한 HT-29의 apoptosis를 유도하는 것을 알 수 있었다.

## 감사의 글

이 논문은 2011학년도 원광대학교 교비 지원에 의하여 수행되었음.

## 참고문헌

1. Yang, B.K., Hwang, S.L., Yun, I.J., Do, E.J., Lee, W.H., Jung, Y.M., Hong, S.C., Park, D.C. Antitumor effects and immunomodulating activities of phellinus linteus extract in a CT-26 cell-injected colon cancer mouse model. *Mycobiology*. 37(2):128-132, 2009.
2. Denipote, F.G., Trindade, E.B., Burini, R.C. Probiotics and prebiotics in primary care for colon cancer. *Arq. Gastroenterol*. 47(1):93-98, 2010.
3. Ryu, D.S., Kim, S.H., Lee, D.S. Anti proliferative effect of polysaccharides from salicornia herbacea on Induction of G2 M arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *J Microbiol Biotechnol*. 19(11):1482-1489, 2009.
4. Liu, J.J., Ake, N., Stina, O., Vladimir, B., Zhao, W.Z., Duan, R.D. Boswellic Acids trigger apoptosis via a pathway dependent on caspase-8 activation but independent on Fas/Fas ligand interaction in colon cancer HT-29 cells. *Carcinogenesis*. 23(12):2087-2093, 2002.
5. Pathak, S., Sharma, C.H., Jayaram, H.N., Singh, N. Apoptotic signaling induced by benzamide riboside : an in vitro study. *Mol Cell Biochem*. 328(2):67-73, 2009.
6. Pan, J., Chang, Q., Wang, X., Son, Y., Zhang, Z., Chen, G., Luo, J., Bi, Y., Chen, F., Shi, X. Reactive oxygen species-activated Akt/ASK1/p38 signaling pathway in nickel compound-induced apoptosis in BEAS 2B cells. *Chem Res Toxicol*. 15;23(3):568-577, 2010.
7. Suzuki, T., Tsukamoto, I. Arsenite induces apoptosis in hepatocytes through an enhancement of the activation of Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase caused by partial hepatectomy. *Toxicol Lett*. 10;165(3):257-264, 2006.
8. Kim, H.J., Yeom, S.H., Kim, M.K., Shim, J.G., Paek, I.N., Lee, M.W. Nitric oxide and prostaglandin synthesis inhibitory activities of diarylheptanoids from the Barks of *Alnus japonica* Steudel. *Arch Pharm Res*. 28(2):177-179, 2005.
9. 정기화, 이은방, 정춘식, 우병희. 오리나무 수피엑스의 위염 및 위궤양에 대한 효과. *응용약물학회지* 4(1):84-88, 1996.
10. 전소영, 배옥석, 김종봉. 대장암의 예후와 Apoptosis 활성화. *대한의생명과학회지* 4(2):121-128, 1998.
11. 황상구, 이형철, 김춘관, 김대근, 송호준, 박영준, 김원신, 전병훈. p53-결핍 Jurkat T 임파구의 세포사멸에 대한 鷄血藤 물 추출물의 세포주기 억제효과. *동의생리병리학회지* 15(6):887-892, 2001.
12. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 외. *중약대사전*. 정담. 8: 3745-3755.
13. 김종원, 노재섭 문영희, 박종희, 양기숙, 육창수, 황완균. *종합약용식물학*. 139-140, 2002.
14. Tung, N.H., Kwon, H.J., Kim, J.H., Ra, J.C., Kim, J.A., Kim, Y.H. An anti-influenza component of the bark of *Alnus japonica*. *Arch Pharm Res*. 33(3):363-367, 2010.
15. Kim, S.T., Kim, J.D., Ahn, S.H., Ahn, G.S., Lee, Y.I., Jeong, Y.S. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Alnus japonica* extracts on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother Res*. 18(12):971-975, 2004.
16. Joo, S.S., Kim, S.G., Choi, S.E., Kim, Y.B., Park, H.Y., Seo, S.J., Choi, Y.W., Lee, M.W., Lee, D.I. Suppression of T cell activation by hirsutenone, isolated from the bark of *Alnus japonica*, and its therapeutic advantages for atopic dermatitis. *Eur J Pharmacol*. 1;614(1-3):98-105, 2009.
17. 이연아, 조수민, 김광호, 김준식, 김세원, 이민원. 물오리나무

- 에서 분리된 diarylgepatanoid의 항산화작용. 약학회지 44(2):193-196, 2000.
18. 배춘일, 공재명, 오정완, 김현종, 오갑진, 박시경, 정순간, 조외환. 산오리나무의 세포독성 성분연구. 약학회지 41(5):559-564, 1997.
  19. Jin, Z., El-Deiry, W.S. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* 4: 189-163, 2005.
  20. Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., Wang, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 15: 269-290, 1999.
  21. Eeva, J., Nuutinen, U., Ropponen, A., Matto, M., Eray, M., Pellinen, R., Wahlfors, J., Pelkonen, J. The involvement of mitochondria and the caspase-9 activation pathway in rituximab-induced apoptosis in FL cells. *Apoptosis.* 14(5):687-698, 2009.
  22. Alves, N.L., Van, R.A., Eldering, E. Withdrawal symptoms in display: Bcl-2 members under investigation. *Trends Immunol.* 28(1):26-32, 2007.
  23. Puthalakath, H., Strasser, A. Keeping killers in a tight leash: transcriptional and post translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ.* 9(5):505-512, 2002.
  24. Koujiro, I., Daisuke, K., Takeshi, N., Takako, M., Kazuhiro, S., Kazuo, F., Miyuki, Y., Hiroyuki, M., Tetsuya, T., Kaku, T., Takeshi, M., Hidenori, I., Eiichi, A. Impact of mitochondrial reactive Oxygen species and apoptosis signal-regulating kinase 1 on insulin signaling. *Diabetes.* 55(5):1197-1204, 2006.
  25. 최병민, 오미혜, 유기환. 신생 백서신장에서 안지오텐신 전환 효소 억제제가 MAPK Family 발현에 미치는 영향에 관한 연구. *대한소아과학회.* 47(3):325-331, 2004.
  26. Chen, Y.R., Meyer, C.F., Tan, T.H. Persistent activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in gamma radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 271(2):631-634, 1996.
  27. Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J., Davis, R.J. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem.* 270(13):7420-7426, 1995.
  28. Ryter, S.W., Kim, H.P., Alexander, H., Park, J.W., Nakahira, K., Wang, X., Augustine, M., Choi, K. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxidant Redox Signal.* 9(1):49-89, 2007.