

백혈병세포주 Jurkat T 세포에서 합환피 (*Albizzia julibrissin*) 물 추출물의 아포토시스 유도 효과

황상구 · 이형철 · 김춘관 · 김용익 · 주성민* · 김원신* · 전병훈#
원광대학교 한의과대학 한의학과 병리학교실, *원광대학교 자연과학대학 생명과학부
(Received September 26, 2001; Revised November 1, 2001)

Effect of the Water Extract of *Albizzia julibrissin* on Apoptotic Cell Death in the Human Leukemic Jurkat T Cell Line

Sang-Gu Hwang, Hyung Chul Lee, Chun Kwan Kim, Yong Ik Kim,
Sung Min Ju*, Won Sin Kim* and Byung Hun Jeon#

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,
Iksan, Chonbuk 570-749, Korea

*Division of Life Science, College of Natural Sciences, Wonkwang University,
Iksan, Chonbuk 570-749, Korea

Abstract — Apoptosis is a morphologically and biochemically distinct form of cell death that occurs in many different cell types in a wide variety of organisms. *Albizzia julibrissin* belonging the family Leguminosae has been used for the treatment of contusion, sore throat, amnesia, and insomnia in oriental traditional medicine. This study investigates whether the water extract of *A. julibrissin* induce apoptotic cell death in Jurkat T-acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells. Jurkat cells were increased inhibitions of cell viability in a concentration-dependent manner by *A. julibrissin*. This herbal medicine also caused apoptosis as measured by cell morphology and DNA fragmentation. The capability of *A. julibrissin* to induce apoptosis was associated with proteolytic cleavage of specific target protein such as poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) protein suggesting the possible involvement of caspases. Our result showed that Bcl-2 and Bax protein levels were not changed in all *A. julibrissin*-treated groups compared to control group. These results suggest that *A. julibrissin*-mediated apoptosis is independent with Bcl-2 related signaling pathway in this cells.

Keywords □ *Albizzia julibrissin*, water extract, acute lymphoblastic leukemia, Jurkat T cells, apoptosis

암이란 개체를 구성하는 세포가 정상적인 조직 기능의 범주와 주위 장기의 정상적인 영향력에서 벗어나 몸에 불리하게 과잉 성장하는 것을 의미한다.¹⁾ 현재 암은 국내 및 서구 사회에서 심혈관질환 다음으로 일반적인 사망 원인으로 부각되었으며, 1998년 세계 보건기구 자료에 의하면 선진국의 암 사망자 수가 전체 사망 원인의 21%를 차지하였다. 또한 암은 아직도 그

발생원인과 기전이 명백히 밝혀져 있지 않은 상태이며 생물학적 성상이 복잡하기 때문에 난치병으로 인식되고 있어, 21세기 인간수명의 연장을 위해 최우선적으로 극복되어야 할 과제 중의 하나로 사료된다. 백혈병 (leukemia)은 백혈구를 생산하는 조직인 골수 또는 림프내장계에서 발생한 암세포 즉, 백혈병세포가 비정상적으로 증식하여 모든 장기에 침윤하면서 다식 증식하는 것으로 알려져 있다.²⁾ 이들은 조혈계를 침범하여 정상적인 혈구형성을 파괴하며, 그로 인해 백혈병 환자들은 호중구 감소증, 혈소판 감소증, 빈혈에 의한 감염, 출혈, 피로 등의 증상이 발생된다. 백혈병은 韓醫

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 063-850-6835 (팩스) 063-850-6843
(E-mail) omdjhh@wonkwang.ac.kr

學에서 熱勞, 急勞, 血證, 溫病, 積聚, 痰核 등의 범주에 속하며 그 주요한 病因病機를 살펴보면 內因으로는 勞倦, 饑飽, 房欲, 七情所傷, 外因으로는 溫熱毒邪侵襲으로 熱毒이 蘊結되고, 營分이 傷하여 血이 動함으로서 발생한다고 알려져 있다.³⁾ 현재 서양의학에서 암의 치료법으로 임상에서 널리 사용되고 있는 것은 수술요법, 화학요법, 방사선요법, 면역요법 등이 있다. 특히, 항암제의 대부분은 화학요법 약제로서 이들은 각기 다른 활성기전을 갖고 있어 다양한 약물들이 적절한 치료를 위하여 선택되어지고 있다.⁴⁾ 그런데 합성물질들은 암세포뿐만 아니라 정상세포에도 독성을 나타내어 탈모, 체중감소, 골수 조형기능 장애, 소화기 장애 및 면역기능 저하 등의 많은 부작용을 발생시키는 문제점이 있으므로,⁵⁾ 최근에는 부작용이 적으면서 유효한 항암제를 개발하기 위해 천연물을 대상으로 항암제의 개발이 요구되고 있다.^{6,7)} 韓醫學에서 암의 치료는 환자의 正氣狀態 및 암화의 정도에 따라 크게 益氣養血, 健脾和胃, 健脾益氣, 溫補腎陽, 및 滋補肝腎 등 인체의 항병능력을 증진시키는 扶正法과 清熱解毒, 活血祛瘀, 理氣化血, 化痰利濕 및 以毒攻毒 등 직접 암세포를 살상하는 祛邪法 및 이 두 가지 방법을 배합한 扶正祛邪法 등이 활용되고 있다.⁸⁾ 예전에는 막연히 민간 전승요법과 경험에 의해서 천연물질을 소극적으로 이용하여 왔고, 우리 나라에 자생하는 항암 식물에 대한 기초적인 연구도 광범위하게 이루어지지 않았었다. 그러나 최근 과학의 발달과 천연물에 대한 인식이 새로워짐에 따라 생리활성물질을 적극적으로 이용하고 있으며,^{9,10)} 과학적인 실험을 통하여 천연물 이용에 대한 효능을 검증할 필요성이 점차 높아지고 있다.

합환피는 콩과(Leguminosae)에 속하는 낙엽교목인 자귀나무(*Albizia julibrissin* Durazzini)의 수피를 건조한 것으로서,¹¹⁾ 한방에서는 불면증, 강장, 흥분, 이뇨, 진통, 구충제로 널리 사용되어 왔다.¹²⁾ 합환피의 성분에 관한 연구는 수피로부터 quercetin 3-O-galactoside, quercetin 3-O-rhamnoside,¹³⁾ flavonoid인 3',4',7-trihydroxyflavone과 a-spinasteryl glucoside,¹⁴⁾ 수 중의 triterpenoid,^{15,16)} saponin¹⁷⁻¹⁹⁾ 및 lignan^{20,21)} 성분 등이 분리되어 보고되었으며, 종자로부터 albizzin과 S-(2-carboxyethyl)-L-cysteine이 분리, 보고되었다.²²⁾ 이외에도 김²³⁾이 꼬투리의 성분에 관한 연구를 통하여 4가지의 물질을 분리하고 화학구조를 밝혔다. 합환피 성분의 약리작용에 관한 연구로는 saponin fraction에

서 자궁수축작용 증가를 보고한 것,²⁴⁾ polysaccharide fraction이 sarcoma 180 solid form에 대하여 항암활성을 보고한 것,²⁵⁾ 항균활성에 관한 것,²⁶⁾ 설사를 억제시키는 효과에 관한 것,²⁷⁾ 꽃에서 추출된 flavonol glycoside들에 의한 수면 효과를 보고한 것²⁸⁾들이 있으나, 혈액암인 백혈병에 대한 항암 활성 연구는 아직 보고된 바가 없다. 그러므로 본 연구는 합환피의 물추출물을 이용하여 급성림프성백혈병 세포주인 Jurkat T lymphocytes에 대한 apoptosis 유도효과가 있는지를 조사하였다.

실험방법

시료의 제조

합환피 200 g을 등근 플라스크에 넣고 증류수 2,000 ml을 넣은 후 3시간 동안 가열, 추출하고 침전물을 3M 여과지를 이용하여 3회 여과하였다. 이 여과액을 rotary vacuum evaporator로 감압, 농축하였다. 농축된 용액을 -70°C deep freezer에서 12시간 동안 방치하고, 30시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하여 10%의 수율인 20 g의 분말을 얻었다.

Cell Culture

사람 T 세포성 유래의 급성림프성백혈병 세포주인 Jurkat은 미국세포주 은행인 The American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)으로부터 분양 받아, 실험실에서 37°C, 5% CO₂ 공급 조건을 갖춘 Sanyo회사 배양기에서 배양하였다. 부유성인 Jurkat 세포의 배양액은 L-glutamine이 포함된 RPMI 1640 배지에 56°C 수조에서 30분간 가온하여 불활성화시킨 fetal bovine serum (FBS)을 10% 포함하고, 1% 항생제(100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin)와 배지 1 L당 NaHCO₃ 2 g을 첨가하여 제조하였다.

Cell Death Induction

세포들은 plastic culture dish에서 배양되었고, 4×10⁵ cells/ml 정도의 세포 수를 가진 배양 배지에 합환피 추출물을 투여하였다. Jurkat 세포들은 여러가지 농도(5, 10, 20, 30, 40 µg/ml)의 추출물로 24시간 동안 처리되었다. 합환피 분말은 4°C에 저장되었고 사용 직전에 40 mg/ml 농도로 만든 후 실험에 필요한 농도

로 배양배지에 희석하여 사용하였다. 세포고시는 아래에 기재된 것처럼 세포 성장률의 비교, 세포 핵 내 염색체 형태의 변화 및 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 단백질의 가수분해 패턴 등을 비교하여 결정하였다.

Antibody

Monoclonal anti-PARP 항체는 Calbiochem (San Diego, CA, USA) 회사로부터 구입하였고, monoclonal anti-CPP32, monoclonal anti-Bax 항체들과 polyclonal anti-Bcl-2 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 회사로부터 구입하였다. Peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin와 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin은 Amersham Life Sciences (Cleveland, OH, USA) 회사로부터 구입하였다.

Cell Viability

세포 증식에 대한 합환피 성분의 영향을 알아보기 위하여 Jurkat 세포를 24-well plate에 배양한 후 합환피의 추출물을 5, 10, 20, 30, 40 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 24시간 동안 처리하였다. 그 후 각 표본들의 세포를 1.5 ml tube에 모았으며, 동일 용량의 trypan blue 용액을 tube에 첨가한 후 부드럽게 섞고 3분간 방치하였다. 살아있는 세포의 수는 혈구 측정기로 계수하였다.

MTT assay는 생존한 암세포들의 효소활성을 측정하는 것으로 세포를 96-well plate에 배양한 후 합환피 추출물을 위의 실험과 동일한 조건으로 처리하였다. 각 well에 5 mg/ml 농도로 저장된 MTT 용액 20 μl 를 첨가하고 3시간 동안 배양하였다. 그 후 MTT 용액이 포함된 배양액을 제거하고 각 well 당 0.1% isopropanol 150 μl 를 첨가하여 30분간 더 배양 후 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 3회의 서로 다른 실험 결과를 종합하여 평균 값과 표준편차 값을 그림으로 나타내었다.

Western Blot Analysis

실험에 이용된 세포를 15 ml tube에 모은 후 냉장 보관하였던 phosphate-buffered saline (PBS)로 2~3회 씻고 2000 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 상등액을 없앤 후 cell pellet에 EBC lysis buffer (50 mM

Tris-HCl, pH 8.0, 120 mM sodium chloride, 0.5% Nonidet P-40)를 넣고 20분간 얼음 위에 놓아두면서 5분마다 vortexing 하였다. Lysates를 13,000 rpm에서 15분 동안 원심분리한 후 상등액만을 취하여 다른 tube에 옮겼다. 단백질 농도는 Bradford 방법(Bio-Rad)에 준하여 측정하였으며, 표준 단백질로 bovin serum albumin (BSA)를 사용하였다. 각 실험군마다 동일량의 단백질이 7.5% (PARP)와 12.5% (CPP32, Bcl-2, Bax) SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 이용하여 분리되었으며, 젤상에 있는 모든 단백질은 nitrocellulose membrane (Hybond C, Amersham Corp.)으로 옮겨졌다. Membranes들은 0.5%(v/v) tween-20을 포함한 Tris-NaCl-Tween 20 (TNT) buffer를 이용하여 만들어진 5%(w/v) nonfat milk 용액에 넣어서 선처리 하였다. Nonfat milk 용액에 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 만들어져 있는 PARP, CPP32, Bcl-2 및 Bax 일차 항체를 1시간 동안 실온에서 membrane에 처리하였다. Membrane들을 TNT buffer에 의해 10분 간격으로 3회 세척하였고, 일차 항체에 알맞은 이차 항체(peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin과 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin)로 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 다시 membrane들을 TNT buffer로 세척한 후 enhanced chemiluminescence reagent (Amersham)을 이용하여 2분간 반응시킨 후, X-ray필름을 이용하여 반응의 강도를 확인하였다.

DNA Fragmentation

세포를 PBS 용액으로 세척한 후 원심분리기를 이용하여 순수 세포만을 모았다. DNAzol reagent 1 ml을 넣고 pipetting하여 세포 pellet을 분쇄하였다. 그 후 13,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리하였으며 상등액만을 다른 tube에 옮기고 pellet은 버렸다. Lysate에 100% 에탄올 0.5 ml을 첨가하여 여러 번 흔들어서 DNA를 침전시켰다. 3분 후 DNA pellet만 남기고 상등액을 제거하고 DNA precipitate를 95% 에탄올 1 ml에 2회 세척하고 5~15분 정도 실온에서 air dry 시켰다. DNA를 Tris-EDTA buffer를 이용하여 녹인 후 분광광도계를 이용하여 260 nm와 280 nm의 optical density (OD) 값을 측정하여 DNA를 정량하였다. 10 μg 의 DNA 표본들을 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 ethidium bromide를 포함한 1.0%(w/v) agarose

gel로 2시간 정도 전기영동을 하였고 ultraviolet light 에서 DNA 절편들을 관찰하였다.

포의 성장을 억제시키면서 세포사멸을 유도하는 또 다른 증거로 보여진다.

실험결과

합환피 물추출물 의한 백혈병 세포 Jurkat 의 세포사멸 유도

합환피는 예로부터 한방에서 불면증, 강장, 흥분, 이뇨, 진통, 구충제로 널리 사용되어 왔다.¹²⁾ 본 실험에서는 사람의 급성림프성백혈병 세포주인 Jurkat의 세포사멸에 대한 합환피 추출액의 효과를 알아보기 위하여 추출액을 5, 10, 20, 30 및 40 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 증가시키면서 세포 배양매지에 처리하여 24시간 동안 세포를 배양하였다. Fig. 1A에서 보여지듯이, trypan blue 용액으로 세포 생존을 변화를 측정한 결과, 합환피는 처리농도 의존별로 Jurkat 세포의 생존율을 급격히 감소시키면서 세포사멸을 증가시켰다. MTT assay 결과 또한 대조군에 비교하여 5 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 실험군에서 38%의 세포사멸이 일어났음을 보여주었고, 10, 20, 30 및 40 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 그룹들에서도 각각 55, 73, 78 및 83%의 세포사멸이 일어났음을 보여주었다(Fig. 1B). 합환피에 노출된 세포들의 외부 형태적인 특징을 현미경 하에서 관찰한 결과 세포막 외부 용기의 돌출현상을 볼 수 있었다 (data not shown). 이런 현상은 합환피의 추출성분이 Jurkat 세

합환피로 세포고사(apoptosis)를 유도한 Jurkat 세포에서 핵 DNA 의 분절현상

합환피에 노출된 Jurkat의 세포사멸이 수동적이고 물리적인 necrosis인지, 능동적이고 자발적인 생리적 사멸의 apoptosis인지를 확인하기 위하여 Fig. 1과 동일한 조건하에서 처리된 표본들을 이용하여 DNA fragmentation 실험을 실시하였다. 정상세포와 세포사멸이 유도된 세포들로부터 완전한 염색체 DNA가 아닌 분절이 일어난 DNA를 추출하여 전기영동을 실시하였다. 그 결과 Fig. 2에서 보여주듯이, 합환피 추출액을 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 저농도로 처리한 실험군에서도 고분자량의 DNA(50~300 kb)와 oligonucleosome 크기의 DNA 분절(180 bp)을 포함하는 apoptotic DNA ladder 현상을 agarose gel에서 볼 수 있었다. DNA 분절의 정도는 투여된 합환피의 농도가 높을수록 점차 증가함을 알 수 있었다(Fig. 2). 이와 같은 DNA 분절 양상은 기존의 연구보고²⁹⁾에 의해 밝혀진 결과와 마찬가지로 세포고사가 진행되는 세포에서 internucleosomal DNA cleavage가 초래되어 나타나는 DNA 크기와 일치함을 보여주므로 합환피에 의한 Jurkat의 세포사멸은 programmed cell death임을 보여준다.

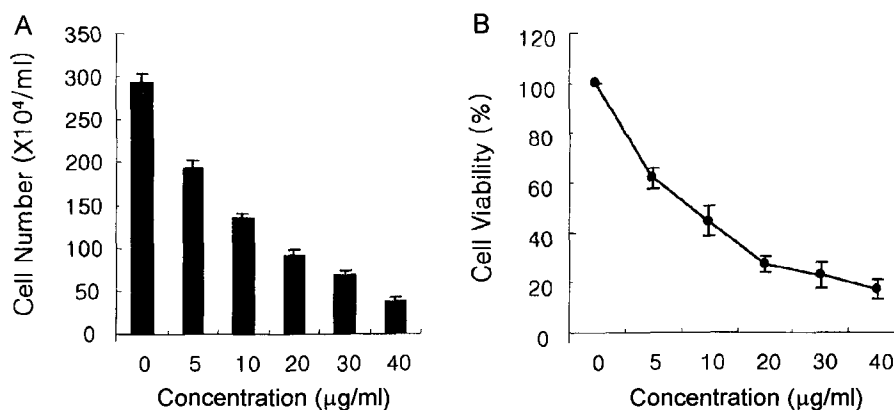


Fig. 1 - Induction of concentration-dependent cell death in Jurkat cells by *A. julibrissin*. Cells were incubated for 24 h at 37°C with the 5, 10, 20, 30, and 40 $\mu\text{g/ml}$ concentrations of *A. julibrissin*. (A) Cells were harvested into 1.5 ml eppendorf tube and resuspended in 1 ml PBS. Same volume of trypan blue was then added and gently mixed. After 2 min, cells were counted using hemacytometer. (B) Cell viability by MTT assay was measured as described in Materials and Methods. Results were expressed as the means \pm S.D. of three experiments and presented as a total cell number (A) or a percentage of control values (B).

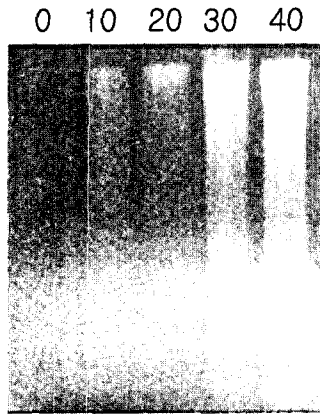
Albizzia julibrissin ($\mu\text{g/ml}$)

Fig. 2 – Induction of apoptotic DNA fragmentation by *A. julibrissin* in Jurkat cells. Genomic DNA was extracted from control and *A. julibrissin* treated samples. Ten micrograms of DNA sample was separated on a 1.0% agarose gel containing 10 $\mu\text{g/ml}$ ethidium bromide for 2 h and visualized under ultraviolet light.

합환피로 세포고사(apoptosis)를 유도한 Jurkat 세포에서 Caspase-3 활성도 변화

최근 연구 결과에 의하면 세포고사를 유도하는 대부분의 약물들이 시스테인 분해효소인 caspase family의 순차적인 신호전달과 활성을 통해서 세포사멸을 일으키는 것으로 알려져 있다.^{30,31} 특히, caspase-3(CPP32)

는 효소학적으로 세포고사를 일으키는데 결정적인 역할을 수행하므로, 합환피의 여러 농도에 24시간 노출되어 세포고사가 일어난 Jurkat 세포의 경우에도 caspase-3의 활성도가 변하는지를 조사하였다. 그 결과 대조군에서는 pro-caspase-3의 형태인 32 kDa의 크기가 검출되었으며, 세포고사가 일어나는 세포들에서는 caspase-3의 활성화된 형태인 17kDa 크기의 분자량을 볼 수가 있었다(Fig. 3A). 이러한 현상은 합환피의 처리 농도가 높을수록 더욱 증가함을 알 수 있었다(Fig. 3A).

합환피로 세포고사(apoptosis)를 유도한 Jurkat 세포에서 PARP 단백질의 가수분해

많은 종류의 세포성 단백질 즉, 세포질과 핵 속에 존재하는 단백질들이 세포고사가 진행되는 동안 caspase에 의해 조각짐 현상이 일어남을 보여주고 있다. 현재까지 알려진 기질들을 보면 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), RB, actin, lamin, fodrin, PKA, presenilin 등 다양하다.^{32,33} 그러므로 caspase-3의 주요 기질로 알려진 PARP 단백질 분해 양상을 조사하기 위하여 Jurkat 세포 배양매지에 합환피를 Fig. 3과 같이 농도별로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 그 결과 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 저농도에서 116 kDa의 완전한 PARP 단백질이 85 kDa 크기로 분해되는 양상이 유도되었으며, 처리 농도가 높으면 높을수록 PARP 단백질 가수분해 정도가 증가함을 알 수 있었다(Fig. 3B).

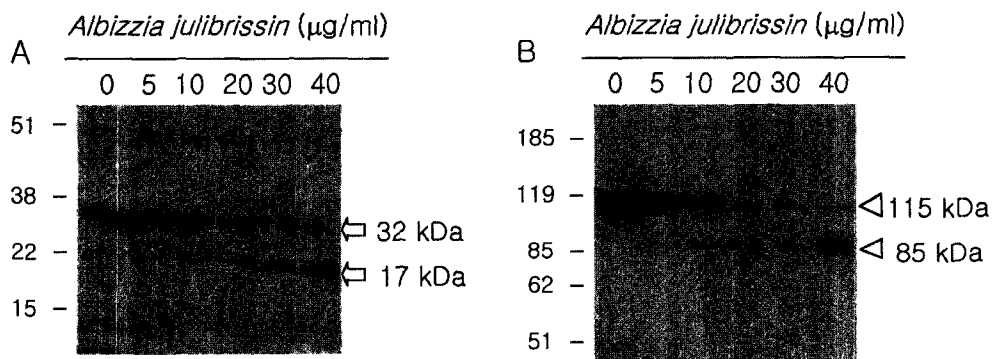


Fig. 3 – Induction of CPP32 activation and PARP cleavage during apoptosis induced by *A. julibrissin* in Jurkat cells. Cells were incubated for 24 h at 37°C with the 5, 10, 20, 30, and 40 $\mu\text{g/ml}$ concentrations of *A. julibrissin*. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on 12.5% (CPP32) and 7.5% (PARP) SDS-PAGE gels, transferred to nitrocellulose membranes, and the blots were probed with CPP32 (A) or PARP (B). Full length of PARP 115 kDa and large fragmented of 85 kDa bands (closed and open triangles respectively) are shown.

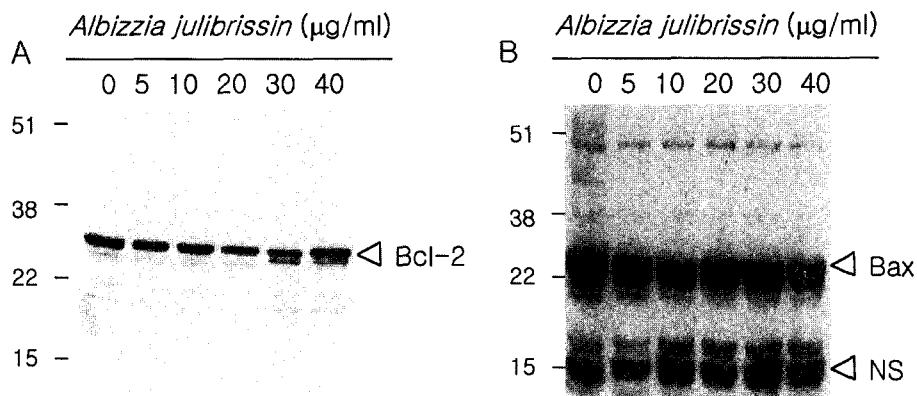


Fig. 4 - Expression levels of Bcl-2 and Bax proteins in *A. julibrissin*-mediated apoptotic Jurkat cells. Cells were incubated for 24 h at 37°C with the 5, 10, 20, 30, and 40 µg/ml concentrations of *A. julibrissin*. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on a 12.5% SDS-PAGE gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and the blots were probed for Bcl-2 (A) and Bax (B).

이러한 실험 결과는 핵 속에서 일어나는 DNA fragmentation의 경향과 매우 잘 일치함을 보여 주었다. 이런 관점에서 볼 때 합환피 처리에 의한 PARP 단백질의 쪼개짐 현상은 caspase-3 활성의 가장 주요한 증거 중의 하나이며 세포고사의 현상이 일어남을 보여준다. 합환피에 의해 유도된 세포고사의 경우 어떤 기질 단백질들이 가장 중요한 역할을 하는지는 차후 조사해 보아야 할 것이다.

합환피로 세포고사(apoptosis)를 유도한 Jurkat 세포에서 Bcl-2 및 Bax 단백질들의 발현

세포고사가 일어나는 경우에는 일반적으로 Bcl-2 단백질 양이 감소하고 Bax 단백질 양이 증가하는 것이 관찰되지만 이런 현상이 모든 세포사멸의 경우에 적용되는 것은 아니다. Apoptosis 관련 유전자로 잘 알려진 p53는 세포고사가 진행되는 세포들에서 단백질 발현량이 증가하는 것으로 밝혀졌고, 증가된 p53 단백질이 Bcl-2의 단백질 발현량을 억제시키고 Bax의 단백질 발현량을 증가시키는 것으로 알려져 왔다.³⁴⁾ 본 실험은 wild type-p53가 결핍된 Jurkat 세포에서 Bcl-2 및 Bax가 세포고사와 관련성이 있는지를 알아보려고 하였다. 합환피를 처리하여 세포고사를 유도한 Jurkat 세포에서 Bcl-2 및 Bax의 단백질 발현 정도를 Western blot으로 조사하였다. 그 결과 대조군의 Bcl-2 및 Bax 단백질 발현 정도와 여러 가지 농도의 합환피를 처리한 실험군 모두에서 Bcl-2 및 Bax 단백질 발현 정도를 비교해 볼 때 차이점을 발견할 수 없었다

(Fig. 4A, B). 이는 합환피 처리에 의한 Jurkat의 세포고사는 Bcl-2 및 Bax와 관련없이 다른 신호기전에 의해서 진행되는 것으로 추정된다.

고 찰

1998년 보건복지부 통계 자료에 의하면 백혈병은 인구 10,000명당 남성 4명, 여성 3명 정도로 추정되며 그 발생 빈도가 높아지고 있으므로 백혈병에 대한 기초적인 연구와 천연 항암물질의 개발이 계속적으로 이루어져야 할 것이다. 우리나라 산야에는 약용 및 식용으로 이용할 수 있는 식물이 많이 자생하고 있고, 이들 중에는 항암 효능을 가진 식물이 상당히 많이 있을 것으로 사료되므로 과학적인 실험을 통하여 천연물질의 항암효능을 검증하여야 할 것이다. 본 연구는 콩과에 속하는 낙엽교목인 자귀나무의 수피를 건조한 합환피¹¹⁾를 이용하여 백혈병 세포주인 Jurkat에 대한 항암효능을 검증하고자 하였다. MTT assay와 Trypan blue 용액으로 세포 생존율 변화를 측정된 결과, 합환피는 농도 의존별로 Jurkat 세포의 생존율을 점점 감소시켰다(Fig. 1). 또한 합환피에 노출된 세포들의 외부 형태적인 특징을 현미경 하에서 관찰한 결과 세포막 외부 융기의 돌출현상과 사멸 소체를 배지 속에서 볼 수 있었다. 이들 결과는 합환피의 추출성분이 Jurkat 세포의 성장을 억제하고 세포사멸을 유도하는 효과가 있음을 보여준다.

일반적으로 세포고사(apoptosis)는 방사선, 세포독성

유발 물질, 성장 인자의 결핍, 열충격, 바이러스 감염과 같은 다양한 종류의 자극에 의해 유도되는 것으로 알려져 있다.³⁵⁾ 이러한 자극물질들은 세포 내에서 수많은 세포기전을 통하여 세포의 생리적인 자발적 사멸 (programmed cell death)을 유도하는 것으로 밝혀져 오고 있다. 세포의 생리적 사멸은 다양한 외부 형태적, 생화학적인 변화를 동반하며 세포는 크기가 축소되고, 세포막 용기가 돌출하는 현상이 생기며, 핵에서는 염색사 응축과 핵 분절 등의 변화가 동반된다.^{36,37)} 특히, 핵 속에서 일어나는 일련의 염색체 변화는 세포고사의 한 증거로서 이용되며 180 bp 크기의 분절된 DNA가 검출되었는지 완전한 DNA의 함량이 줄어드는 현상이 나타나면 세포고사가 진행되는 것으로 보고되는 예는 이제 더 이상 놀라운 일이 아니다.^{38,39)} DNA fragmentation 실험을 실시한 결과 대조군에 비해 합환피를 처리한 실험군에서 oligonucleosome 크기의 DNA 분절 (180 bp)을 포함하는 apoptotic DNA ladder 현상이 증가하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 2). 이 결과는 백혈병 세포주인 Jurkat이 합환피에 노출되어 일어나는 세포사멸은 물리적인 necrosis가 아니고 생리적인 apoptosis에 의한 세포사멸인 것을 보여주는 예이다.

최근 연구에 의하면 세포고사 유도물질들은 intracellular cysteine proteases인 caspase family를 활성화시켜 세포사멸을 초래한다고 보고하였다.^{30,31)} 현재 단백질 분해 기능을 가지면서 세포사멸의 신호를 실행하는 효소로서 15종류의 caspase가 밝혀져 있고, 세포사멸의 신호를 받게되면 caspase 계열이 활성화되는 cascade를 거치게 되고 최종적으로 활성화된 caspase-1, -3 및 -4 등이 세포내의 생존신호에 관련된 단백질을 분해하여 불활성화시키고 또한 세포골격 단백질을 절단하여 구조적인 변화를 유발하여 세포사멸을 실행한다.⁴⁰⁾ 그 중에서도 caspase-3라는 효소는 불활성화한 zymogen(N-terminal prodomain, p20 large subunit, p10 small subunit) 상태로 존재하다가 세포사멸의 신호를 받아 활성화된 형태로 되며, 이 효소와 관련된 기질 단백질들은 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), retinoblastoma, fodrin, lamins, gelsolin 등이 알려져 있다.^{32,33)} 본 연구에서 caspase-3의 주요 기질로 알려진 PARP 분해패턴을 조사하기 위하여 Jurkat 세포 배양매지에 합환피를 농도별로 처리하고 24시간 동안 배양한 결과 116 kDa의 완전한 PARP 단백질이 85 kDa 크기로 분해되는 양상이 유

도되었으며, 처리 농도가 높으면 높을수록 PARP 분해 정도가 증가함을 알 수 있었다(Fig. 3). 합환피 처리에 의한 PARP 단백질의 쪼개짐 현상은 caspase-3 활성화의 가장 주요한 증거 중의 하나이며 이를 통하여 세포고사의 현상이 일어남을 보여준다.

세포고사 관련 유전자로 잘 알려진 것으로 p53, Bcl-2 및 Bax들이 있으며, 이들의 발현이 직간접적으로 세포고사와 깊이 관련되어 있는 것이 알려지고 있다. 미토콘드리아의 외막, 소포체나 핵막에 위치해 있는 Bcl-2 단백질은 림프종양 세포에서 얻어진 것으로 apoptosis를 억제하는 생리적인 기능이 Vaux (1988)⁴¹⁾ 등에 의해 처음으로 밝혀졌다. 최근 연구에 의하면 p53가 세포고사가 진행되는 세포들에서 단백질 발현량이 증가하는 것으로 밝혀졌으며, 이 증가된 p53 단백질이 Bcl-2의 단백질 발현량을 억제시키고 Bax의 단백질 발현량을 증가시키는 것으로 알려져 있다.³⁴⁾ 그런데 본 실험에서는 합환피에 노출된 Jurkat이 세포고사가 진행됨에도 불구하고 Bcl-2 및 Bax 단백질 발현의 정도가 대조군에 비해서 차이가 없었다(Fig. 4). 이 현상은 백혈병 세포주인 Jurkat이 wt p53가 결핍되어 있기 때문에 apoptosis가 진행되는 동안에도 Bcl-2 및 Bax를 직접적으로 조절하지 못한 것으로 사료되며, 아울러 다른 신호기전도 Bcl-2 및 Bax를 조절하지 못하는 것으로 생각된다. 결국 합환피에 의해 초래되는 Jurkat 세포의 생리적 사멸은 Bcl-2와 무관한 다른 신호기전의 경로를 통하여 일어남을 의미한다.

감사의 말씀

본 연구는 2001년도 보건복지부 한방치료기술연구 개발사업(PJ9-PG1-01CO04-0002)과 한국과학재단 지정 전북도청 지원의 원광대학교 의약자원연구센터(MRRC) 연구지원비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) 대한병리학회 : 병리학, 고문사, 서울 (1990).
- 2) 대한의학협회 분과학회 : 암의 진단과 치료, 여문각, 서울 (1992).
- 3) 문구, 정병학, 김병주 : 암 동서의 결합치료, 원광대학교출판국, 익산 (1999).
- 4) Hersh, E. M., and Ereish, E. J. : *Host defence*

- mechanism and their modification by cancer chemotherapy.* In methods in cancer research, New York Academic Press, p.335 (1986).
- 5) Ruddon, R. W. : *Chemical carcinogenesis.* In principles of drug action (3rd.), Churchill Livingstone, p.735 (1990).
 - 6) Ito, N., and Shimura, K. : Studies on antitumor activity of traditional Chinese medicines. *Japan J. cancer Chemother.* **12**, 2149 (1985).
 - 7) King, M. L. : Screening study on Taiwan plants for antitumor activity. *Cancer chromatography reports part 2*, 1074 (1990).
 - 8) 방약중 : 실용중의내과학, 상해과학기술출판사, 상해 (1986).
 - 9) Dong, Y., Yang, M. M., and Kwan, C. Y. : In vitro inhibition of proliferation of HL-60 cells by tetrandrine and coriolus versicolor peptide derived from Chinese medicinal herbs. *Life Sci.* **60**, 135 (1997).
 - 10) Eun, J. S., and Song, W. Y. : The combined effect of n-BuOH fraction of Ulmi cortex and anticancer drugs on cancer cell lines. *Kor. J. Pharmacogn.* **25**, 144 (1994).
 - 11) 江蘇新醫學院(中國) : 中藥大辭典, 제 1 판, 下冊, 상해과학기술출판사, 上海 (1979).
 - 12) Tang, W., and Eisenbrand, G. : *Chinese drugs of plant origin.* Springer-Verlag, New York (1992).
 - 13) Kaneta, M., Hikichi, H., Endo, S., and Sugiyama, N. : Identification of flavones in sixteen Leguminosae species. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 1407 (1980).
 - 14) Chamsuksai, P., Choi, J. S., and Woo, W. S. : 3',4',7-trihydroxyflavone in *Albizzia julibrissin*. *Arch. Pharm. Res.* **4**, 129 (1981).
 - 15) Woo, W. S., and Kang, S. S. : Isolation of a new monoterpene conjugated triterpenoid from the stem bark of *Albizzia julibrissin*. *J. Nat. Prod.* **49**, 547 (1984).
 - 16) Chen, S. P., and Zhang, R. Y. : Studies on the triterpene sapogenine from *Albizziae Cortex*. *Acta Pharm. Sin.* **32**, 144 (1997).
 - 17) Kinjo, J., Araki, K., Fukui, K., Higuchi, H., Ikeda, T., Nohara, T., Ida, Y., Takemoto, N., Miyakoshi, M., and Shoji, J. : Six new triterpenoidal glycosides including two new sapogenols from *Albizziae Cortex*. *V. Chem. Pharm. Bull.* **40**, 3269 (1992).
 - 18) Ikeda, T., Fujiwara, S., Kinjo, J., Nohara, T., Ida, Y., Shoji, J., Shingu, T., Isobe, R., and Kajimoto, T. : Three new triterpenoidal saponins acylated with monoterpene acid from *Albizziae Cortex*. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **68**, 3483 (1992).
 - 19) Chen, S. P., Zhang, R. Y., Ma, L. B., and Tu, G. Z. : Structure determination of three saponins from the stem bark of *Albizzia julibrissin* Durazz. *Acta Pharm. Sin.* **32**, 110 (1997).
 - 20) Kinjo, J., Fukui, K., Higuchi, H., and Nohara, T. : The first isolation of lignan tri- and tetra-glycosides. *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 1623 (1991).
 - 21) Higuchi, H., Fukui, K., Kinjo, J., and Nohara, T. : Four new glycosides from *Albizziae Cortex*. III. *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 534 (1992).
 - 22) 약품식물학회 : 약품식물학각론, 학창사, p.212, 서울 (1987).
 - 23) Kim, Y. H. : Isolation of acylated steryl glycosides from the legumes of *Albizzia julibrissin*. *Kor. J. Pharmacogn.* **30**, 290 (1999).
 - 24) Woo, W. S., Lee, E. B., and Shin, K.-H. : A Review of research on plants for fertility regulation in Korea. *Kor. J. Pharmacogn.* **12**, 153 (1981).
 - 25) Moon, C. K., Lee, B. G., and Lee, S. H. : Effects of antitumor polysaccharides from *Albizzia julibrissin* on immune function. *Arch. Pharm. Res.* **8**, 277 (1985).
 - 26) Yang, M. S., Ha, Y. L., Nam, S. H., Choi, S. U., and Jang, D. S. : Screening of domestic plants with antibacterial activity. *Agricultural Chemistry and Biotechnology* **38**, 584 (1995).
 - 27) Yoo, J. S., Jung, J. S., Lee, T. H., Son, K. H., Suh, H. W., Song, D. K., and Kim, Y. H. : Inhibitory effects of extracts from traditional herbal drugs on 5-Hydroxytryptophan-induced diarrhea in mice. *Kor. J. Pharmacogn.* **26**, 355 (1995).
 - 28) Kang, T. H., Jeong, S. J., Kim, N. Y., Higuchi, R., and Kim, Y. C. : Sedative activity of two flavonol glycosides isolated from the flowers of *Albizzia julibrissin* Durazz. *J. Ethnopharmacol.* **71**, 321 (2000).
 - 29) Bicknell, G. R., Snowden, R. T., and Cohen, G. M. : Formation of high molecular mass DNA fragments is a marker of apoptosis in the human leukaemic cell line, U937. *J. Cell Sci.* **107**, 2483 (1994).
 - 30) Martin, S. J., O'Brien, G. A., Nishioka, W. K., McGahon, A. J., Sadio, T., and Green, D. R. :

- Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J. Biol. Chem.* **270**, 6425 (1995).
- 31) Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., and Yuan, J. : Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**, 171 (1996).
- 32) Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E., and Poirier, G. G. : Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* **53**, 3979 (1993).
- 33) An, B., and Dou, Q. P. : Cleavage of retinoblastoma protein during apoptosis: an interleukin 1 beta-converting enzyme-like protease as candidate. *Cancer Res.* **56**, 438 (1996).
- 34) Agarwal, M. L., Taylor, W. R., Chernov, M. V., Chernova, O. B., and Stark, G. R. : The p53 network. *J. Biol. Chem.* **273**, 1 (1998).
- 35) Vaux, D. L. : Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 786 (1993).
- 36) Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., and Currie, A. R. : Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251 (1980).
- 37) Wyllie, A. H. : Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Meta. Rev.* **11**, 95 (1992).
- 38) Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F., and Riccardi, C. : A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **139**, 271 (1991).
- 39) Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S. A. J. : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* **119**, 493 (1992).
- 40) Casciola-Rosen, L. A., Miller, D. K., Anhat, G. J., and Rosen, A. : Specific cleavage of the 70-kDa protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein is a characteristic biochemical feature of apoptotic cell death. *J. Biol. Chem.* **269**, 30757 (1994).
- 41) Vaux, D. L., Cory, S., and Adams, J. : Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**, 440 (1988).