

유향 물추출물의 HL-60 혈액암세포에서 세포사멸 유도효과

박래길 · 오광록* · 이광규* · 문연자# · 김정훈 · 우원홍
원광대학교 한의학전문대학원 신약개발학과, *우석대학교 한의과대학
(Received March 6, 2001; Revised April 6, 2001)

The Water Extract of *Boswellia carterii* Induces Apoptosis in Human Leukemia HL-60 Cells

Rae-Kil Park, Kwang-Rok Oh*, Kwang-Gyu Lee*, Yeun-Ja Mun#,
Joung-Hoon Kim and Won-Hong Woo

Department of Newly-Developed Drugs, Professional Graduate School of Oriental Medicine,
Wonkwang University, Iksan, 570-749, Korea

*College of Oriental Medicine, Woosuk University, Samrye, 565-701, Korea

Abstract — The possible mechanism of the antiproliferative and apoptotic effects of *Boswellia carterii* water extract were studied in HL-60 human leukemia cells. The cytotoxicity of HL-60 cells after the treatment of *Boswellia carterii* water extract showed dose- and time-dependent manner. The apoptotic effect of 300 µg/ml *Boswellia carterii* water extract was demonstrated by DNA laddering. The activity of caspase 3-like protease was markedly increased in HL-60 cells treated with *Boswellia carterii* water extract. Furthermore, the level of Bcl-2 was time-dependently reduced, whereas Bax protein level was enhanced by *Boswellia carterii* water extract treatment. In conclusion, our results suggest that apoptotic effect of *Boswellia carterii* water extract may partly mediated through activations of caspase-3 activity, and Bax expression, and inhibition of Bcl-2 expression.

Keywords □ *Boswellia carterii* water extract, apoptosis, caspase, Bcl-2, Bax

암의 발생기전 및 종류는 매우 다양한데 비하여 아직까지도 그 치료법은 정상세포와 암세포를 선택적으로 명확히 구분하지 못하기 때문에 원인에 입각한 근본적인 대책보다는 결과를 수습하는 수준의 수술요법, 방사선요법, 화학요법 등이 주가 되고 있다. 또한 기존의 항암제들은 암세포주에 대해 직접적인 살상을 목표로 하고 있기 때문에 세포독성 효과는 있지만 대부분 개체 저항력을 떨어뜨리는 부작용 등의 많은 문제점들을 나타내고 있어, 근래에는 세포독성은 비록 약할지라도 항암제와 병용 투여함으로써 항암성을 증가시키고 부작용을 줄일 수 있는 면역요법이나 apoptosis,

세포분화유도법, 혈관형성저해법 등과 관련한 연구가 활발히 진행중인 실정이다.¹⁻³⁾

Apoptosis는 다세포 생명체에서 정상적인 기관의 발달과 조직의 항상성 유지에 필수적인 생리현상의 하나인 세포의 계획된 죽음(programmed cell death)을 말하는 것이다.⁴⁾ 이는 괴사(necrosis)와는 다르게 독특한 형태와 생화학적인 특징을 동반하는 유전자 활성화에 의하여 조절 받은 생리과정이며, apoptosis 유도 기전은 종양치사인자(tumor necrosis factor)에 의한 연구에서 신호전달기전이 밝혀지기 시작한 이래,⁵⁾ caspase계 cysteine proteases(caspase family cysteine proteases)나 MAP kinase(mitogenoactivated protein kinase)의 중요성이 제시되고 있다.⁶⁻⁸⁾

한의학에서 암을 비롯한 모든 질병은 정기와 사기의

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 063-850-6835 (팩스) 063-850-6840

성쇠에 의하여 발생된다고 인식하므로, 암의 치료 또한 증형에 따른 활혈화어, 화담연건 등의 거사법과 건비익기, 자보간신 등의 부정법을 응용하고 있지만, 이 중 활혈화어법은 적극적인 치료방식으로 어혈과 종양의 밀접한 관련성 때문에 많이 활용되어지고 있는 실정이다.⁹⁻¹²⁾ 최근에는 항암제의 부작용을 줄이면서 항종양효과를 극대화하기 위하여 생약을 이용한 연구가 비교적 활발히 진행되어지고 있는데,^{13,14)} 그 중에서도 유향은 감람나무과에 속한 유향나무의 수지로서 활혈화어와 지통의 효능을 가지고 있고,¹⁵⁾ <본초강목>에 “소용저제독, 탁리호심, 활혈정통, 신근, 치부인난산, 절상”이라 하였기 때문에 이를 바탕으로 실제 암 치료에 많이 응용될 수 있는 약재라 사료된다.^{16,17)}

이에 저자들은 활혈화어의 효능을 가지는 유향물추출물이 인체의 백혈병에서 유래된 HL-60 혈액암세포에 어떠한 영향을 미치는지를 밝히기 위하여, apoptosis의 기전 중 특히 caspase cysteine protease의 활성도 및 apoptosis와 관련 단백질의 발현변화 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험방법

실험재료 - 실험에 사용된 유향(*Boswellia carterii*)은 우석대학교 부속 한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였으며, 시료는 유향 100g을 물 1l에 넣고 100°C에서 3시간 환류냉각장치에서 추출 여과하고 3,200 rpm으로 20분간 원심분리 후 상등액을 감압농축한 다음 -70°C에서 12시간 이상 동결건조시켜, 유향물추출물 22.63g(수득률 : 22.63%)을 얻어 시료로 사용하였다.

HL-60 혈액암세포주 배양 - 인체 백혈병으로부터 유래된 암세포주인 HL-60은 CO₂ 세포배양기(37°C, 5% CO₂)에서 10% fetal bovine serum이 포함된 RPMI 1640(Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD, USA) 배지에서 배양하였다. 약 48시간 주기로 RPMI 1640 배양액을 교체하여 주었으며, log phase에 있는 세포에 phosphate-buffered saline(pH 7.0)으로 용해시킨 유향물추출물을 처리하여 세포의 apoptosis 현상과 이에 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

세포 viability 측정 - 세포의 생존율은 MTT assay 방법을 이용하였다.¹⁸⁾ 세포배양판(24-well plate)에 well당 1×10⁵ cell/ml씩 분주하여, 실험에 필요한 각

조건에 한약제 등을 처리하고 일정시간 배양한 후, 배양액에 MTT를 최종농도 100 µg/ml이 되도록 넣어주었다. 생존율의 판정은 MTT 처리 3시간 후에 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 불용성의 formazan을 100 µl의 10% SDS가 포함된 0.01N HCl 용액으로 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 방치하여 녹인 다음, ELISA reader로 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

Caspase계 cysteine protease 활성도의 측정 - HL-60세포(2×10⁶ cells)를 4°C에서 15분 동안 lysing buffer(1% TritonX-100, 0.32M sucrose, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 2 mM dithiothreitol(DTT), 10 mM Tris/HCl, pH 8.0)에 용해시키고 14,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하였다. 원심분리하여 얻은 상층액은 Bicinchoninic acid(BCA, Sigma Co, St. Louis, CA, USA)법으로 정량하여 assay buffer(100 mM Hepes, 10% sucrose, 0.1% Chaps, pH 7.5, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 2 mM DTT)에 희석시킨 후, 형광표지된 기질과 37°C에서 30분간 반응시킨 후 fluorometer(Molecular Devices Co, Sunnyvale, USA)로 측정하였다. Caspase-1과 caspase-3의 활성측정은 각각 기질로 fluorogenic substrate인 7-amino-4-coumarin(AMC)-YVAD(Calbiochem, San Diego, CA, USA) 50 µM 및 7-amino-4-coumarin(AMC)-DEVD(Calbiochem Co, San Diego, CA) 50 µM을 사용하였으며, 이들의 proteolytic cleavage를 측정하여 caspase 활성을 결정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength (380 nm)와 emission wavelength(460 nm)를 사용하였다. Caspase-6 효소활성은 기질로서 Ac-VEID-AMC(Calbiochem, San Diego, CA, USA) 50 µM 사용하였으며 이들의 proteolytic cleavage를 380 nm (excitation wavelength)와 460 nm(emission wavelength)의 파장 하에서 측정하였다. Caspase-8과 caspase-9 효소활성은 기질로서 Z-IETD-AFC, Ac-LEHD-AFC(Calbiochem, San Diego, CA, USA)를 각각 50 µM 사용하였으며 이들의 proteolytic cleavage를 400 nm(excitation wavelength)와 505 nm(emission wavelength)의 파장에서 측정하였다.

DNA추출 및 전기영동 - DNA 분절현상을 알아보기 위해 genomic DNA 추출은 Wizard genomic DNA purification kit(Promega Co, Madison, WI)를 이용

하여 추출하였다. 먼저 유향물추출물이 처리되어진 세포를 수확하고 nuclear lysis solution을 첨가하여 세포를 파괴하였다. RNase를 37°C에서 5분 처리하여 RNA를 제거한 후 단백질을 침전용 완충용액으로 단백질을 제거하고 isopropanol 침전에 의하여 응축된 DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 진공건조기로 건조하였다. 여기에 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 가하여 DNA pellet을 용해한 후 260 nm와 280 nm의 적외선 분광광도계(Beckman, Du-7 Model, Palo Alto, CA, USA)하에서 OD 값을 측정하여 DNA를 정량하였다. DNA 5 µg을 1.2% agarose gel에서 전기영동(50V, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV등 아래에서 DNA 분절을 관찰하였다.

Bcl-2 및 Bax 단백질의 발현변화(Western blotting) - 배양된 HL-60 세포에 유향물추출물을 다양한 시간동안 처리 후 세포를 포집하여 차가운 Hank's balanced salt 용액(HBSS)으로 2회 세척하였다. 원심 분리하여 얻은 세포는 RIPA 용액(50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin)으로 4°C에서 용해하였다. 용해 세포 부유액에 2배 sample buffer와 섞어 100°C에서 3분간 끓인 후, 10% sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 4°C, 30V에서 16시간 동안 transfer한 후 blocking buffer (10% skim milk)로 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. Bcl-2나 Bax 등에 대한 항체를 Tris-buffered saline에 1:1000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응시켰다. 이차항체인 anti-rabbit IgG conjugated horseradish peroxydase(Amersham, England)와 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence kit(ECL kit : Amersham, England)를 사용하여 필름에 노출시켰다.

실험결과

유향물추출물이 혈액암세포 HL-60의 세포생존율에 미치는 영향 - 유향물추출물이 혈액암 환자로 부터 유래된 HL-60 세포의 생존율에 어떤 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 유향물추출물의 농도를 변화시키면서

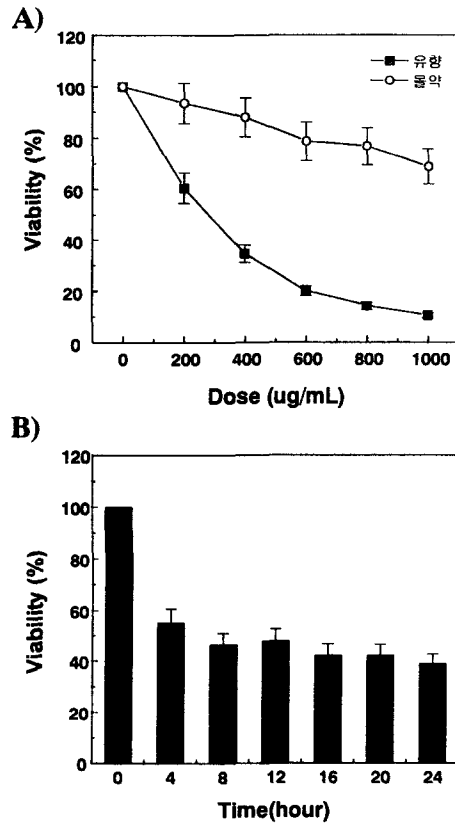


Fig. 1 - Effects of *Boswellia carterii* water extract on the viability of HL-60 cells. A) HL-60 cells were treated with *Boswellia carterii* water extract at various concentrations (from 200 to 1000 µg/ml). After 24 hr, the cell viability was measured by MTT assay. B) HL-60 cells were treated with *Boswellia carterii* water extract (300 µg/ml) for various time intervals (from 4 to 24 hrs). The data represented as mean ± S.D. of quadruplicates.

세포의 치사도를 MTT assay 방법으로 측정하였다. 유향물추출물의 경우 300 µg/ml 농도에서 40% 이하의 생존율을 보였고, 600 µg/ml 이상의 유향물추출물 처리시 대략 20% 정도의 생존율을 나타내었다(Fig. 1A). 또한 300 µg/ml 농도의 유향물추출물에 의한 시간별 생존율의 변화를 측정한 결과, 시간에 따른 HL-60 세포의 생존율은 유향물추출물 처리 4시간 이후에 55%였으며, 8시간 이후부터는 40%이하의 생존율을 보였다. 8시간 이후에는 시간에 따른 더 이상의 세포 생존율 저하를 관찰할 수 없었다(Fig. 1B).

DNA fragmentation에 미치는 영향 - 유향물추출물을 처리한 HL-60 세포의 죽음의 기전이 apoptosis

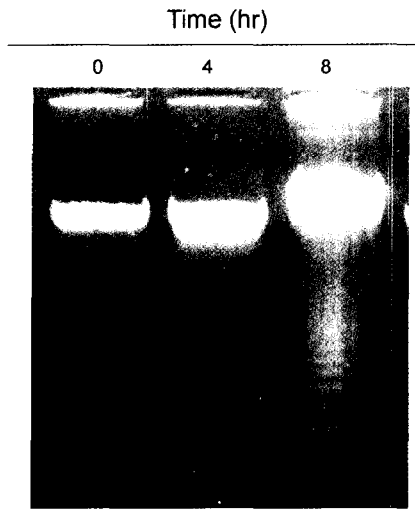


Fig. 2 – Electrophoresis of fragmented DNA in HL-60 cells treated with *Boswellia carterii* water extract. HL-60 cells were treated with *Boswellia carterii* water extract at 300 $\mu\text{g/ml}$ for 4 and 8 hrs, respectively. Genomic DNA was then isolated and separated on 1.2% agarose gels. The DNA was stained with ethidium bromide and visualized under UV light. 1 lane; control, 2 lane; 4 hr, 3 lane; 8 hr.

혹은 괴사(necrosis) 과정에 의하여 매개되는지를 확인하기 위해 apoptosis 현상의 특징인 agarose electrophoresis법을 이용한 ladder형 DNA분절을 확인하였다. 유향물추출물을 300 $\mu\text{g/ml}$ 농도가 되도록 HL-60 세포주에 4시간 간격으로 처리하여 DNA를 추출한 후 1.2% agarose gel에 전기영동하여 ethidium bromide 염색을 통하여 조사한 결과, 8시간 이후부터 ladder형의 DNA분절을 확인하였다(Fig. 2).

Caspase 활성화에 미치는 영향 – 유향물추출물에 의한 HL-60 백혈병 유래 혈액 암세포의 apoptosis가 caspase의 활성화와 관계가 있는지를 확인하기 위하여 caspase계 cysteine proteases인 caspase-1, caspase-3, caspase-6, caspase-8 및 caspase-9의 활성변화의 정도를 조사하였다(Figs. 3A, 3B, 3C). 먼저 유향물추출물을 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리 후 처리 시간에 따른 caspase의 활성변화를 조사한 결과, caspase-1, caspase-6, caspase-8 및 caspase-9는 시간 경과에 따른 변화가 없었다(Figs. 3A, 3B). Caspase-3은 유향물추출물 처리 4시간 이후부터 증가하여 8시간에는 대조군에 비해 활성이 약 5배 이상 증가하다가 점차 둔화되는 양상을 보였고(Fig 3C), western blot으로 확인한 cas-

pase-3 기질 물질인 PARP 단백질(116 kDa band)은 시간이 경과함에 따라 caspase-3의 활성정도와 비례하여 PARP 분해 단백질(85 kDa band)로 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 3D).

Bcl-2 및 Bax 단백질 발현 양상의 변화에 미치는 영향 – Apoptosis를 조절하는데 관여하는 여러 가지 유전자 산물 중에서 제일 먼저 알려진 암유발 유전자산물의 하나인 Bcl-2는 다른 암 유전자 단백질과는 달리 세포생존에는 관여하지 않고 세포생존 조절, 즉 apoptosis를 억제하는 기능이 있다. 한편 Bcl-2 계열에 속하는 Bax 단백질은 apoptosis를 촉진시키는 단백질로 밝혀졌으며 Bcl-2와의 hetero- 혹은 homodimer를 형성함으로써 apoptosis의 조절에 깊이 관여하고 있다. 따라서 본 실험에서 유향물추출물 처리시에 Bcl-2 및 Bax의 발현양상의 변화를 조사한 결과, Bcl-2의 발현은 유향 추출물 처리 4시간 이후부터 점차 시간 의존적으로 감소하였고(Fig. 5A), 이와는 달리 apoptosis를 촉진시키는 기능을 수행하는 Bax 단백질의 발현은 시간 의존적으로 증가되어 나타났다(Fig. 4B).

고 찰

암의 치료법은 수술요법, 방사선요법, 화학요법 등이 주를 이루고 있으나 대부분 부작용 등 여러 가지 문제점들이 있어, 근래에는 세포독성은 약하지만 기존 항암제와 병용하여 항암성을 증가시키고 부작용을 줄일 수 있는 면역요법이나 apoptosis, 세포분화유도법, 혈관형성저해법 등과 관련된 새로운 방법의 연구가 활발히 진행중이다.¹⁻³⁾ 단일약물의 항암효과에 대한 실험적 보고로 Tang 등¹³⁾은 백출이, Moon 등¹⁴⁾은 봉출이 각각 상당한 항암효과가 있음을 보고하였고, Kang 등¹⁹⁾은 인삼과 녹차가 발암을 억제한다고 하였고, You 등²⁰⁾은 저령이 간중양세포의 DNA, RNA, 단백질 합성을 억제하였다고 보고하였다. 또한 한방제의 항암효과에 대한 실험적 보고로 Aburada 등²¹⁾은 십전대보탕이 항암제의 부작용을 감소시키며 동시에 항암효과를 증진시킨다고 보고하였다.

Apoptosis는 1980년대 후반기부터 중요 관심분야로 세포생물학 영역에 도입되면서 많은 분야에 혁명적인 변화를 가져 왔으며 특히 신경계와 면역계 세포의 생성, 분화 및 기능발현 등에 중요하게 작용하고 있음이 밝혀졌다.^{22,23)} 그러나 이런 apoptosis의 기전에 장애가

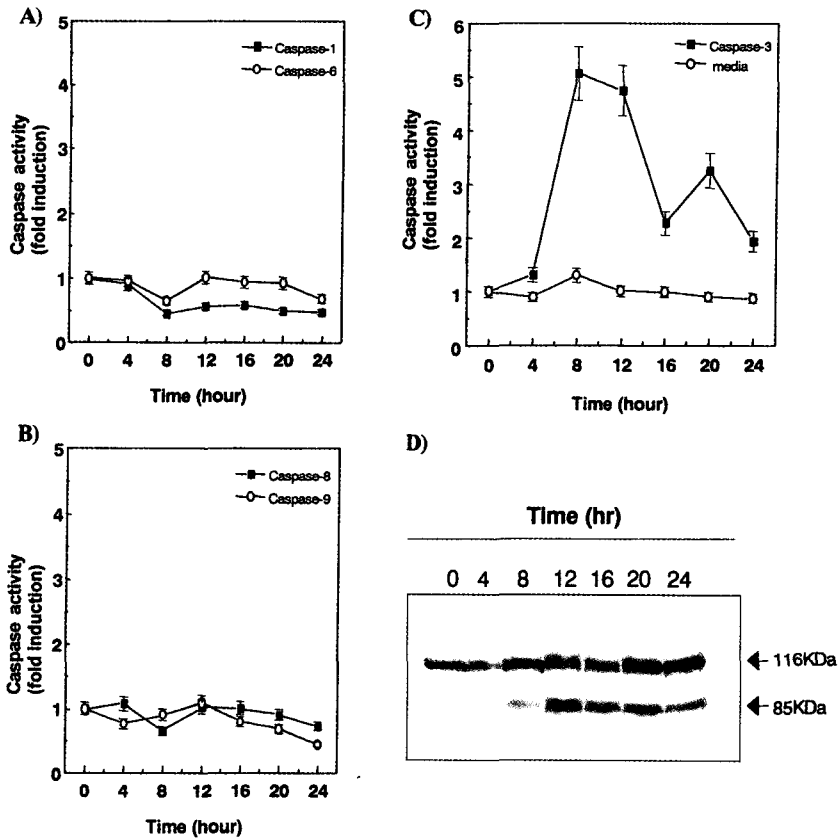


Fig. 3 – Effects of *Boswellia carterii* water extract on the enzymatic activity of caspases in HL-60 cells. HL-60 cells were treated with *Boswellia carterii* water extract at 300 µg/ml for various time intervals. A and B) Lysate from the HL-60 cells was used to measure the activities of caspase 1, 6, 8, 9-like proteases by using each fluorogenic peptide including acetyl-YVAD-AMC, Ac-VEID-AMC, Z-IETD-AFC and Ac-LEHD-AFC, respectively. C) Lysate from the cells was used to measure the activity of caspase 3-like proteases by using fluorogenic peptide acetyl-DEVD-AMC. The data represented as mean ± S.D. of quadruplicate. D) PARP cleavage was measured by western blotting with anti-PARP antibody.

발생하면 암의 발생이나 항암치료에 대한 내성발현, 자가면역질환, 퇴행성질환 및 HIV가 초래된다고 보고되었다.^{23,24)} 최근 연구에 의하면 양방에서 흔히 사용되는 많은 항암제들, 특히 Ara-c, cisplatinum, cyclophosphamide, adriamycin, etoposide, teniposide, vincristine, mitoxantrone, taxol, hydroxyurea 및 bleomycin 등은 다양한 세포주에서 apoptosis를 유도하고 있다고 밝혀졌고, 그 작용기전으로 Fas/Fas ligand system, sphingomyelin/ceramide 경로, 즉 발현 초기유전자 (early immediate gene)의 발현, apoptosis 관련 단백질분해효소인 caspase, DNA fragmentation을 일으키는 endonuclease 등이 관여하는 것으로 보고되고 있다.²⁵⁻²⁷⁾ 따라서 항암제의 효용성은 apoptosis 유도능력

과 밀접한 관련성이 있기 때문에 apoptosis의 정확한 생화학적 기전을 밝혀 암치료 과정을 도입키 위한 연구가 빠르게 진행되고 있는 실정이다.

유향은 활혈화어와 지통작용을 가지고 있고, 또한 <본초강목>에서는 “소용저제독, 이호심, 활혈정통, 신근, 치부인난산, 절상”이라 하였기 때문에 실제 암 치료에 많이 응용될 수 있는 약재라 사료되므로,¹⁵⁻¹⁷⁾ 본 연구에서는 유향의 항암효과를 규명하고자 유향물추출물을 인체의 백혈병에서 유래된 HL-60 세포주에 직접 투여함으로써 암세포주의 다양한 신호전달 과정에 관여하는 apoptosis가 일어나는지에 대하여 관찰하였다.

먼저 유향물추출물이 HL-60 세포주에 직접적인 살상작용을 할 수 있는지에 대하여 알아보기 위하여 유

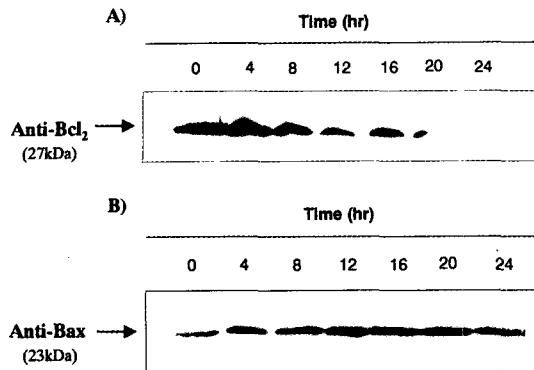


Fig. 4 – Effects of *Boswellia carterii* water extract on the expression of Bcl-2 and Bax in HL-60 cells. A) The treatment of *Boswellia carterii* water extract decreased the expression of Bcl-2 in HL-60 cells. B) The treatment of *Boswellia carterii* water extract increased the expression of Bax in HL-60 cells. The cells were treated with *Boswellia carterii* water extract at 300 $\mu\text{g/ml}$ for various periods, and the cell lysates were analyzed with anti-Bcl-2 and Bax antibodies.

항물추출물을 농도별로 처리한 결과 농도에 비례하는 암세포에 대한 세포독성이 있음을 확인하였다(Fig. 1). 유향물추출물을 처리한 HL-60 세포의 독성이 apoptosis 혹은 necrosis 과정에 의하여 매개되는지를 확인하기 위하여 유향물추출물 300 $\mu\text{g/ml}$ 를 HL-60 세포주에 4 시간 간격으로 처리하여 DNA를 추출한 후 1.2% agarose gel에 전기영동하여 ethidium bromide 염색을 통해 조사한 결과, 8시간 이후부터 ladder형의 DNA분절이 확인되어(Fig. 2), 유향물추출물에 의한 세포의 독성은 apoptosis 과정으로 확인되었다. 이는 Jing 등²⁸⁾이 보고한 HL-60 세포에서 유향이 nitroblue tetrazolium(NBT) test와 DNA fragmentation 분석에 의한 apoptosis 억제유도 효과와 일치하였다.

Caspase 계는 염증반응이나 포유동물의 apoptosis 유도에 핵심적인 역할을 수행하는 효소로서 정상적인 세포내에서는 불활성화 효소 형태로 존재하다가 apoptosis 유도 자극시에는 활성화되므로, apoptosis의 특징적인 현상을 초래하는 세포내 신호전달기전에서 caspase의 중요성은 이미 잘 알려져 있다.^{6,27)} 이러한 caspase는 protease로서 지금까지 14가지가 알려져 있고, 이 중 caspase-3(CPP32, yama)의 역할에 대해서는 많은 연구가 진행되고 있다. 일단 caspase-3이 활성화가 되면 poly(ADP-ribose), polymerase(PARP),

lamin, MEKK 및 다른 caspases 등의 여러 표적 단백질에 작용해서 기능적 활성화나 불활성화를 유도함으로써 세포내 여러 신호전달활성을 조절하기 때문에 이들은 대부분 apoptosis에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{6,27,29)} 그러므로 유향물추출물이 caspase활성화에 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 알아본 결과, 유향물추출물에 의한 apoptosis에서도 역시 caspase-3 효소활성이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 즉 유향의 처리효과는 시간 의존적으로 작용하여 8시간부터 최고 활성을 보이다가 그 이후부터는 감소되어 유향물추출물이 HL-60 백혈병 유래 혈액 암세포에서 caspase의 활성, 특히 caspase-3 cysteine protease 활성을 증가시켜 apoptosis가 유도되었음을 알 수 있었다.

한편, Bcl-2는 인체의 림프종(human follicular lymphomas)과 밀접하게 관련된 유전자로서 단백질의 분자량은 26 kDa이며, 다른 암유전자와는 달리 세포종식에는 관여하지 않고 apoptosis의 억제기능에만 관여하고 있다.³⁰⁾ Bcl-2에 의한 apoptosis 억제의 관련 기전으로서 제시되고 있는 것은 산화환원상태조절, 세포내 이온의 분포조절, caspase 활성, 미토콘드리아 막전위, 핵 DNA 분절화, apoptosis 신호전달계의 활성화(JNK, p38 등) 조절 등 광범위하다. 또한 Bax단백질은 Bcl-2와는 달리 오히려 apoptosis를 촉진시키는 기능을 수행한다고 알려져 있는데,³¹⁾ 본 연구결과 유향물추출물을 처리하였을 때 Bcl-2의 발현은 감소되었으나(Fig. 4A), Bax 단백질의 발현은 유향물추출물 처리시에 시간 의존적으로 발현이 증가되었다(Fig. 4B). 따라서 유향물추출물이 Bcl-2 및 Bax 발현조절에 관여함을 알 수 있었고, 또한 Bcl-2 및 Bax 발현조절이 유향물추출물 유도성 HL-60 apoptosis에 중요 기전임을 알 수 있었다.

이상의 연구결과, 유향물추출물은 apoptosis 신호전달기전인 caspase 3-like cysteine protease와 Bax같은 세포사멸 유도 단백질을 활성화시킴으로써 apoptosis가 이루어짐을 알 수 있었다.

결론

유향물추출물이 인체의 백혈병에서 유래된 HL-60 혈액암세포에 어떠한 영향을 미치는지를 규명하기 위하여, caspase cysteine protease의 활성화도 및 apop-

tosis 관련 단백질 발현의 변화 등을 관찰한 결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 유향물추출물은 300 µg/ml 처리 농도에서 HL-60세포의 생존율이 40%정도를 나타냈다.

2. 전기영동에 의한 DNA laddering 관찰 결과, 유향물추출물에 의한 apoptosis시 DNA 분절현상이 관찰되었다.

3. 유향물추출물 300 µg/ml 농도로 처리 후 시간경과에 따른 caspase cysteine protease의 활성변화를 조사한 결과, caspase 3-like cysteine protease 활성을 증가시켰다.

4. 유향물추출물 300 µg/ml 농도로 처리 후 시간경과에 따라 Bax 단백질의 발현은 증가 되었으나, Bcl-2 단백질의 발현은 억제되었다.

이상의 결과, 유향물추출물은 apoptosis 신호전달기전인 caspase 3-like cysteine protease와 Bax 단백질의 활성화를 증가시킴으로써 apoptosis가 이루어짐을 알 수 있었다.

감사의 말씀

본 연구는 한방치료기술개발 연구지원사업(HMP-99-O-01-0003)의 일부 연구비지원으로 수행되었기에 감사드립니다.

문헌

- 1) Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R. and Currie, A. R. : Cell death; The significance of cell death. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251 (1980).
- 2) Searle, J., Kerr, J. F. R. and Bishop, C. J. : Necrosis and apoptosis; Distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol. Annu.* **17**, 229 (1982).
- 3) Im, S. Y., Han, S. J., Ko, H. M., Choi, J. H., Chun, S. B., Lee, D. G., Ha, T. Y., and Lee, H. K. : Involvement of nuclear factor-kappa B in platelet-activating factor-mediated tumor necrosis factor-alpha expression. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2800 (1997).
- 4) Cohen, J. J. : Apoptosis. *Immunol. Today*, **14**, 126 (1993).
- 5) Robaye, B., Mosselmans, R., Fiers, W., Dumont, J. E. and Galand, P. : Tumor necrosis factor induces apoptosis in normal endothelial cells *in vitro*. *Am. J. Pathol.* **138**, 447 (1991).
- 6) Klaus, S. O. and Davide, F. : Apoptosis signal by death receptors. *Eur. J. Biochem.* **254**, 439 (1998).
- 7) Alnemri, E. S., Livingstone, 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).
- 8) Xia, Z., Dickens, M., Raingaud, J., Davis, R. J. and Greenberg, M. E. : Opposing effect of ERK and JNK-p38 MAP kinase on apoptosis. *Science* **270**, 1326 (1995).
- 9) 郁仁存 : 中醫腫瘤學 上冊, 科學出版社, 北京 p. 120 (1997).
- 10) 李家庚 : 中醫腫瘤防治大全, 科學技術文獻出版社, 中國 p. 10 (1994).
- 11) 東西醫學融合研究會編 : 臨床東西醫學, 永林社, 서울 p. 538 (1997).
- 12) 鄭遇悅, 安圭錫 : 韓方臨床病理學, 永林社, 서울 p. 19 (1998).
- 13) Tang, D., Hao, Y., Liu, Z., Miao, S., Wei, H. and Wu, J. : Constituents of the essential oil from rhizome of *Attactylodes macrocephala* produced in pingjiang (China) and their antitumor effects. *Yaoxue Tongbao.* **19**, 555 (1984).
- 14) Moon, C. K., Lee, B. G., Lee, S. W. and Kang, T. L. : Effect of antitumor polysaccharides from *Albizia julibrissin* on immune function. *Arch. Pharmacol. Res.*, **8**, 277 (1985).
- 15) 姜春華 : 活血化癥研究, 上海科學技術出版社, 上海 p. 407 (1981).
- 16) 李時珍 : 本草綱目3, 醫聖堂, 서울 p. 1954 (1993).
- 17) 辛民教 : 臨床本草學, 永林社, 서울 p. 729 (1997).
- 18) Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; Application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55 (1983).
- 19) Kang, K. S., Kang, B. C., Lee, B. J., Che, J. H., Li, G. X., Trosko, J. E. and Lee, Y. S. : Preventive effect of epicatechi and ginsenoside Rb₂ on the inhibition of gap junctional intercellular communication by TPA and H₂O₂. *Cancer Lett.* **152**, 97 (2000).
- 20) You, J. S., Han, D. M., Chen, K. T. and Huang, H. F. : Combined effects of chuling (*Polyporus umbellatus*) extract and mitomycin C on experimental liver cancer. *Am. J. Chin. Med.* **22**, 19 (1994).

- 21) Aburada, M., Takeda, S., Ito, E., Nakamura, M. and Hosoya, E. : Protective effects of Juzentaihoto, dried decoctum of 10 Chinese herbs mixture, upon the adverse effects of mitomycin C in mice. *J. Pharmacobiodyn.* **6**, 1000 (1983).
- 22) Raff, M. C., Bares, B. A., Burne, J. F., Coles, H. S., Ishizaki, Y. and Jacobson, M. D. : Programmed cell death and the control of cell survival. *Science* **262**, 695 (1993).
- 23) Thomson, C. B. : Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456 (1995).
- 24) Williams, G. T. : Programmed cell death; Apoptosis and oncogenesis. *Cell* **65**, 1097 (1991).
- 25) Mesner, P., Budihardjo, I. and Kaufmann, S. H. : Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv. Pharmacol.* **41**, 461 (1997).
- 26) Han, J., Lee, J. D., Bibbs, L. and Ulevitch, R. J. : A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* **265**, 808 (1994).
- 27) Kim, Y. M., Talanian, R. V. and Billiar, T. R. : Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increase in caspase 3-like activity via two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* **272**, 31138 (1997).
- 28) Jing, Y. K. and Han, R. : Combination induction of cell differentiation of HL-60 cells by daidzein (S86019) and BC-4 or Ara-C. *Yao Hsueh Hsueh Pao.* **28**, 11 (1993).
- 29) Luo, Y., Umegaki, H., Wang, X., Abe, R. and Roth, G. S. : Dopamine induces apoptosis through an oxidation-involved SAPK/JNK activation pathways. *J. Biol. Chem.* **273**, 3756 (1998).
- 30) Reed, J. C. : Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell. Biol.* **124**, 1 (1994).
- 31) Kroemer, G., Dallaporta, B. and Rescherigon, M. : The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Nature Med.* **6**, 614 (1998).