

간암 세포주에서의 豨薺의 Apoptosis 유도와 기전

김윤태 · 이헌재 · 김길훤 · 신흥묵*

동국대학교 한의과대학 생리학교실

Induction of Apoptosis and Its Mechanism by Siegesbeckia Glabrescens in HepG2 cells

Yoon Tae Kim, Heon Jae Lee, Gil Whon Kim, Heung Mook Shin*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

This study was performed for the investigation of anticancer effects of Siegesbeckia glabrescens(SG) on HepG2 cells, a human hepatoma cell line. In the previous study, we examined the involvement of nitric oxide (NO) on anti-proliferative and apoptotic efficacy of SG in vascular smooth muscle cells. The possible mechanism of the apoptotic effects of SG was investigated in HepG2 cells. SG showed potent cytotoxic activity in HepG2 but not chang cells, liver normal cells. SG treatment caused morphological change such as cell shrinkage, nuclei condensation and cell blebbing in HepG2 cells. SG also increased the nitrite production of HepG2 cells in a dose-dependent manner. Furthermore, L-NNA treatment inhibited the anti-proliferative effect of SG. From RT-PCR, SG decreased Bcl-2 but no affected on Bax. Western blot for procaspase-3 and COX-2 showed that degradation of procaspase-3 protein level or inhibition of COX-2 protein expression by SG treatment. In addition, the apoptotic effect of SG was also demonstrated by DNA laddering. In conclusion, SG-induced HepG2 cells death can occur via apoptosis which was dose-dependent, and associated with apoptosis-related Bcl-2/Bax gene expressions, COX-2 inhibition, caspase-3 activation and NO pathway. These results suggest that SG is potentially useful as a chemotherapeutic/chemopreventive agent in hepatocellular carcinoma.

Key words : Siegesbeckia glabrescens, HepG2, apoptosis, Bcl-2, procaspase-3, COX-2

서 론

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, 방사선 요법, 화학요법 등이 주가 되고 있다. 또 지금까지의 항암제는 암세포 주에 대해 직접적인 살상을 목표로 하고 있기 때문에 세포독성 효과는 있지만 대부분 개체 저항력을 떨어뜨리는 부작용 등의 많은 문제점들을 나타내고 있어¹⁾, 기존 항암제의 한계를 극복할 수 있는 새로운 약물의 개발이 요망되고 있다.

최근 apoptosis라 불리는 세포자연사에 대해 관심이 모아지

고 있는데, 이는 apoptosis가 정상적 생리과정에 중요하지만 암을 포함한 자가면역질환, 퇴행성 신경질환 및 후천성면역결핍질환(AIDS)와 같은 병리상태에 연루되어 있어 인간의 다양한 질병의 발생기전을 밝히고 치료방법을 연구하는 데에 매우 중요하기 때문이다^{2,3)}. 정상적인 포유동물의 조직에서는 세포의 증식과 사멸이 apoptosis를 통해 균형을 이루고 있다. 반대로 암 조직에서 처럼 apoptosis가 제대로 이루어지지 않을 경우 세포의 증식이 세포의 손실보다 훨씬 빠른 속도로 일어날 수 있다. 이처럼 apoptosis의 조절에 이상이 생기으로써 악성 종양으로의 변형(malignant transformation)을 일으킨다면 apoptosis에 의한 세포 사멸을 인위적으로 유도함으로써 암의 진행을 억제하거나 암세포만을 선택적으로 제거하도록 고안할 수도 있을 것이다⁴⁾. 실제 여러 가지 항암제들이 악성종양세포에서 apoptosis를 유도한다는 사실이 보고 된 바 있다^{5,6)}.

한의학에서 癌은 악성 腫瘍에 상당하며, 그 발병의 원인은

* 교신저자 : 신흥묵, 경북 경주시 석장동 707, 동국대학교 한의과대학

E-mail : heungmuk@dongguk.ac.kr, Tel : 054-770-2372

· 접수 : 2005/03/05 · 수정 : 2005/04/24 · 채택 : 2005/05/23

내인과 외인에 의한 氣滯血瘀, 痰結濕聚, 熱毒蘊結, 經絡瘀阻로 설명된다. 치료방법은 크게 扶正과 祛邪로 구분되며 치료제는 효능에 근거 清熱解毒, 瀉下逐水, 化痰祛瘀, 活血化瘀, 軟堅散結, 以毒攻毒, 扶正培本 및 理氣藥으로 구분된다^{7,8)}.

희렴은 苦辛하고 寒한 性味로 肝經에 작용하여 祛風除濕하고 清熱解毒하며 活血通絡의 효능⁹⁾이 있는데, 이를 심혈관계 질환 치료에 상응하는 작용으로 해석하여 혈관확장 기능과 항산화 작용^{10,11)}, 혈압강화효과와 혈청중 지질함량의 감소^{12,13)}, 내피세포 의존성 혈관이완효능¹⁴⁾ 및 혈관평활근 세포에서의 NO를 매개로 한 apoptosis의 유도¹⁵⁾가 보고 되고 있다. 특히 희렴의 apoptosis 유도를 암 치료의 清熱解毒의 치법과 연계하면 항암치료의 祛邪法의 일종으로 해석되며 간암 세포주에 대한 일정한 항암효과를 발휘할 것으로 기대되나 이에 대한 연구는 보이지 않는다.

이에 저자는 간암 세포주인 HepG2에서의 희렴의 apoptosis 유도과 그 기전을 Bcl-2/Bax의 발현, caspase-3의 활성화, COX-2 활성화, nitrite 생성 및 NO 경로와 연계하여 연구하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 한약 추출물의 제조

희렴(*Siegesbeckia glabrescens*; SG) 200g를 round flask에 넣고, 증류수 1,000ml을 가하여 가열 추출한 후 추출액을 여과지로 여과하고, 이 여액을 rotary evaporator로 감압 농축하고 동결 건조하여 22.28g의 분말을 얻었다.

2. 방법

1) 세포배양

정상 간세포주인 chang cell, 간암세포주인 HepG2 세포를 95% O₂/5% CO₂가 유지되는 humidity incubator에서 37℃의 온도로 10% fetal bovine serum과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배지를 이용하여 배양하였다. 각 세포는 90% 정도 자랐을 때, trypsin-EDTA를 처리하여 계대 배양한 후 포집하여 사용하였다.

2) 세포 생존율 측정

96 wells plate에 cell (chang; 7.5×10⁴cells/ml, HepG2; 2×10⁴cells/ml)을 분주하고 24시간 배양 후, 다시 serum free media로 24시간 배양하였다. 희렴을 농도별로 처리하고 다시 24시간을 배양하였다. Well당 50μl의 XTT(Roche, USA)를 처리 후 4시간 반응 시켰다. ELISA reader(Bio-tek instruments EL321e)를 이용하여 490nm에서 흡광도의 변화를 관찰하였다. 세포를 뺀 배지를 같이 배양하여 대조군과 실험군의 흡광도와 비교·보정하여 세포 생존율을 백분율(%)로 표시하였다¹⁶⁾.

3) Nitric Oxide 측정

세포 배양액에 축적된 NO의 농도는 Griess 법¹⁷⁾에 따라 ELISA reader (Bio-tek instruments EL312e)로 흡광도를 측정하였다. 6wells plate에 cell이 1×10⁵ cells/ml 되게 분주하고, 24시간 배양한 다음, serum free media로 다시 24시간을 배양하였다.

희렴을 농도별로 처리하고 24시간 동안 배양 후, 각 sample로부터 배지를 따서 E-tube에 옮겼다. 모은 배지를 96wells plate에 50μl씩 분주한 후 50μl의 1% sulfanilamide in phosphoric acid를 더하였다. Shaker에서 10분간 반응시킨 후, 다시 50μl의 0.1% naphthyl-ethylendiamine dihydrochloride를 혼합하여 상온에서 10분간 반응 시킨 후 ELISA reader로 A570에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 sodium nitrite의 농도를 기준으로 작성한 표준곡선으로 환산하여 계산하였으며, 각 실험에서 기본 대조군은 세포를 뺀 세포 배양액을 사용하였다.

4) Western blot

간암 세포주인 HepG2를 serum-free DMEM으로 24시간 배양한 후, 희렴을 처리하고 다시 24시간동안 배양하였다. 세포로부터 NP-40을 포함하는 RIPA buffer (20μg/ml Na₃VO₄, 10μg/ml leupeptin, 10μg/ml aprotinin, 1μM PM8F)로 단백질을 추출한 뒤 Lowery method (Bio-Rad kit)로 정량하였다¹⁸⁾. 정량 후 SDS PAGE(12.5%)에 의해 단백질을 분리하고, nitrocellulose membrane으로 transfer 한 후, TBS에 녹인 3% non fat dry milk로 1시간 30분 반응시켰다. 그리고 dry milk에 녹인 procaspase-3 (Aalexis, 1:1000)에 1시간 반응 시켰다. TBST로 세척 (10min×3)하고, horseradish peroxydase-conjugated secondary antibody와 ECL kit (Amersham Pharmacology)로 발색시켰다. 밴드의 density는 Densitometry (gel pro 3.1)를 이용하여 측정하였다.

5) DNA fragmentation 측정¹⁹⁾

일정한 농도로 (1×10⁵ cells/ml) 배양된 HepG2 세포에 희렴을 처리한 후 48 시간동안 배양하였다. 배지를 제거한 후, PBS로 세포를 두 번 세척하였다. 샘플 당 Lysis buffer(10 mM Tris-Cl(pH8.0), 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100) 400μl를 더한 뒤, 얼음 위에서 30분 동안 배양하고, scraper와 pipetting으로 세포를 용해하였다. 4℃에서 12,000rpm으로 30분간 원심 분리하여 취한 상층액에 동량의 phenol solution (phenol/chloroform/isoamyl alcohol=25:24:1)을 넣고 vortex를 한 뒤 12,000rpm에서 1분 동안 원심분리 하였다. 위의 과정을 세 번 반복 수행하였다. 상층 액의 1/10 부피의 3M sodium acetate (pH 5.2)를 넣고, 전체 부피의 2.5배 되는 100% ethanol을 더하고 -70℃에서 30분 동안 배양하였다. 12,000rpm에서 10분 동안 4℃에서 원심분리한 후, 상층 액을 버리고 pellet를 3분 동안 air-dry 하였다. 10μl TE buffer(+RNase)를 처리한 후 37℃에서 4시간동안 배양하고, 1% agarose gel에 10μl를 loading하여 전기영동한 후 ethidium bromide(EtBr)로 염색하여 관찰하였다.

6) RT-PCR

일정한 농도로 (1×10⁵ cells/ml) 배양된 세포에 희렴을 농도별로 처리한 후 24시간동안 배양하였다. 배지를 제거한 후, 500 μl TRI reagent(Molecular Research Center, Inc.)를 첨가하였다. 몇 차례의 pipetting 후, E-tube로 옮긴 다음 상온에서 5분간 반응시켰다. 100μl의 chloroform을 각 샘플에 첨가하고 inverting과 vortexing을 15초 정도 수행 한 후, 12,000rpm에서 15분간 4℃에서 원심 분리하여 상층 액을(150μl) 취하였다. 취해진 상층 액에 250μl isopropanol을 더한 다음 다시 inverting과 vortexing을

한 후, 상온에서 10분 동안 반응시켰다. 12,000rpm에서 8분간 4°C에서 원심분리 후, 상층 액을 버리고 500 μ l 75% EtOH를 더한 다음 약하게 vortexing을 하였다. 7,500rpm에서 5분 동안 원심분리 후, 상층 액을 버리고 4분정도 건조시킨 후, 각 샘플 당 10 μ l의 DEPC-treated water를 더하였다. 1.0%의 gel에 2.5 μ l의 sample과 0.5 μ l의 loading dye를 혼합한 3 μ l를 loading하여 동일한 RNA를 정량하였다. RNA로부터 cDNA를 만들기 위해 다음의 RT를 수행하였다. 샘플 당 1 μ l oligo dT와 2 μ l D.W 반응물에 2 μ l의 RNA를 더한 다음 65°C에서 5분간, 8°C에서 5분간 반응시킨 후, 샘플 당 0.5 μ l RT, 0.5 μ l RI, 1 μ l 10mM dNTP, 4 μ l 5 \times Reaction Buffer, 9 μ l D.W.를 더하였다. 42°C에서 1시간, 95°C에서 Heat inactivation 시킨 후, PCR 과정을 수행하였다. PCR을 수행하기 위해 다음의 primer를 제작하였다. Bcl-2-[forward; gacaacgggagatagtgat, reward;actcaaagaaggccacaatcc]²⁰⁾, Bax-[forward; accaagaagctgagcgagtgtc, reward;acaagaatggtcaggtctgccc]²¹⁾, GAPDH-[forward;ccatggagaaggctgggg, reward; caaagtgtcatggtgacc]. 0.5 μ l의 RT product에 0.2 μ l taq, 2.5 μ l 10 \times Reaction Buffer, 1 μ l 10mM dNTP, 2 μ l primer, 18.8 μ l D.W.를 더한 다음, 다음의 조건으로 PCR를 수행하였다. 95°C 2min, 95°C 20sec, AT [Bcl-2=45°C, Bax=52°C, GAPDH=59°C] 45sec, 72°C 1min, 72°C 10min. 1.0%의 gel에 5-10 μ l를 loading한 뒤, EtBr로 염색 후 같이 loading한 standard Marker에 의해 분자량을 확인하였다.

7) 형태적 관찰

6 wells plate에 1 \times 10⁵ cells/ml의 세포를 분주하고 24시간 배양한 다음, serum free media로 다시 24시간을 배양하였다. 희렴 추출물을 농도별로 처리하고 24시간 동안 배양 후, inverted microscope (Olympus CK40, Japan)을 이용하여 세포의 형태변화를 관찰하였다.

실험성적

1. 희렴이 정상 간세포의 생존에 미치는 영향

희렴의 세포독성을 확인하기 위하여 정상 간세포 (chang cell)에 미치는 영향을 XTT 방법을 이용하여 농도별 세포생존율을 관찰하였다. 희렴은 정상 간세포의 생존에 영향을 미치지 않았다(Fig. 1).

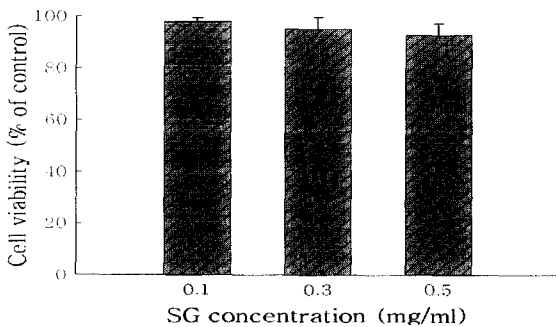


Fig. 1. Effect of SG on cell viability of liver normal chang cells. Chang cell line(1.5 \times 10⁵ cells/ml) was incubated in the presence of different concentrations of SG for 24hrs. Cell viability was measured by XTT assay as described in Materials and Methods. Values are mean \pm S.D., n=7.

2. 희렴의 간암 세포주에 대한 독성 효과

항 간암 활성효과를 평가하기 위한 선행실험으로 HepG2에 대한 희렴의 세포사멸 효과를 관찰하였다. 희렴은 간암세포에 대하여 0.1mg/ml의 농도에서 18 \pm 4%, 0.3mg/ml 이상의 농도에서 약 47%의 세포사멸을 초래하였다(Fig. 2).

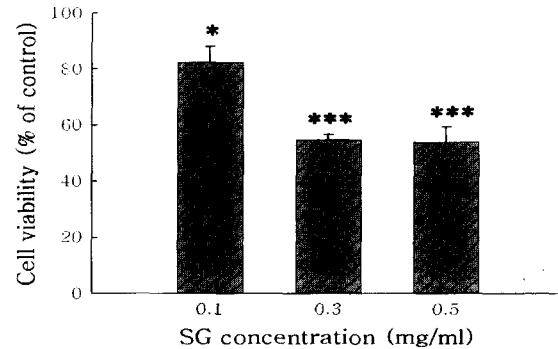


Fig. 2. Effect of SG on cell viabilities of liver cancer cells (HepG2). Each cell line(HepG2: 5.0 \times 10⁴ cells/ml) was incubated in the presence of different concentrations of SG for 24hrs. Cell viability was measured by XTT assay as described in Materials and Methods. Values are mean \pm S.D., n=7. *p<0.05, ***p<0.001 as compared with control group.

3. 희렴에 의한 간암 세포주의 형태적 변화

희렴이 세포의 형태적 변화에 미치는 영향을 농도별 (0, 0.1, 0.3, 0.5mg/ml)로 관찰하였다. 정상 간세포인 chang cell에서는 영향을 미치지 않았으나(Fig. 3A), 간암 세포주인 HepG2에서는 핵과 세포질의 농축, 죽은 세포의 부유 등 형태적 변화가 관찰되었다(Fig. 3B).

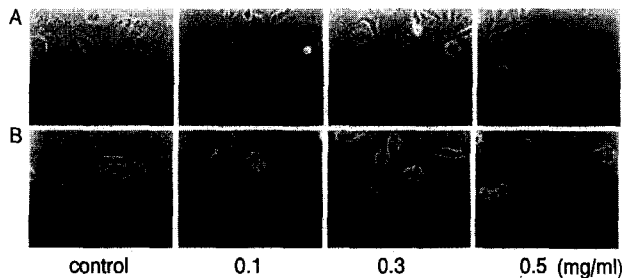


Fig. 3. Morphological changes of chang cells(A) and HepG2 cells (B) by SG. Each cell line(1.0 \times 10⁵ cells/ml) was incubated in the presence of different concentrations of SG for 24 hr. n=3. \times 200

4. 희렴에 의한 간암 세포주의 DNA fragmentation

희렴의 간암 세포 주에 대한 세포사멸 효과가 apoptosis에 의한 것인지를 확인하기 위해 apoptosis의 특징인 internucleosomal DNA fragmentation을 확인하였다. 그 결과 희렴에 의한 농도의존적 ladder형의 DNA 분절을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4).

5. 희렴이 Bcl-2, Bax의 발현에 미치는 영향

Apoptosis를 일으키는 또 다른 증거로 apoptosis를 저해시키거나 촉진시키는데 있어 중요한 역할을 하는 Bcl-2 family중 anti-apoptotic 유전자인 Bcl-2와 proapoptotic 유전자인 Bax의 mRNA 유전자 발현을 RT-PCR을 이용하여 관찰하였다. Fig. 5에서 보는바와 같이 희렴은 Bcl-2의 발현을 감소시켰으나(A), Bax

mRNA의 발현에는 영향을 미치지 않았다(B).

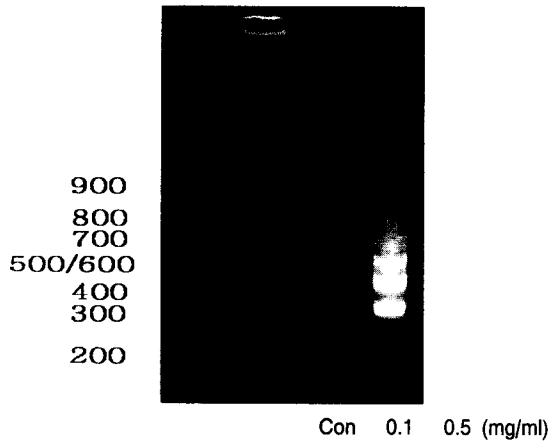


Fig. 4. DNA ladder pattern formation in HepG2 cells after treatment with SG. Cells were treated with SG at indicated doses for 48 hr and the formation of oligonucleosomal fragments was determined by 1% agarose gel electrophoresis. n=3.

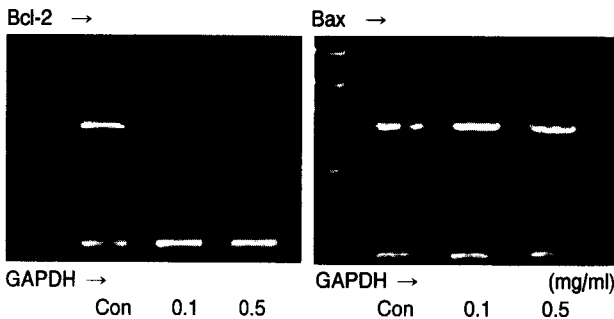


Fig. 5. Analysis of Bcl-2 and Bax mRNA expression in SG-treated HepG2 cells. Total RNA was isolated from HepG2 cells treated with SG (0, 0.1, 0.5 mg/ml) for 24 hr and analyzed by RT-PCR to measure mRNA for Bax and Bcl-2 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) as described in Methods. n=3.

6. 희렴에 의한 procaspase-3의 degradation 유도

모든 apoptosis의 경로에 caspase-3 활성화가 관여하므로 희렴의 세포사멸이 apoptosis에 의한 것인지를 western blot 분석을 이용한 procaspase-3 활성 유무를 확인하였다. 희렴은 HepG2의 세포주에 대하여 0.5mg/ml의 농도에서 procaspase-3의 활성을 유의하게 감소시켰다(Fig. 6).

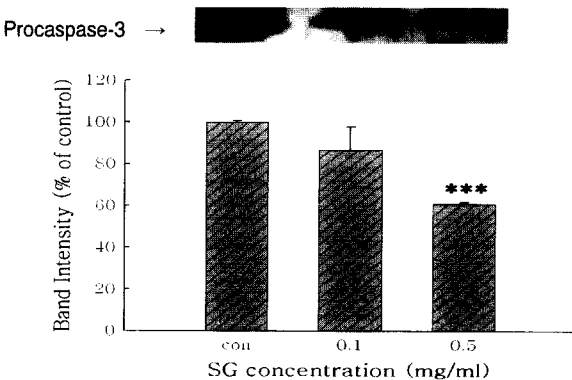


Fig. 6. Effects of SG on procaspase-3 degradation in HepG2 cells. Cells were treated with SG for 24 hr at the indicated doses. The cells were washed with PBS, lysed, and Western blot analysis was performed to detect intact procaspase-3. n=3.

7. 희렴에 의한 COX-2의 발현억제

정상세포에는 거의 발현되지 않으나 mitogen, cytokine, growth factor 및 tumor promoter 등에 의해 유도되는 cyclooxygenase (COX)-2는 많은 암에서 과잉 발현된다. 따라서 COX-2의 활성화와 발현은 임상적으로 암의 치료와 예방에 있어서 중요한 역할을 한다^{22,23}. COX-2의 단백질 발현을 관찰한 결과 희렴은 간암 세포주의 COX-2를 저해하였다 (Fig. 7).

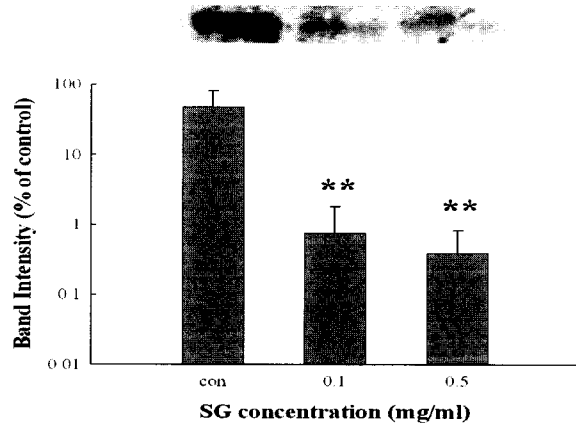


Fig. 7. Effect of SG on the expression of COX-2 protein in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with SG(0.1, 0.5 mg/ml) for 24 hr. Expression of COX-2 was determined by Western blot analysis. n=4.

8. HepG2에서의 희렴에 의한 Nitrite 생성

희렴의 암세포에 대한 독성효과와 NO의 관련성을 파악하기 위하여 농도별 nitrite 생성량을 관찰하였다. 희렴은 HepG2에 대하여 0.3mg/ml, 0.5mg/ml의 농도에서 nitrite의 생성을 유의하게 ($p<0.05$) 증가시켰다(Fig. 8).

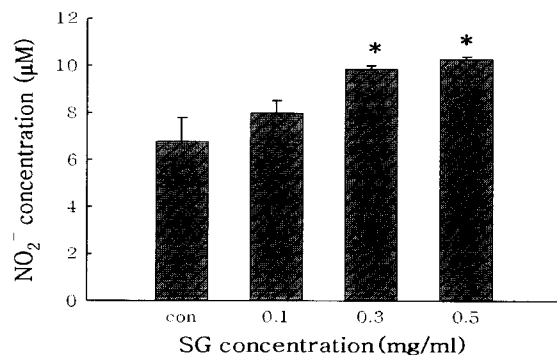


Fig. 8. Nitrite production of SG on HepG2 cells. HepG2 (1×10^5 cells/ml) was incubated in the presence of different concentration of SG for 24 hr. Values are mean \pm S.D., n=3. *, p(0.05 as compared with the normal group.

9. L-NNA가 희렴의 apoptosis에 미치는 영향

NO는 혈관확장 및 신경전달 등 세포와 세포사이의 전령자로서 역할과 함께 강력한 세포 독성물질로 작용하는데, NO는 생성량에 따라 apoptosis를 항진시키거나 억제하는 역할을 한다^{24,25}. 희렴의 농도 의존적 NO의 생성이 HepG2의 apoptosis에 관여함을 확인하기 위해 L-NNA 처리에 의한 세포 생존율을 측정하였다. L-NNA는 희렴에 의한 세포 생존율 저하를 억제하였다(Fig. 9).

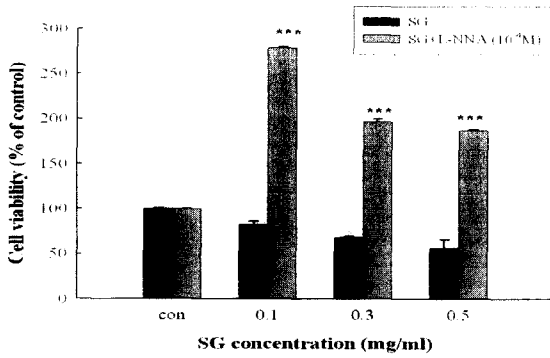


Fig. 9. Inhibition of SG-induced apoptosis by L-NNA (10⁻⁴M) treatment. n=3. ***p<0.001.

고찰

최근 새로운 항암제 개발에도 불구하고 암 자체의 다양성 및 발병기전의 다양화로 인하여 부작용이 적고 내성을 극복할 수 있는 한약 유래 항암제 개발의 필요성이 대두되고 있다.

한의학은 임상적으로 효능정보가 축적된 지적자산을 기반으로 잠재적 항암활성효능 약제의 seed bank 구축, 암세포 사멸효능 검색을 통한 항암활성물질의 검색, 나아가 활성 순수물질의 분리와 신규 항암순수성분의 발굴을 통하여 기존 항암제의 한계점(부작용과 내성)을 극복할 수 있는 항암 치료기술을 개발하는 단서를 제공할 수 있을 것으로 생각된다. 한의학에서 癌의 발생은 氣滯血瘀, 痰結濕聚, 熱毒蘊結, 經絡瘀阻 등의 기전으로 설명하고 있으며²⁶⁾, 치료는 益氣養血, 健脾益氣, 補益肝腎, 健脾益腎의 면역기능을 향진시키는 扶正培本의 치법과 清熱解毒, 活血化瘀, 化痰消痰, 理氣消腫의 직접 암세포를 죽이는 祛邪法 및 두 방법을 배합한 扶正祛邪法을 활용하고 있다^{27,28)}. 또 치료 약제는 효능에 근거 清熱解毒, 瀉下逐水, 化痰祛瘀, 活血化瘀, 軟堅散結, 以毒攻毒, 扶正培本 및 理氣藥으로 구분된다.

희렴은 肝經에 작용하여 風濕을 제거하고 清熱解毒하며 經絡을 통하게 하는 효능이 있다⁹⁾. 특히 肝經에 작용하여 風濕을 제거하고 清熱解毒의 효능을 항암치료의 祛邪法의 일종으로 해석하고 간암세포에 대한 일정한 항암효과를 발휘할 것으로 기대되어 희렴의 항암효과를 평가하기 위한 선행실험으로 간암 세포주인 HepG2의 apoptosis 유도를 통한 세포사멸 효과를 확인하고 그 기전을 관찰하였다. Apoptosis는 세포의 증식과 사멸을 조절하며, 암조직에서 apoptosis가 제대로 일어나지 않으면 비정상적 증식이 계속되어 악성종양으로의 변형을 일으킨다. 따라서 apoptosis에 의한 세포사멸의 유도와 기전의 해석은 암을 포함한 다양한 약제의 개발과 치료방법의 연구에 중요한 의의를 가진다. 특히 간암은 세계적으로 가장 흔한 악성 종양의 하나로 치명적인 암일 수 있다²⁹⁾. 또 간 실질에 있어서의 전이, 경화 및 다른 병리적 변화 때문에 흔히 수술적 절제가 제한된다. 때문에 간암 치료를 위한 화학적 요법과 예방을 위한 약제의 개발은 간암에 의한 사망률을 줄이는데 매우 중요하다. 희렴은 정상 간세포인 liver chang cell의 생존율에는 아무런 영향을 미치지 않았다. 그러나 간암 세포주인 HepG2에 대하여 농도의존적 세포사멸을 확

인할 수 있었고, 형태학적으로 핵과 세포질의 농축, 죽은 세포의 부유 등 변화를 관찰할 수 있었다.

희렴의 HepG2에 대한 이러한 세포사멸이 apoptosis에 의한 것인지를 확인하기 위하여 apoptosis 과정중 미토콘드리아와 관련된 단백질인 Bax와 Bcl-2, procaspase-3의 활성 및 ladder형 DNA 분절을 조사하였다. Apoptosis의 유발에는 apoptosis를 직접 조절하는 Bcl-2 및 Bax와 같은 유전자가 관여한다는 사실이 밝혀지면서 apoptosis와 연관된 분자적 기전이 최근 많이 밝혀지고 있다. Bcl-2는 apoptosis를 억제하는 반면 Bax는 apoptosis를 유도하며^{30,31)}, 두 단백질은 서로 dimer를 형성하면서 미토콘드리아에서 cytochrome c와 같은 apoptosis 인자들의 조절에 관여한다.

본 실험에서 희렴은 Bax의 발현에 큰 영향을 미치지 않았으나 Bcl-2의 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다. 따라서 희렴 추출물 처리에 의한 HepG2의 apoptosis 유발에는 Bax의 발현 증가보다는 Bcl-2 발현의 감소와 연관성이 있는 것으로 생각된다. Apoptosis의 경로 중 mitochondria 의존경로에서 Bcl-2가 저해되면 그 결과 cytochrome c의 세포질 내 유입으로 인해 caspase-9과 caspase-3가 활성화 되는데, caspase-3는 apoptosis 유발 경로에 중요한 조절인자로서 지금까지 알려진 caspase 중 apoptosis가 유발된 세포에서 높은 활성을 보여주는 caspase-3의 발현정도를 불활성형인 procaspase-3 단백질 발현에 기초하여 측정하였다. 희렴은 procaspase-3 단백질 발현을 감소시켰으며 이는 caspase-3 활성화를 의미한다. 따라서 희렴에 의한 HepG2의 apoptosis 유발은 caspase-3 활성이 관련되어 있음을 알 수 있다. 또한 희렴에 의한 간암 세포주의 세포사멸이 necrosis가 아닌 apoptosis에 의한 농도 의존적 DNA fragmentation을 통해 확인할 수 있었다. 정상세포에서는 거의 발현되지 않으나 mitogen, cytokine, growth factor 및 tumor promoter 등에 의해 유도되는 COX-2는 많은 암에서 과잉 발현된다. 따라서 COX-2의 활성과 발현은 임상적으로 암의 치료와 예방에 있어서 중요한 역할을 한다^{22,23)}. 본 실험에서 희렴에 의한 apoptosis가 COX-2 단백질 발현의 저해(down-regulation)에 의해서 유도됨을 확인하였다. 또 COX-2 특이적 저해제에 의한 COX-2의 저해가 암세포의 세포사멸을 초래하는 것은 암의 예방과 치료에 있어서 중요한 분자적 목표가 됨을 시사하며^{32,33)}, COX-2의 과잉 발현이 환자의 간암발생에 연계되어 있으므로³⁴⁾ 희렴의 COX-2 저해와 caspase-3 활성화는 apoptosis 유도를 통한 간암의 치료와 예방에의 활용가능성을 제시하는 것으로 생각된다.

한편 nitric oxide(NO)는 혈관확장 및 신경전달 등 세포와 세포사이의 전령자로서 역할과 함께 강력한 세포 독성물질로 작용하는데, NO는 생성량에 따라 apoptosis를 향진시키거나 억제하는 역할을 한다^{17,18)}. 희렴은 농도 의존적으로 NO의 생성을 증가시켰으며, 희렴에 의한 HepG2의 apoptosis에 NO가 관여함을 확인하기 위해 L-NNA 처리에 의한 희렴에 의한 세포 생존율 저하의 억제를 확인하였다. 결론적으로 희렴의 HepG2의 세포사멸은 apoptosis의 유도를 통해 일어나며, apoptosis의 과정에 COX-2와 Bcl-2 유전자의 발현감소, caspase-3의 활성화 및 NO 생성이 관여함을 알 수 있었다.

이상에서 비록 HepG2 세포에서의 희렴의 작용에 대한 분자 기전이 완전히 밝혀지지 않았지만 그 清熱解毒의 효과와 간암세포의 성장억제 효능의 상관성을 확인할 수 있었으며, 향후 희렴의 암세포 사멸효능을 바탕으로 한 항암 치료기술을 개발을 위하여 항암활성물질의 검색과 순수물질의 분리에 대한 연구가 기대된다.

결 론

희렴의 간암 세포주(HepG2)에 대한 세포사멸의 연구를 통하여 다음의 결론을 얻었다.

희렴은 XTT와 현미경 관찰을 이용한 세포 생존율의 측정에서 정상 간세포에서는 0.5mg/ml까지 세포 생존율에 영향을 미치지 않았으나, 간암 세포주인 HepG2에 대하여는 0.1mg/ml의 농도부터 유의한 세포사멸을 초래 하여 0.5mg/ml에서 약 47%의 세포사멸을 나타내었다. 또 형태학적으로 죽은 세포의 부유, 핵 농축 및 세포질 수축 등 변화를 관찰할 수 있었다.

희렴에 의한 간암 세포주의 apoptosis 유도과 작용기전으로 다음의 결과를 얻었다. 희렴은 Bax의 발현에 큰 영향을 미치지 않았으나, Bcl-2의 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다. 희렴은 COX-2의 발현을 저해하고, procaspase-3의 분해를 일으켰다. 희렴은 농도 의존적 DNA fragmentation을 유도하였다.

희렴은 HepG2에 대하여는 0.5mg/ml의 농도에서 유의하게 NO의 생성을 증가시켰다. 희렴에 의한 세포사멸은 NOS 억제제인 L-NNA의 처리에 의하여 유의하게 억제되었다.

이상의 결과로 희렴의 HepG2에 대한 항암효과를 확인할 수 있었다. 또 희렴의 HepG2에 대한 항암효과는 Bcl-2의 발현 감소에 의한 caspase-3의 활성화, COX-2 저해 및 NO 경로가 관여하는 apoptosis에 의함을 알 수 있었다.

참고문헌

- 박래길, 오광록, 이광규, 문연자, 김정훈, 우원흥. 유황 물추출물의 HL-60 혈액암세포에서 세포사멸 유도효과, 약학회지, 45(2):161-168, 2001.
- Thompson, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of dosage. Science, 267, 1456-1462, 1995.
- Devitt, G.P., Creagh, E.M., Gotter, T.G. Antioxidant 4b,5,9b,10 -tetrahydroindenol[1,2-b]indole inhibits apoptosis by preventing caspase activation following mitochondrial depolarization. Biochemical and Biophysical Communications, 264, 622-629, 1999.
- 허연진, 김정환, 장정희, 인병준, 서영준. 새로운 Anthraquinone 유도체, DHAQ-97의 항암작용: 아포토시스에 의한 인체 유방암 세포 사멸 유도, Environmental Mutagens & Carcinogens 20(1):14-20, 2000.
- Planchon, S.M., Wuerzberger, S., Frydman, B., Witiak, D.T., Hutson, P., Church, Dr, Wilding, G., Boothman, D.A. β -Lapachone-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia(HL-60) and human prostate cancer cells: p-53-independent response. Cancer Res., 55, 3706-3711, 1995.
- Muller, I., Jenner, A., Bruchelt, G., Niethammer, D., Halliwell, B. Effect of concentration on the cytotoxic mechanism of doxorubicin-apoptosis and oxidative DNA damage. Biochem. Biophys. Res. Commun. 230, 254-257, 1977.
- 劉嘉湖 主編. 實用中醫學腫瘤手冊, 上海, 上海科技教育出版社, pp 1-7, 1996.
- 張民獻, 龔惠明 主編. 抗腫瘤中藥的臨床應用, 北京, 人民衛生出版社, 1998.
- 高學敏. 中藥學, 北京, 北京中醫學院, pp 155-156, 1986.
- 金昊顯, 申興默, 金吉萱. 稀蓼이 收縮된 血管에 미치는 影響, 東醫生理學會誌, 10(1):25-36, 1995.
- 신흥묵. 稀蓼의 혈관이완 효과와 항산화 동태에 관한 연구, 대한한의학회지 21(1):77-83, 2000.
- 남상수, 박동석, 희렴약침 자극이 자발성 고혈압 흰쥐의 혈압에 미치는 영향 및 강압기전에 대한 연구, 대한한의학회지, 18(1):218-237, 1997.
- 김호철, 생희침과 주증희침 추출물이 자발성 고혈압 흰쥐의 항 고혈압 작용에 미치는 영향, 본초학회지 13(1):53-58, 1998.
- 김호현, 김길환, 희렴이 가토의 혈관내피세포성 이완인자에 미치는 영향, 대한한의학회지, 18(2):15-32, 1997.
- 신동훈. 희렴의 Nitric Oxide 유리를 통한 평활근세포에서의 Apoptosis 유도, 동국대학교 대학원, 2003.
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., Boyd, M. R. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Research. 48, 4827-4833. 1988.
- Griess, P. Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt. "Ueber einige azoverbindungen." Chem. Ber. 12, 426. 1879.
- Lowery, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 193, 265-275. 1951.
- Herrmann, M., Lorenz, H.M., Vollm, R., Grunkem, M., Woithm, W., Kaldenn, J.R. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. Nucleic Acids Res. 22, 5506-5507, 1994.
- GeneBank Accesion No: M13994, Human Bcl-2 complete CDS.
- Semon, Wu, Yu-Shien, Ko, Ming-Sheng, Teng, Yu-Lin, Ko, Lung-An, Hsu, Chueh, Yung-Yin, Chou, Choong-Chin, Liew and Ying-Shiung, Lee. Adriamycin-induced Cardiomyocyte and Endothelial Cell Apoptosis: In vitro and In vivo studies. J Mol Cell cardiol. 34, 1595-1607, 2002.
- Takeo, M.M. Cyclooxygenase-2 inhibition in tumorigenesis (part I), J Natl Cancer Inst, 90, 1529-1536, 1998.

23. Taketo, M.M. Cyclooxygenase-2 inhibition in tumorigenesis (part II), *J Natl Cancer Inst*, 90, 1609-1620, 1998.
24. Esperanza, R. Matarredona, Maribel Murilo-Carretero, Bernardo Moreno-Lopez, Carmen Estrada. Nitric Oxide synthesis inhibition increase proliferation of neural precursors isolated from the postnatal mouse subventricular zone. *Brain Research*, 995, 274-284, 2004.
25. Kurose, I., Higuchi, H., et al. Rat Kupffer cell-derived nitric oxide suppresses proliferation and induces apoptosis of syngeneic hepatoma cells. *Gastroenterology*, 111(4):1058-1070, 1996.
26. 郁仁存. 中醫腫瘤學, 上海, 上海과학기술출판사, pp 1-22, 41-44, 384-391, 1991.
27. 저수금, 惡性腫瘤中醫調理四法, 上海중의약잡지, 7, 33-34, 1992.
28. 趙健斌. 吳一純教授治療晚期惡性腫瘤的經驗, 陝西醫學, 14, 451-453, 1993.
29. Wanebo, H.J., Falkson, S.E. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, vol.1. Lippincott, London, pp 836-870, 1989.
30. Chiarugi, V., magneil, L., Cinelli, Basi G. Apoposis and the cell cycle. *Cell. Mol. Biol. Res.* 40:603-612, 1994.
31. Antonsson, B., Martinou, J.C. The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res*, 256, 50-57, 2000.
32. Qui, D.K., Ma, X., Peng, Y.S. Chen, X.Y. Significance of cyclooxygenase-2 expression in human primay hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 8, 815-817, 2002.
33. Chen, Q., Yang, G.W., An, L.G. Apoptosis of hepatoma cells SMMC-7721 induced by Ginkgo biloba seed polysaccharide. *World J Gastroenterol*, 8, 832-836, 2002.
34. Koga, H., Sakisaka, S., Ohishi, M., Kawaguchi, T., Taniguchi, E., Sasatomi, K., Harada, M., Kusabab, T., Tanaka, M., Kimura, R., Nakasima, Y., Nakasima, O., Kojiro, M., Kurohiji, T., Sata, M. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor defifferentiation, *Hepatology* 29, 688-696, 1999.