

蘇木이 사람 간암 세포주인 HepG2의 세포사멸에 미치는 영향과 그 경로

김판준, 윤현정, 이영태, 서교수, 박선동
동국대학교 한의과대학 방제학교실

ABSTRACT

The effects of Somok on apoptosis of human liver cancer HepG2 cell.

Kim Pan Jun, Yun Hyun Joung, Lee Young Tae, Seo Kyo Soo, Park Sun Dong
Department of Herbal pharmacology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

The purpose of this study was to investigate the anticancer effects of *Caesalpiniae Lignum* (Somok) on HepG2 cells, a human liver cancer cell line. To study the cytotoxic effect of *Caesalpiniae Lignum* methanol extract (CL-MeOH) on HepG2 cells, the cells were treated with various concentrations of CL-MeOH and then cell viability was determined by XTT reduction method and trypan blue exclusion assay. CL-MeOH reduced proliferation of HepG2 cells in a dose-dependent manner. To confirm the induction of apoptosis, HepG2 cells were treated with various concentrations of CL-MeOH. The activation of caspase 3 and the cleavage of poly ADP-ribose polymerase (PARP), a substrate for caspase-3 and a typical sign of apoptosis, was examined by western blot analysis. CL-MeOH decreased procaspase 3 level in a dose-dependent manner and induced the cleavage of PARP at concentration > 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling cascades are multi-functional signaling networks that influence cell growth, differentiation, apoptosis, and cellular responses to stress. CL-MeOH-induced MAPK activation was examined by Western blot for

교신저자 : 박선동

경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학 방제학교실

Tel : 054-770-2654 e-mail : sundong@dongguk.ac.kr

접수 : 2005/ 10/ 7 채택 : 2005/ 10/ 15

phosphorylated ERK, p38 and JNK. CL-MeOH significantly increased p38 phosphorylation and JNK phosphorylation in a dose-dependent manner. Inhibition of p38 function using the selective inhibitor SB203580 results in inhibition of apoptosis by CL-MeOH. These results suggest that CL-MeOH-induced apoptosis is MAP kinase-dependent apoptotic pathway.

These results suggest that CL-MeOH is potentially useful as a chemotherapeutic agent in human liver cancer.

Key Word : *Somok*, apoptosis, MAPK

I. 緒 論

간장은 良性 또는 악성의 세포성장이 일어나 종양이 형성될 수 있는데 종전부터 간암을 癌中癌이라고 부를 만큼 다부위의 암에 비해 그 진행속도나 예후가 극히 불량한 형태의 질환이다. 그러나 현대에 이르기까지 간에서의 종양형성을 유발하는 원인 및 발생기전에 관해 확실한 이론이 설명되지 못하고 있으며 단지 발생빈도 및 병리과정을 통해 추론 내지 단편적인 논리만이 제시되고 있을 뿐이다. 간암은 처음부터 간장에서 생기는 원발성 간암과 다른 장기에서 발생한 암이 전이(轉移)되어 생기는 속발성(전이성)간암이 있다. 한의학적으로는 황달, 협통, 적취, 고창, 충문에서 간 종양과 유사한 병증을 볼 수 있다. 치료에 있어서는 氣血瘀滯證과 熱毒內盛證으로 변증하여 氣血瘀滯證에는 活血化瘀之劑를 투여하고 熱毒內盛證에는 清熱解毒和中之劑를 투여한다¹⁾. 이에 저자는 氣血瘀滯證에 응용하는 活血化瘀之劑에 속하는 소목 추출물의 항암 효과를 살펴보고자 한다.

蘇木(Caesalpiniae Lignum)은 상록성 작은 교목으로 콩과 식물 소목(Caesalpinia sappan L.)의 마른 심재이다. 소목의 外皮 및 邊材를 제거하고 心材를 취하여別に 말려 사용한다²⁾. 味는 甘·鹹하고, 性은 平하다. 귀경은 심, 간, 비경이다. 주성분은 색소성분의 brasilin C₁₆H₁₄O₅·과 α-L-p hellandrene, ocimene을 주성분으로 하는 정유 및 tannin을 포함한다³⁾.

소목의 부탄을 추출물에 의해 Melan-a 세포의 멜라닌 생성을 억제하는 효과⁴⁾가 있고 구강암 및 골육종 세포주에 대해 항암작용이 있다⁵⁾. 또한 A549 폐암 세포주에서 caspase 3-like cysteine protease의 활성화, PARP 단백질의 분해 촉진 및 ATP 감소를 통하여 apoptosis를 유도시킴으로서 항암작용이 있는 것으로 밝혀졌다⁶⁾. 소목은 platelet count, prothrombin time, fibrinogen level에 양호하게 작용하여 혈전증 치료에도 유효하며⁷⁾, 또한 지질 과산화를 억제하고 세포의 항산화계를 자극함으로써 CCl₄에 의한 간 손상을 방어한다고 알려져 있다⁸⁾.

최근 항암 물질개발의 주요 표적으로 주목받고 있는 topoisomerase I 억제제는

DNA의 대사에서 중요한 역할을 수행하는 세포주기에 있어서 그 활성이 높을 것으로 예상되어지는 topoisomerase가 증식하는 것으로 알려져 암세포의 좋은 표적이 될 수 있다는 점을 이용한 항암 물질로서 점차 약제 개발 및 임상치료 분야에도 적용되고 있다. 소목 추출물을 대상으로 인체 암 세포주 5종에 대한 세포독성과 topoisomerase I 활성억제에 대한 효과가 있는 것으로 나타났다⁹⁾.

세포는 세포 내 전달 명령에 의하여 세포 밖의 신호를 세포 내로 전달하게 된다. 그러한 신호의 전달 변환에 의해 종종 이용되어지는 대표적인 경로에 MAPK가 위치하고 있다¹⁰⁻¹²⁾. MAPKs는 serine/threonine kinase로서 extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 MAPK, c-jun N-terminal kinase (JNK)로 구분된다¹³⁻¹⁵⁾. MAPKs의 활성은 세포 내 인산화에 의해 기인하고, 그 신호전달과정은 세 가지의 세포 내 protein kinase의 활성과정에 의해 구성되며 MAPK kinase kinase (MAPKKK)의 활성화에 의해 시작된다. 활성화된 MAPKs는 다른 protein kinase들과 핵단백질, 또는 전사인자를 활성화시켜 신호를 전달하게 된다¹⁶⁻¹⁸⁾.

이에 본 실험에서는 사람 간암 세포주인 HepG2를 선정하여 소목 추출물의 항암 효과를 조사하였다. 먼저, 세포독성 여부를 확인하기 위하여 농도별로 소목을 처리하여 XTT assay와 trypan blue exclusion assay를 수행하였으며, 세포의 형태학적 변화는 현미경을 통해 관찰하였다. 농도에 따른 세포사가 apoptosis (programmed cell death)에 의한 것인지를 확인하기 위하여 western blot을 수행하였다. 또한 세포

의 증식, 분화, 그리고 세포의 생존과 세포사멸을 포함하는 다양한 생물학적 기능을 조절한다고 알려져 있는 mitogen-activated protein kinase (MAPK)가 관여하는 지 알아 보았다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 소목 (Caesalpiniae Lignum)은 동국대학교 부속 한방병원에서 정선하여 구입하였으며, 400 g의 소목에 3배량의 80% methanol을 가한 다음 48시간 동안 추출하고, 이 과정을 2회 반복하여 여과한 후 농축하고 동결 건조하여 22.7 g (수율 : 5.7%)을 얻었다.

2) 시약

RPMI-1640, fetal bovine serum, streptomycin-penicillin 등의 세포배양용 시약들은 Gibco BRL (Grand Island, USA)사에서, 배양조는 Corning (Rochester, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 HEPES, sodium dodecyl sulfate (SDS), NP-40, CAPS, protease inhibitors 등은 Sigma (St. Louis, USA)사에서 구입하였으며, 실험에 사용된 항체인 anti-caspase 3는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)사에서, anti-PARP, anti-P-ERK1/2, anti-P-p38은 Cell signaling사에서 구입하였다. 또한 실험에 사용된 시약 중 p38 MAPK의 저해제인 SB203580은 Sigma (St. Louis, USA)에서 구입하였다. Enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit

t는 Oxford, UK에서, protein assay reagent는 Bio-Rad (Hercules, USA)사에서 구입하였으며, 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

2. 방법

1) 세포배양

사람 간암 세포주인 HepG2 (human liver cancer cell, KCLB)을, 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 RPMI-1640 배지에서 5% CO₂, 37°C 배양조에서 배양하였다.

2) XTT assay

소목의 메탄올 추출물 (CL-MeOH)에 의한 세포 세포독성을 알아보기 위해 XTT assay를 수행하였다. Well당 1×10^5 의 cell을 96 well plate에 분주하고 serum free media로 16시간동안 starvation 시킨 후, 소목을 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. Well당 100 μ l의 XTT (Roche, USA) labeling mixture (5 ml XTT labeling reagent + 0.1 ml electron coupling reagent)를 처리하여 4시간 반응시킨 후, micro plate reader (DYNEX, Opsys MR)를 이용하여 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다. 약제가 갖는 흡광도를 보정하기 위하여 세포를 썬 배지를 같이 배양하여 대조군과 실험군의 흡광도를 비교 보정하여 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

3) 생존 세포 수 측정

60 mm 배양조에 1×10^6 cells/ml로 세포를 심고 serum free media로 16시간동안

starvation 시킨 후, 소목 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. Trypsin-EDTA를 처리하고 원심분리하여 세포들은 모아서 trypan blue dye (0.4%)로 염색하여 hemacytometer를 이용하여 생존한 세포의 수를 측정하였다.

4) Western blot analysis

전기영동을 위한 단백질 시료의 추출은 처리 시간별로 세포를 ice-cold tris buffered saline (TBS; 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl)으로 3회 수세한 후 lysis buffer (TBS, 1% NP-40, 1 mM sodium orthovanadate, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin 및 1 mM PMSF)를 넣어 4°C에서 20분간 반응시키고 12,000 \times g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 모았다. 동일한 양의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리시킨 후, 단백질을 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 이 membrane을 항체의 비특이적 결합을 차단하기 위하여 blocking buffer (5% non-fat milk와 0.1% Tween 20을 함유한 TBS 용액)에서 1시간 동안 반응시킨 후 각 검증 단백질에 대한 항체를 가하여 1~2시간 동안 반응시켰다. 이어서 0.1% Tween 20을 함유한 TBST 용액으로 10분씩 3차례 수세한 다음, peroxidase-conjugated anti-mouse IgG 혹은 anti-rabbit IgG를 secondary antibody로 반응시켰다. 이어서 ECL system으로 반응 시킨 후 X-ray film상에서 단백질을 검증하였다. 각 시료의 단백질 정량은 Bradford protein assay kit를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 실시하였다.

Ⅲ. 實驗結果

1. 소목 추출물의 HepG2 세포에 대한 독성

소목 추출물의 세포독성에 관해 알아보기 위하여 간암세포주인 HepG2 세포에 다양한 농도 (50~400 $\mu\text{g/ml}$)로 24시간동안 처리하여 XTT assay 와 trypan blue exclusion assay를 수행하였다. XTT assay 결과, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서부터 세포에 대한 독성을 나타내었으며 (Figure 1), trypan blue 염색을 통해 관찰한 결과 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 control의 76.3% 생존율을 보였고 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 44.2%까지 생존율이 감소하였다 (Figure 2).

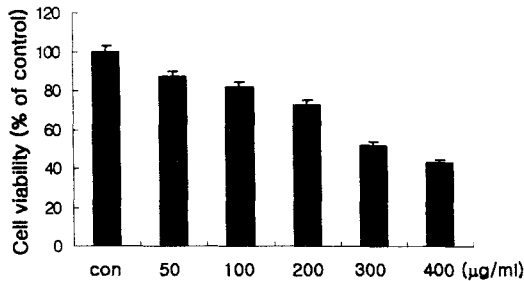


Figure 1. Effect of CL-MeOH on the rate of cell viability of the HepG2 cells. HepG2 cells were incubated in the absence or presence of the various concentrations of CL-MeOH for 24 hrs. Cell viability was measured by XTT assay as described in Materials and methods. Data were chosen from six independent triplicate experiments. Values are mean \pm S.D.

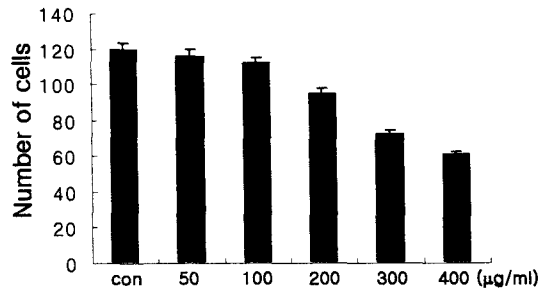


Figure 2. Effect of CL-MeOH on cell viability of the HepG2 cells.

Cell viability was determined by trypan blue exclusion assay as described in Materials and Methods. Data were chosen from six independent triplicate experiments. Values are mean \pm S.D.

2. 소목 추출물에 의한 HepG2 세포의 형태적 변화

소목 추출물 처리 시 HepG2 세포의 형태적으로 어떠한 변화가 나타나는지 관찰하였다. 50~400 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 24시간 동안 처리한 후, 현미경을 통해 관찰한 결과, 처리한 소목 추출물의 농도가 증가할수록 관찰되는 세포의 수가 감소하였고 200 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 세포의 형태적 변화를 통해 세포사를 관찰할 수 있었다 (Figure 3).

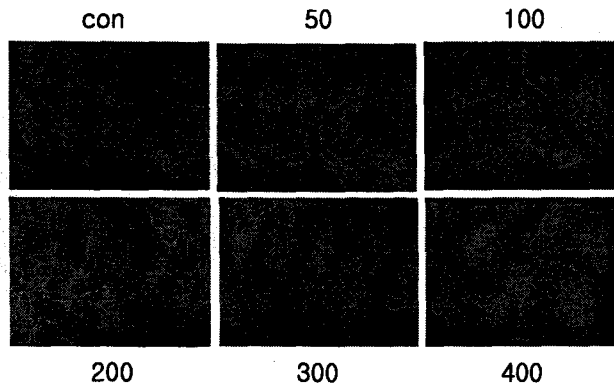


Figure 3. Morphological changes of HepG2 cells.

CL-MeOH exposed cells undergoing apoptosis are shown by their characteristically shrunken cytosol, nuclear condensation. CL-MeOH treated cells showed more apoptotic cells with condensed and fragmented nuclei.

3. 소목 추출물에 의한 HepG2의 세포사멸 유도

소목 추출물에 의한 세포사가 apoptosis 인지 확인하기 위하여 HepG2 세포에 소목을 농도별로 처리하여 세포사멸의 진행 정도를 알아보았다. 세포는 세포사멸 과정동안 회복 기능을 상실하게 되는데, 여기에 중요한 polymerase가 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)이다. 이 PARP의 절단이 곧 세포사멸을 확인할 수 있는 하나의 지표가 된다. 또한 PARP의 upstream reg

ulator로서 caspase 3가 존재한다. 이에 western blot을 통해 caspase 3의 발현양상과 PARP의 cleavage를 관찰하였다. 그 결과, 200 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 세포사멸이 유도되는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 4). 또한 PARP의 upstream regulator인 procaspase 3가 소목 추출물의 농도가 증가함에 따라 점점 감소함을 볼 수 있었다 (Figure 4). 이로써, 소목 추출물에 의해 HepG2 세포의 apoptosis가 유도되는 것을 확인할 수 있었다.

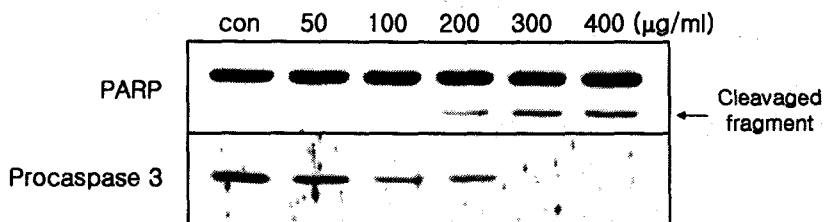


Figure 4. CL-MeOH-induced apoptosis.

HepG2 cells were incubated in the absence or presence of various concentrations of CL-MeOH for 24 hrs. The cleavages of PARP and the reduction of procaspase-3 were detected by Western blot.

4. 소목 추출물에 의한 Mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 활성 변화

Mitogen-activated protein kinase (MAPK)는 세포의 증식, 분화, 그리고 세포의 생존과 세포사멸을 포함하는 다양한 생물학적 기능을 조절한다고 알려져 있다. 소목 추출물처리 시, MAP kinase의 활성화

어떠한 변화가 있는지 알아보기 위하여 anti-P-ERK1/2와 anti-P-p38을 이용한 western blot을 수행하였다. 그 결과, 농도의존적으로 P-p38 MAP kinase와 P-JNK가 증가하는 것을 확인하였다. 반면, P-ERK1/2의 발현에는 변화가 관찰되지 않았다 (Figure 5).

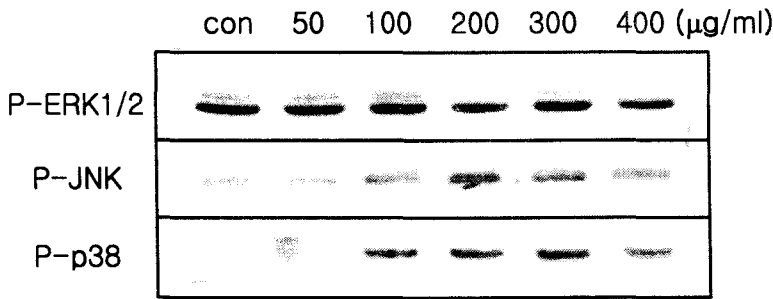


Figure 5. Changes of the activities of MAPs during CL-MeOH-induced apoptosis. HepG2 cells were incubated in the absence or presence of various concentrations of CL-MeOH for 24 hrs. MAPKs activation was analyzed by Western blot.

5. p38 MAP kinase의 활성화에 따른 세포사멸의 변화

소목 추출물 처리 시 p38 MAP kinase의 인산화가 증가하는 것으로 보아 이때 증가한 P-p38이 소목 추출물에 의한 apoptosis와 관련이 있을 것으로 생각되어 p38 MAP kinase의 specific inhibitor인 SB203580을 소목과 cotreat한 후, apoptosis가 유

도에 어떠한 변화가 나타나는지 알아보았다. 그 결과, SB203580에 의해 p38의 인산화가 억제되었을 경우 PARP의 cleavage가 관찰되지 않았고 procaspase-3의 감소도 나타나지 않았다 (Figure 6). 이로써, 소목 추출물에 의해 증가된 p38 MAP kinase의 활성화에 의해 HepG2 세포의 apoptosis가 유도되는 것으로 볼 수 있다.

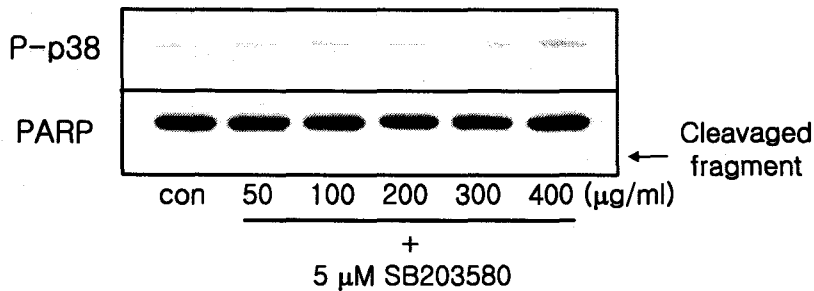


Figure 6. Inhibition of P-p38 by a specific inhibitor, SB203580, lead to inhibit the fragmentations of PARP and procaspase 3.

HepG2 cells were cotreated with CL-MeOH and 5 μ M SB203580 for 24 hrs. The cleavages of PARP and the expression of procaspase 3 were analyzed by Western blot.

IV. 考 察

모든 악성종양은 인체의 생리상 불필요한 증식성의 생물로서 악성으로 팽창할 뿐만 아니라, 더욱 확산, 전이된다. 동양의학에서는 종양과 유사한 증으로 積을 들고 있는데, 그것은 正氣가 부족하고 邪氣가 正氣를 上廻하여 陰陽이 失調함으로써 氣滯, 鬱血, 痰飲 등이 積聚되어 형성된다고 설명하고 있다¹⁹⁾.

간암은 한의학적으로 황달, 적취, 험통, 고창, 충문에서 살펴볼 수 있다. 난경 오십육난에서는 “脾之積 名曰痞氣 在胃脘 腹大如盤 久不愈則 令人四肢不收 發黃疸 飲食不爲肌膚”라 하여 간암의 임상표현과 가장 유사한 병증을 기재하고 있다. 즉, 六鬱과 七情所傷으로 인하여 氣血이 허약해졌을 때에 起居不節하거나 勞力過度하면 六氣가 內侵하고 또한 飲食過度로 인하여 胃腸이 腸滿하면 胃腸의 絡脈이 損傷하여 瘀血이 內溢하게 되며, 內溢된 瘀血이 腸外部로 溢出하여 외부에 있던 寒冷한 津液과 相搏

하면 并合凝結하며 癥積痞塊가 형성되는 것이다²⁰⁾. 그러므로 간에서 종양이 형성되는 원인은 정기부족, 육율, 칠정소상, 기거부절, 음식부절, 노력과도 등의 복합적인 상호 연계작용에 의해 이루어지는 것으로 볼 수 있다.

소목은 味는 甘·鹹하고, 性은 平하며, 귀경은 심, 간, 비경이다. 약리작용을 살펴보면 止血, 行血祛瘀, 通絡止痛작용이 있다. 소목 추출물은 A549 폐암 세포주에서 caspase 3-like cysteine protease의 활성화, PARP 단백질의 분해 촉진 및 ATP 감소를 통하여 apoptosis를 유도시킴으로써 항암작용이 있는 것으로 밝혀졌다. 또한 소목은 platelet count, prothrombin time, fibrinogen level에 양호하게 작용하여 혈전증 치료에 유효하다.

Apoptosis는 능동적이고 자발적인 반응으로 programmed cell death라고 표현하기도 한다. 1972년 Kerr 등이 쥐 유방암 세포가 죽는 것을 관찰한 후 이를 shrinkage necrosis라고 표현하였는데, 그 후 그리스어인 apo (off)와 ptosis (falling)의 합성

어로서 apoptosis라고 처음 명명하게 되었다. 정상적인 조직에서 apoptosis의 조절에 이상이 생기게 되면 세포의 증식과 사멸의 균형이 깨어지게 되어 악성 종양으로 변형된다²¹⁻²³. 따라서 암세포의 apoptosis를 인위적으로 유도함으로써 세포의 증식을 억제할 수 있다. 이에 본 실험에서는 소목의 메탄올 추출물이 사람 간암 세포의 apoptosis를 유도할 수 있는 지 알아보았다. 먼저 소목 추출물이 간암 세포주인 HepG2의 세포사를 일으킨다는 것을 확인하였고, 이러한 세포사가 apoptosis에 의한 것인지 알아보기 위하여 anti-procaspase 3와 anti-PARP를 사용하여 western blot을 수행하였다. Caspase는 cystinyl aspartate-specific protease로 active site에 cysteine을 가지고 있으며, sequence specific proteolytic activity를 가지게 됨으로써 활성화되게 되고, 이로 인해 세포의 DNA 복제 및 유전자 발현과 관련된 단백질 및 핵의 구조 유지, 세포의 항상성 유지 등과 관련된 단백질들을 파괴시키거나 관련된 단백질을 활성화시켜 apoptosis를 유도하게 된다²⁴⁻²⁶. Caspase 3는 특이적인 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD) sequence에서 PARP의 절단을 조절한다고 알려져 있는데²⁷, 소목 추출물에 의한 procaspase 3의 발현 감소와 PARP의 cleavages를 관찰함으로써 apoptosis가 유도된다는 것을 확인할 수 있었다.

MAP kinase family (MAPK)는 serine/threonine kinase로서, extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 MAPK, c-jun N-terminal kinase (JNK)로 구분된다. MAPKs는 세포의 증식, 분화, 그리고 세포의 생존과 세포사멸을포함한 다양한 생물

학적 기능을 조절한다고 알려져 있다²⁸⁻²⁹. MAPK의 활성화는 세포내 인산화에 의해 기인한다. MAPK의 활성화과정은 빠르게 이루어짐으로써 세포가 환경적 변화에 적절하게 반응할 수 있도록 해 준다. ERK1/2는 세포 내에서 광범위하게 발현되고, 유사분열과 감수분열의 조절, postmitotic 기능에 관여하며, 성장인자와 cytokine, 바이러스 감염, 형질전환 물질, carcinogen 등과 같은 많은 자극에 의해 활성화 된다³⁰⁻³¹. p38 MAP kinase는 네 가지의 동위효소를 가지고 있으며 stress, heat shock, radiation 등과 같은 일련의 자극에 의해 활성화되어 염증반응, apoptosis, 세포 분화 등 다양한 생물학적 반응을 유도한다고 알려져 있다³²⁻³⁴. c-jun N-terminal protein kinase (JNK)는 두개의 p46 JNK1과 p54 JNK2로 구성되며, 세포 밖의 여러 자극에 의해 전사인자인 c-jun의 N-terminal에 존재하는 Ser63과 Ser73 domain을 인산화 시킴으로써 활성화시키게 된다³⁵.

이에 본 연구에서는 소목 추출물이 HepG2 세포 내의 MAPKs활성변화에 어떠한 영향을 주는 지 알아보았다. 소목 추출물을 24시간 처리 시, P-ERK1/2의 변화는 거의 나타나지 않았고 P-JNK1과 P-p38은 농도 의존적으로 증가하였다. MAP kinase의 이러한 활성 변화로 보아 증가된 P-p38이 소목 추출물에 의한 apoptosis와 연관성이 있을 것으로 생각되어 p38의 특이적 저해제인 SB203580을 cotreat한 후 PARP의 발현양상을 조사하였다. 그 결과 소목 추출물에 의해 증가되는 p38의 활성을 저해하였을 때 PARP의 cleavages가 거의 관찰되지 않은 것으로 보아, 소목 추출물에 의해 증가된 p38의 활성이 HepG2 세

포의 apoptosis를 유도하는 데에 관여하는 것으로 볼 수 있었다.

이러한 실험 결과들로 보아, 소목의 메탄을 추출물은 사람 간암 세포주인 HepG2의 apoptosis를 유도하며, 이 때 유도되는 apoptosis가 증가된 p38의 활성화에 의한 것임을 알 수 있었다. 이로써 소목이 간암 치료에 효과적으로 작용할 것으로 보이며 앞으로 더 많은 실험을 통해 소목이 간암 세포내에 작용하는 분자적 기작에 관해 알아보아야 할 것이며 또한 in vivo 실험도 함께 수행해 보아야 할 것이다.

V. 結 論

소목의 메탄을 추출물에 의한 사람 간암 세포주인 HepG2의 세포사멸 유도와 그 mechanism에 관한 연구를 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 소목 추출물의 세포독성을 확인하기 위해 XTT assay와 trypan blue exclusion assay를 수행한 결과, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 세포사가 관찰되었다. 또한 현미경을 이용한 세포 형태학적 관찰을 통해서도 이와 같은 결과를 얻었다.
2. 소목 추출물에 의한 세포사가 apoptosis에 의한 것인지 확인하기 위하여 western blot을 수행한 결과, 처리한 소목 추출물의 농도에 의존적으로 세포사멸의 지표가 되는 PARP cleavages가 확인되었고 PARP의 upstream regulator인 caspase 3를 관찰한 결과, procaspase 3의 발현이 소목 추출물의 농도가 증가할수

록 점차 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

3. 소목 추출물 처리 시, MAP kinase의 활성화에 어떠한 변화가 있는지 알아보기 위하여 anti-P-ERK1/2, anti-P-p38, anti-P-JNK를 이용한 western blot을 수행하였다. 그 결과, P-ERK1/2의 변화는 거의 관찰되지 않았고, 반면 P-JNK와 P-p38 MAP kinase는 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다.
4. p38 MAP kinase의 저해제인 SB203580을 소목 추출물과 cotreat한 후, apoptosis가 유도에 어떠한 변화가 나타나는지 알아 본 결과, SB203580에 의해 p38의 인산화가 억제되었을 경우 PARP의 cleavage가 관찰되지 않았다.

이 같은 결과로 보아, 소목의 메탄을 추출물은 간암 세포주인 HepG2의 apoptosis를 유도할 수 있으며 MAP kinase의 활성화에 변화를 가져온다는 것을 확인하였다. P-ERK1/2 활성화에는 변화가 없었지만 P-JNK와 P-p38의 활성화는 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다. 이에 소목 추출물에 의해 유도되는 apoptosis가 P-p38의 증가된 활성화와 어떠한 연관이 있을 것으로 생각되어, p38 저해제인 SB203580을 함께 처리한 결과, 소목 추출물에 의해 유도되는 apoptosis가 저해되는 것을 확인하였다. 이로써, 소목 추출물에 의해 증가된 P-p38의 활성화에 의해 apoptosis가 유도될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

- 본 연구는 동국대학교 학술지원 사업 비로 이루어진 논문임.
- 본 연구는 과학기술부/한국과학재단 기초의과학연구센터육성사업의 지원으로 수행되었음 (과제번호 : R13-2005-013-01000-0).

參 考 文 獻

1. 전국한의과대학 간계내과학교수 공저. 간계 내과학. 동양의학연구원. p274-279, 1989
2. 金昌玟, 辛民教, 安德均, 李京淳. 완역 중앙대사전. 정답출판사. 제 6권:p2420-2423, 1999
3. 李尙仁, 安德均, 辛民教, 盧昇鉉, 李暎鐘, 金善熙 共譯. 한약임상응용. 정보사. p299-300, 1986
4. 천현자, 이진선, 백승화, 전병훈, 우원홍. 소목의 부탄을 추출물에 의한 Melan-a 세포의 멜라닌생성 억제효과. 생약학회지. 33(2):p130-136, 2002
5. 이종수, 김여갑, 김정희. 소목 추출물의 구강암 및 골육종 세포주에 대한 항암 작용에 관한 연구. 대한 구강 악안면외과 학회지. 2001
6. 문연자, 남용재, 이광규, 최두호, 이성원, 안성훈, 최민규, 우원홍. A549 폐암 세포주에 대한 소목 水抽出物の 세포고사 유도효과, 동의생리병리학회지. 제 16권:p521-527, 2002
7. 고승희, 전찬용, 박종형, 한양희, 김동우, 박세기, 이청정혜, 고재철, 최유경, 백은기, 홍의식, 박지윤. 도인, 소목이 Endotoxin으로 誘發된 瘀血病態모델에 미치는 影響. Korean J. Orient. Int. Med. 22(1):p39-44, 2001
8. 하헌. 소목 추출물의 항산화 및 간 보호 작용. KOR. J. ENVIRON. TOXICOL. 17(3):p261-264, 2002
9. 전원경, 박갑주, 김수영, 마진열, 성현재. Kor. J. pharmacogn. 30(1):1-6, 1999
10. Dong C, Dayis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. Ann u Rev Immunol. Oct;20(2):55-72, 2002.
11. Tamura S, Hanada M, Ohnishi M, Katsura K, Sasaki M, Kobayashi T. Regulation of stress-activated protein kinase signaling pathways by protein phosphatases. Eur J Biochem. Feb;269(4):1060-1066, 2002
12. Hofmann TG, Stollberg N, Schmitz ML, Will H. HIPK2 regulates transforming growth factor-beta-induced c-Jun NH(2)-terminal kinase activation and apoptosis in human hepatoma cells. Cancer Res. Dec;63(23):8271-8277, 2003
13. Orton RJ, Sturm OE, Vyshemirsky V, Calder M, Gilbert DR, Kolch W. Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. Biochem J. Dec;392(2):249-261, 2005
14. Kim SK, Woodcroft KJ, Oh SJ, Abdelmegeed Novak RF. Role of mechanical and redox stress in activation of mitogen-activated protein kinases in primary cultured rat hepatocytes. Bio

- chem Pharmacol. Dec;70(12):1785-1795, 2005
15. A kinetic approach towards understanding substrate interactions and the catalytic mechanism of the serine/threonine protein kinase ERK2: identifying a potential regulatory role for divalent magnesium. *Biochim Biophys Acta*. Mar 11;1697(1-2):81-87, 2004
 16. Branca M, Ciotti M, Santini D, Bonito LD, Benedetto A, Giorgi C, Paba P, Favalli C. Activation of the ERK/MAP kinase pathway in cervical intraepithelial neoplasia is related to grade of the lesion but not to high-risk human papillomavirus, virus clearance, or prognosis in cervical cancer. *Am J Clin Pathol*. Dec;122(6):902-911, 2004
 17. Marella M, Gaggioli C, Batoz M, Deckert M, Tartare-Deckert S, Chabry J. Pathological prion protein exposure switches on neuronal mitogen-activated protein kinase pathway resulting in microglia recruitment. *J Biol Chem*. Jan 14;280(2):1529-1534, 2004
 18. Choi JH, Park SH, Leung PC, Choi KC. Expression of leptin receptors and potential effects of leptin on the cell growth and activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab*. Jan;90(1):207-210, 2005
 19. 전국한외과대학 간계내과학교수 공저. 간계 내과학. 동양의학연구원. p274, 1989
 20. 전국한외과대학 간계내과학교수 공저. 간계 내과학. 동양의학연구원. p274-279, 1989
 21. Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia*. Feb;18(2):189-218, 2004
 22. Liu Y, Kulesz-Martin M. Programmed cell death in the ovary: insights and future prospects using genetic technologies. *Carcinogenesis*. Jun;22(6):851-860, 2001
 23. Capello F, Branes L. Synovial sarcoma and malignant mesothelioma of the pleura: review, differential diagnosis and possible role of apoptosis. *Pathology*. May;33(2):142-148, 2001
 24. Prunet C, Lemaire-Ewing S, Menetrier F, Neel D. Activation of caspase-3-dependent and -independent pathways during 7-ketocholesterol- and 7 β -eta-hydroxycholesterol-induced cell death: A morphological and biochemical study. *J Biochem Mol Toxicol*. Nov;19(5):311-326, 2005
 25. Shi Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci*. Aug;13(8):1979-1987, 2004
 26. Kreuter M, Langer C, Kerkhoff C, Raddanna P, Kania AL, Maddika S, Chlichlia K, Bui TN. Stroke, myocardial infarction, acute and chronic inflammatory diseases: caspases and other

- r apoptotic molecules as targets for drug development. *Arch Immunol Ther Exp.* May;52(3):141-155, 2004
27. Decker P, Muller S. Modulating poly (ADP-ribose) polymerase activity: potential for the prevention and therapy of pathogenic situations involving DNA damage and oxidative stress. *Curr Pharm Biotechnol.* Sep;3(3):275-283, 2002
 28. Ley R, Balmanno K, Hadfield K, Weston C, Cook SJ. Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. *J Biol Chem.* May;278(21):18811-18816, 2003
 29. Apati A, Janossy J, Brozik A, Bauer PI, Magocsi M. Calcium induces cell survival and proliferation through the activation of the MAPK pathway in a human hormone-dependent leukemia cell line, TF-1. *J Biol Chem.* Mar;278(11):9235-9243, 2003
 30. Craxton A, Draves KE, Gruppi A, Clark EA. BAFF regulates B cell survival by downregulating the BH3-only family member Bim via the ERK pathway. *J Exp Med.* Nov;202(10):1363-1374, 2005
 31. Xie J, Qian J, Yang J, Wang S, Freeman MF 3rd, Yi Q. Critical roles of Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling and inactivation of p38 MAP kinase in the differentiation and survival of monocyte-derived immature dendritic cells. *Exp Hematol.* May;33(5):564-572, 2005
 32. Holasek SS, Wengenack TM, Kandimalla KK, Montano C, Gregor DM. Activation of the stress-activated MAP kinase, p38, but not JNK in cortical motor neurons during early presymptomatic stages of amyotrophic lateral sclerosis in transgenic mice. *Brain Res.* May;1045(1-2):185-198, 2005
 33. Zhang H, Vollmer M, De Geyter M, Durrenberger M, De Geyter C. Apoptosis and differentiation induced by staurosporine in granulosa tumor cells is coupled with activation of JNK and suppression of p38 MAPK. *Int J Oncol.* Jun;26(6):1575-1580, 2005
 34. Jiang C, Kim KH, Wang Z, Lu J. Methyl selenium-induced vascular endothelial apoptosis is executed by caspases and principally mediated by p38 MAPK pathway. *Nutr Cancer.* May;49(2):174-183, 2004
 35. Hassanzadeh P, Ahmadiani A. Nitric oxide and c-Jun N-terminal kinase are involved in the development of dark neurons induced by inflammatory pain. *Synapse.* Nov;59(2):101-106, 2005