

# 복분자가 U937세포의 apoptosis에 미치는 효과

이광규 · 한종현<sup>1</sup> · 오찬호<sup>2\*</sup>

우석대학교 한의과대학, 1: 원광대학교 한의과대학, 2: 우석대학교 식품생명공학과

## Effects of *Rubus Coreanus Miquel* on the Apoptosis of U937 Cells

Kwang Kyu Lee, Jong Hyun Han<sup>1</sup>, Chan Ho Oh<sup>2\*</sup>

College of Oriental Medicine, Woosuk University, 1: College of Oriental Medicine, Wonkwang University, 2: Department of Food & Biotechnology, Woosuk University

Methanol extracts of *Rubus Coreanus Miquel* (RCM) were found to exhibit apoptosis induction of U937 human histiocytic leukemia cells. Treatment of RCM exerted strong cytotoxicity against U937 human leukemia cells. RCM induced apoptosis of U937 leukemia cells in a dose dependent manner. Nitric oxide (NO) production was increased in RCM-treated RAW264.7 macrophage cell line. RCM increased the p53 and NFκB gene and decreased the IκB gene expression in U937 cells. RCM also increased the NFκB protein expression, but decreased the PCNA and Bcl-xL protein expression in cultured U937 cells. These data suggest that RCM are effective on the apoptosis induction of human leukemia cells and anti-cancer properties.

Key words : *Rubus Coreanus Miquel*, apoptosis, p53, NFκB, Bcl-xL, PCNA

### 서 론

복분자(覆盆子 : *Rubus Coreanus Miquel*)는 장미과(Rosaceae)에 속하는 낙엽, 활엽의 덩굴성식물로서 주로 열매를 사용한다. 열매는 핵과가 모여서 반달모양의 검은 복과를 형성하며 5-6월에 장미색으로 개화하고 7-8월에 열매가 성숙되어 붉은색으로 익다가 흑색으로 완숙된다. 한방에서는 복분자 딸기나무의 미숙과를 복분자라 부르며 補肝腎,明目, 이뇨제의 효능과 정력감퇴, 유정, 빈뇨증의 치료에 사용하고 있다<sup>1)</sup>. 주성분으로서 triperpene 배당체, phenol화합물로 항산화활성을 나타내는 quercetin, anthocyanin 등이 동정되었으며<sup>2)</sup>, 주된 생리활성에 대한 연구보고로서는 항산화활성<sup>3)</sup>, 면역활성<sup>4,5)</sup>, 알레르기 억제효과<sup>6)</sup> 등의 결과가 보고되어 있지만 암세포의 apoptosis에 관련한 연구는 거의 보고되지 않은 상황에서 본 연자 등이 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 1. 계대배양 세포주

\* 교신저자 : 오찬호, 원주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 식품생명공학과

· E-mail : choh@woosuk.ac.kr, · Tel : 063-290-1431

· 접수 : 2009/11/16 · 수정 : 2009/11/30 · 채택 : 2009/12/11

실험에 사용한 세포주는 한국세포주은행(KCLB)에서 분양받은 U937(human histiocytic leukemia) 백혈병세포를 사용하였으며 37℃의 CO<sub>2</sub>배양기(5% CO<sub>2</sub>, 95% Air)내에서 배양하였다.

#### 2. 시약 및 기구

실험에 사용한 시약은 RPMI1640배지, fetal bovine serum (FBS), phosphate buffered saline (PBS), propidium iodide (PI), ethidium bromide(EB), triton X-100, RNase A, proteinase K 등은 Sigma, Nonidet NP-40 (Amresco), Taq DNA polymerase, M-MLV reverse transcriptase, Oligo (dT), PCR marker (Promega), dNTP set (Amersham), anti-rabbit p53 antibody, PCNA (FL-261) rabbit polyclonal IgG antibody, goat anti-rabbit IgG-HRP antibody, Coomassie Blue R-250(Santa Cruz) 등이며 사용기기로는 ELISA reader (Molecular Device, VERSAmax), flow cytometer (Coulter, EPICS-XL), PCR system (Takara, PCR Thermal cycler Dice), 전기영동장치(Mupid-21) 등을 사용하였다.

#### 3. 검액의 조제

본 실험에 사용한 복분자(*Rubus Coreanus Miquel*)는 고창 군농업기술센터 복분자 시험장에서 제공받아 사용하였으며, 완숙열매 500 g을 메탄올로 추출한 후, 여과한 여액을 rotary

evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결 건조하여(이하 RCM이라 함) 세포배양시에는 멸균 PBS에 용해시켜 사용하였다.

4. 세포증식능 측정<sup>7)</sup>

MTT법에 의해 U937세포 배양계에 RCM (1~100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 첨가하여 48시간 동안 37°C의 CO<sub>2</sub>배양기 내에서 배양하였다. 배양 종료 4시간 전에 5 mg/ml 농도로 DPBS-A(pH 7.4)에 희석한 MTT용액 20  $\mu\text{l}$ 를 각 well에 첨가하고, 0.1 N HCl에 녹인 10% SDS 100  $\mu\text{l}$ 로 용해시켜 18시간 동안 은막지로 빛을 차단하였다. 발색된 각 well의 흡광도를 ELISA reader를 이용해서 570 nm에서 측정하고 대조군의 흡광도와 비교하여 세포생존율을 백분율로 환산하였다.

5. Apoptosis 측정

U937세포 배양계에 RCM (1~100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 첨가한 후, 24시간 동안 배양한 다음, 세포를 수집, 세정 ( $\times 3$ 회, 1,500 rpm, 5분)하였다. 이 후 침전시킨 세포분획에 PI(10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 20  $\mu\text{l}/1 \times 10^6$  세포의 농도로 염색 (4°C, 30분)한 다음 flow cytometer (Coulter, EPICS XL; excitation: 488 nm, emission: 620 nm)를 이용하여 Sub-G1 peak를 정량하였다<sup>8)</sup>. 또한 단편화된 DNA의 확인은 검체에 100  $\mu\text{l}$ 의 nuclear lysis buffer(50 mM Tris-HCl, 0.5% SDS, 10 mM EDTA, pH 8.0)를 가하여 4°C에서 10 분간 방치하고, 16,000 rpm으로 20 분간 원심분리한 후 상층액을 별도의 원심관에 취하였다. RNase A(20 mg/ml) 2  $\mu\text{l}$ 를 가해 37°C에서 1 시간 동안 배양한 후 다시 20 mg/ml의 proteinase K액(20 mg/ml) 2  $\mu\text{l}$ 를 가해 37°C에서 1 시간 동안 배양하고 5 M NaCl 20  $\mu\text{l}$ 와 isopropyl alcohol 120  $\mu\text{l}$ 를 가해 -20°C에서 over night시켰다. 16,000 rpm으로 20분 원심분리해서 상층액을 제거하고, TE buffer 20  $\mu\text{l}$ 에 용해하여 1.2% agarose gel 전기영동(minigel: Mupid-II, 50V, 2시간)후 ethidium bromide(10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 염색하고 단편화된 DNA를 정성적으로 확인한 후 gel documentation reader로 판독하였다<sup>9)</sup>.

6. Nitric oxide (NO) 측정<sup>10)</sup>

Griess방법에 준하여 RAW264.7세포를  $5 \times 10^5$  세포/ml로 조정하여 12 well plate의 각 well에 부착시킨 후, 검체를 농도별로 처리하였다. 37°C의 CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 24시간 동안 배양한 후 NO를 측정하였다. NO측정은 Griess시약 (1% sulfanilamide, 0.1% N-naphtyl- ethylenediamine · 2HCl/2.5% phosphoric acid)을 사용하여 570 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하고 미리 작성한 NaNO<sub>2</sub>의 검량선에 의해 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 농도를 환산하였다.

7. RT-PCR<sup>11)</sup>

U937세포 배양계에 RCM (0.1~100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 첨가하여 24 시간 동안 배양한 후, 각각의 세포로부터 RNA를 분리하여 p53유전자 및 NF $\kappa$ B/I $\kappa$ B유전자를 확인하였다. Total RNA는 easy-BLUE를 이용하며 제조회사의 방법에 준하였다. cDNA는 Maxime RT

PreMix (Oligo dT primer)를 사용하여 합성하고, Maxime RT PreMix (i-starTaq)를 이용하여 TaKaRa PCR thermocycler (DICE)에서 증폭하였다. 각각의 cycle은 95°C에서 30초간 denaturation시킨 후, 55°C에서 30초간 annealing시키고, 72°C에서 30초간 extension시켰다. PCR 산물은 1% agarose gel상에서 전기영동하고, ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

8. Western blotting<sup>12)</sup>

U937세포 배양계에 RCM (1~100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 첨가한 후, 24시간 동안 배양하고 PRO-PREP (Intron)을 사용하여 단백질을 분리하였고, 분리방법은 제조회사의 방법에 준하였다. 분리된 단백질은 Coomassie blue R-250을 이용한 Bradford법을 사용하여 정량하였고, Western blot analysis를 위해 단백질 20  $\mu\text{g}$ 을 12.5% SDS-PAGE를 실행한 다음, nitrocellulose membrane으로 transfer한 후, 5% Non-Fat Dry Milk로 18시간 동안 blocking하고, PCNA rabbit polyclonal IgG antibody (1:1000 dilution)로 1차 염색하여 4°C에서 1시간 동안 반응시키고, goat anti-rabbit IgG-HRP conjugated antibody로 2차 염색하여 동일한 방법으로 반응시켜 X-ray 필름을 enhanced chemiluminescence (ECL)법으로 감광하였다.

9. 통계처리<sup>13)</sup>

모든 실험결과는 mean $\pm$ S.E.로 나타내었고 통계처리는 Student's t-test를 실시하여, p<0.05이하를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

1. U937세포의 세포독성

U937백혈병세포 배양계에 RCM (1~100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 첨가해서 세포 증식능을 살펴본 결과, U937 백혈병세포의 증식을 농도 의존적으로 감소시켰다(Fig. 1). 이 결과는 RCM이 사람 백혈병세포의 증식을 억제하는 이른바 항암활성을 보유하고 있음을 나타내는 것이다.

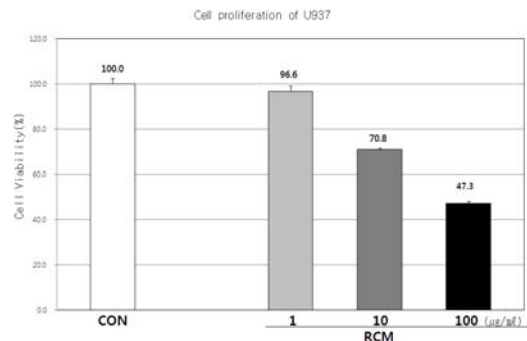


Fig. 1. Effect of the RCM on the proliferation of U937 human histiocytic leukemia cell. Sample was added into the cultured leukemia cell line at indicated concentration and cultured for 48 hours at 37°C. The proliferation of the cells was assayed by MTT method. Each bar represents the mean $\pm$ SE of three determinations.

2. U937세포의 아포토시스 유도

U937세포 배양계에 RCM (1~100 µg/ml)을 첨가해서 flow cytometer를 이용하여 sub G1 peak를 측정할 결과, RCM는 U937세포의 apoptosis를 농도 의존적으로 유의성 있게 촉진시키는 결과를 관찰하였으며 DNA단편화를 확인하기 위하여 DNA laddering의 발현 유무를 전기영동을 시행하여 재확인하였다 (Fig. 2A, 2B). 이러한 결과는 RCM이 백혈병세포의 apoptosis를 촉진시켜 항암활성을 나타내는 것을 확인한 중요한 결과이다.

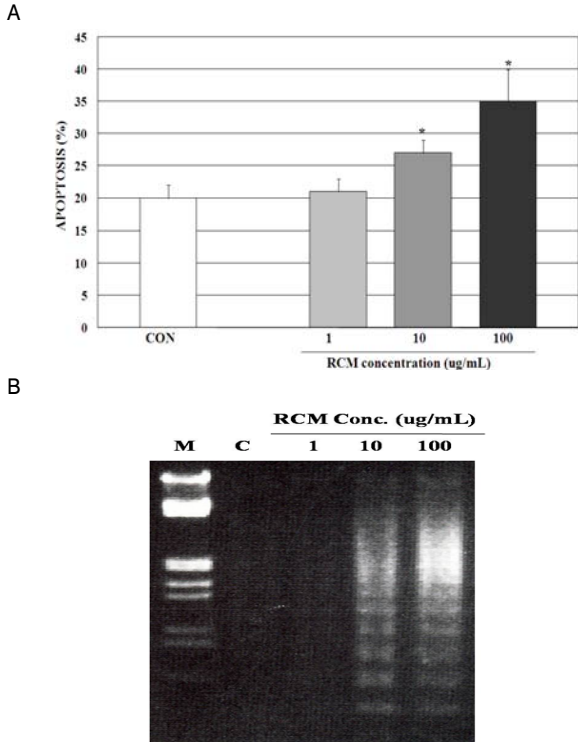


Fig. 2. Effect of the RCM on the DNA fragmentation of U937 leukemia cell line. Sample were treated to cultured U937 leukemia cell lines, incubated for 24 hours, and then cells were collected and the DNA fragmentation (Sub-G1 peak) was measured by a flow cytometer staining with propidium iodide(A). DNA laddering pattern(B). The data represents the mean±S.E of 3 experiments. \*: Significantly different from control group(\*\*p<0.05)

3. RAW264.7세포에서의 NO생성

Macrophage cell line인 RAW264.7세포 배양계에 RCM (1~100 µg/ml)을 처리하고 NO생성을 살펴본 결과, RCM 10 및 100 µg/ml의 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는 NO생성의 증가가 관찰되었다(Fig. 3). 이 결과는 RCM이 대식세포에서 생성되는 NO를 증가시킴으로써 항암활성을 나타내는 것이라 추정되는데, 이는 항암성분인 flavone-8-acetic acid와 xantherone-4-acetic acid가 대식세포를 활성화시키며 NO생성이 촉진되어 항암작용을 한다는 보고<sup>14)</sup>와도 잘 부합되며, 생체 내에서 NO는 가스상의 신호전달물질로서 vasodilating agent, neurotransmitter로서의 작용 외에 세균이나 암세포에 대한 비특이적 면역반응을 하는 효능물질로 알려져 있고, 특히 생쥐에서는 대식세포와 호중구 등의 식세포에서 주로 분비되며, T세포에서 분비하는 cytokine을 조절하는 인자로도 잘 알려져 있다<sup>15)</sup>.

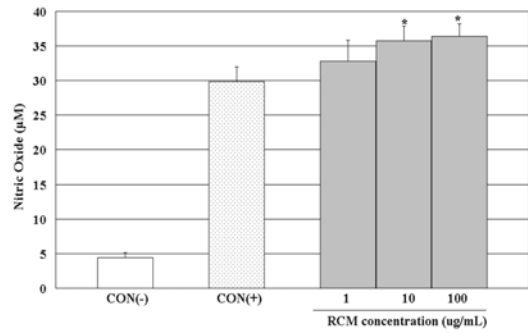


Fig. 3. Effect of the RCM on the nitric oxide production from RAW264.7 macrophage cell line. Sample was added into the cultured RAW264.7 macrophage cell line and incubated in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C for 24 hours. The OD of each well was measured at 570 nm with a ELISA reader. Nitric oxide standard curve were measured with NaNO<sub>2</sub>. Each bar represents the mean±SE of three determinations. \*: Significantly different from control group(\*\*p<0.05)

4. RT-PCR 결과

RCM이 p53 및 NFκB/IκB유전자 발현에 미치는 효과를 검토하기 위하여 U937세포 배양계에 RCM (0.1~100 µg/ml)을 첨가하여 배양한 결과, 대조군에 비하여 p53 및 NFκB유전자의 발현이 농도 의존적으로 증가되었으며 IκB유전자의 발현은 감소되고 있음을 확인하였다(Fig. 4). 이는 RCM이 종양억제유전자인 p53유전자 및 세포신호전달 인자인 NFκB유전자의 발현을 증가시켜 항암작용을 발휘하고 있음을 확인시키는 중요한 결과라 추정된다. p53유전자는 암세포의 아포토시스를 비롯하여 광범위하게 종양억제에 관여하는 유전자로 알려져 있으며, NF-κB는 면역, 염증 스트레스, 세포증식 및 아포토시스를 조절하는데 관여하는 전사인자로 알려져 있다<sup>16-18)</sup>.

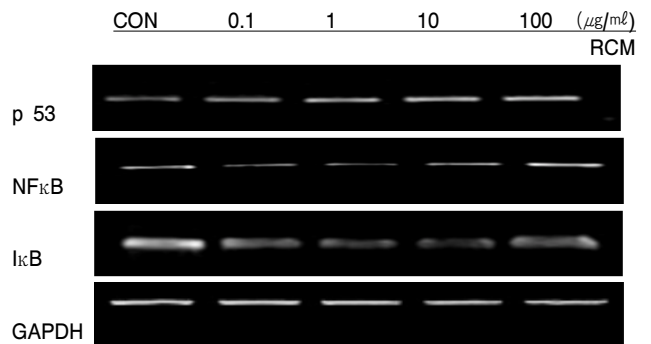


Fig. 4. Effect of the RCM on the mRNA expression of p53 and NF-κB/IκB gene in U937 cell. Treatment of RCM for 24 hours leads to increase the expression of p53 and NFκB gene in U937 leukemia cells. Poly(A+)RNA isolated from untreated cells(CON) and cells treated with RCM for 24 hours.

5. Western blot analysis

U937세포 배양계에 RCM (1~100 µg/ml)을 첨가해서 48시간 동안 배양한 다음 NFκB, PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 및 Bcl-xL단백질의 발현을 Western blot으로 확인해 본 결과, 대조군에 비하여 RCM첨가군에서 NFκB단백질은 농도 의존적으로 증가되었으나 PCNA 및 Bcl-xL 단백질 발현은 농도 의존적으로 감소되었다(Fig. 5). NF-κB는 자연면역과 염증반응에

있어서 중심적인 역할을 담당하는 조절단백이며, 다양한 세포표면의 수용체들이 NF-κB 신호체계를 활성화시키는데, 염증성 cytokine인 TNF-α나 IL-1의 수용체가 리간드와 결합하게 되면 NF-κB의 signaling pathway를 활성화시켜 염증반응을 증폭하는 것으로 알려져 있다<sup>19)</sup>. NF-κB는 평상시 세포질의 억제단백질인 IκB와 결합되어 있다가 활성화가 될 경우 억제단백으로부터 떨어져 나와 세포질로부터 핵으로 들어간 후 염증반응에 관여하는 수많은 유전자들의 전사를 유도한다<sup>20)</sup>. 또한 PCNA 단백질은 세포증식에 다량으로 발현하는 증식세포핵항원으로 상기 결과는 UV조사에 의해 PCNA가 증가하고 p53단백질이 발현된다는 연구보고 등<sup>21)</sup>과 유사한 결과라 할 수 있다. 본 연구결과에서 RCM이 U937백혈병 세포에서 세포증식에 관여하는 PCNA 단백질을 억제하여 항암활성을 나타내는 것으로 추정된다.

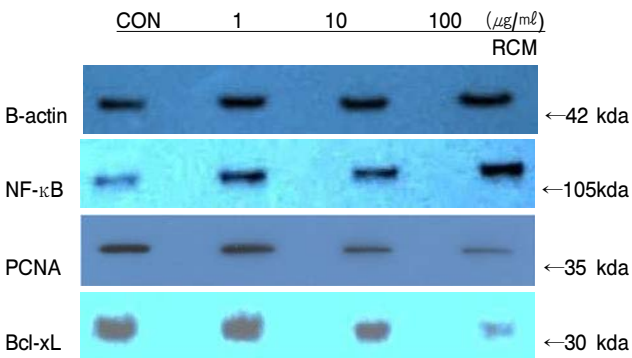


Fig. 5. Western blot analysis of RCM on the expression of NF-κB, PCNA and Bcl-xL in U937 leukemia cell. Treatment of RCM for 48 hours leads to increase the expression of NFκB protein but decrease the expression of the PCNA and Bcl-xL protein expression in U937 cell. Lane 1: CON(negative control), Lane 2: RCM 1 μg/ml, Lane 3: RCM 10 μg/ml, Lane 4: RCM 100 μg/ml

## 결론

복분자 메탄올추출물 (RCM)은 U937백혈병세포의 증식을 유의성 있게 억제함과 동시에 U937세포의 apoptosis를 농도 의존적으로 증가시켰다. RCM은 대식세포주인 RAW264.7세포에서의 NO생성을 촉진시켰으며, p53 및 NFκB유전자의 발현은 농도 의존적으로 증가시켰고 IκB발현은 감소시켰다. 또한, RCM을 처리한 세포에서의 NFκB단백질의 발현은 증가되었으나 PCNA 및 Bcl-xL 단백질 발현은 농도 의존적으로 감소되었다. 이상의 결과에서 복분자는 대식세포에서 생성되는 NO를 경유해서 p53유전자를 활성화시키며 NFκB의 활성화 촉진 및 PCNA, Bcl-xL 단백질의 활성을 억제하여 이른바 백혈병세포에 대한 apoptosis를 유도하여 항암활성을 증가시키는 것으로 추정된다. 이 결과는 장래 복분자의 항암 치료시 병용요법제로서의 개발에 대한 기초 근거 자료가 될 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2009년도 우석대학교 교내 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

## 참고문헌

1. Cha, H.S., Lee, M.K., Hwang, J.B., Park, K.M. Physicochemical characteristics of *Rubus coreanus* Miquel. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 30(6):1021-1025, 2001.
2. 윤 인, 위지향, 문제학, 안태희, 박근형. 복분자열매에서 항산화활성을 지닌 quercetin의 분리 및 동정. *한국식품과학회지* 35(3):499-502, 2003.
3. 최 먼, 신건재, 최근표, 도재호, 김중대. 흰쥐의 항산화활성에 미치는 홍삼, 삼백초, 복분자 추출물의 상승효과. *한국약용작물학회지* 11(2):148-154, 2003.
4. 원경숙, 이태원, 은재순, 송정모. 복분자가 생쥐의 특이적 면역반응에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 17(3):656-661, 2003.
5. 이택렬, 김대근, 소준노, 권 진, 송정모, 은재순, 복분자 미숙과 및 성숙과가 생쥐의 복강 Macrophages에 미치는 영향. *대한동의병리학회지* 17(4):991-995, 2003.
6. Guang-zhao Li, 채옥희, 송창호. 생체실험에서 복분자의 compound 48/80에 의한 아나필락틱 속과 혈관투과성 증가의 억제효과. *대한체질인류학회지* 17(2):99-107, 2004.
7. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods*, 65: 55-63, 1983.
8. Telford, W.G., King, L.E. and Fraker, P.J. Evaluation of glucocorticoid-induced DNA fragmentation in mouse thymocytes by flow cytometry. *Cell Prolif.*, 24: 447-459, 1991.
9. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, G. and Riccardi, C.A. Rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, 139: 271-279, 1991.
10. Kondo, Y. and Takano, F. Nitric oxide production in mouse peritoneal macrophage enhanced with glycyrrhizin. *Biol. Pharm. Bull.* 17(5):759-761, 1994.
11. Miyashita, T. and Reed, J.C., Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80: 293-299, 1995.
12. W. Neil Burnette. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A". *Analytical Biochemistry*, 112(2):195-203, 1981.
13. Dowdy, S. and Wearden, S. *Statistics for research*, Wiley, New York, p 262, 1983.
14. Thomsen, L.L., Ching, L.M. and Baguley, B.C. Evidence for the production of nitric oxide by activated macrophages treated with the antitumor agents flavone-8-acetic acid and xantherone-4-acetic acid. *Cancer Res.*, 51: 6073-6078, 1991.
15. Liew, F.Y., Li, Y., Severn, A., Millott, S.M., Schmidt Salter, M. and Moncada, S. A possible novel pathway of

- regulation by murine T helper type-2(Th2) cells of a Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthetase on macrophages. *Eur. J. Immunol.* 21: 2489-2494, 1991.
16. Kastan, M.B., Canman, C.E. and Leonard, C.J. p53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Cancer Metas. Rev.* 14(1):3-15, 1995.
17. Floryk, D. and Huberman, E. Differentiation of androgen-independent prostate cancer PC-3 cells is associated with increased NF- $\kappa$ B activity, *Cancer Res.* 65(24):11588-11596, 2005.
18. Dai, Y., Rahmani, M. and Grant, S. An intact NF- $\kappa$ B pathway is required for histone deacetylase inhibitor-induced G1 arrest and maturation in U937 human myeloid leukemia cells, *Cell Cycle*, 2: 467-472, 2003.
19. Barnes, P.J., Karin, M. Nuclear Factor- $\kappa$ B-a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl. J Med.*, 336: 1066-1071, 1997.
20. Jacobs, M.D., Harrison, S.C. Structure of an I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B Complex. *Cell* 95(6):749-758, 1998.
21. Scott, M., Bonnefin, P., Vieyra, D., Boisvert, F.M., Young, D., Bazett-Jones, D.P. and Riabowl, K. UV-induced binding of ING1 to PCNA regulates the induction of apoptosis, *Journal of Cell Science*, 114: 3455-3462, 2001.