

## 인체 혈구암세포에 대한 丹仙湯 추출물의 증식억제 및 세포사멸 유도에 관한 연구

김성환, 박상은, 홍상훈  
동의대학교 한의과대학 한방내과학교실

### Anti-proliferative and Pro-apoptotic Effects of *Dan-Seon-Tang* in Human Leukemia Cells

Seong-hwan Kim, Sang-eun Park, Sang-hoon Hong  
Dept. of Oriental Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dong-Eui university

#### ABSTRACT

**Objectives :** This study investigated the biochemical mechanisms of anti-proliferative and pro-apoptotic effects of the water extract of *Dan-Seon-Tang* (DST) in human leukemia U937 cells.

**Methods :** U937 cells were exposed to DST and growth inhibition was measured by MTT assay.

**Results :** Exposure of U937 cells to DST resulted in the growth inhibition in a concentration-dependent manner. This inhibitory effect was associated with morphological changes and apoptotic cell death such as formation of apoptotic bodies, increased populations of apoptotic-sub G1 phase and induction of DNA fragmentation. The induction of apoptotic cell death in U937 cells by DST was associated with up-regulation of death receptor 4 (DR4) and down-regulation of Bid, surviving and cellular inhibition of apoptosis protein-2 (cIAP-2) expression. DST treatment also induced the proteolytic activation of caspase-3, caspase-8 and caspase-9, and a concomitant degradation of caspase-3 substrate proteins such as poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), phospholipase (PLC)- $\gamma$ 1,  $\beta$ -catenin and DNA fragmentation factor 45/inhibitor of caspase activated DNase (DFF45/ICAD). Furthermore, apoptotic cell death by DST was significantly inhibited by caspase-3 specific inhibitor z-DEVD-fmk, demonstrating the important role of caspase-3.

**Conclusions :** These findings suggest that herb prescription DST may be a potential chemotherapeutic agent for the control of human leukemia U937 cells; further study is needed to identify the active compounds.

**Key words :** human leukemia, apoptosis, *Agrimonia pilosa* Ledeb, *Codonopsis pilosula*(Fr.) Nannf, *Salviae multiorrhizae* Radix

#### 1. 緒 論

인체에서 정상적으로 조절되지 않으며 침윤 및 전이를 유발하는 질병으로 모든 사망원인 중 약

1/3 정도를 차지하고 있는 암은 산업의 발달과 식생활의 서구화에 따라 급격하게 증가되고 있는 추세이지만, 아직도 암의 발생기전이 명확히 밝혀져 있지 않아서 난치성 질병으로 분류되고 있다<sup>1</sup>.

혈액암은 골수에서 유발되는 급성 림프구성 백혈병과 과립성 백혈구 및 단핵 백혈구에서 발병하는 골수성 백혈병으로 나누어지며 치료가 어렵고 재발의 확률도 매우 높은 것으로 보고되어지고 있

· 교신저자: 홍상훈 부산시 부산진구 양정로62  
동의대학교 부속 한방병원 한방1내과  
TEL: 051-850-8810 FAX: 051-867-5162  
E-mail: shhong@deu.ac.kr

다<sup>2-4</sup>. 그러나 혈액암의 치료를 위하여 현재 사용되어지고 있는 다양한 종류의 항암제들은 개개인에 따라서 약리작용이 다르게 나타나고, 독성에 의한 부작용이 문제점으로 지적되고 있다.

仙鶴草(*Agrimonia pilosa* Ledeb)는 장미과에 속한 다년생 초본인 길신나물(龍牙草) 및 동속식물의 쏜초를 건조한 것으로, 味가 苦澁微甘하고 氣는 平하며 收斂止血, 補虛止痛, 殺蟲의 효능이 있어<sup>5</sup> 瘡毒을 흠어지게 하고 初期의 乳癰 癰疽 結毒에 복용하여 소염시키고 통증을 완화시키는 데 주로 사용되어져 왔다<sup>6</sup>.

黨蔘(*Codonopsis pilosula*(Fr.) Nannf.)은 蔓蔘이라고도 하며 saponin 과 alkaloid, sucrose 등이 포함되어 있으며 性은 平, 無毒하고 味는 甘하고 脾經과 胃經에 歸經하며 補中 益氣 生津의 효능으로 脾胃虛弱, 氣血兩虧, 體倦無力, 食少, 口渴, 久瀉, 脫肛에 사용하는 補氣藥이다<sup>7</sup>.

丹蔘(*Salviae miltiorrhizae* Radix)은 꿀풀과에 속한 다년생 초본인 丹蔘의 根과 根莖을 건조한 것으로 性味는 微寒, 苦하고 肝經에 歸經하며 活血 祛瘀, 涼血消癰의 效能이 있어 癥瘕積聚, 癰瘡腫毒을 치료한다<sup>8</sup>.

丹仙湯은 仙鶴草, 黨蔘, 丹蔘으로 구성된 처방으로 급성기를 지난 紫斑症에 부작용이 없이 효과를 발휘하여 동의대학교 부속한방병원 내과에서 활용이 빈번한 처방이다. 仙鶴草, 黨蔘 및 丹蔘은 한의학에서 많이 사용되어지고 있으나 현재까지 발표된 연구 결과들을 살펴보면 이들 약물의 항암작용 및 그에 따른 분자생물학적 기작에 관하여 아직까지 정확하게 알려진 바는 없다.

본 연구는 丹仙湯의 항암효과를 검증하기 위하여 설계되었다. 丹仙湯 추출물이 인체혈구암세포인 U937 세포의 증식에 미치는 영향, 증식억제 현상이 apoptosis에 어떠한 영향을 미치는 지를 조사하기 위하여 extrinsic pathway 및 intrinsic pathway에 관여하는 몇 가지 중요한 유전자들의 발현 변화에 대한 유의적인 결과를 얻었기에 이를 보고하

는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 시료준비

본 실험에 사용된 약재는 (주)옵니허브를 통하여 구입하였으며, 黨蔘, 丹蔘은 중국 감숙성, 仙鶴草는 경남에서 채취한 것으로 丹仙湯의 처방구성 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1). 丹仙湯 추출물(water extract of *Dan-Seon-Tang*, 이하 DST 라 칭함)을 얻기 위하여 약재 1 g당 증류수 10 ml을 가하여 환류 냉각장치가 장착된 가열기에서 180-200 °C의 온도로 3시간 동안 끓인 후 이를 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 찌꺼기를 제거하고 상층액만 분리하였다. 분리된 상층액을 Whatman 필터(No. 2)로 걸러내고 감압 농축과정 및 동결건조를 통하여 고형성분을 얻어내어 막자사발로 마쇄하고 밀봉시켜 -70 °C 초저온 냉동고에 보관하였으며, 실험 시에는 3차 증류수를 이용하여 100 mg/ml의 농도로 만들고 이를 0.2 μm의 pore size를 가진 syringe filter(Sartorius stedim biotech, Germany)를 이용하여 미생물 및 불순물을 걸러낸 배지에 희석하여 처리하였다.

Table 1. Prescription of *Dan-Seon-Tang* (DST).

藥物名	生藥名	用量 (g)
仙鶴草	<i>Agrimonia pilosa</i> Ledeb	100
黨蔘	<i>Codonopsis pilosula</i> (Fr.) Nannf	20
丹蔘	<i>Salviae miltiorrhizae</i> Radix	20

### 2. 실험재료

본 실험에서 mRNA 분석을 위하여 Bioneer(Taejeon, Korea)에서 구입한 primer를 사용하였으며, 단백질 분석을 위하여 사용된 TRAIL, DR4, DR5, Fas, FasL, Actin, Bcl-2, Bcl-XL, Bax, Bad, Bid, survivin, XIAP, cIAP-1, cIAP-2, caspase-3, caspase-8, caspase-9, PARP, PLC-γ1, β-catenin, iNOS, COX-1, COX-2, c-myc.

hTERT 및 Sp1 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, DFF40/CAD 및 DFF45/ICAD 항체와 caspase-3의 활성을 억제하기 위하여 사용된 caspase-3 specific inhibitor인 z-DEVD-fmk는 CalBiochem(San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. Immunoblotting을 위해 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Life Science Corp.(Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다. 또한 caspases의 *in vitro* 활성 측정을 위한 colorimetric assay kits는 R&D Systems(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다.

### 3. 세포의 배양

실험에 사용한 인체혈구암세포인 U937 세포는 American type culture collection(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양 받았으며 90%의 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL)에 2mM glutamine(Gibco BRL), 100 U/ml penicillin(Gibco BRL), and 100 $\mu$ g/ml streptomycin(Gibco BRL)이 포함된 성장 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C의 조건하에서 배양하였다. 또한 Bcl-2가 과발현된 U937/Bcl-2 세포는 계명대학교 의과대학 권택규 교수로부터 분양 받았고 0.7  $\mu$ g/ml geneticin(G418 sulfate, Calbiochem)을 첨가하여 배양하였으며 48시간마다 적정수의 세포를 제거한 후 새로운 배지를 첨가하여 재배양하였다.

### 4. Hemocytometer를 이용한 세포 생존율의 측정

DST에 의한 세포의 생존율을 측정하기 위하여 세포 배양용 6 well plate에 암세포를 5 × 10<sup>4</sup> 개/ml의 개수로 well 당 2 ml씩 분주한 다음 DST을 적정농도로 처리하여 배양하였다. 48시간 후 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 배지를 제거하고 phosphate-buffered saline(PBS)를 각 well 당 1 ml을 첨가하여 세포를 부유시킨 다음 0.5%

trypan blue solution(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)을 동량으로 섞은 후 2분간 처리한 후 도립 현미경(inverted microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 살아있는 세포를 계수하였으며, 이에 따른 결과를 Microsoft Excel program을 사용하여 분석하였다.

### 5. MTT assay에 의한 세포 성장억제 조사

MTT assay를 이용하여 DST이 세포의 성장에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하기 위하여 세포 배양용 6 well plate에 U937 인체혈구암세포를 5 × 10<sup>4</sup> 개/ml로 분주하고 DST을 배지로 희석하여 적정 농도로 처리한 후 배양하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt(MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 시약을 0.5 mg/ml 농도로 배지에 희석하여 2 ml씩 분주하고 37 °C에서 3시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 dimethylsulfoxide(DMSO, Sigma)를 1 ml씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 96 well plate에 200  $\mu$ l씩 옮겨서 ELISA reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 세 번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 Microsoft EXCEL program을 사용하여 분석하였다.

### 6. 도립 현미경을 이용한 세포의 성장과 형태의 관찰

DST에 의한 암세포의 성장 정도와 형태의 변화 정도를 살펴보기 위하여 세포 배양용 100 mm dish에 세포를 10<sup>5</sup>개/ml 정도로 분주한 후 DST을 적정 농도로 희석 처리하여 배양하였다. 48시간 경과 후 DST 처리농도에 따른 성장 정도와 형태의 변화를 도립 현미경(inverted microscope)을 이용하여 200 배의 배율로 관찰하였다.

### 7. DAPI staining에 의한 세포핵의 형태 관찰

Apoptosis가 유발되었을 경우 나타나는 핵의 형

태적 변화를 관찰하기 위하여 정상 및 DST이 처리된 배지에서 배양된 세포를 모은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 37% formaldehyde 용액과 PBS를 1 : 9의 비율로 섞은 fixing solution을 모아진 세포에 500  $\mu$ l 첨가하여 충분히 섞은 후, 상온에서 10분 동안 고정하였다. 다시 2,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 fixing solution을 제거하고 PBS 200  $\mu$ l를 넣어서 충분히 섞은 후, 세포가 포함되어 있는 PBS 80  $\mu$ l를 slide glass 위에 떨어뜨리고 1,000 rpm에서 5분간 cytospin하여 세포를 slide glass에 부착하였다. 세포가 부착된 slide glass를 PBS로 2~3회 정도 세척하고 0.2%의 Triton X-100(Amresco, Solon, OH, USA)을 첨가하여 상온에서 10분간 고정한 후 다시 PBS로 세척하고 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI, Sigma) 용액을 세포가 고정된 slide glass 위에 떨어뜨린 후 빛을 차단하고 상온에서 15분간 염색시켰다. 염색이 끝난 후 PBS로 DAPI 용액을 세척하고 증류수로 세척한 다음 absolute alcohol을 이용하여 탈수과정을 거친 slide glass 위에 mounting solution을 처리한 후 형광 현미경(Carl Zeiss)을 이용하여 400배의 배율로 각 농도에 따른 암세포의 핵의 형태 변화를 관찰하였다.

#### 8. Flow cytometry 분석

정상 및 DST이 함유된 배지에서 48시간 동안 처리된 세포들을 모은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 PBS를 이용하여 2-3회 세척하였다. 준비된 세포에 Cycle TEST PLUS DNA REAGENT Kit(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 고정 및 염색을 하여 4  $^{\circ}$ C 암실에서 30분 동안 반응을 시켰다. 반응시킨 세포를 35 mm mesh를 이용하여 단일세포로 분리한 후 FACS Calibur(Becton Dickinson)를 이용하여 형광반응에 따른 Cellular DNA content 및 histogram을 Cell Quest software(Becton Dickinson) 및 Modifit LT(Becton Dickinson)

프로그램으로 분석하였다.

#### 9. DNA fragmentation의 분석

Apoptosis 유발되었을 경우 확인할 수 있는 DNA fragmentation 현상의 분석을 위하여 DST이 함유된 배지에서 48시간 동안 처리된 세포들을 모은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 상층액이 제거된 세포에 850  $\mu$ l의 lysis buffer [5 mM Tris-HCl(pH 7.5), 5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100]를 첨가하여 4  $^{\circ}$ C에서 30분간 lysis 시킨 다음 14,000 rpm, 4  $^{\circ}$ C에서 20분간 원심 분리하여 상층액 750  $\mu$ l를 회수하였다. 회수된 상층액에 proteinase K solution(Sigma)를 0.5 mg/ml의 농도로 처리한 다음 50  $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 반응시킨 후 750  $\mu$ l의 phenol : chloroform : isoamyl alcohol 혼합 용액(25 : 24 : 1, Sigma)을 첨가하고 30분간 rotate시킨 다음 14,000rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 여기서 얻어진 상층액 600  $\mu$ l에 300  $\mu$ l의 isopropanol(Sigma)과 100  $\mu$ l의 5 M NaCl를 첨가하여 4  $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 반응시킨 후, 14,000rpm, 4  $^{\circ}$ C에서 30분간 원심분리시켜 상층액을 제거하고 DNA pellet을 추출하였다. DNA pellet에 RNase A가 적당량 들어있는 TE buffer를 이용하여 녹인 후, 6X gel loading dye(Bioneer, Daejeon, Korea)를 섞어 주었다. 마지막으로 1.5% agarose gel을 만들어서 1시간 동안 50 v로 전기영동 시킨 후 ethidium bromide(EtBr, Sigma)로 염색하여 DNA fragmentation 현상을 확인한 다음 자외선하에서 사진 촬영하였다.

#### 10. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의한 mRNA의 분석

정상 및 DST이 48시간 동안 처리된 암세포에 TRIzol reagent(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 1 ml을 첨가하여 4  $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시킨 후 다시 200  $\mu$ l의 chloroform(Sigma)을 첨가하여 다시 4  $^{\circ}$ C에서 30분 동안 반응시켰다. 14,000 rpm, 4  $^{\circ}$ C

에서 15분간 원심분리시켜 400  $\mu$ l의 상층액을 분리하여 동량의 isopropanol(Sigma)을 첨가하여 4  $^{\circ}$ C에서 30분 동안 반응시킨 후 14,000 rpm, 4  $^{\circ}$ C에서 30분간 원심분리시켜 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 DEPC water(Amresco)를 이용하여 녹이고 정량한 후, 각각의 primer, DEPC water 그리고 ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit(Intron, Korea)를 넣고 Mastercycler gradient(Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 역전사 및 증폭하였다. 각 PCR 산물들을 양적 차이를 확인하기 위하여 1X TAE buffer로 1% agarose gel을 만들고 well 당 각각의 primer에 해당하는 PCR 산물에 DNA gel loading solution을 섞어서 loading 한 후 100 v에서 전기영동을 하였다. 전기영동으로 DNA 분리가 끝난 gel을 EtBr를 이용하여 염색한 후 자외선하에서 확인하고 Imaging analyzer(KOMA, Korea)를 이용하여 사진 촬영을 하였다. 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 internal control로 사용하였다.

#### 11. Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

상기와 동일한 방법으로 처리된 세포들을 원심분리를 이용하여 모은 다음 PBS로 2-3회 세척하였다. 이렇게 모아진 세포에 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl(pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 5 mM dithiothreitol(DTT)]를 첨가하여 4  $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상층액에 있는 total 단백질을 분리하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 정량한 다음 동량의 Laemmli sample buffer(Bio-Rad)를 섞어서 sample을 만들었다. 이렇게 만든 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate(SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후, 분리된 단백질을 함유한

acrylamide gel을 nitrocellulose membrane(Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시켰다. 분리된 단백질이 전이된 nitrocellulose membrane을 5% skim milk를 함유한 PBS-T(0.1% Tween 20 in PBS)에 담구어 상온에서 1시간 정도 incubation하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 PBS-T로 15분(5분간 3번)정도 세척하였다. 준비된 membrane에 1차 항체를 처리하여 상온에서 2시간 이상 또는 4  $^{\circ}$ C에서 over night 시킨 다음 PBS-T로 세척(15분간 1번, 5분간 5번)하고 처리된 1차 항체에 맞는 2차 항체(PBS-T로 1:1500으로 희석하여 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 다시 PBS-T로 세척(10분간 4번)하고 Enhanced Chemiluminescence(ECL) slution (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 발현 양을 비교 분석하였다.

#### 12. *In vitro* caspases activity 측정

Apoptosis 유발에 중요한 역할을 하는 caspases의 활성화 정도를 알아보기 위하여 정상 및 DST이 함유된 배지에서 48시간 동안 처리된 세포를 모은 다음 상기와 동일한 방법으로 단백질을 추출하고 정량하였다.

150  $\mu$ g의 단백질이 함유된 50  $\mu$ l의 sample에 기질 100  $\mu$ M이 함유된 reaction buffer [40 mM HEPES (pH 7.4), 20% glycerol(v/v), 1 mM EDTA, 0.2% NP-40 and 10 mM DL-DTT] 50  $\mu$ l를 혼합하여 각 sample 당 총 volume이 100  $\mu$ l가 되게 하였다. 여기에 caspase 종류에 따른 기질 5  $\mu$ l를 첨가하여 37  $^{\circ}$ C, 암실에서 3시간 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm의 흡광도를 이용하여 반응의 정도를 측정하였다.

실험에 사용된 기질은 caspase-3의 경우에는 Asp-Glu-Val-Asp(DEV D)-p-nitroaniline(pNA)이었고 caspase-8의 경우에는 Ile-Glu-Thr-Asp(IETD)-pNA

이었으며, caspase-9은 Leu-Glu-His-Asp(LEHD)-pNA였다.

### III. 結果

#### 1. DST이 암세포의 생존율에 미치는 영향

DST의 처리에 따른 인체혈구암세포인 U937 세포의 생존율을 알아 보기 위하여 DST을 적정농도로 48시간 동안 처리한 후, hemocytometer로 살아 있는 세포의 수를 계수하여 확인하였다.

0.3 mg/ml의 농도까지는 생존율에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났지만, 0.4 mg/ml의 농도에서부터 급격한 생존율의 감소가 유발되어 0.5 mg/ml 처리군에서는 약 65%의 생존율 감소 현상이 관찰되었으며, 고농도 처리군인 0.6 mg/ml 이상 처

리군에서는 DST에 의하여 U937 세포가 거의 생존하지 못하는 것으로 조사되었다(Fig. 1A).

#### 2. DST이 암세포의 증식에 미치는 영향

DST이 인체혈구암세포인 U937 세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보기 위하여 시료 처리 48시간 경과 후 MTT assay를 이용하여 확인하였다.

0.3 mg/ml의 농도까지는 증식억제효과가 크게 나타나지 않았지만, 0.4 mg/ml의 농도에서 약 50% 정도의 급격한 증식억제효과가 나타나기 시작하며, 0.5 mg/ml의 농도에서는 약 70% 정도의 증식억제효과가 나타났다. 또한 0.6 mg/ml 처리군 이상에서는 U937 세포의 증식이 거의 일어나지 않은 것으로 나타났다(Fig. 1B).

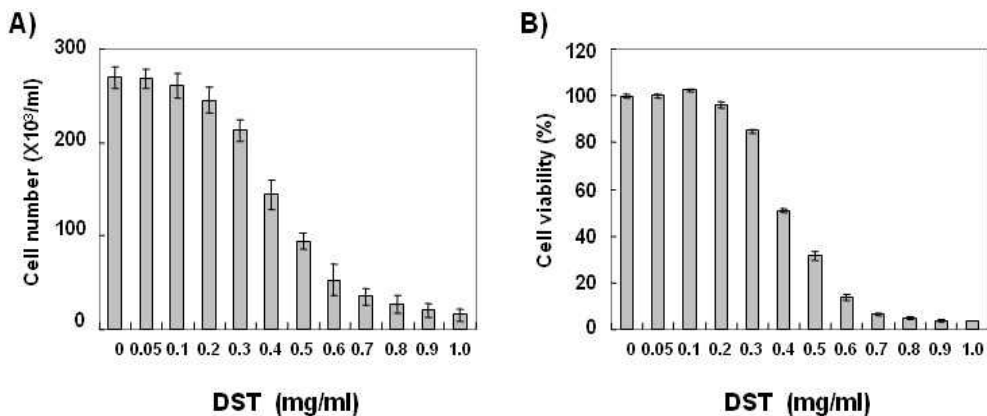


Fig. 1. Inhibition of cell viability and growth of human leukemia U937 cells after treatment with DST.

U937 cells were seeded at  $1 \times 10^5$ /ml in a 6-well plate and treated with variable concentrations of DST for 48 hours. (A) Cell number and (B) viability were determined by hemacytometer counts of trypan blue excluding cells and metabolic-dye-based MTT assay, respectively. The data shown are means  $\pm$  standard deviations of three independent experiments.

#### 3. DST이 암세포의 형태변화에 미치는 영향

DST 처리에 의한 암세포의 생존율 감소 및 증식억제 현상이 U937 세포의 형태에 어떠한 영향을 미치는지를 상기와 동일한 시간동안 시료를 처리

후 도립현미경을 이용하여 200배의 배율로 관찰하였다.

0.3 mg/ml의 처리군까지는 형태적인 변화가 거의 나타나지 않았지만, 0.4 mg/ml 농도에서부터 전체

적인 세포의 밀도가 감소하였고 심한 형태적 변형이 관찰되었다(Fig. 2).

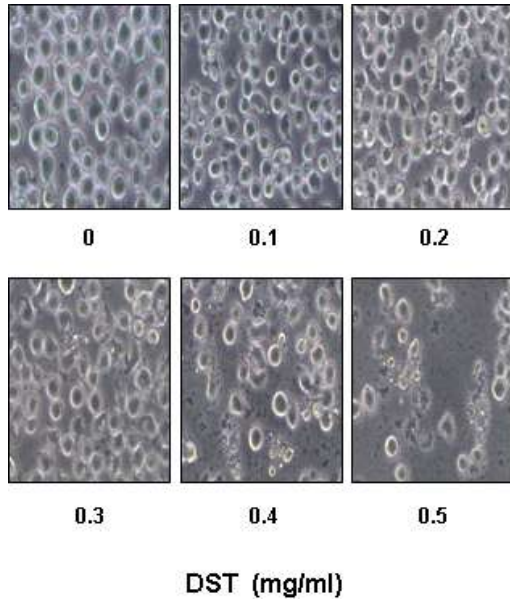


Fig. 2. Morphological changes of human leukemia U937 cells after treatment with DST.

U937 cells were seeded at  $1 \times 10^5$ /ml in a 6-well plate and treated with variable concentrations of DST for 48 hours. Cell morphology was visualized by an inverted microscopy. Magnification,  $\times 200$ .

#### 4. DST이 핵의 형태변화에 미치는 영향

DST 처리에 의해 유발되는 생존율 감소, 증식 억제 및 형태변화가 apoptosis 유발과 연관성이 있는지를 조사하기 위하여, apoptosis 유발 시 특이하게 관찰되는 핵의 형태변화를 조사하였다. 이를 위하여 정상 및 DST이 처리된 배지에서 48시간 동안 배양된 U937 세포를 고정시킨 후 DAPI 염색을 실시하여 형광현미경하에서 관찰하였다.

정상 및 0.3 mg/ml의 DST 처리군까지는 전체적인 핵의 밀도 및 형태의 변화가 관찰되지 않았지만, 0.4 mg/ml 처리군에서부터는 핵의 밀도 감소와 더불어 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 염색질 응축에 의한 apoptotic body가 관

찰되었다(Fig. 3).

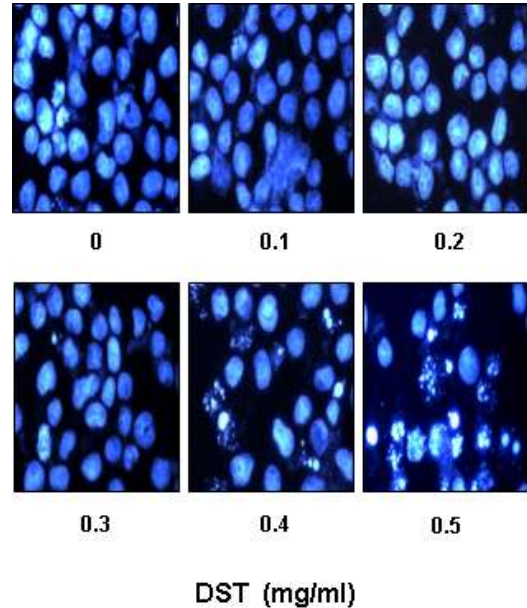


Fig. 3. Formation of chromatin condensation by DST treatment in human leukemia U937 cells.

U937 cells were treated with DST for 48 hours and then stained with DAPI solution. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescent microscope using blue filter. Magnification,  $\times 400$ .

#### 5. DST이 Sub-G1기 형성에 미치는 영향

다음은 DST 처리에 따른 U937 세포의 apoptosis 유발 정도를 정량적으로 비교 분석하기 위하여 상기와 동일한 조건으로 배양된 암세포를 대상으로 flow cytometry를 이용하여 apoptosis가 유발되었을 것으로 예상되는 sub-G1기에 해당하는 세포를 측정하였다.

정상배지에서 자란 U937 세포에서의 자연적 apoptosis 유발 빈도는 약 1.3%로 매우 낮았으며, DST 0.1, 0.2 및 0.3 mg/ml 처리군에서도 1.4, 2.5 및 4.3% 정도로 정상배지에서 자란 암세포와 큰 차이를 보이

지 않았다. 하지만 0.4 mg/ml 처리군에서는 약 15.6%, 0.5 mg/ml 처리군에서는 약 33.5% 정도의 암세포에서 apoptosis가 유발되는 것으로 나타났다(Fig. 4A, B).

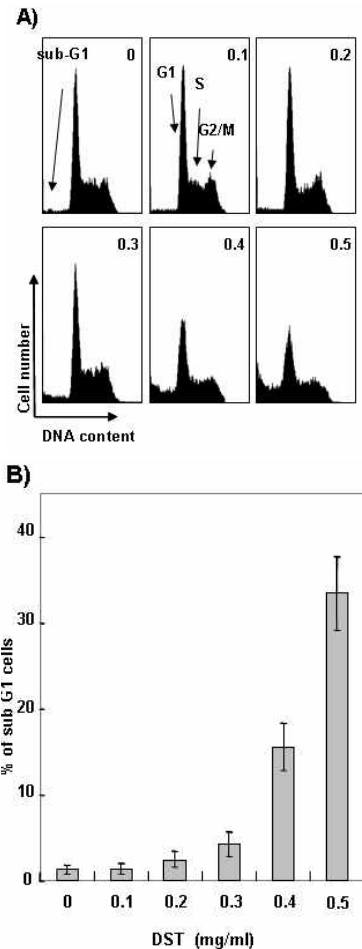


Fig. 4. Increase of apoptotic sub-G1 cell population by DST in human leukemia U937 cells.

(A) Exponentially growing cells at 50% confluency were treated for 48 hours with indicated concentrations of DST. Cells were trypsinized and pellets were collected. The cells were fixed and stained with CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit, and analyzed by flow cytometry. (B) The percentages of cells with hypodiploid DNA(sub-G1 phase) contents represent the fractions undergoing apoptotic DNA degradation. Data are means average of two separate experiments.

## 6. DST이 DNA fragmentation에 미치는 영향

Apoptosis 유발 현상의 재확인을 위하여 apoptosis 유발의 직접적인 또 다른 증거에 해당하는 DNA fragmentation 여부를 agarose gel 전기영동으로 조사하였다.

정상 및 0.3 mg/ml 처리군까지는 DNA fragmentation에 따른 DNA laddering 현상을 관찰할 수 없었지만, 0.4 mg/ml 처리군에서는 DNA가 끌리는 현상이 나타났으며, 0.5 mg/ml 처리군에서는 apoptosis가 일어난 세포들에서 볼 수 있는 DNA laddering과 일부에서 necrosis에서 볼 수 있는 smearing을 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

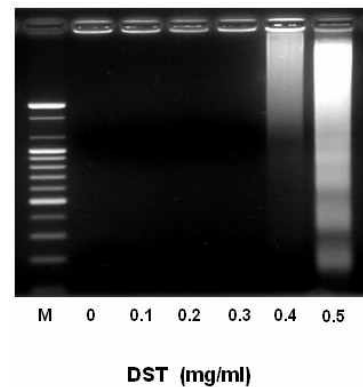


Fig. 5. Induction of DNA fragmentation by DST in human leukemia U937 cells.

U937 cells were incubated with variable concentrations of DST for 48 hours, then collected and DNA was extracted. The DNA fragmentations were separated on 1.5% agarose gel electrophoresis and visualized under UV light after staining with EtBr.

## 7. DST이 death receptor 연관 유전자들의 발현에 미치는 영향

DST 처리에 의한 apoptosis 유발 시 death receptor에 속하는 유전자들이 관여하는지를 확인하기 위하여 대표적인 death receptor 유전자 몇 가지의 발현 변화를 전사 및 번역 수준에서 조사하였다.

RT-PCR 방법으로 조사한 결과, mRNA 수준에



서는 DST 처리에 의한 발현 변화는 조사된 해당 유전자들 모두에서 관찰되지 않았다(Fig. 6A).

하지만 Western blot analysis 방법을 이용하여 단백질 수준에서의 발현 변화를 조사한 결과, TRAIL, DR5, Fas 및 FasL의 경우는 큰 변화가 나타나지 않았지만, DR4의 경우는 0.3 mg/ml의 농도에서부터 발현양의 증가가 관찰되었다(Fig. 6B).

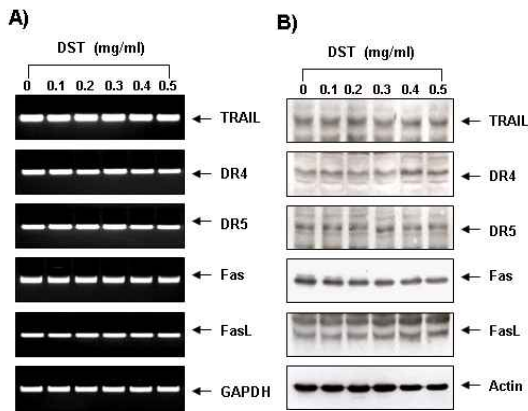


Fig. 6. Effects of DST treatment on the TRAIL, DR4, DR5, Fas and FasL expression in human leukemia U937 cells.

(A) After 48 hours incubation with DST, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

### 8. DST이 Bcl-2 family의 발현에 미치는 영향

Bcl-2 family에 속하는 유전자들의 단백질은 mitochondria 외막에 존재하는 것으로 알려져 있으며 mitochondrial membrane potential(MMP,  $\Delta\psi_m$ ) 조절에 관여함으로써 apoptosis 유발 여부를 결정

하는 것으로 알려져 있다.

Anti-apoptotic 유전자인 Bcl-2 및 Bcl-XL과 pro-apoptotic 유전자인 Bax 및 Bad의 발현은 mRNA 및 단백질 모두에서 유의적인 변화가 나타나지 않았다(Fig. 7A, B).

하지만 또 다른 pro-apoptotic 유전자로써 death receptor를 통한 caspase-8의 활성화로 인하여 단편화 현상이 유발되는 것으로 알려진 Bid 단백질의 경우 단편화된 tBid의 발현은 관찰되지 않았지만 Bid 단백질 자체의 발현이 감소하는 것으로 조사되었다(Fig. 7B).

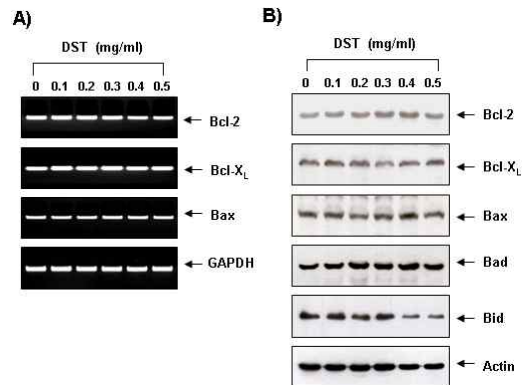


Fig. 7. Effects of DST treatment on the Bcl-2 family expression in human leukemia U937 cells.

(A) After 48 hours incubation with DST, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

### 9. DST이 IAP family의 발현에 미치는 영향

Inhibitors of apoptosis protein(IAP) family의 발현에 DST이 어떠한 영향을 미치는 지를 확인하였

다.

IAP family 중 XIAP 및 cIAP-2의 발현에는 큰 변화가 관찰되지 않았지만, 또 다른 IAP family인 survivin 및 cIAP-1의 경우에는 0.4 mg/ml 및 0.5 mg/ml 처리군에서 mRNA 및 단백질 수준에서의 발현 감소가 관찰되었다(Fig. 8A, B).

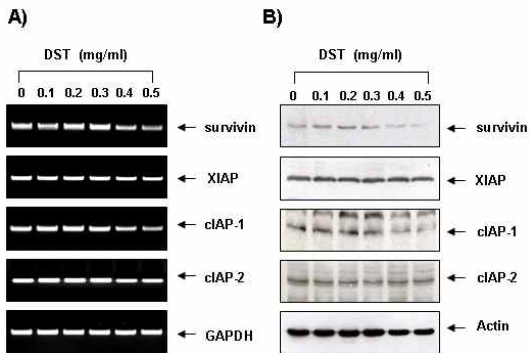


Fig. 8. Effects of DST on the levels of IAP family members in human leukemia U937 cells.

(A) After 48 hours incubation with DST, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

#### 10. DST이 caspases의 발현 및 활성화에 미치는 영향

Extrinsic pathway 및 intrinsic pathway를 통한 apoptosis 유발 시 여러 종류의 caspases가 관여하는 것으로 알려져 있는데, 이들 중 특히 caspase-3, caspase-8 및 caspase-9가 중요한 유전자로 밝혀져 있다.

3가지 caspase의 불활성형 단백질의 발현이 전체적으로 DST 처리에 따라 농도 의존적으로 감소

되는 것으로 나타났지만 활성형의 단백질 발현 증가를 정확히 관찰하기는 어려웠다(Fig. 9).

따라서 이상의 결과를 재확인하기 위하여 caspases의 활성 정도를 *in vitro* assay를 통하여 활성 정도를 직접 분석하였다.

Caspase-3, caspase-8 및 caspase-9 모두가 0.3 mg/ml의 농도까지는 활성정도가 거의 증가하지 않았지만, 0.4 mg/ml의 농도에서 부터는 급격하게 증가되었고, 특히 정상세포와 비교하여 최고 농도인 0.5 mg/ml 처리군에서는 활성정도가 caspase-3의 경우 약 5배, caspase-8은 약 3.5배 및 caspase-9의 경우 약 3배 정도 증가하는 것으로 조사되었다(Fig. 10).

#### 11. DST이 caspase-3 기질단백질의 발현에 미치는 영향

Apoptosis가 유발된 세포에서 활성화된 caspase-3에 의하여 특이하게 분해가 일어나는 몇 가지 기질단백질의 발현에 미치는 DST의 영향을 조사하였다.

DST의 처리 농도 증가에 따라 DNA repair 및 genomic stability에 관여하는 대표적인 기질단백질인 poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)와 세포의 성장과 증식에 중요한 역할을 하는 phospholipase C- $\gamma$ 1(PLC- $\gamma$ 1) 단백질의 경우에는 주단백질의 발현감소와 더불어 단편화된 단백질의 발현 증가가 관찰되었으며, 세포내 골격 유지와 세포 유착에 관여하는  $\beta$ -catenin 단백질의 경우에는 단편화된 단백질은 관찰되지 않았지만 주단백질의 발현감소가 관찰되었다(Fig. 9).

또한 caspase-3의 기질단백질로써 apoptosis가 유발될 때 DNA의 단편화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 DFF40/CAD 및 DFF45/ICAD의 발현을 조사한 결과, DFF40/CAD는 큰 변화가 관찰되지 않았지만, DFF45/ICAD의 경우는 처리농도 의존적으로 발현양의 감소가 관찰되었다(Fig. 9).

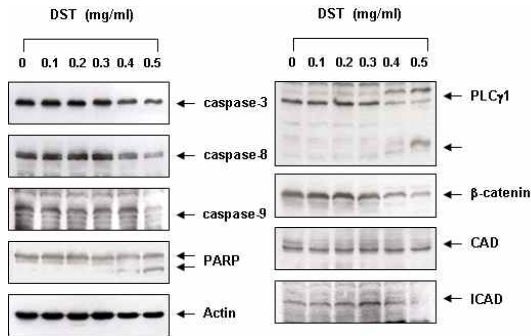


Fig. 9. Effects of DST in the levels of caspases and caspase-3 substrate proteins in human leukemia U937 cells.

After 48 hours incubation with DST, U937 cells were lysed, and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

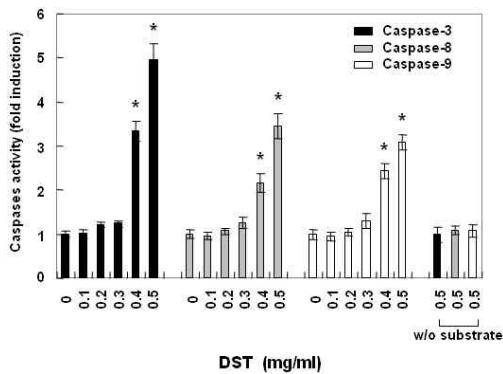


Fig. 10. Activation of caspase-3, caspase-8 and caspase-9 by DST treatment in human leukemia U937 cells.

U937 cells were treated with indicated concentrations of DST for 48 hours, collected and then lysed. Aliquots (150  $\mu$ g proteins) were incubated with DEVD-pNA, IETD-pNA and LEHD-pNA for caspase-3, caspase-8 and caspase-9 activity, respectively, at 37  $^{\circ}$ C for 3 h. The released fluorescent products were measured. Data represent the mean of two independent experiments.

## 12. Caspase-3 inhibitor에 의한 apoptosis의 억제

Caspase-3의 활성화를 억제하였을 경우에 apoptosis가 억제되는지를 조사하였다. 먼저 caspase-3 specific inhibitor인 z-DEVD-fmk를 1시간 선처리하여 caspase-3의 활성화를 억제한 다음 0.5 mg/ml의 DST을 48시간 처리하여 암세포의 증식억제 정도 및 sub-G1기의 형성 정도를 확인하였다.

0.5 mg/ml의 DST을 단독 처리하였을 경우에는 암세포의 증식이 억제되었으며 sub-G1기의 형성도 증가된 반면, caspase-3의 활성을 억제하였을 경우에는 암세포의 증식이 억제되지 않았으며 sub-G1기의 형성도 현저하게 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 11A, B).

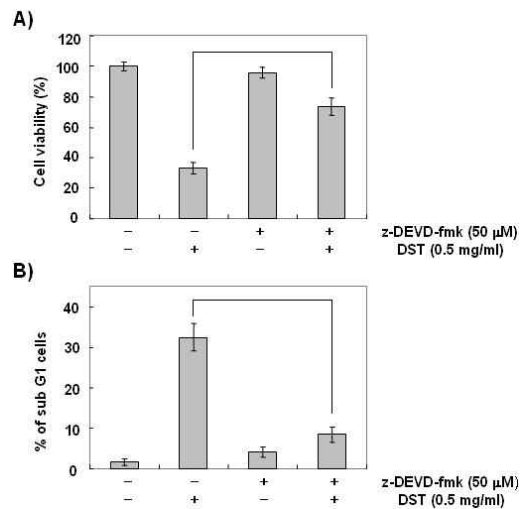


Fig. 11. Suppression of DST-induced growth inhibition and increase of sub-G1 population by caspase-3 inhibitor, z-DEVD-fmk, in human leukemia U937 cells.

U937 cells were pretreated with 50  $\mu$ M of z-DEVD-fmk for 1 h, then treated with 0.5 mg/ml DST for 48 hours. (A) The growth inhibition was measured by the metabolic-bye-based MTT assay. (B) The cells were collected and stained with PI for flow cytometry analysis. The percentages of cells with hypodiploid DNA (sub-G1 phase) contents represent the fractions undergoing apoptotic DNA degradation. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviations of three independent experiments.

Apoptosis 억제현상을 재확인한 결과에서도 핵의 형태 변화 및 DNA fragmentation 정도가 caspase-3의 활성 억제를 통해서 현저하게 감소한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 12A, B).

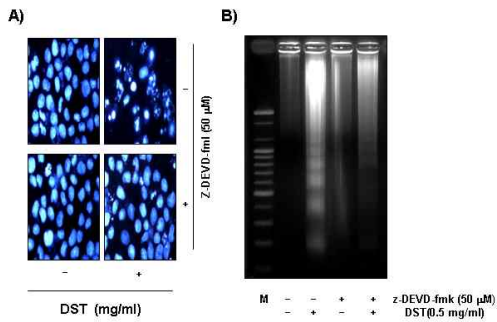


Fig. 12. Suppression of DST-induced chromatin condensation and DNA fragmentation by caspase-3 inhibitor, z-DEVD-fmk, in human leukemia U937 cells.

(A) U937 cells grown under the same condition as in Fig. 11 were treated with DST for 48 hours and then stained with DAPI solution. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescent microscope using blue filter. Magnification,  $\times 400$ . (B) Cells grown under the same condition as in Fig. 11 were collected and DNA was extracted. The DNA fragmentations were separated on 1.5% agarose gel electrophoresis and visualized under UV light after staining with EtBr.

### 13. Bcl-2 과발현이 apoptosis에 미치는 영향

Bcl-2는 대부분의 암세포에서 과발현되어 있으며 암치료에 있어서 항암제의 저항성을 일으키는 주요 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 따라서 Bcl-2를 인위적으로 과발현 시켰을 경우 DST의 처리에 의해 유발되는 apoptosis가 억제되는지를 확인하였다.

Bcl-2가 과발현된 세포에서 증식 억제 및 sub-G1의 형성 정도가 약간 감소하였지만 큰 변화는 나타나지 않는 것으로 조사되었다.

이러한 결과를 다시 한번 확인하기 위하여 핵의 형태 변화 및 DNA fragmentation 정도를 조사한 결과에서도 Bcl-2 과발현에 따른 큰 변화는 관찰되지 않았다.

## IV. 考 察

암은 인체에서 발병되는 여러 가지 질병 중 하나로써 정상적으로 제어되지 않으며 침윤과 전이를 하는 특징을 가진다<sup>1</sup>. 최근 20여년 간 이러한 암의 발병기전에 대한 연구가 진행되면서 암을 일으키는 원인으로 알려진 다양한 종류의 종양유전자 및 암의 발생을 억제하는 것으로 생각되어지는 암 억제 유전자가 밝혀지고 있다<sup>9-11</sup>. 따라서 이러한 암을 억제하는데 있어서 종양유전자 및 암 억제 유전자들을 조절하는 기전을 해석하는 것이 암을 포함한 질병 관련 약제의 개발에 매우 중요한 의의를 가질 수 있다.

특히 한의학에서 사용하는 여러 가지 약제들이 뛰어난 항암효과를 가짐에도 불구하고 그와 관련된 연구가 매우 부족한 현실이므로 이러한 한약 및 한약제제들이 유발하는 항암효과 및 그와 관련된 암 억제 기전에 대한 연구가 필요하다고 할 수 있겠다.

仙鶴草에 대한 최근의 종양에 관한 연구를 살펴보면 오<sup>12</sup>는 仙鶴草가 암세포 증식억제 효과가 있음을 보고하였다. 최<sup>13</sup>는 仙鶴草 복강 투여가 항암제 혹은 종양치료제로서의 개발가능성을 제시하였다. 이<sup>14</sup>는 仙鶴草가 종양 증식 억제효과가 있으며 안전하다고 판단되어 종양치료제로서의 개발가능성을 제시하였다. 최<sup>15</sup>는 仙鶴草가 인간 위암 세포주의 세포사멸 기전에만 선택적으로 작용함으로써 정상세포에 대해서는 세포독성이 없는 안정적인 항암제로서의 유의성을 확인하였다. 송<sup>16</sup>은 仙鶴草의 높은 암세포 성장 저해활성을 보고하였다.

黨蔘에 대한 최근 연구로는 이<sup>17</sup>는 蔓蔘추출물이 항산화능을 가지고 있으며 세포보호효과가 있음을

보고하였다. 전<sup>18</sup>은 蔓蓼추출물이 현저한 항종양효과가 없다할지라도 항암화학요법제인 MMC의 효과를 항진시키는 것을 보고하였다.

丹蓼에 대한 최근의 종양에 관한 연구를 살펴보면 丹蓼이 항암효과가 있다는 것을 밝히고 있으며<sup>19-20</sup> 폐암<sup>21</sup>, 유방암<sup>22</sup>, 전립선암<sup>23</sup> 등 각종 암에 대한 항암효과 그리고 그 분자적 기전을 밝히고 있다<sup>24</sup>. 하지만 이러한 연구결과에도 불구하고 DST이 가지는 항암효과 및 그와 관련된 기전에 대한 연구가 많이 부족한 실정이다.

본 연구에서는 인체혈구암세포인 U937 세포에서 DST이 나타내는 항암효과 및 항암기전을 조사하였다.

먼저, 정상배지 및 DST이 함유된 배지에서 48 시간동안 배양된 암세포들을 대상으로 생존율 및 증식 억제 정도를 조사하였다.

정상배지에서 자란 암세포와 비교해서 DST이 함유된 배지에서 자란 암세포의 생존율 감소 현상 및 증식 억제 정도가 증가하는 것으로 조사되었다 (Fig. 1A, B). 특히 0.3 mg/ml 처리군까지는 큰 변화를 보이지 않았지만 0.4 mg/ml 처리군에서부터 생존율 감소 및 증식 억제 현상이 현저하게 증가되었다.

이러한 생존율 감소 및 증식 억제 현상이 암세포의 형태 변화에 영향을 미치는지를 확인한 결과, 0.3 mg/ml DST 처리군까지는 암세포의 형태변화가 거의 나타나지 않았지만, 0.4 mg/ml 및 0.5 mg/ml 처리군에서는 급격한 세포 수의 감소 현상이 나타났으며, 특히 apoptosis 유발시 특이하게 관찰되는 membrane blebbing 현상 등과 같은 심한 형태적 변형이 관찰되었다(Fig. 2).

DST 처리에 의하여 나타난 생존율 감소, 증식 억제 및 형태 변화가 apoptosis 유발과 어떠한 연관성이 있는지를 확인하기 위하여 암세포의 핵 형태 변화를 관찰한 결과, 고농도 처리군인 0.4 mg/ml 농도에서부터 핵의 밀도 감소와 더불어 apoptosis 유발시 전형적으로 관찰되는 염색질 응축에 의한

apoptotic body가 증가하는 것으로 관찰되었다(Fig. 3).

이는 DST이 암세포의 nucleosome의 linker DNA 부분의 절단을 유발함으로써 나타나는 DNA 단편화 현상이므로 DST 처리에 의한 암세포의 생존율의 감소, 증식 억제 및 형태적 변형이 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음을 나타내는 결과라고 생각된다.

이러한 apoptosis 유발정도를 정량적으로 확인하기 위하여 flow cytometry 분석에 의한 apoptosis 유발 세포군에 해당하는 sub-G1기에 속하는 세포들의 빈도를 조사한 결과, 0.3 mg/ml 처리군까지는 약 4.3% 정도의 sub-G1의 유발이 거의 유발되지 않는 것으로 나타났지만, 0.4 mg/ml 및 0.5 mg/ml 처리군에서는 약 15.6% 및 33.5% 정도의 sub-G1이 유발되어 고농도 처리군에서 현저하게 증가한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 4A, B).

이상에서와 같은 DST 처리에 의한 apoptosis 유발을 다시 한번 확인하기 위하여 DNA fragmentation 여부를 agarose gel 전기영동으로 조사한 결과, DST 고농도 처리군에서 apoptosis가 일어난 세포들에서 나타나는 DNA laddering 현상을 관찰할 수 있었다 (Fig. 5). 이는 endonuclease가 활성화되어 chromosomal DNA가 단편화되었음을 의미하는 결과로써 apoptosis 유발의 증거이다. 일부에서 necrosis에서 보이는 smearing 처럼 보이는 부분이 관찰되었는데, 추후 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

이상의 결과에서 DST 처리에 의한 인체혈구암세포인 U937 세포의 생존율 감소, 증식 억제 및 형태변화는 apoptosis 유발에 의하여 일어나는 현상이라는 것을 알 수 있었다.

본 실험에서는 DST 처리에 의한 apoptosis 유도에 관한 기전을 해석하기 위하여 apoptosis 유발에 있어서 extrinsic pathway에 중요한 역할을 하는 대표적인 유전자인 death receptor ligand 및 death receptor 들의 발현변화를 조사한 결과, death receptor 인 DR4의 발현이 단백질 수준에서 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 6A, B). 이는 DST에 의해 유발

되는 apoptosis의 경우 extrinsic pathway가 관여할 수 있음을 의미하는 결과라고 할 수 있다.

Apoptosis 유발에 있어서 mitochondria가 intrinsic pathway에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, U937 세포에 DST을 처리하였을 경우 Bcl-2 family에 속하는 유전자들의 발현 변화가 유발되는지를 확인한 결과, anti-apoptotic 유전자인 Bcl-2 및 Bcl-XL과 pro-apoptotic 유전자인 Bax 및 Bad의 경우에는 mRNA 및 단백질 모두에서 발현 변화가 관찰되지 않았다. 하지만 Bid 단백질의 경우 발현이 현저하게 감소하는 것으로 조사되었다(Fig. 7A, B).

이상의 결과를 살펴볼 때, 조사된 유전자 수준에서는 death receptor인 DR4의 발현 증가를 통한 extrinsic pathway의 활성화로 인하여 유발된 현상으로 판단되며, intrinsic pathway는 DST에 의하여 유발되는 apoptosis에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 생각된다.

Caspases 의존적인 apoptosis는 여러 단계로 조절되는데, 그 중 IAP family는 전사 조절인자인 nuclear factor kappa B(NF- $\kappa$ B)에 의해 조절되고 apoptosis 유발 시 중요한 역할을 하는 caspases와의 결합함으로써 caspases 활성화 억제를 통한 apoptosis 억제에 직접적으로 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 IAP family의 발현 변화에 DST이 어떠한 영향을 미치는지를 확인한 결과, XIAP 및 cIAP-2의 발현에는 큰 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 8A, B).

하지만 survivin 및 cIAP-1의 경우에는 DST의 농도가 증가함에 따라 mRNA 및 단백질 수준에서의 발현 감소가 관찰되었으므로(Fig. 8A, B) DST 처리에 의한 apoptosis 유발에 있어서 survivin 및 cIAP-1의 발현 감소로 인한 caspases 활성화 억제 실패가 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

본 실험에서는 DST이 여러 종류의 caspases 중 apoptosis 유발에 직접적으로 관여하는 것으로 알려진 caspase-3, caspase-8 및 caspase-9의 발현에

어떠한 영향을 미치는지를 조사한 결과, initiator caspases인 caspase-8 및 caspase-9와 effector caspases인 caspase-3 모두 활성형 단백질의 발현은 관찰할 수 없었지만 비활성형 단백질의 발현 감소가 나타났다(Fig. 9).

비활성형 단백질의 감소로써 caspases의 활성이 증가했다는 것을 추측할 수 있었지만 보다 더 정확한 확인을 위하여 *in vitro* assay를 이용하여 caspases의 활성 정도를 직접적으로 측정해본 결과, 조사된 3 종류의 caspases인 caspase-3, caspase-9 및 caspase-8 모두에서 활성 정도가 현저하게 증가한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 10).

활성화된 caspase-3은 많은 기질단백질들을 분해함으로써 apoptosis를 유발하게 되는데, 대표적인 기질단백질로는 PARP, PLC- $\gamma$ 1,  $\beta$ -catenin, DFF40/CAD 및 DFF45/ICAD 등이 존재한다.

먼저 PARP 단백질의 경우에는 DNA repair, DNA stability 및 전사조절에 관여하는 nuclear enzyme으로써 molecular nick sensor 기능을 하는 N-terminal DNA binding domain과 NAD<sup>+</sup>가 결합하는 C-terminal catalytic domain으로 구성되어 있으며, DNA repair 기능을 하는 동안은 DNA의 결합을 인지하는 F1 및 F2라고 하는 두 개의 zinc finger motif를 가지고 있는 것으로 알려져 있다<sup>25,26</sup>. 정상적인 PARP 단백질은 116 kDa의 분자량을 가지지만 여러 가지 apoptosis 유발신호에 의하여 caspase-3이 활성화되면 PARP 단백질의 Asp214와 Gly215 사이에서 분해가 일어나서 85 및 24 kDa의 단편으로 proteolytic cleavage가 유발되는 것으로 알려져 있다<sup>27-30</sup>.

최근 연구에 의하면 phospholipase C(PLC) signaling pathway는 세포의 증식에 있어서 매우 중요하다고 보고되어지고 있다<sup>31-33</sup>. PLC는 세포 및 조직에 넓게 분포하고 있는 PLC- $\gamma$ 1 및 조혈세포에만 존재하는 PLC- $\gamma$ 2과 같은 두 가지 isoform이 존재하며, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate(PI 4,5-P<sub>2</sub>)를 protein kinase C(PKC) activator인 diacylglycerol 및 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 조절에 중요한 역할을 하는 inositol

1,4,5-trisphosphate(IP<sub>3</sub>)로 가수분해하는 것으로 알려져 있다<sup>34,35</sup>. 특히 PLC- $\gamma$ 1의 경우는 apoptosis가 유발될 경우 caspase-3의 활성화로 인하여 분해되어 단편화 현상이 일어나므로 apoptosis 유발의 생화학적 표식자로 사용이 되고 있다<sup>36,37</sup>.

또 다른 caspase-3 기질단백질이며 cell-cell adhesion 및 Wnt signaling 에 관여하는 E-cadherin-associated protein인  $\beta$ -catenin은 세포 내 골격 유지와 다양한 부착성 세포의 전사 조절에 중요한 역할을 하며 세포 유착과 관계된 apoptosis 조절에 관여한다<sup>38-40</sup>.  $\beta$ -catenin은 정상 세포의 경우 92 kDa의 분자량을 가지나 caspase-3의 활성화를 통한 세포 유착성 apoptosis가 유발되면 adenomatous polyposis coli(APC)와 결합하여 N-terminal에서 glycogen synthase kinase 3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ ) 의존적인 phosphorylation을 유발하는 complex와 p53 의존적인 세포주기 억제에 반응하는 complex 등과 같은 두 개의 proteasome degradation complex에 의해 분해되어 62-72 kDa로 단편화가 일어나는 것으로 알려져 있다<sup>41-44</sup>.

Apoptosis의 가장 중요한 현상 중 하나인 DNA 단편화에 관여하는 유전자인 DFF는 DFF40/CAD와 DFF45/ICAD로 구성되어 있다<sup>45,46</sup>. DFF40/CAD와 DFF45/ICAD는 서로 complex를 형성하고 있으며, caspase-3가 활성화되면 DFF45/ICAD의 두 군데 Asp 잔기에서 단편화가 유발되어 DNA fragmentation에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>47-51</sup>.

따라서 DST에 의한 apoptosis 유발시 이들 유전자들의 발현 양상을 살펴본 결과, PARP 및 PLC- $\gamma$ 1의 경우는 단편화 현상이 관찰되었으며,  $\beta$ -catenin 및 DFF45/ICAD의 경우는 단편화 현상이 관찰되지 않았지만 발현양 자체가 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 9).

이상의 결과를 살펴보면, DST에 의한 인체혈구암 세포인 U937 세포에서의 apoptosis는 death receptor인 DR4의 발현 증가로 인한 caspase-8의 활성화와 그에 따른 Bid 단백질의 감소 및 caspase-9의 활성화, caspase-3의 활성화에 의한 기질단백질들의 단편화

현상 및 발현 감소 등과 같은 extrinsic pathway를 통해 유발된다는 것을 알 수 있었다.

Caspase-3의 중요성을 확인하기 위하여 caspase-3 specific inhibitor인 z-DEVD-fmk를 이용하여 caspase-3의 활성화를 억제하였을 경우에 apoptosis가 억제되는지를 조사한 결과, 증식 억제 현상이 현저하게 억제되었으며 apoptosis 정도도 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 11 및 12).

이러한 결과는 DST처리에 따른 apoptosis 유발에 있어서 caspase-3의 활성화가 하위단계에서 중요한 역할을 담당하고 있다는 것을 의미한다.

Mitochondrial membrane의 permeability 변화를 통한 apoptosis 유발에 있어서 중요한 역할을 하는 Bcl-2 family 중 anti-apoptotic 유전자인 Bcl-2는 대부분의 암세포에서 과발현되어 있는 것으로 알려져 있으며 암치료에 있어서 항암제 저항성을 가지는 원인이 된다고 보고되어지고 있다<sup>52-54</sup>. 따라서 Bcl-2의 발현을 조절하는 것이 암치료의 효율을 높이는 데 중요하다고 할 수 있다.

본 실험에서는 Bcl-2를 인위적으로 과발현 시켰을 경우 DST의 처리에 의해 유발되는 apoptosis가 억제되는지를 확인하였다. 그러나, 정상 U937 세포 및 Bcl-2를 인위적으로 과발현 시킨 U937/Bcl-2 세포에 DST을 처리하였을 경우, 세포의 증식 억제 현상에 큰 변화는 나타나지 않았다(Fig. 13).

이러한 결과는 sub-G1의 형성 정도, 핵의 형태 변화 및 DNA fragmentation 정도를 조사한 결과를 통해서도 재확인 할 수 있었다(Fig. 14). 즉 Bcl-2의 과발현은 DST이 유발하는 apoptosis 억제에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 DST을 인체혈액암세포주인 U937 세포에 처리하였을 경우, 처리 농도 의존적으로 생존율 감소, 증식 억제 및 형태 변화가 유발되었으며, 이러한 변화들은 apoptosis 유발과 밀접한 연관이 있는 것으로 나타났다.

따라서 apoptosis 유발이 어떠한 경로를 통하여 이루어지는지를 확인하기 위하여 apoptosis 유발에

관여하는 유전자들을 조사한 결과, death receptor 인 DR4의 발현 증가를 통한 caspase-8의 활성화가 유발되었으며, 이로 인하여 Bid 단백질의 발현 감소와 함께 caspase-9 및 caspase-3의 활성화와 기질 단백질들의 분해 등과 같은 extrinsic pathway를 통하여 apoptosis가 유발되는 것으로 확인되었다. 이때 caspase-3이 중요한 역할을 한다는 것을 확인할 수 있었다.

그러나 이상의 결과만으로 DST의 항암작용 여부를 직접적으로 논하기에는 매우 어려우므로 다양한 추가적인 실험이 수행되어야 할 것으로 생각되며, 0.4 mg 이상의 고농도에서 이러한 효과가 나타나므로 정상 혈구 세포의 cytotoxicity에 대한 추가 실험이 필요하다고 사료된다.

본 연구의 결과는 DST의 생화학적 항암기전 해석을 이해하고 향후 지속적인 연구를 위한 기초 자료로서 그 가치가 매우 높을 것으로 생각된다.

## V. 結 論

본 연구에서는 DST가 가지는 항암효과 및 그와 관련된 기전에 대해 알아보기 위하여 인체혈구암 세포인 U937 세포에서 DST에 의하여 유발하는 apoptosis 기작에 관한 연구를 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 인체혈구암 세포인 U937 세포에 DST를 처리하였을 경우 처리농도 의존적으로 암세포의 생존율 및 증식이 강하게 억제되었으며, membrane blebbing 현상 등과 같은 심한 형태적 변형이 나타나는 것을 확인하였다.
2. DST를 처리에 의한 핵의 형태변화를 관찰한 결과 apoptosis 유발 시 나타나는 염색질 응축에 의한 apoptotic body가 관찰되었고, apoptosis 유발 세포군에 해당하는 sub-G1기가 증가하였으며, DNA 단편화 현상이 나타나는 것으로 확인되었다. 따라서 DST에 의해서 유발되는 U937

세포에서의 생존율 및 증식 억제와 형태변화가 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다.

3. DST에 의한 U937 세포의 apoptosis 유도에 있어서 death receptor인 DR4의 번역수준에서의 발현 증가가 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였다.
4. DST는 Bcl-2 family 중 death receptor를 통한 caspase-8의 활성화로 인하여 단편화 현상이 유발되어 MMP loss에 관여하는 것으로 알려진 Bid의 발현을 감소시키는 것으로 확인되었다.
5. DST는 caspases와 결합하여 apoptosis 유발을 억제하는 것으로 알려진 IAP family 중 survivin 및 cIAP-1의 발현을 전사 및 번역수준에서 억제하는 것으로 확인되었다.
6. DST는 U937 세포의 apoptosis 유도에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 caspase-3, -8 및 -9의 발현 감소와 더불어 활성을 증가시키는 것으로 확인되었다.
7. DST는 caspase-3의 기질단백질인 PARP, PLC- $\gamma$ 1,  $\beta$ -catenin 및 ICAD의 발현감소 및 단편화 현상을 유발시키는 것으로 확인되었다.
8. caspase-3의 활성을 억제하였을 경우 DST에 의하여 유발되는 apoptosis가 억제되는 것으로 나타났다으므로 caspase-3가 중요한 조절자로서 작용한다는 것을 확인할 수 있었다.
9. 대부분의 암세포에 과발현되어 있으며 apoptosis 유발을 억제하는 것으로 알려진 Bcl-2가 과발현되었을 경우 DST에 의하여 유발되는 apoptosis에 어떠한 영향을 미치는 지를 조사한 결과 Bcl-2가 과발현된 세포에서 apoptosis 유발 정도가 약간 감소하였지만 큰 변화는 나타나지 않았다. 따라서 DST 처리에 의해 유발되는 apoptosis에 있어서 Bcl-2는 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 확인되었다.

이상의 결과들은 DST의 항암작용을 이해하는데



중요한 자료가 될 것이며, 향후 이와 유사한 항암제 후보물질들의 연구에 있어서 기초 자료로서 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 하지만 본 연구의 결과에서 DST의 항암작용 여부를 직접적으로 논하기 위해서 고용량으로 인한 세포독성 등에 대한 다양한 추가적인 실험이 수행되어야 할 것이다.

### 參考文獻

1. Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(3): 776-81.
2. Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA. The molecular basis of leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004:80-97.
3. Abramson N, Melton B. Leukocytosis: basics of clinical assessment. *Am Fam Physician* 2000;62: 2053-60.
4. Harris P, Ralph P. Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *J Leukoc Biol* 1985; 37:407-22.
5. 김호철. 한약약리학. 서울: 집문당; 2001, p. 294-95.
6. 김창민 외 역. 中藥大辭典. 鼎談: 1999, p. 2352-5.
7. 전국한의과대학 본초학교실. 본초학. 서울: 영림사; 1991, p. 533-4.
8. 辛民教. 臨床本草學. 서울: 영림사; 1997, p. 519-21.
9. Altieri DC. Survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer. *Prog Cell Cycle Res* 2003;5:447-52.
10. Jacotot E, Ferri KF, Kroemer G. Apoptosis and cell cycle: distinct checkpoints with overlapping upstream control. *Pathol Biol(Paris)* 2000;48: 271-9.
11. Lundberg AS, Weinberg RA. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* 1999;35:531-9.
12. 오천식, 김덕호, 영지 산자고 선학초 권백 외송 이 암세포 감수성에 미치는 영향. 경희한의대 논문집 1987;10:99-115.
13. 최정원. C57BL/6 암유발모델 쥐에 대한 선학초(靑新나물) 복강주사의 항암효과 탐색 및 약물대사 효소의 변화. 학위논문(박사). 경원대학교 대학원; 2009.
14. 이시형. C57BL/6 암유발모델 쥐에 대한 선학초(靑新나물) 경구투여시 항암효과 탐색 및 약물대사 효소의 변화. 학위논문(박사). 경원대학교 대학원; 2009.
15. 최순자. 선학초(靑新나물)에 의한 in vitro와 in vivo에서의 암세포사멸 기전 탐색. 학위논문(박사). 경원대학교 대학원; 2009.
16. 송진욱. 목향, 선학초, 하고초 추출물의 항산화 및 항암 활성. 학위논문(박사). 계명대학교 대학원; 2009.
17. 이선구. 만삼의 과산화수소에 의한 SK-N-MC의 세포사에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 2008;22(2):328-32.
18. 전병훈, 정우열. 만삼의 methanol 추출액이 mitomycin C의 세포독성효과에 미치는 영향. 한국전통의학지 1997;7(2):5-10.
19. 최선미, 최승훈, 안규석. 丹蔘의 抗癌活性과 apoptosis에 미치는 影響. 동의생리병리학회지 2000;14(2): 22-47.
20. 정국찬, 이지영, 김동천. 단삼(Salvia miltiorrhiza) 추출물의 암세포 증식 억제 효과에 관한 연구. 한국식품영양과학회지 2000;29(4):726-31.
21. 박재석, 김희철. 丹蔘 추출액이 Urethane으로 유발된 생쥐의 폐암에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2008;29(3):595-607.
22. 이경원. Tanshinone I Suppresses the Expression of Adhesion Molecules and Metastasis of Human Breast Cancer Cells. 경상대학교 대학원; 2008.
23. 원숙현. Effect of tanshinone IIA on apoptosis induction and androgen receptor/prostate specific antigen pathway in LNCaP prostate cancer

- cells = LNCaP 전립선 암 세포에서 세포고사 유도와 androgen receptor/prostate specific antigen pathway에 대한 tanshinone IIA 의 효과. 경희대학교 대학원: 2009.
24. Chung J, Chang JE, Son YH, Park HR, Lim SH, Oh YH, et al. Salvia miltiorrhiza inhibits tumor cell growth in association with Rb dephosphorylation through up-regulation of p21 via p53-dependent pathway. *Immune network* 2002;2(1):19-24.
  25. De Murcia G, Ménessier de Murcia J. Poly (ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem Sci* 1994;19:172-6.
  26. Muller S, Briand JP, Barakat S, Lagueux J, Poirier GG, De Murcia G, et al. Autoantibodies reacting with poly(ADP-ribose) and with a zinc-finger functional domain of poly(ADP-ribose) polymerase involved in the recognition of damaged DNA. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;73:187-96.
  27. Los M, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K. The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity* 1999;10:629-39.
  28. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, et al. Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 1995; 81:801-9.
  29. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 1994;371:346-7.
  30. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 1993;53:3976-85.
  31. Kim MJ, Kim E, Ryu SH, Suh PG. The mechanism of phospholipase C-gamma regulation. *Exp Mol Med* 2000;32:101-9.
  32. Rhee SG, Bae YS. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem* 1997;272:15045-8.
  33. Kamat A, Carpenter G. Phospholipase C-gamma: regulation of enzyme function and role in growth factor-dependent signal transduction. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8:109-17.
  34. Nishizuka Y, Kikkawa U. Early studies of protein kinase C: a historical perspective. *Methods Mol Biol* 2003;233:9-18.
  35. Berridge MJ, Irvine RF. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 1984;312:315-21.
  36. Myklebust JH, Blomhoff HK, Rusten LS, Stokke T, Smeland EB. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is important for erythropoietin-induced erythropoiesis from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 2002;30:990-1000.
  37. Bae SS, Perry DK, Oh YS, Choi JH, Galadari SH, Ghayur T, et al. Proteolytic cleavage of phospholipase C-gamma during apoptosis in Molt-4 cells. *FASEB J* 2000;14:1083-92.
  38. Olmeda D, Castel S, Vilaró S, Cano A. Beta-catenin regulation during the cell cycle: implications in G2/M and apoptosis. *Mol Biol Cell* 2003;14: 2844-60.
  39. Wijnhoven BP, Dinjens WN, Pignatelli M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg* 2000;87:992-1005.
  40. Johnson JP. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 1999;18:345-57.
  41. Polakis P. More than one way to skin a catenin. *Cell* 2001;105:563-6.

42. Neufeld KL, Zhang F, Cullen BR, White RL. APC-mediated downregulation of beta-catenin activity involves nuclear sequestration and nuclear export. *EMBO Rep* 2000;1:519-23.
43. Henderson BR. Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol* 2000;2:653-60.
44. Fukuda K. Apoptosis-associated cleavage of beta-catenin in human colon cancer and rat hepatoma cells. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:519-29.
45. Fukushima K, Kikuchi J, Koshiba S, Kigawa T, Kuroda Y, Yokoyama S. Solution structure of the DFF-C domain of DFF45/ICAD. A structural basis for the regulation of apoptotic DNA fragmentation. *J Mol Biol* 2002;321:317-27.
46. Lechardeur D, Drzymala L, Sharma M, Zylka D, Kinach R, Pacia J, et al. Determinants of the nuclear localization of the heterodimeric DNA fragmentation factor(ICAD/CAD). *J Cell Biol* 2000;150:321-34.
47. Widlak P, Garrard WT. Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J Cell Biochem* 2005;94:1078-87.
48. Todor A, Sharov VG, Tanhehco EJ, Silverman N, Bernabei A, Sabbah HN. Hypoxia-induced cleavage of caspase-3 and DFF45/ICAD in human failed cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H990-5.
49. Widlak P. The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta Biochim Pol* 2000;47:1037-44.
50. Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 2000;256:12-8.
51. Thomas DA, Du C, Xu M, Wang X, Ley TJ. DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. *Immunity* 2000;12:621-32.
52. Jeong SY, Seol DW. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep* 2008;41:11-22.
53. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003;22:8590-607.
54. Bouillet P, Huang DC, O'Reilly LA, Puthalakath H, O'Connor L, Cory S, et al. The role of the pro-apoptotic Bcl-2 family member bim in physiological cell death. *Ann N Y Acad Sci* 2000;926:83-9.