

MCF-7 유방암 세포에서 영릉향 추출물에 의한 Apoptosis 유도에 관한 연구

이세희, 김근태, 김종일, 임은경, 김인섭, 김영민*

The Extract from *Lysimachia foenum-graecum* Induces Apoptosis in MCF-7 Breast Cancer Cells

Se Hee Lee, Guen Tae Kim, Jong Il Kim, Eun Gyeong Lim, In Seop Kim, and Young Min Kim*

접수: 2013년 8월 15일 / 게재승인: 2013년 10월 21일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: The extract from *Lysimachia foenum-graecum* (LFE) has been known to possess various instructive characters including anti-oxidant, anti-obesity, fungicidal activities. However, the accurate mechanism of those effects of LFE is not well known. In that respect, we evaluated the apoptotic effect and anti-cancer efficacy of extracts of LFE in MCF-7 breast cancer cells. In this study, we hypothesized that LFE may exert cancer cell apoptosis through regulating p53 and mitochondria-mediated apoptotic proteins. And this substance can generate ROS to cause free radical-induced apoptosis. Accordingly, the generation of ROS by LFE triggers the activation of p53 which are accompanied by pro-apoptotic protein activation and suppression of pro-survival proteins. We determined with MTT assay, flow cytometry for detection of intracellular ROS and Annexin V-PI staining, Western blotting. Consequently, our researches demonstrated that the treatment of LFE to breast cancer cells resulted in an activation of p53, Puma, Bax, cleaved-PARP and an inhibition of Bcl-2 expressions.

Keywords: MCF-7 breast cancer cells, Reactive oxygen species (ROS), p53, Apoptosis

1. 서론

유방암은 전 세계적으로 여성들에게 가장 흔히 발병되는 질병으로 발생률이 꾸준히 증가하고 있으며, 이에 따른 사망률 또한 점차 증가하고 있다. 유방암은 여성의 에스트로젠 호르몬 의존성 암으로, 산업화에 의한 잘못된 식습관과 출산 문제 등 여러 가지 요인에 의해 발생한다 [1]. 항암제를 이용한 암 치료는 암세포뿐만 아니라 정상세포에도 영향을 미치고, 내성을 가지게 된다는 문제점을 야기시키기 때문에 이를 대체할 수 있는 물질을 찾아내는 것이 중요한 과제로 여겨지고 있다. 최근에 천연물 자체의 효능에 대한 관심이 늘어나면서 천연추출물에 의한 세포 신호분자들의 조절과 암세포의 apoptosis 유도 효과에 관한 연구가 주목을 받고 있다.

전통적인 한약재로 잘 알려져 있는 영릉향 (*Lysimachia foenum-graecum*)은 강한 향기가 있고, 맛은 달고 쓰며, 기의 순환을 촉진하여 통증, 치통, 염증 제거 그리고 항비만 효과가 있다고 알려져 있다 [2,3]. 하지만 영릉향의 암에 대한 연구는 아직까지 잘 이루어지지 않았으며, 이에 따라 본 연구에서는 영릉향을 이용하여 apoptosis 관련 단백질들의 조절을 확인하며, 이러한 apoptosis 유도 효과가 reactive oxygen species (ROS)의 생성에 의한 것임을 밝히고자 한다. ROS는 세포 내 신호전달에 영향을 주는 매개체이며, 과도한 ROS의 생성은

한남대학교 생명나노과학대학 생명시스템과학과
Department of Biological Sciences and Biotechnology, College of Life Science and Nano Technology, Hannam University, Yuseong-gu, Daejeon 305-811, Korea
Tel: +82-42-629-8753, Fax: +82-42-629-8873
e-mail: kym@hnu.ac.kr

세포 내 산화적 스트레스를 증가시켜 세포 손상을 유발하여 세포 기능 및 세포주기의 억제, 그리고 apoptosis를 유도한다 [5,6]. Apoptosis는 세포 내 외부에서 오는 신호에 의해 일련의 과정을 거치는데, 주로 p53, Bcl-2 family, Bax, Caspase 등이 연관되어 있는 것으로 알려져 있다 [4]. 이와 관련된 연구 결과에 따르면, berberine이 HL-60세포에서 산화적 스트레스를 유발시킴으로써 미토콘드리아의 pro-apoptotic Bcl-2 family가 세포질로 cytochrome c를 방출하게 되며 그로 인해 caspase의 활성화를 이루어 apoptosis를 유도한다는 연구결과가 있다 [7].

Tumor protein 53 (p53)은 종양억제단백질로 DNA 손상 시 활성화되고 세포주기 G1기에서 머무르며 DNA를 수선하게 되는데, DNA의 손상이 크지 않은 경우 p21을 활성화시키며, DNA의 손상이 큰 경우 p53이 전사조절인자로서 작용하여 Bcl-2-associated X protein (Bax)의 발현을 유도하고 Bcl-2 발현을 억제 시키는 것으로 알려져 있다. 또한 Wild type p53의 발현이 회복되면 세포 내에서 apoptosis가 유도되며 세포성장이 억제된다 [8,9]. p53 upregulated molecular of apoptosis (Puma)는 미토콘드리아에서 p53-dependent, -independent한 경로를 통하여 apoptosis를 유도하는 단백질로서, Bcl-x, Bcl-2, Mcl-1의 BH3 motif와의 상호작용을 통하여 anti-apoptosis 활성을 억제한다 [10]. Bcl-2 family의 하나인 B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)는 apoptosis의 조절에 관여하는 유전자로서 다른 암유전자와 달리 세포증식에 관여하지 않고 세포의 생존 조절, 즉 apoptosis를 억제하는 기능을 가진다. Bcl-2는 산화환원, 미토콘드리아 막전위, 세포 내 이온 분포 조절 및 apoptosis 신호 전달 경로의 활성 등의 기능을 통해 세포를 죽음으로부터 보호한다고 알려져 있다 [11]. 또한 미토콘드리아 외막, 핵막의 세포질에 존재하며, caspase-9의 활성화에 필요한 성분인 cytochrome c를 포함한 여러 단백질이 미토콘드리아로부터 방출되는 것을 막는다. 반면 Bax는 미토콘드리아와의 상호작용을 통해 mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP)을 증가시켜 cytochrome c의 방출을 돕는다. Bax는 apoptosis를 촉진시키는 단백질이며 Bcl-2와의 hetero-또는 homodimer를 형성함으로써 apoptosis의 조절에 관여하고 있다 [12]. 따라서 이러한 단백질들 간의 신호경로와 활성을 조절하는 것은 암의 예방 및 치료, 그리고 apoptosis 유도에 효과적일 것이다.

본 연구에서는 여러 질병에 효과를 가진 영롱향 추출물 (LFE)을 항암 작용에 적용하여 MCF-7 유방암 세포에서 세포 신호경로 조절을 통한 암세포의 apoptosis 유도 효과를 알아보고자 하였다. 우선적으로 LFE 처리에 따른 암세포 억제 과정에 있어서 p53의 조절을 통한 apoptosis 유도효과를 확인하고, 이러한 p53이 LFE의 어떠한 작용에 의해 조절되는지 밝히고자 하였다. 또한 p53에 의해 조절되는 단백질인 Puma의 발현, 그리고 LFE가 세포의 apoptosis 유도 및 억제 과정에 관여하는 미토콘드리아 관련 단백질들인 Bcl-2, Bax의 발현을 조절하는 과정 통해 LFE에 의한 HT-29 대장암 세포의 apoptosis 유도 과정의 세포 신호전달 경로를 확인하고

자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

본 실험에 이용된 영롱향은 대전한약재시장에서 구입하였으며, 영롱향 분쇄가루 100 g에 에탄올 800 mL을 가하여 완전히 침지한 후, 상온에서 환류시키면서 추출하였다. 상기 추출 방법을 통해 제조된 영롱향 추출물을 감압농축기를 이용하여 감압농축한 후, 수득한 추출물은 -80°C에서 보관하였다. 상기 영롱향 추출물은 각 농도의 물질을 동일한 용량의 DMSO에 녹였고, -20°C에 냉동 보관하여 사용하였다. Pifithrin- α 는 Calbiochem (San Diego, USA)에서 구입하였으며, DMSO에 용해하여 20 μ g/ml stock으로 만들어 -20°C에 보관하였다. NAC은 Sigma (St. Luis, MO, USA)에서 구입하였으며, 1 M stock으로 만들어 -20°C에 보관하여 사용하였다.

2.2. 세포 배양

MCF-7 세포는 America Type Culture Collection (ATCC, Gaithersburg, MD)에서 분양 받았으며, 10% FBS (Hyclone Laboratories Inc., Logan, UT, USA)와 1% antibiotics (100 mg/L streptomycin, 100 U/mL penicillin)가 포함된 RPMI 1640 media (Hyclone, Laboratories Inc., Logan, UT, USA)를 사용하여 5% CO₂, 37°C 조건하에서 배양하였다. 매 24시간마다 Trypsin-EDTA (Hyclone Laboratories Inc., Logan, UT, USA)를 이용하여 세포를 부유상태로 만든 다음 세포를 1 \times 10⁶ cells/mL로 분주하여 계대 배양하였다.

2.3. MTT assay에 의한 세포생존을 측정

12 well plate에 MCF-7 세포를 1 \times 10⁶ cells/ml로 분주하고 24 시간 동안 배양시킨 후 LFE를 처리하였다. 24시간 후 MTT solution (5 mg/mL)을 20 μ L씩 첨가하여 1시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. MTT solution이 들어있는 배지를 제거한 후에 DMSO를 150 μ L씩 넣어 well에 생성된 formazan을 모두 녹인 후, 96 well plate에 100 μ L씩 옮겨서 ELISA microplate reader (Bio-Rad model 680, Bio-Rad Laboratories Inc., Tokyo, Japan)로 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 세 번 시행하며, 이에 따른 평균값과 표준오차는 Microsoft Excel program을 이용하여 분석하였다.

2.4. Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)에 의한 apoptosis 관찰

Apoptosis는 FITC-Annexin V apoptosis detection kit (BD PharmingenTM, San Diego, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. Annexin V-PI staining을 위해, MCF-7 세포에 LFE를 농도별 (0, 10, 20, 50, 100 μ g/mL)로 처리하였다. 24시간 배양한 세포를 PBS로 세척 후 trypsin-EDTA로 모은 다음, 1 \times 10⁶ cells/mL의 농도에서 binding buffer로 suspension하였다. 그

후 MCF-7 세포를 Annexin V-FITC와 propidium iodide (PI)로 15분간 염색한 후, Flow cytometry - FACS Canto (Becton-Dickinson Biosciences, Drive Franklin Lakes, NJ, USA)로 분석하여 결과를 관찰하였다.

2.5. FACS 및 Fluorescence microscope를 이용한 세포 내 ROS 측정

세포 내 ROS 측정을 위해, MCF-7 세포에 LFE를 농도별 (20, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리하였다. 24시간 후에 DCFH-DA를 10 μM 로 처리하여 30분간 배양하였다. 세포를 PBS로 세척 후 trypsin-EDTA로 모은 다음, 1×10^6 cells/mL의 농도에서 PBS로 suspension하였다. 그 후 세포를 PBS에 suspension한 후, Flow cytometry - FACS Canto (Becton-Dickinson Biosciences, Drive Franklin Lakes, NJ, USA)로 분석하여 결과를 관찰하였다. 또한 12 well plate에 cover glass를 넣어 1×10^6 cells/mL로 분주하여 배양시키며, N-acetylcysteine (NAC)을 처리하고 30분 후에 LFE를 처리하였다. 물질처리 경과 시간에 따른 ROS 발생 관찰을 위해 시간에 맞추어 DCFH-DA를 처리하여 incubation시킨 후, fluorescence microscope (Carl Zeiss SMT AG, Oberkochen, Germany)를 이용하여 관찰하였다.

2.6. Western blotting

LFE를 농도별로 처리한 후 24시간 동안 CO_2 incubator에서 배양한 다음, 단백질 추출을 위하여 RIPA lysis buffer {50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% NP 40, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM phenylmethylsulfonyl}를 각 well에 150 μL 씩 첨가하여 반응시킨 후, 14,000 rpm, 4°C 에서 20분 동안 원심분리한 후 상등액을 취하였다. 그런 다음, ELISA-reader 595 nm에서 흡광도를 측정하여 각 표본의 단백질 농도를 결정하였다. $5 \times$ Laemmli sample buffer (loading dye; 250 mM Tris-Cl (pH 6.8), 40% glycerol, 4% β -mercaptoethanol, 0.08% bromophenol blue, 8% SDS)와 MCF-7 세포에서 추출한 단백질을 혼합하여 표본을 제작하였다. 1차 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)로부터 구입하여 각각 p53 (1:1000), PARP (1:1000) Bcl-2 (1:1000), Puma (1:1000), Bax (1:1000), β -actin (1:1000)의 농도로 반응시켰으며, 2차 항체는 mouse (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA), rabbit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 각각의 농도로 희석하여 반응시킨 다음 Blue X-ray film에 감광하여 결과를 관찰하였다.

2.7. 통계처리

실험설계에 대한 분석은 통계 프로그램인 SPSS (SPSS, Chicago, IL, USA)의 Student's *t*-test로 검정하였다. 각 자료는 3번 이상의 반복된 실험을 통하여 얻어진 결과로 검정하였고 $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. LFE에 의한 MCF-7 세포 증식 억제 및 apoptosis 유도 효과

암은 비정상적인 세포 증식 또는 암세포의 apoptosis가 원활하게 이루어지지 않는 경우에 나타나는 질병으로 알려져 있다. 따라서 세포 내 단백질 조절을 통한 암세포의 증식 억제와 apoptosis 유도가 암 억제에 효과적이라는 것이 밝혀졌다. 본 연구에서는 LFE가 MCF-7 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 LFE를 농도별로 처리하여 MTT assay를 통하여 암세포의 생존율을 측정하였다. Fig. 1(a)에 따르면 MCF-7 세포에서는 LFE를 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 24시간 처리하였을 때, LFE의 농도가 증가함에 따라 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 96.5%, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 82.2%, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$

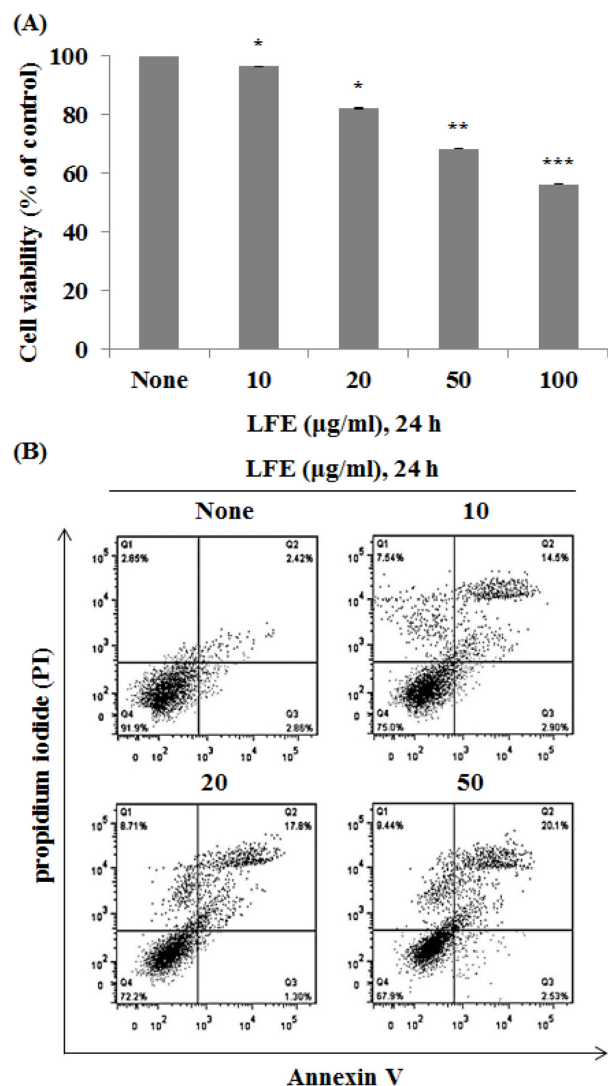


Fig. 1. (A) LFE inhibits cell proliferation in MCF-7 breast cancer cells. Cell viability was measured by MTT assay. Cells were treated with LFE 10~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h. (B) Apoptotic effects of LFE were evaluated by Annexin V-fluorescein isothiocyanate and propidium iodide (PI). Cells were treated with LFE 10~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h. * $p < 0.05$ compared to control. ** $p < 0.01$ compared to control, *** $p < 0.001$ compared to control. (each experiment's $n=3$)

mL에서 68.34%, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 56.25%로 세포의 생존율이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 MCF-7 유방암 세포의 증식 억제에 있어서 LFE가 농도 의존적으로 작용함을 관찰하였다. 또한 LFE에 의한 암세포증식 억제효과가 apoptosis에 의한 것인지 알아보기 위하여 MCF-7 세포에 LFE를 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 24시간 동안 처리한 후 Annexin V-PI staining을 통하여 apoptosis가 유도된 세포를 측정하였다. 그 결과 Fig. 1(b)에서와 같이 LFE를 처리하였을 때 농도 의존적으로 세포의 apoptosis가 유도 되었으며, 이를 통하여 LFE의 처리에 따른 HT-29 세포의 증식억제 효과는 apoptosis 유도에 의한 것임을 확인하였다.

3.2. LFE에 의한 MCF-7세포에서의 ROS 생성 분석

일반적으로 ROS는 정상세포에 손상을 주지만, 암세포 내에서는 apoptosis signaling kinase 1 (ASK1)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) 신호경로를 통하여 초기 apoptosis를 조절한다고 알려져 있다 [13]. 따라서 ROS 생성을 촉진하는 것뿐만 아니라, 세포 내 신호경로의 조절을 통해 apoptosis를 유도하는 신소재를 찾아내는 것이 새로운 항암 연구의 기초가 될 수 있다. 선행연구에 의하면 MCF-7 유방암세포에 퀴세틴을 처리하였을 때, 농도 의존적으로 세포 내 ROS가 증가하는 것을 DCFH-DA 염색을 통하여 확인하였으며, 동일한 조건에서 ROS scavenger인 NAC과 퀴세틴을 병행 처리한 결과

ROS의 발생이 억제되는 것이 확인된 바 있다 [14]. 또한 HT-29 대장암세포에서 레스베라트롤의 처리에 따른 세포 내 ROS 증가에 의해서 AMPK가 활성화되어 apoptosis가 유도되며, 같은 세포에서 EGCG 처리 농도가 증가함에 따라 p53과 PARP의 cleavage가 일어나는 원인이 ROS 증가에 의한 것임을 DCFH-DA 염색을 통해 확인한 바 있다 [15,16]. 따라서 본 연구에서는 MCF-7 세포에 LFE를 처리하였을 때 나타나는 세포증식억제 및 apoptosis 유도 효과가 LFE의 ROS 생성과 연관이 있을 것이라는 점을 확인하고자 하였다. 이를 확인하기 위하여 Fig. 2(a)에서 MCF-7 세포에 LFE를 농도별(0, 20, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 24시간 처리하여 flow cytometric 분석을 통해 DCF의 검출을 확인한 결과, LFE의 처리 농도가 증가함에 따라 ROS 수준이 증가한다는 것을 밝혀냈다. 또한 Fig. 2(b)에서 fluorescence microscope를 이용하여 LFE를 처리한 1시간, 2시간 후의 세포 내 ROS 생성을 확인하고, NAC을 이용하여 세포 내 ROS를 제거하였을 때의 상태 변화를 나타내었다. 그 결과 LFE 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 단독으로 처리한 군에서는 시간이 지남에 따라 DCF 형광이 증가하는 것으로 보아 ROS 발현이 증가하고, NAC을 30분 선처리 후 LFE를 처리하였을 시에는 LFE에 의한 ROS의 발생이 억제되어 DCF에 의한 형광이 감소한 것을 확인하였다.

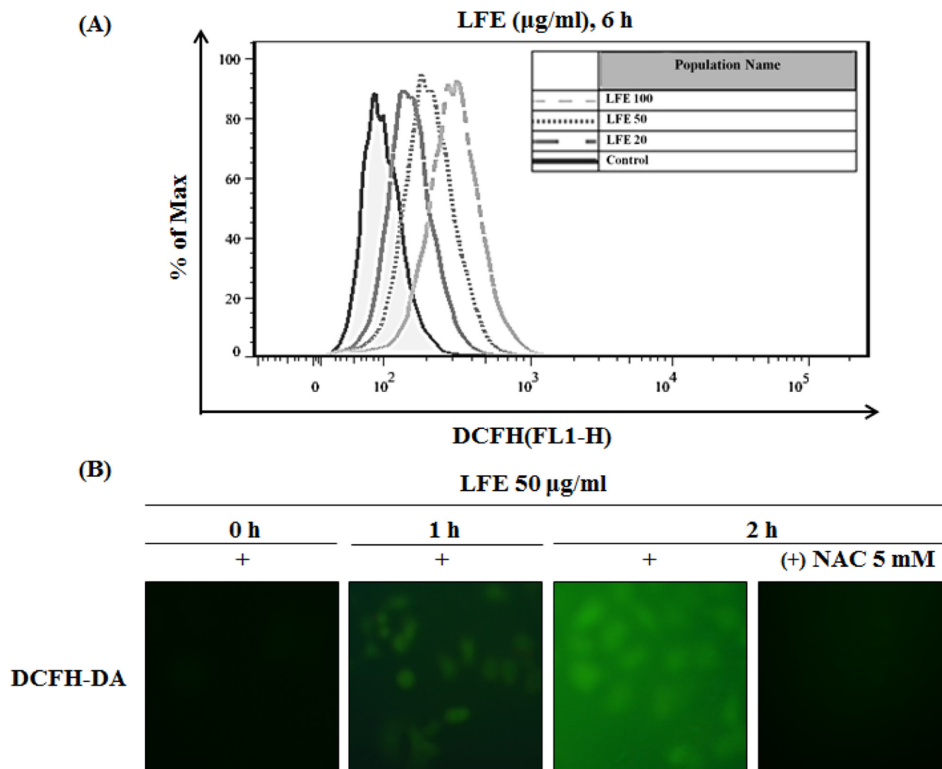


Fig. 2. LFE generated ROS in MCF-7 breast cancer cells. (A) Cells were treated with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of LFE and 10 μM of DCFH-DA. Cells were pre-treated with 5 mM of NAC for 30 min and then exposed to LFE and 10 μM of DCFH-DA. After treatment, fluorescence intensity was measured by flow cytometry system (FACS). (B) For observance of intracellular ROS by fluorescence microscope, cells were treated with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of LFE and then incubated with 10 μM of DCFH-DA.

3.3. LFE 처리에 따른 p53의 활성화와 apoptosis 관련 단백질의 조절

암세포는 세포 성장 및 증식을 유지하기 위하여 다량의 에너지, 지방 그리고 아미노산 등을 필요로 하며, 산화적 스트레스와 pro-survival 분자들의 조절, 그리고 항산화적 기능의 변환 등과 같은 방법으로 스스로를 보호하기 위한 방어수단을 만들어 낸다 [17]. 본 실험에서는 이러한 암세포의 자가방어 현상을 파괴하기 위한 수단으로써, ROS가 세포 산화환원반응 신호경로뿐만 아니라 세포의 산화적 손상을 유도한다는 점에 주목하여 실험을 진행하였다. 이에 따라 MCF-7 유방암 세포에서 LFE의 처리에 따른 ROS의 증가가 세포 생존에 중요한 역할을 하는 p53의 활성을 조절하여 apoptosis 유도 과정에 중요한 역할을 할 것이라 예상하였다. 또한 p53에 의한 apoptosis 유도 분자인 Puma의 활성화 및 세포의 생존 및 사멸에 관여하는 미토콘드리아 관련 단백질들인 Bcl-2, Bax의 조절을 확인하여 HT-29 세포에서의 apoptosis를 확인하고자 하였다. 우선 LFE를 농도별로 처리했을 때 p53, Puma, Bcl-2, Bax의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Western blotting을 실시하였다. 그 결과 Fig. 3에서와 같이 LFE의 농도의존적으로 p53의 활성이 증가하는 것을 확인하였다. LFE의 처리에 따라 미토콘드리아에 존재하는 단백질인 Puma는 종양억제자인 p53의 조절로 인하여 그 발현이 증가하고, 또한 Bcl-2의 활성을 억제시킴으로써 Bax의 발현을 증가시키는 일련의 신호경로를 조절할 수 있다는 것을 확인하였다. 유방암세포에서의 apoptosis 과정 중 p53과 Bcl-2는 매우 밀접한 관계를 가진 것으로 알려져 있으며, p53 돌연변이가 과발현될 경우 Bcl-2의 발현이 down-regulation된다 [18]. 또한 Bcl-2 cDNA를 encoding하고 있는 pCR-Bcl-2 plasmid를 transfection하여 Bcl-2를 과발현 시킨 MCF-7/Bcl-2 세포에서 genistein의 처리로 Bcl-2의 억제, Bax, p53의 활성화 그리고 PARP의 cleavage를 통한 apoptosis를 유도한 연구결과가 보고되어왔다 [19]. ROS를 통한 pro-apoptosis의 유도는 암세포의 apoptosis 유도 과정에 있어서 중요한 역할을 하는 Bax의 활성화와 Bcl-2

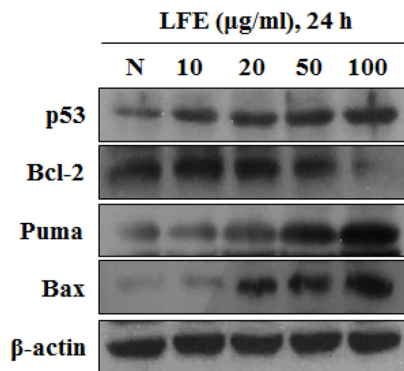


Fig. 3. LFE generated ROS activated p53 as well as other proteins in MCF-7 breast cancer cells. LFE effects on p53, Bcl-2, Bax and Puma in MCF-7 breast cancer cells. Cells were treated with LFE 10–100 µg/mL for 24 h. Protein levels of p53, Bcl-2, Bax and Puma were determined by Western blotting.

의 억제 및 caspase의 활성화에 의해서 이루어진다는 선행연구와 본 연구의 결과를 바탕으로 LFE의 처리에 의하여 p53 그리고 미토콘드리아의 apoptosis 연관 단백질들인 Puma, Bcl-2, Bax와 같은 신호분자들의 조절이 이루어질 수 있다는 것을 확인하였다.

3.4. p53의 저해 상태 및 항산화 조건에서 LFE의 처리에 따른 신호분자들의 관계 확인

p53은 산화-환원에 관련된 유전인자들을 활성화하고, 이들 유전인자로부터 만들어진 생성물들이 반응성이 강한 산소를 발생하여 결국 산화과정에서 의해 세포의 미토콘드리아 구성 물질들이 분해됨으로써 apoptosis 단계에 이르게 된다 [8,9]. 이러한 p53이 전사인자로서 활동하는 작용을 억제하는 물질인 pifithrin-α (PFT-α)를 이용하여 LFE에 의한 ROS 조건 형성 과정에 있어서 p53의 역할에 대해 알아보하고자 하였다. 이를 위하여 먼저 MTT assay를 통해 PFT-α를 단독 그리고 LFE와 병행처리하였을 때의 세포 생존율을 확인하였다. Fig. 4(a)에서와 같이 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비하여 LFE

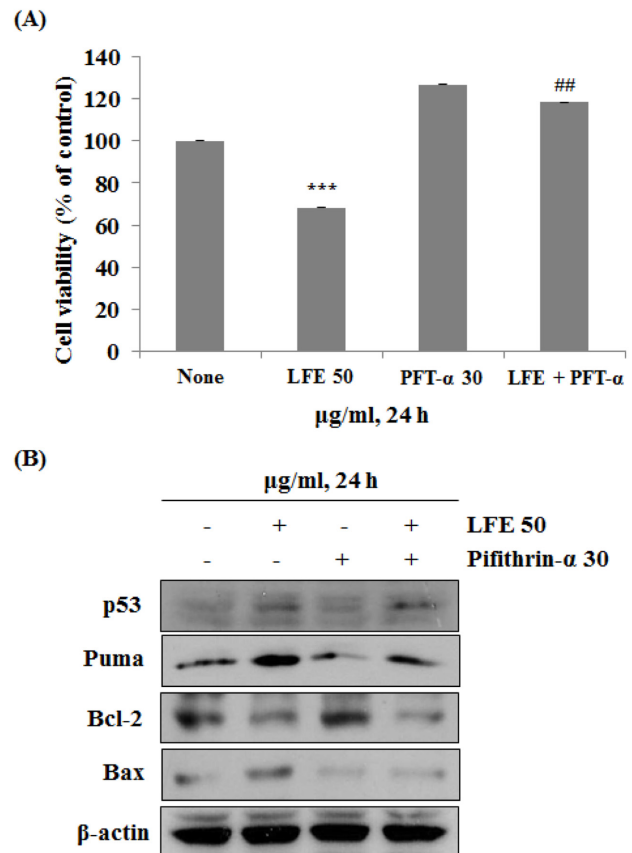


Fig. 4. The specific inhibition of p53 using PFT-α reduced LFE-induced cell death. (A) Cell viability was measured by MTT assay. Cells were treated with 50 µg/ml of LFE for 24 h after pretreatment of 30 µg/ml PFT-α for 30 min. (B) Same conditions, expression of p53, Bcl-2, Bax and Puma were determined by Western blotting. ## $p < 0.01$ compared to LFE 50 µg/ml-treated group, *** $p < 0.001$ compared to control. (each experiment's $n = 3$)

단독처리 군에서는 68.2%의 생존율을 나타냈으며, PFT- α 단독 처리시 126.7%, LFE와 PFT- α 병행처리 시에는 118.18%를 나타냄을 관찰하였다. 이러한 결과를 토대로 p53이 암세포의 증식에 있어서 중요한 역할을 하며, 전사인자로서 p53의 작용이 억제되었을 시 세포증식과 관련된 인자들이 활성화됨을 알 수 있었다. 이와 같은 조건으로 Western blotting을 실시한 결과, Fig. 4(b)에서 나타내는 것과 같이 p53은 LFE 처리시 증가하며, PFT- α 는 p53 자체의 발현을 억제하는 것이 아니기 때문에 PFT- α 와 LFE 병행처리 시에도 증가됨을 확인하였다. 또한 p53의 조절을 받는 Puma는 LFE 단독 처리시 발현이 증가하였으며, LFE에 의한 Puma의 조절은 p53 의존적인 경로를 통해 일어남을 알 수 있다. Bcl-2는 LFE 단독처리에 의해 저해되어 Bax의 발현을 증가시키지만, PFT- α 와 LFE 병행처리시 p53의 작용이 억제된 조건에서는 Bcl-2의 저해를 통해 Bax의 발현이 증가하지 않는다는 것이 확인되었다. PFT- α 의 처리에 따른 세포 내 환경에서는 LFE가 Bax를 조절할 수 없다는 것을 의미한다. 이를 통해 LFE를 통한 apoptosis 유도 과정에 있어서 p53의 역할이 매우 중점적임을 알 수 있다. 선행 연구에 따르면 MCF-7 세포에서 천연 식물에서 추출한 stevioside의 처리로 인한 ROS의 생성이 mitochondrial transmembrane potential (MTP)의 변화를 유도하며, 이에 따라 미토콘드리아 연관 apoptotic 단백질들인 Bax, Bcl-2, Caspase-9의 조절되어 apoptosis를 일으키기 밝혀졌다 [20]. 따라서 선행연구 및 본 연구의 결과를 통해 MCF-7 세포에서의 apoptosis 유도는 식물 추출물에 의한 ROS생성과 그에 따른 p53의 활성을 통해 이루어 질 수 있음을 확인할 수 있다.

Fig. 4를 통하여 LFE의 처리로 p53 의존적 ROS 산화과정을 통한 apoptosis 유도 관련 단백질 조절 관계를 살펴보았다. 그러므로 LFE에 의한 ROS 발생을 NAC을 통해 억제시킨 조건에서의 단백질 조절 양상을 살펴볼 필요가 있었다. 이를 위하여 우선 MTT assay를 통해 NAC의 처리에 따른 세포 생존율의 변화를 관찰하였다. Fig 5(a)에서 나타내는 것과 같이 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비하여 LFE 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리한 군은 약 60%, NAC 단독처리군에서 101%, 병행 처리군에서 99.5%를 나타냈다. NAC의 단독 처리 및 LFE와 병행 처리한 결과를 통하여 NAC의 처리로 인해 LFE의 ROS 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었으며, 이와 동일한 조건으로 Western blotting을 실시하여 NAC과 LFE의 처리가 세포 내 신호전달 체계에 미치는 영향을 확인해보고자 하였다. 그 결과 p53은 NAC을 통한 항산화 조건에서 발현되지 않았으며, LFE와 병행 처리한 경우에도 발현이 증가하지 않는 것으로 나타났다. 또한 Puma와 Bax 역시 LFE 단독 처리군 외에 NAC의 처리에 의해서 그 발현이 억제됨을 확인하였다. Bcl-2는 NAC과 LFE 병행 처리군에서 감소하는 것으로 나타난 것으로 보아, 항산화 조건에서도 LFE의 ROS 이외의 다른 경로를 통하여 직접적으로 저해할 수 있다는 것을 의미한다. 결과적으로 NAC의 처리에 따른 항산화 조건에서는 LFE에 의해 발생하는 ROS의 제거로 인해 p53에 의한 apoptosis 유도 효과가 감소한다는 것을 의미한다. 본 연구에서의 LFE에 의

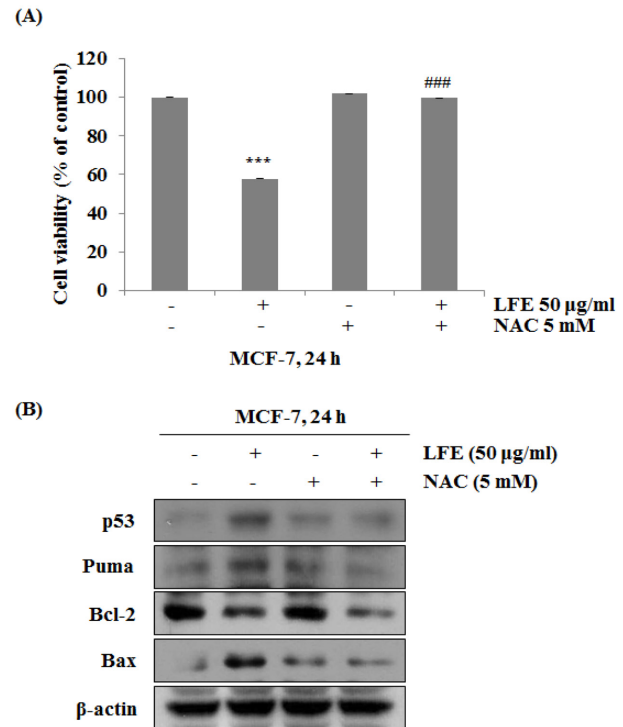


Fig. 5. Treatment of NAC inhibited LFE-generated ROS. (A) Cell viability was measured by MTT assay. Cells were treated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LFE for 24 h after pre-treatment of 5 mM NAC for 30 min. (B) Same conditions, expression of p53, Bcl-2, Bax and Puma were determined by Western blotting. *** $p < 0.001$ compared to control, ### $p < 0.001$ compared to LFE 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -treated group. (each experiment's $n=3$)

한 apoptosis 유도 과정이 일어남에 있어서 p53이 중심적인 역할을 하며, LFE에 의한 ROS는 p53의 활성에 의해 발생할 수 있다는 것을 바탕으로 향후 심화적인 연구를 진행할 필요가 있을 것으로 보인다. 더하여 Bcl-2의 조절과 같이, LFE의 ROS생성 기능뿐만 아니라 다양한 경로를 통한 apoptosis 유도 효과를 확인할 필요가 있을 것으로 보인다. 또한 암세포의 증식억제 및 ROS 생성을 통한 apoptosis유도 효과를 가진 신소재를 발견하였다는 점에서 앞으로 더 많은 *in vitro*, *in vivo* 실험을 통하여 LFE를 이용한 항암효과를 확인해 볼 필요가 있을 것이다.

4. 결론

암 예방 및 치료를 위하여 항암제, 파이토케미컬, 그리고 최근에는 천연물 추출물을 이용하여 세포 내 신호 경로를 조절을 통한 apoptosis, angiogenesis, metastasis 등 다양한 분야의 연구가 진행되고 있다. 본 연구에서는 MCF-7 유방암 세포에서 영령향 추출물 (LFE)에 의해 생성되는 ROS를 이용한 apoptosis 유도 효과를 확인하였다. MTT assay를 이용하여 LFE의 처리에 따른 세포 생존율의 억제를 확인하였고, 이러한 세포

증식억제가 apoptosis에 의한 것임을 PI-Annexin V staining을 통해 확인하였다. 또한 DCFH-DA 염색을 통하여 LFE에 의한 ROS 발생 증가를 확인한 후, LFE를 농도별로 처리했을 때 p53, Puma, Bax, Bcl-2와 같은 apoptosis 관련 단백질들의 발현이 조절됨을 Western blotting을 통하여 확인하였다. PFT- α 를 이용하여 종양형성 억제자인 p53의 기능을 억제하였을 때, MCF-7 세포에서 LFE에 의한 apoptosis 유도 과정은 p53 중심으로 일어남을 확인하였다. 결론적으로, LFE에 의한 ROS 발생은 p53-dependent한 경로를 통해 이루어지며, 이를 통하여 암세포의 생존 및 apoptosis에 관여하는 단백질들을 조절하여 암세포의 증식억제 효과를 가진다는 것을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부와 한국산업기술재단의 전략기술양성 사업 및 2013년 정부 (교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (KRF-2013-0021402).

REFERENCES

- Chen, T. and Y. S. Wong (2008) Selenocystine induces S-phase arrest and apoptosis in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells by modulating ERK and Akt phosphorylation. *J. Agr. Food Chem.* 56: 10574-10581.
- Shen, Y. H., Z. Y. Weng, Q. S. Zhao, Y. Q. Zeng, J. L. Ríos, W. L. Xiao, and H. D. Sun (2005) Five new triterpene glycosides from *Lysimachia foenum-graecum* and evaluation of their effect on the arachidonic acid metabolizing enzyme. *Planta. medica.* 71: 770-775.
- Li, H. Y., Z. B. Hao, X. L. Wang, L. Huang, and J. P. Li (2009) Antioxidant activities of extracts and fractions from *Lysimachia foenum-graecum* Hance. *Bioresource technology* 100: 970-974.
- Korsmeyer, S. J. (1995) Regulators of cell death. *Trends Genet.* 11: 101-105.
- Sauer, H., M. Wartenberg, and J. Hescheler (2001) Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell. Physiol. Biochem.* 11: 173-186.
- Kuo, P. L., C. Y. Chen, and Y. L. Hsu (2007) Isoobtusilactone a induces cell cycle arrest and apoptosis through reactive oxygen species/apoptosis signal-regulating kinase 1 signaling pathway in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 67: 7406-7420.
- Lin, C. C., S. T. Kao, G. W. Chen, H. C. Ho, and J. G. Chung (2006) Apoptosis of human leukemia HL-60 cells and murine leukemia WEHI-3 cells induced by berberine through the activation of caspase-3. *Anticancer Res.* 26: 227-242.
- Tyner, S. D., S. Venkatachalam, J. Choi, S. Jones, N. Ghebranious, H. Igelmann, X. Lu, G. Soron, B. Cooper, C. Brayton, S. H. Park, T. Thompson, G. Karsenty, A. Bradley, and L. A. Donehower (2002) p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 415: 45-53.
- Conseiller, E., L. Debussche, D. Landais, C. Venot, M. Maratrat, V. Sierra, B. Tocque, and L. Bracco (1998) CTS1: a p53-derived chimeric tumor suppressor gene with enhanced in vitro apoptotic properties. *J. Clin. Invest.* 101: 120-127.
- Nakano, K., and K. H. Vousden (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell* 7: 683-694.
- Gross, A., J. M. McDonnell, and S. J. Korsmeyer (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13: 1899-1911.
- Gomez-Lazaro, M., M. F. Galindo, R. M. F. De Mera, F. J. Fernandez-Gomez, C. G. Concannon, M. F. Segura, J. X. Comella, J. H. M. Prehn, and J. Jordan (2007) Reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase activate Bax to induce mitochondrial cytochrome c release and apoptosis in response to malonate. *Mol. Pharmacol.* 71: 736-743.
- Moungjaroen, J., U. Nimmannit, P. S. Callery, L. Y. Wang, N. Azad, V. Lipipun, P. Chanvorachote, and Y. Rojanasakul (2006) Reactive oxygen species mediate caspase activation and apoptosis induced by lipoic acid in human lung epithelial cancer cells through Bcl-2 down-regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319: 1062-1069.
- Lee, Y. K., J. T. Hwang, D. Y. Kwon, Y. J. Surh, and O. J. Park (2010) Induction of apoptosis by quercetin is mediated through AMPK α 1/ASK1/p38 pathway. *Cancer Lett.* 292: 228-236.
- Hwang, J. T., D. W. Kwak, S. K. Lin, H. M. Kim, Y. M. Kim, and O. J. Park (2007) Resveratrol induces apoptosis in chemoresistant cancer cells via modulation of AMPK signaling pathway. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1095: 441-448.
- Hwang, J. T., J. Ha, I. J. Park, S. K. Lee, H. W. Baik, Y. M. Kim, and O. J. Park (2007) Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway. *Cancer Lett.* 247: 115-121.
- Farber, E. and H. Rubin (1991) Cellular adaptation in the origin and development of cancer. *Cancer Res.* 5: 2751-2761.
- Haldar, S., M. Negrini, M. Monne, S. Sabbioni, and C. M. Croce (1994) Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res.* 54: 2095-2097.
- Tophkhane, C., S. Yang, W. Bales, L. Archer, A. Osunkoya, A. D. Thor, and X. Yang (2007) Bcl-2 overexpression sensitizes MCF-7 cells to genistein by multiple mechanisms. *Int. J. Oncol.* 31: 867-874.
- Paul, S., S. Sengupta, T. K. Bandyopadhyay, and A. Bhattacharyya (2012) Stevioside induced ROS-mediated apoptosis through mitochondrial pathway in human breast cancer cell line MCF-7. *Nutr. Cancer* 64: 1087-1094.