

Apoptotic Cell Death of Human Leukemia U937 Cells by Essential Oil purified from Schisandrae Semen

Yung Hyun Choi*

Department of Biochemistry, Donggeui University College of Korean Medicine, Busan 614-052, and Anti-Aging Research Center and Blue-Bio Industry RIC, Donggeui University, Busan 614-71, Korea

Received December 21, 2014 / Revised January 8, 2015 / Accepted January 8, 2015

Schisandrae fructus [*Schizandra chinensis* (Turcz.) Baillon] is a medicinal herb widely used for treating various inflammatory and immune diseases in East Asian countries. The Schisandrae Semen essential oil (SSeo) from this plant has pharmacological activities, including antioxidant, antimicrobial, and anti-tumoral activities. Nevertheless, the biological activities and underlying molecular mechanisms of the potential anti-cancer effects of this oil remain unclear. In the present study, we investigated the potential inhibition of apoptosis signaling pathways by SSeo in human leukemia U937 cells and evaluated the underlying molecular mechanism. Exposure to SSeo resulted in a concentration-dependent growth inhibition due to apoptosis, which was verified by DNA fragmentation, the presence of apoptotic bodies, and an increase in the sub-G1 ratio. Induction of apoptotic cell death by SSeo was correlated with the down-regulation of members of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family (including X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), cIAP-1, and surviving) and anti-apoptotic Bcl-2, and with up-regulation of death receptor (DR) 4 and DR5, depending on dosage. SSeo treatment also induced Bid truncation, mitochondrial dysfunction, proteolytic activation of caspase-3, -8 and -9, and concomitant degradation of activated caspase-3 target proteins such as poly (ADP-ribose) polymerase. Taken together, these findings suggest that SSeo may be a potential chemotherapeutic agent for use in the control of human leukemia cells. Further studies are needed to identify its active compounds.

Key words : Apoptosis, caspase, essential oil, MMP, Schisandrae Semen

서론

Apoptosis (세포사멸)는 정상세포나 주위의 조직에 손상을 주지 않으면서 악성 또는 암세포 등의 제거를 위한 생리적 기전으로 세포의 위축(cell shrinkage)과 염색질 응축(chromatin condensation)과 같은 형태적 변형이 동반되는 세포 죽음의 일종이다. 따라서 표적 암세포의 apoptosis 유도는 항암치료의 전략으로 최상의 방법 중의 하나로 인식되어지고 있다. 일반적으로 apoptosis는 intrinsic mitochondria-mediated 및 extrinsic death receptor (DR)-mediated pathway 두 가지 크게 구별되어진다. Intrinsic pathway는 미토콘드리아 막의 붕괴에 따른 세포질로의 cytochrome *c*와 같은 인자의 방출을 통한 caspase-9의 활성을 통하여 apoptosis를 유도한다[4, 11]. Extrinsic pathway는 DRs와 ligand와의 상호작용을 통한 caspase-8의 활성에 의하여 이루어진다[15, 16]. 또한 활성화된

caspase-8은 세포질에 존재하는 Bid를 절단형(truncated Bid, tBid)으로 전환시켜 pro-apoptotic 단백질인 Bax의 중합화(oligomerization)에 의한 미토콘드리아 삼투성 전이 미세공(mitochondrial permeability transition pore)의 형성을 통하여 mitochondrial membrane potential (MMP)의 소실과 cytochrome *c*의 세포질로의 유리를 유도한다[9, 16, 17]. Apoptosis의 최종단계에서는 두 가지 경로의 의하여 caspase-3 및 -7과 같은 실행자 caspase가 활성화되어 표적 기질 단백질들의 분해를 통하여 apoptosis가 완성된다.

최근 식물성 생리활성 화합물들에 의한 다양한 질환의 병리적 원인 제거와 질환의 진행 차단 효과 등이 입증되면서 이를 활용한 식의약 신소재의 발굴이 광범위하게 이뤄지고 있다. 특히 다양한 식물 유래 천연물 중, 휘발성 아로마 화합물(volatile aroma compound)인 소수성 정유(essential oil)의 활용에 관한 연구가 최근 많은 관심을 끌고 있다[2, 8, 30]. 그동안 많은 연구자들에 의하여 정유의 항균[10, 23], 항산화[5], 항돌연변이성[24] 등의 효능을 바탕으로 항암활성에 관한 연구가 지속적으로 이루어져 왔다[18, 20, 27, 28]. 한편 오미자[*Schizandra chinensis* (Turcz.) Baillon]의 열매(Schisandrae fructus)는 동아시아 지역에서 오랫동안 다양한 염증 및 면역계 질환의 치료 목적으로 사용되어온 약초의 일종이다[21, 25]. 최근 오미자의 항산화, 항균 및 항종양 활성을 포함한 약리학적 활성을 지니

*Corresponding author

Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

는 정유에 관한 연구가 부분적으로 시도되어 왔으나[6, 7, 19, 22], 오미자 종자 정유의 항암활성에 관한 구체적인 연구는 거의 이루어진 바 없다. 따라서 본 연구에서는 오미자 종자 정유[Schisandrae Semen essential oil (SSEO)]의 항암 활성에 관한 연구의 시도를 위하여 U937 인체백혈병 세포를 이용한 항암활성 및 관련 기전 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

오미자 종자 정유의 추출

본 연구에 사용된 오미자 종자는 경상북도 문경 일대에서 수거한 것으로, furnace (Daihan Scientific Co., Seoul, Republic of Korea)를 이용하여, 180°C에서 건조한 다음 미세 분쇄하고, 동결건조기(Freezone 1; Labconco Co., Kansas, MO, USA)로 재건조하였다. 이를 100% 주정에 실온에서 24시간 동안 침전시킨 다음 여과하고, 여과액을 rotary vacuum evaporator (Buchi Rotavapor R-144, BÜCHI Labortechnik, Flawil, Switzerland)로 농축한 다음 3시간 동안 hydrodistillation을 통해 분리하였다[14].

세포 배양 및 세포 생존력 측정

인체 급성 골수 백혈병(acute myeloid leukemia) U937 세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS)가 함유된 RPMI 1640 배지(Gibco-BRL, Rockville, MD, USA)를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. SSEO 처리에 따른 세포 생존력 측정은 colorimetric methyl-thiazol-tetrazolium (MTT) assay에 준하여 실시하였다[3].

Apoptosis 유발 확인

SSEO 처리에 따른 U937 세포의 apoptosis 유도 확인을 위한 세포의 형태적 변화 관찰은 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 염색법에 준하였고[1], DNA의 단편화 확인은 agarose gel 전기영동으로 관찰하였으며[29], apoptosis 유도의 정량화를 위해 propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 염색을 통한 유세포 분석기(flow cytometer, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용한 sub-G1 기에 해당되는 세포의 빈도를 측정하였다[13].

Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

준비된 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 총 단백질을 분리하였다. 동량의 sample을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후, nitrocellulose membrane (Schleicher

and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시켰다. 분리된 단백질이 전이된 membrane을 5% skim milk를 처리하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 1차 항체를 처리하여 상온에서 2시간 이상 또는 4°C에서 over night 시킨 다음 1차 항체에 맞는 2차 항체를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 반응이 끝난 후 enhanced chemiluminescence (ECL) solution (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 발현 양을 분석하였다. 본 연구에 사용된 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), Chemicon (Temecula, CA, USA) 및 Amersham Life Science Corp.에서 구입하였다.

MMP ($\Delta\psi_m$) 값의 분석

MMP 변화 정도를 측정하기 위하여 적정시간 동안 SSEO가 처리된 세포들을 모은 다음 5,5', 6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide (JC-1, Sigma-Aldrich) 용액을 처리하여 20분 동안 37°C에서 반응시켰다. 반응시킨 세포를 2,000 rpm으로 원심 분리하여 상층액을 버리고 다시 500 μ l의 차가운 PBS를 첨가하고 35 mm mesh를 이용하여 단일세포로 분리한 후 유세포 분석기에 적용시켜 SSEO 처리에 따른 MMP의 변화 정도를 분석하였다.

통계 처리

모든 실험결과는 평균값으로 표시하였고 SigmaPlot을 이용하여 Student *t*-test를 이용하여 통계적 유의성을 얻었다.

결 과

U927 세포의 증식에 미치는 SSEO의 영향

인체 백혈병 U937 세포에서 SSEO가 유발하는 증식억제 현상을 조사하기 위하여 SSEO를 적정농도로 24시간 동안 처리한 후 MTT assay를 실시한 결과(Fig. 1A), 20 μ g/ml 농도까지는 큰 변화가 나타나지 않았지만 30 μ g/ml 이상 처리군에서는 SSEO 농도 의존적으로 증식억제 효과가 나타났다.

SSEO 처리에 의한 U937 세포의 apoptosis 유도

SSEO 처리에 의한 U937 세포의 증식억제가 apoptosis 유도 와 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 apoptosis 유발 시 특이하게 관찰되는 핵의 형태변화와 어떠한 연관이 있는지를 DAPI 염색법으로 확인하였다. Fig. 1B에 나타난 바와 같이 SSEO가 처리되지 않은 정상 배지에서 자란 암세포에서 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나 SSEO 처리농도 증가에 따라 전체적인 핵의 밀도 감소와 더불어 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 염색질 응축에 의한 apoptotic body가 관찰되었다. 다음으로 apoptosis 유발의 또

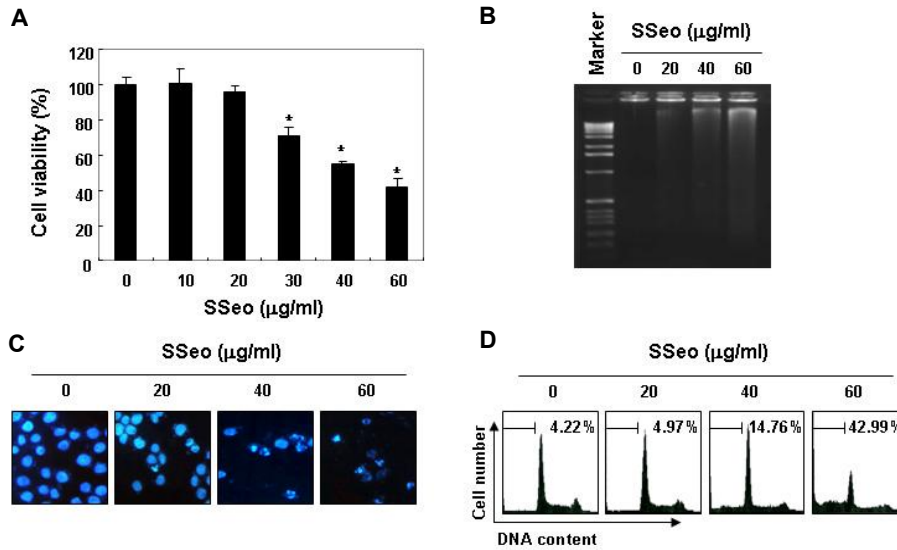


Fig. 1. Inhibition of cell viability and induction of apoptosis by SSeo treatment in human leukemia U937 cells. Cells were plated at 1×10^3 cells per 60-mm plate, and incubated for 24 hr. The cells were treated with the indicated concentrations of SSeo for 24 hr. (A) Cell viability was measured by the metabolic-dye-based MTT assay. (B) Cells grown under the same conditions as (A) were fixed and stained with DAPI. Following a 10-min incubation period at room temperature, stained nuclei were observed under a fluorescence microscope using a blue filter (original magnification 400X). (C) DNA was extracted from cells and analyzed by 1.0% agarose gel electrophoresis in the presence of EtBr. (D) To quantify the degree of apoptotic cells, the cells were collected and stained with PI for flow cytometry analysis. The fraction of apoptotic sub-G1 cells is indicated. Data represent relative mean values \pm SD of three independent experiments. The significance was determined by the Student's t-test ($*p < 0.05$, compared with control).

다른 증거인 DNA 단편화 현상을 관찰하였다. 이를 위하여 정상 및 SSeo가 함유된 배지에서 자란 U937 세포를 대상으로 총 DNA를 추출하여 agarose gel 전기영동으로 조사한 결과는 Fig. 3C에 나타난 바와 같다. 결과에서 볼 수 있듯이 SSeo 처리 농도가 증가할수록 DNA 단편화 현상이 관찰되었다. SSeo 처리에 의한 apoptosis 유발의 정량적인 평가를 위하여 동일한 조건으로 배양된 U937 세포를 대상으로 DNA flow cytometry를 이용하여 apoptosis가 유발되었을 것으로 예상되는 sub-G1기에 해당하는 세포를 측정 한 결과는 Fig. 1D에 나타난 바와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 정상배지에서 자란 암세포에서 자연적 apoptosis 유발 빈도는 약 4.22%로 매우 낮았으나 SSeo 처리농도 증가에 따라 sub-G1기에 해당하는 세포의 빈도가 증가하여 40 및 60 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 약 14.76 및 42.99% 정도의 apoptosis가 유발되었다.

Death receptor 및 ligand의 발현에 미치는 SSeo의 영향

Apoptosis 유발 과정에서 extrinsic pathway를 경유하는 과정에서 중요한 역할을 하는 death receptor 및 ligand에 속하는 유전자들의 발현에 SSeo가 어떠한 영향을 미치는지를 확인한 결과는 Fig. 2A에 나타난 바와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 death receptor 관련 여러 유전자 중 tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), Fas 및 Fas ligand (FasL)의 발현에는 큰 변화가 관찰되지 않았지만 DR4

및 DR5의 발현은 SSeo 처리 농도 의존적으로 증가하였다.

Bcl-2 family의 발현에 미치는 SSeo의 영향

Intrinsic pathway에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 Bcl-2 family 유전자의 발현에 SSeo가 어떠한 영향을 미치는지를 확인한 결과는 Fig. 2B에 나타난 바와 같으며, apoptosis를 억제하는 것으로 알려진 anti-apoptotic 유전자인 Bcl-2 및 Bcl-X_L의 경우는 약간 발현이 감소되거나 큰 변화가 없었으며 apoptosis를 유발하는 것으로 알려진 pro-apoptotic 유전자인 Bax의 경우도 큰 변화를 보이지 않았다. 그러나 활성화된 caspase-8에 의하여 단편화되어 MMP 소실 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 Bid 단백질이 SSeo 처리에 의하여 total Bid의 발현이 감소하는 것으로 나타났으므로 단편화된 형태인 tBid의 증가가 유발되었다는 것을 예상할 수 있었다.

MMP ($\Delta\psi_m$)에 미치는 SSeo의 영향

SSeo 처리에 따른 apoptosis 유발에 있어서 미토콘드리아가 어떠한 역할을 하는지를 확인하기 위하여 MMP 값을 조사한 결과는 Fig. 2C에 나타난 바와 같다. 정상 및 SSeo가 처리된 U937 세포의 MMP 소실 정도를 dual-emission fluorescent dye인 JC-1을 이용하여 확인한 결과, SSeo 처리농도 증가에 따라서 MMP 소실 정도가 증가하였다.

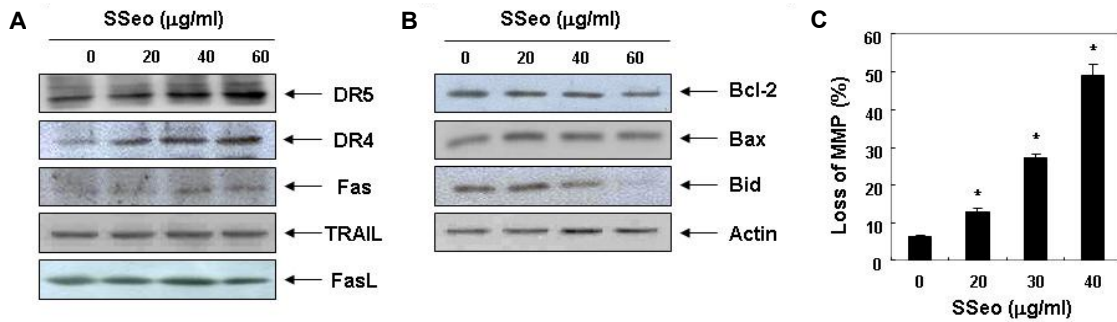


Fig. 2. Effects of SSeo on levels of IAP and Bcl-2 family proteins, and MMP values in U837 cells. (A and B) Following a 24 hr incubation period with various concentrations of SSeo, cells were lysed, and cellular proteins were then separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control. (C) The cells were collected and incubated with 10 µM JC-1 for 20 min at 37°C in the dark. The cells were then washed once with PBS and mean JC-1 fluorescence intensity was detected using a flow cytometer. Data represent relative mean values ± SD of three independent experiments. The significance was determined by the Student's t-test (**p*<0.05, compared with control).

IAP family의 발현에 미치는 SSeo의 영향

Apoptosis에 관여하는 여러 인자들 중 caspase와 직접적으로 결합하여 caspase의 활성을 억제함으로써 apoptosis 유발을 억제하는 것으로 알려진 inhibitors of apoptosis protein (IAP) family에 속하는 인자들의 발현에 SSeo가 어떠한 영향을 미치는 지를 확인하였다. Fig. 3A에 나타난 바와 같이 SSeo 처리에 의하여 조사된 4가지 IAP family (XIAP, cIAP-1, cIAP-1 및 survivin)의 발현이 SSeo 처리 농도 의존적으로 감소하였다.

Caspases의 활성화에 미치는 SSeo의 영향

Apoptosis 유발에 중요한 조절인자로서 작용하는 것으로 알려진 caspases 중 extrinsic 및 intrinsic pathway에 직접적으로 관여하는 caspase-8 및 -9와, 두 경로의 공통 활성 caspase인 caspase-3의 발현에 미치는 SSeo의 영향을 조사하였다. Fig. 3B의 결과에서 알 수 있듯이 SSeo 처리에 의하여 조사된 3가지

caspase의 불활성형 발현이 감소되거나 활성형의 발현이 상대적으로 증가되었음을 알 수 있었다. 또한 caspase-3의 기질 단백질로서 DNA repair와 genomic stability에 관여하는 poly (ADP-ribose)-polymerase (PARP) 단백질의 단편화 동반되었음을 확인하였다.

논 의

본 연구에서는 다양한 약리학적 활성을 가질 것으로 알려진 오미자 종자 정유(SSeo)의 항암효능을 알아보기 위하여 인체 백혈병 U937 세포의 증식에 미치는 영향과 이와 연관된 apoptosis 유발 여부와 함께 그에 따른 분자생물학적 기전에 대해서 조사하였다. 본 연구의 결과에 의하면 SSeo의 처리에 따른 U937 세포의 증식억제 현상은 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있었다.

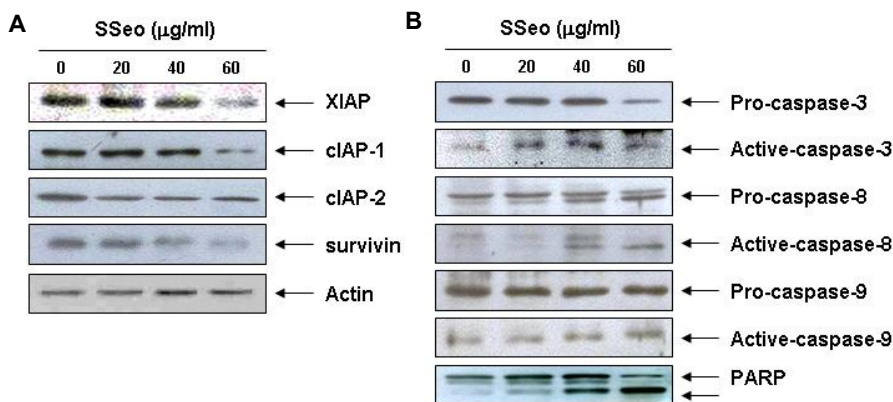


Fig. 3. Inhibition of IAP family proteins and activation of caspases by SSeo in U837 cells. After 24 hr incubation with WEEH, the cells were collected and lysed. The proteins were then separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

일반적으로 apoptosis 과정은 extrinsic 및 intrinsic pathway로 구분되며, 이 과정은 다양한 유전자들의 발현 및 활성 변화와 연계되어 있다. Extrinsic pathway의 경우는 세포막에 존재하는 DR4, DR5 및 Fas 등과 같은 death receptor에 TRAIL 및 FasL 등과 같은 apoptotic ligand가 결합함으로써 시작된다. 이러한 신호에 의하여 initiator caspase인 caspase-8의 활성화에 의한 caspase cascade에 의하여 하위 단계에 있는 caspase-3의 활성화에 직접적으로 관여하거나 Bid를 단편화시킴으로써 tBid를 형성하여 intrinsic pathway를 통한 apoptosis를 증폭시킨다[15, 16]. Intrinsic pathway의 경우는 기본적으로 Bcl-2 family 단백질의 발현 변화와 미토콘드리아의 기능 이상이 동반된다. Bcl-2 family는 apoptosis를 억제하는 anti-apoptotic member와 apoptosis를 유발하는 pro-apoptotic member로 구성되어 있으며, 이들은 서로 dimer를 형성하며 결합하고 있다. 이들 사이의 균형이 깨어지게 되면 미토콘드리아의 기능 이상을 유발하게 되고 미토콘드리아로 내막에 존재하고 있는 cytochrome c와 같은 단백질인 세포질로 방출됨으로써 하위단계에 있는 여러 가지 유전자들을 조절하여 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다[4, 11].

따라서 SSeo 처리에 따른 U937 세포에서의 apoptosis 유발에 있어서 미토콘드리아 기능 손상이 관여하는지를 확인하기 위하여 MMP의 변화 정도를 확인한 결과, SSeo 처리 농도 증가에 따라 MMP의 소실이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2C). 이러한 MMP의 소실에 extrinsic pathway가 관여하는지를 확인하기 위하여 death receptor 및 apoptotic ligand 유전자들의 발현 변화를 확인한 결과, DR4 및 DR5의 발현이 증가하는 것으로 관찰되었다(Fig. 2A). 또한 intrinsic pathway에 관여하는 Bcl-2 family 유전자들의 발현변화를 확인한 결과, Bcl-2 및 Bax의 발현에는 큰 변화가 없었으나, Bid 단백질의 발현감소가 나타났으므로 상대적으로 tBid의 생성이 증가되었음을 추측할 수 있었다(Fig. 2B). 이상의 결과에서 SSeo에 의한 apoptosis 유발은 death receptor 및 apoptotic ligand의 발현변화에 따른 tBid의 생성증가와 미토콘드리아의 기능 이상이 유발되어 미토콘드리아 내막에 존재하고 있는 cytochrome c가 세포질로 방출되면서 개시하는 것으로 생각되어진다.

한편 IAP family에 속하는 단백질들은 caspase와 직, 간접적으로 결합함으로써 caspase의 활성을 억제하여 apoptosis를 억제하는 것으로 알려져 있다[12, 26]. 따라서 SSeo가 IAP family 인자들의 발현에 어떠한 영향을 미치는지를 확인한 결과, 조사된 대부분의 IAP family 단백질의 발현이 SSeo 처리 농도에 의존적으로 감소되었다(Fig. 3A). Caspase는 cysteine-containing aspartate-specific protease family로서 세포가 정상적으로 성장 및 생존할 경우에는 핵과 mitochondria의 외막에 불활성 상태인 proenzyme 형태로 존재하고 있지만 세포 내외부의 다양한 자극에 의하여 활성화되어 기질 단백질들의 분해를

유발함으로써 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있다. Caspase는 initiator caspase인 caspase-8 및 -9와 effector caspase인 caspase-3, -6 및 -7 등으로 나누어지는데 먼저 initiator caspase가 활성화 되면 하위단계에 있는 effector caspase를 활성화시킴으로써 세포의 성장 및 생존에 중요한 역할을 하는 여러 종류의 기질 단백질들은 분해함으로써 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있다[9, 16, 17]. 특히 caspase-3에 의하여 분해가 유발되는 대표적인 기질 단백질 중의 하나가 PARP이며, caspase-3이 활성화되면 116 kDa의 분자량을 가진 PARP 단백질이 85 및 24 kDa으로 단편화되면 효소적 기능의 상실로 인하여 정상적인 DNA repair 과정이 억제되며, PARP 단백질의 단편화는 apoptosis 유발의 생화학적 표지자로 널리 사용되고 있다. 따라서 본 연구에서는 apoptosis 유발에 직접적으로 관여하는 것으로 알려진 caspase-3, -8 및 -9의 발현에 미치는 SSeo의 영향에 대해서 조사하였다. 결과에서 알 수 있듯이 SSeo는 death receptor에 의하여 활성화 되는 것으로 알려진 caspase-8 및 세포질로 방출된 cytochrome c에 의하여 활성화 되는 것으로 알려진 caspase-9의 활성화를 유발하였으며, caspase cascade에 의하여 apoptosis에 직접적으로 관여하는 caspase-3의 활성화 발현도 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 5). 또한 활성화된 caspase-3에 의하여 분해가 일어나는 기질 단백질인 PARP의 경우 SSeo 처리에 의하여 모두 단편화가 유발되는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합해 보면 인체 백혈병 U937 세포에 SSeo를 처리하였을 경우에 유발되는 apoptosis는 DR4 및 DR5의 발현 증가를 통한 caspase-8의 활성화와 이로 인한 Bid 단백질의 단편화와 함께 미토콘드리아 기능 이상에 의하여 caspase-9 및 -3의 활성화 유발과 기질단백질들의 분해가 중요한 역할을 하는 것으로 생각되며, IAP family의 발현 감소로 인하여 caspase의 활성이 억제되지 못하는 것도 apoptosis 유도에 어느 정도 관여했을 것으로 생각된다. 따라서 SSeo 처리에 의하여 유발되는 apoptosis는 extrinsic 및 intrinsic pathway를 모두 경유하는 multiple apoptotic pathway에 의하여 조절되며, 이때 caspases가 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구(No. 2012046358)의 일부임.

References

1. Atale, N., Gupta, S., Yadav, U. C. and Rani, V. 2014. Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. *J. Microsc.* **255**, 7-19.
2. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils-a review. *Food Chem.*

- Toxicol.* **46**, 446-475.
3. Bellamy, W. T. 1992. Prediction of response to drug therapy of cancer. A review of *in vitro* assays. *Drugs* **44**, 690-708.
 4. Caroppi, P., Sinibaldi, F., Fiorucci, L. and Santucci, R. 2009. Apoptosis and human diseases: mitochondrion damage and lethal role of released cytochrome *c* as proapoptotic protein. *Curr. Med. Chem.* **16**, 4058-4065.
 5. Chaieb, K., Zmantar, T., Ksouri, R., Hajlaoui, H., Mahdouani, K., Abdely, C. and Bakhrouf, A. 2007. Antioxidant properties of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* and its antifungal activity against a large number of clinical *Candida* species. *Mycoses* **50**, 403-406.
 6. Chen, X., Zhang, Y., Zu, Y. and Yang, L. 2012. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Schisandra chinensis* fruits. *Nat. Prod. Res.* **26**, 842-849.
 7. Chen, Y., Tang, J., Wang, X., Sun, F. and Liang, S. 2012. An immunostimulatory polysaccharide (SCP-IIa) from the fruit of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *Int. J. Biol. Macromol.* **50**, 844-848.
 8. Edris, A. E. 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother. Res.* **21**, 308-323.
 9. Esposti, M. D. 2002. The roles of Bid. *Apoptosis* **7**, 433-440.
 10. Gutierrez, J., Barry-Ryan, C. and Bourke, P. 2009. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiol.* **26**, 142-150.
 11. Hajra, K. M. and Liu, J. R. 2004. Apoptosome dysfunction in human cancer. *Apoptosis* **9**, 691-704.
 12. Huang, Y., Park, Y. C., Rich, R. L., Segal, D., Myszka, D. G. and Wu, H. 2001. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* **104**, 781-790.
 13. Jaruga, E., Skierski, J., Radziszewska, E. and Sikora, E. 2000. Proliferation and apoptosis of human T cells during replicative senescence—a critical approach. *Acta Biochim. Pol.* **47**, 293-300.
 14. Kang, J. S., Han, M. H., Kim, G. Y., Kim, C. M., Chung, H. Y., Hwang, H. J., Kim, B. W. and Choi, Y. H. 2014. Schisandrae semen essential oil attenuates oxidative stress-induced cell damage in C2C12 murine skeletal muscle cells through Nrf2-mediated upregulation of HO1. *Int. J. Mol. Med.* **35**, 453-459.
 15. Kantari, C. and Walczak, H. 2011. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 558-563.
 16. Kaufmann, T., Strasser, A. and Jost, P. J. 2012. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death Differ.* **19**, 42-50.
 17. Korsmeyer, S. J., Wei, M. C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K. J. and Schlesinger, P. H. 2000. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome *c*. *Cell Death Differ.* **7**, 1166-1173.
 18. Kumar, A., Malik, F., Bhushan, S., Sethi, V. K., Shahi, A. K., Kaur, J., Taneja, S. C., Qazi, G. N. and Singh, J. 2008. An essential oil and its major constituent isointermedeol induce apoptosis by increased expression of mitochondrial cytochrome *c* and apical death receptors in human leukaemia HL-60 cells. *Chem. Biol. Interact.* **171**, 332-347.
 19. Liu, C. J., Zhang, S. Q., Zhang, J. S., Liang, Q. and Li, D. S. 2012. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from berries of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *Nat. Prod. Res.* **26**, 2199-2203.
 20. Loizzo, M. R., Tundis, R., Menichini, F., Saab, A. M., Statti, G. A. and Menichini, F. 2008. Antiproliferative effects of essential oils and their major constituents in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells. *Cell Prolif.* **41**, 1002-1012.
 21. Lu, Y. and Chen, D. F. 2009. Analysis of *Schisandra chinensis* and *Schisandra sphenanthera*. *J. Chromatogr. A.* **1216**, 1980-1990.
 22. Ma, C. H., Yang, L., Zu, Y. G. and Liu, T. T. 2012. Optimization of conditions of solvent-free microwave extraction and study on antioxidant capacity of essential oil from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *Food. Chem.* **134**, 2532-2539.
 23. Manohar, V., Ingram, C., Gray, J., Talpur, N. A., Echard, B. W., Bagchi, D. and Preuss, H. G. 2001. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biochem.* **228**, 111-117.
 24. Mezzoug, N., Elhadri, A., Dallouh, A., Amkiss, S., Skali, N. S., Abrini, J., Zhiri, A., Baudoux, D., Diallo, B., El Jaziri, M. and Idaomar, M. 2007. Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. *Mutat. Res.* **629**, 100-110.
 25. Panossian, A. and Wikman, G. 2008. Pharmacology of *Schisandra chinensis* Baill.: an overview of Russian research and uses in medicine. *J. Ethnopharmacol.* **118**, 183-212.
 26. Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. and Reed, J. C. 1997. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* **16**, 6914-6925.
 27. Su, M., Wu, P., Li, Y. and Chung, H. Y. 2010. Antiproliferative effects of volatile oils from *Centipeda minima* on human nasopharyngeal cancer CNE cells. *Nat. Prod. Commun.* **5**, 151-156.
 28. Verma, M., Singh, S. K., Bhushan, S., Pal, H. C., Kitchlu, S., Koul, M. K., Thappa, R. K. and Saxena, A. K. 2008. Induction of mitochondrial-dependent apoptosis by an essential oil from *Tanacetum gracile*. *Planta. Med.* **74**, 515-520.
 29. Walker, N. I., Harmon, B. V., Gobé, G. C. and Kerr, J. F. 1998. Patterns of cell death. *Methods Achiev. Exp. Pathol.* **13**, 18-54.
 30. Yang, S. A., Jeon, S. K., Lee, E. J., Shim, C. H. and Lee, I. S. 2010. Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. *Nat. Prod. Res.* **24**, 140-151.

초록 : 오미자 종자 정유에 의한 인체백혈병 U937 세포의 apoptosis 유도

최영현*

(동의대학교 한의과대학 생화학교실, 항노화연구소 및 블루바이오소재개발센터)

오미자 종자에서 추출된 정유(Schisandrae Semen essential oil, SSeo)의 항암활성 및 작용 기전 해석을 위하여 U937 백혈병 세포를 대상으로 apoptosis 유도 여부를 조사하였다. SSeo 처리에 의한 U937 세포의 증식 억제는 apoptosis 유도와 연관성이 있음을 DAPI 염색을 통한 apoptotic body 출현의 증가, agarose gel 전기영도에 의한 DNA의 단편화 유도 및 flow cytometry 분석에 의한 Sub-G1기 세포 빈도의 증가로 확인하였다. SSeo 처리에 의한 apoptosis 유도에서 IAP family 단백질에 속하는 XIAP, cIAP-1 및 survivin의 발현 감소와 anti-apoptotic Bcl-2 단백질의 발현 저하, DR4 및 DR5의 발현 증가와 연관성이 있었다. SSeo 처리는 또한 Bid truncation, 미토콘드리아 기능 손상, caspases (-3, -8 and -9)의 활성화와 활성형 caspase-3의 기질 단백질인 PARP의 단편화를 동반하였다. 본 연구의 결과는 오미자 정유의 생화학적 항암기전 해석을 이해하고 향후 지속적인 연구를 위한 기초자료로서 활용될 수 있을 것으로 생각된다.