

A549세포에서 닥나무 추출물의 미토콘드리아/Caspase 경로를 통한 Apoptosis 유도작용

김태현¹ · 김단희¹ · 문연자^{1,3} · 임규상^{1,4} · 우원홍^{2,4*}

1 : 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, 2 : 원광대학교 한의과대학 해부학교실, 3 : 원광대학교 환경과학연구소
4 : 한국전통의학연구소

Extract of *Broussometia kazinoki* Induces Apoptosis Through the Mitochondria/Caspase Pathway in A549 Lung Cancer Cells

Tae Hyeon Kim¹, Dan Hee Kim¹, Yeun Ja Mun^{1,3}, Kyu Sang Lim^{1,4}, Won Hong Woo^{2,4*}

1 : Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Korean Medicine,
2 : Department of Anatomy, College of Korean Medicine, 3 : Research of Environmental Science, Wonkwang University,
4 : Research Center of Traditional Korean Medicine

Extract of *Broussometia kazinoki* Rhizodermais has been traditionally used for geopoong, diuresis, hwalhyeol. In the present study, the apoptotic effect of methanol extract of *Broussometia kazinoki* (MBK) were investigated. Cell viability of A549 cells was measured by MTT assay. Apoptosis-related protein and MAPK protein levels were measured by Western blot. Chromatin condensation of A549 cells was stained with DAPI. MBK inhibited cell proliferation of A549 cell. Based on DAPI staining, MBK-treated cells manifested nuclear shrinkage, condensation and fragmentation. Treatment of A549 cells with MBK resulted in activation of the caspase-3, -8, -9 and cleavage of poly ADP-ribose polymerase (PARP). In the upstream, MBK increased the expressions Bax and Bak, decreased the expression of Bcl-2, and augmented the Bax/Bcl-2 ratio. MBK-induced apoptosis was accompanied by sustained phosphorylation of JNK, p38 MAPK and apoptosis signal-regulating kinase (ASK)-1. These results suggest that MBK induced apoptosis in A549 cells through Bcl-2 family protein-mediated mitochondria/caspase-3 dependent pathway. In addition, MBK increased the activation of ASK-1, which are critical upstream signals for JNK/p38 MAPK activation in A549 cancer cells.

keywords : *Broussometia kazinoki*, Apoptosis, Bcl-2 family, MAPK, ASK-1

서론

임상적으로 암을 치료하는 화학요법은 세포고사(apoptosis)의 유도, 암세포의 증식억제(anti-proliferation), 암세포의 신생혈관생성억제(anti-angiogenesis) 등 크게 세 가지로 나눌 수 있다¹⁻³. 세포고사는 세포막의 사멸수용체(death receptor)에 리간드가 결합하여 일어나는 외부적 경로와 미토콘드리아에서 일어나는 내부적 경로의 두 가지 주요 경로를 통해 일어난다. 세포고사 유도 신호에 의해 미토콘드리아 내부의 cytochrome C, Apaf-1, Smac/Diablo, 그리고 AIF 등을 유출되는데 세포질로 방출된 cytochrome c는 caspase-9를 활성화시키고, caspase-9는 하위의 caspase-3, -6, -7의 활성을 유도한다. 또한 세포막 사멸수용체를 경유하는 경우 Fas-associated death domain

protein(FADD), caspase-8의 활성을 유도하는 것으로 알려져 있다⁴⁻⁸. Apoptosis signal regulating kinase 1(ASK1)은 세포 신호 전달 과정에 작용하는 단백질 인산화 효소이며 mitogen-activated protein kinase kinase kinase(MAP3K)에 속하는 단백질의 하나로서 세포 내외의 스트레스, 소포체 스트레스, 감염 등의 요인에 의해 활성화 되어 세포 내 단백질의 기능을 조절한다⁹. 또한 TNF- α , Fas/FasL, ROS 등의 자극에 의해 활성화되며 JNK/SAPK와 p38 MAPK를 활성화시켜 apoptosis 및 세포분화를 촉진하는 것으로 알려져 있고¹⁰ 이러한 MAPK의 활성화는 미토콘드리아를 경유하여 apoptosis를 유도하는 것으로 보고되고 있다^{11,12}.

닥나무(*Broussometia kazinoki*)는 아시아가 원산지로 산기슭의 양지쪽이나 밭둑에서 자라나는 췌기풀목 뽕나무과의 낙엽활엽 관목이다. 닥나무는 부위에 따라 여러 가지 한약재로 이용 되는데

* Corresponding author

Won Hong Woo, Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Wonkwang University, 344-2, Sinyong-dong, Iksan-si, Jeollabuk-do, Korea

E-mail : whwoo@wku.ac.kr Tel : +82-63-850-6845

Received : 2016/03/30 Revised : 2016/04/25 Accepted : 2016/06/23

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2016.06.30.3.150

Available online at http://www.hantopic.com/kjopp/KJOPP.htm

근피는 구피마(構皮麻)라 하고 거풍(祛風), 이뇨(利尿), 활혈(滑血)의 효능이 있으며, 류머티즘에 의한 鼻痛, 타박상, 부종, 피부염 등을 치료한다. 닥나무에 대한 선행 연구로는 Bae 등¹³⁾이 kazinol U가 이자섬의 β -세포에서 항염증효과가 있음을 보고하였다. Min 등¹⁴⁾은 닥나무 근피추출물이 마우스육종세포(sarcoma 180 cell)에서 세포독성을 나타냈으며, BALB/c 마우스에서 종양 억제 효과가 있음을 보고하였다.

본 연구에서는 닥나무 근피의 항암 효능에 관한 지속적인 연구의 하나로 닥나무 근피 메탄추출물이 A549 폐암세포의 증식에 미치는 영향과 apoptosis 지표인 caspases(caspase-3, -8, -9), PARP, pro-apoptotic 단백질, anti-apoptotic 단백질 및 MAPK 발현을 관찰하여 세포고사 유도 작용과 그 기전을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 약제

본 실험에 사용된 닥나무 뿌리껍질은 전북 완주군 소양면에서 재배된 닥나무 뿌리를 대승한지마을(전주)에서 구입하여 사용하였다.

2) 시약

RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), antibiotic-antimycotic, trypsin-EDTA은 Gibco-BRL(Grand Island, NY, USA)에서, bovine serum albumin(BSA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), dimethylsulfoxide(DMSO), phenylmethyl sulfonyl fluoride(PMSF), leupeptin, aprotinin, sodium fluoride(NaF), sodium orthovanadate(Na_3VO_4), N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine(TEMED)는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Bcl-2, Bax, Bak, Bid 및 pro-caspase-3, -9 antibody는 Santa Cruz(San Diego, CA, USA)에서, pro-caspase-8, PARP, phospho-p38, phospho-JNK, phospho-ASK-1 antibody는 Cell signaling(Beverly, MA, USA)에서, anti-Goat, anti-Rabbit, anti-Mouse IgG HRP conjugate antibody는 Zymed Laboratories Inc.(San Francisco, CA, USA)에서 구입하였다. 단백질 정량 시약은 Bio-Rad(CA, USA)에서, 4',6'-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI), propidium iodide (PI)는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

3) 세포주

인체 폐암 세포주인 A549 세포는 한국 세포주 은행(KCLB, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

4) 사용기기

원심분리기(centrifuge HA-12, micro 17TR centrifuge), clean bench, CO_2 incubator는 한일기기사(Inchun, Korea) 제품을, ELISA reader는 Bio-TEK사(Winooski, USA) 제품을, electrophoresis power supply는 Amersham사(Buckinghamshire, England) 제품을, ChemiDoc image analysis

는 Bio-Rad사(CA, USA) 제품을, 형광현미경은 Zeiss (Oberkochen, Germany) 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

닥나무 뿌리껍질 200 g에 메탄을 2 L를 가하여 실온에서 초음파분쇄 후 3일간 추출한 것을 일차로 거즈 여과 한 다음 filter paper로 vacuum pump를 이용하여 여과하였다. 여과된 닥나무 메탄추출물을 rotary evaporator로 감압 농축하여 13.84 g(수득율 : 6.92%)의 건조된 추출물을 얻어 시료로 사용하였다. 닥나무 메탄추출물 시료는 DMSO에 녹여 사용하였으며, DMSO는 최종 0.01% 이하의 농도 범위에서 사용하였다.

2) 세포 배양

분양받은 A549 세포는 10% FBS, 100 units/mL penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amphotericin B를 첨가한 RPMI 1640을 사용하여 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 그리고 48시간 주기로 배양액을 교체하여 주었으며 0.25% trypsin EDTA로 세포를 떼어내어 계대 배양하였다.

3) 세포 생존율 측정

A549 세포를 24-well 배양용기에 2×10^4 cell/well의 밀도로 분주하여 24 시간 배양 후 닥나무 메탄추출물을 처리하고 24시간 배양하였다. 배지에 MTT 용액을 0.5 mg/mL 농도로 처리하고 3시간 배양 후 배지를 제거하였다. 실온에서 건조 후 DMSO로 용해시켜 ELISA reader를 이용하여 570 nm 파장의 흡광도를 측정하였다.

4) DAPI 염색을 통한 세포 사멸 분석

A549 세포를 8well Chamber slide에 8×10^2 cell/well의 밀도로 분주하여 24 시간 배양 후 닥나무 메탄추출물을 농도별로 처리하고 24시간 배양 후, 배지를 제거하고 PBS로 3회 세척 한 뒤 4% p-formaldehyde solution을 200 μl 처리하여 15분간 고정하였으며 PBS로 3회 세척 한 뒤 DAPI Fluorescence stain을 200 μl 분주하여 차광하여 30분간 염색하였다. 그 후 PBS로 5회 세척하고 형광현미경을 이용하여 측정하였다.

5) Western blot 분석

A549 세포를 10 cm 배양용기에 1×10^6 개씩 부착시키고 닥나무 메탄추출물을 처리하여 24시간 배양하였다. 배양된 세포를 모두 수거하여 lysis buffer(50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM EGTA, 100 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 2 mM PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin)로 4°C에서 60분간 용해시킨 후, 13,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 얻은 세포 용해액은 Bradford 방법을 이용하여 단백질정량을 하였다. 동량의 세포 용해액(단백질 100 μg)은 2×sample buffer와 혼합하여 95°C에서 5분간 끓인 후 12% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하여 단백질을 분리하였다. 전기영동이 끝난 후 polyvinylidene difluoride membrane(Millipore, Bedford, MA, USA)에 전이시켰다. Membrane은 5% skim milk-TBST(20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에서 1시간 동안 blocking하고, Bcl-2, Bax, Bak, Bid, pro-caspase-3,

pro-caspase-8, pro-caspase-9, pro-caspase-10, PARP, ASK-1, p-38, SAPK/JNK 등의 측정하고자 하는 1차 항체를 각각 첨가하여 4°C에서 실온에서 2시간 반응시켰다. TBST로 3회 세척한 후 이차항체 (anti-rabbit, anti-mouse IgG conjugated horse-radish peroxidase)와 1시간 반응시켰다. TBST로 3회 세척 후 WEST-ZOL®(plus) western blot detection system(iNtRON, Korea)을 사용하여 ChemiDoc으로 촬영하였다.

6) 통계 처리

모든 실험은 3회 반복하였으며, 평균±표준편차로 표시하였고, SigmaPlot (San Jose, CA, USA)의 Student's t-test를 이용하여 p-value를 구하였으며, p<0.05인 경우 *로 표기하였고, p<0.01인 경우 **(#)#로 표기하여 유의성을 나타내었다.

결 과

1. 닥나무 근피추출물의 A549 세포의 증식억제와 염색질응축에 미치는 영향

닥나무 근피추출물이 사람의 폐암 세포주 A549 세포에 사멸효과를 나타내는지 조사하였다. 배양액에 닥나무 근피추출물을 0, 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/mL 농도로 처리하고 24시간 후 MTT assay를 실시하였다. 실험 결과 닥나무 근피추출물 0, 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/mL 농도에서 24시간 후 각각 77% 63% 45% 26% 19%로 세포증식이 억제되었다(Fig. 1A). 추후 실험은 닥나무 매탄올추출물의 세포 생존율이 70% 이하인 25, 50, 100 µg/mL 농도에서 시행하였다.

세포고사는 세포위축, 염색질(chromatin) 응축, DNA 단편화 등 전형적인 형태학적 및 생화학적 특징을 가진다¹⁵⁾. 이에 닥나무 근피추출물에 의한 A549 세포의 증식억제가 세포고사 시 특이하게 관찰되는 형태학적 변화 및 핵의 형태변화와 연관이 있는지 확인하였다. A549 세포에 닥나무 근피추출물을 농도별로 처리한 다음 핵산에 특이적으로 결합하는 DAPI 염색을 실시하여 관찰하였다. 그 결과, Fig. 1B 에서와 같이 닥나무 근피추출물의 농도가 증가할수록 전체적인 세포밀도가 감소하였으며, 닥나무 근피추출물 100 µg/mL의 농도에서는 세포의 모양이 불규칙하고 바닥에 고착되어 있는 세포의 수가 감소하였다. 또한 DAPI 염색을 하여 관찰한 결과 닥나무 근피추출물 처리하지 않은 세포에서는 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색되었으나, 닥나무 근피추출물 처리군에서는 전체적인 핵의 밀도 감소와 더불어 염색질 응축에 의한 apoptotic body가 관찰되었다(Fig. 1C).

2. 닥나무 근피추출물의 Caspase-3의 활성화와 PARP 분절에 미치는 영향

Caspases는 여러 가지 death signal에 의해서 활성화되는데, 그 중 caspase-3는 세포고사의 실행자로서 상위의 caspase-9에 의해 활성화 된다. 이는 cysteine 단백분해효소의 일종으로 CPP32, YAMA, 그리고 apopain으로 불리기도 하며 지금까지 알려진 10여종 이상의 caspase 효소들 중 세포고사 과정의 마지막 단계에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁶⁾. Caspase-3는

세포 내에서 32 kDa의 비활성형(pro-caspase-3)으로 존재하고 death signal에 의해 활성화되어 하위 기질인 poly ADP ribose polymerase(PARP)를 분해한다. PARP는 DNA 손상 시 수복(repair)에 관여하는 효소로 세포의 생존에 중요한 역할을 하고 있다. 따라서 PARP의 분해는 DNA 수복에 문제가 야기되고 세포고사가 진행되게 된다¹⁷⁾. 본 실험에서 닥나무 근피추출물이 caspase-3와 PARP에 미치는 영향을 조사하였다. 시료를 25, 50, 100 µg/mL 농도로 처리하고 24 시간 배양한 후 caspase-3의 발현과 PARP의 분절을 western blotting을 이용하여 확인한 결과 농도의존적으로 활성화형 caspase-3의 발현이 증가하였고(Fig. 2A), 116 kDa의 PARP 단백질이 100 µg/mL 농도에서 89 kDa으로 분절되는 것으로 나타났다(Fig. 2B).

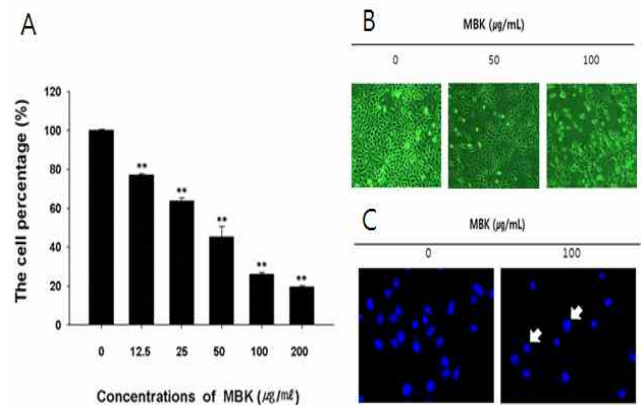


Fig. 1. Effect of MBK on the cell viability of A549 cells(A), morphological change(B) and Conformational change in nuclear chromatin(C) of A549 cells by MBK. A549 cells were treated with MBK at 37°C for 24 hours. The proportion of survival cells was measured by MTT assay (A). The experiments were performed in triplicate. Data presented as means ± S.D. of three independent experiments. *p<0.05, **p<0.01 vs. control. Cell morphology was visualized by light microscopy (×200)(B). MBK-treated cells were fixed with 4% formaldehyde, permeabilized with 0.5% Triton X-100 and stained with DAPI for 20 min. Stained cells were observed by fluorescence microscopic analysis and imaged using Axio Vision Program (C).

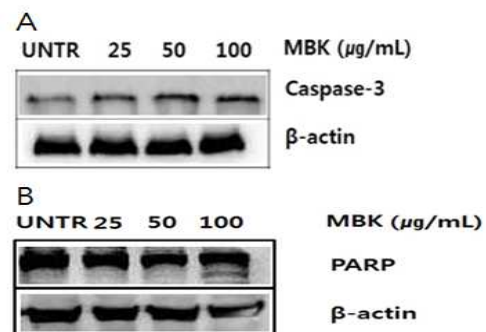


Fig. 2. Dose-dependent effects of MBK on the protein expression level of caspase-3 in A549 cells(A) and effect of MBK on the cleavage of PARP in A549 cells(B). Cells were treated with various concentrations of MBK for 24 h. Cells were lysed and cellular proteins were then separated by SDS-PAGE, followed by western blot analysis using antibody against caspase-3(A) and PARP(B). Actin was used as an internal control.

3. 닥나무 근피추출물의 Bcl-2 family 단백질 발현에 미치는 영향

세포고사의 두 가지 경로 중 미토콘드리아를 경유하는 내부적 경로에서 닥나무 근피추출물이 Bcl-2 family 유전자 발현에 미치는 효과를 조사하였다. Bcl-2 family 단백질은 그 기능과 아미노산 서열의 유사성에 따라 세포고사를 촉진하는 것과 세포고사를 억제하는 단백질로 나뉘는데, 세포고사를 억제하는 anti-apoptotic Bcl-2 family 단백질에는 Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 등이 있으며 세포고사를 촉진하는 pro-apoptotic Bcl-2 family 및 BH-3 only pro-apoptotic 단백질은 Bax, Bak, Bok/Mtd와 Bid, Bad, Bik, Bmf가 있다²⁰⁻²²). 본 실험에서 A549 세포의 Bcl-2와 Bax, Bak, Bid의 발현에 미치는 닥나무 근피추출물의 효과를 western blotting을 이용하여 조사하였다. 실험결과 닥나무 근피추출물 50과 100 µg/mL의 농도에서 Bcl-2 단백질 발현이 현저히 감소하였다(Fig. 3A). 또한 닥나무 근피추출물이 Bax, Bak, Bid의 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 농도의존적으로 Bax와 Bak의 발현이 증가하였다. 그러나 BH-3 only pro-apoptotic 단백질인 Bid의 발현은 변화가 없었다(Fig. 3B).

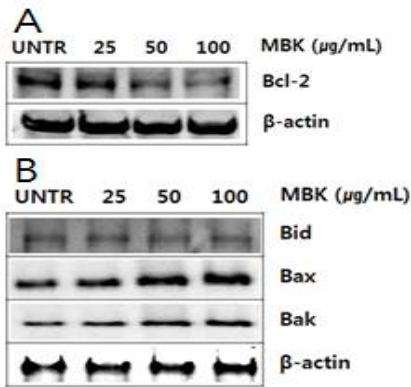


Fig. 3. Expression level of Bcl-2 family protein by MBK treatment in A549 cells. Cells were treated with various concentrations of MBK for 24 h. Cells were lysed and cellular proteins were then separated by SDS-PAGE, followed by western blot analysis using antibody against Bcl-2(A), Bid, Bax and Bak(B). Actin was used as an internal control.

4. 닥나무 근피추출물의 Caspase-8과 caspase-9의 발현에 미치는 영향

현재 약 10여종 이상의 caspases 효소들이 알려져 있으며, 외부적(extrinsic) 세포고사의 신호전달 경로는 death receptor인 Fas, TNF receptor를 경유하여 caspase-8이 활성화 된다. 한편 미토콘드리아를 경유한 내부적(intrinsic) 세포고사는 cytochrome c 방출로 인하여 보조인자인 Apaf-1과의 결합에 의해 caspase-9이 활성화된다⁶⁻⁸). 본 실험에서 닥나무 근피추출물이 caspase-8과 caspase-9에 미치는 영향을 조사하였다. 시료를 25, 50, 100 µg/mL 농도로 처리하고 24 시간 배양한 후 caspase-8과 -9의 발현을 western blotting을 이용하여 확인한 결과 농도의존적으로 불활성형 caspase-8과 caspase-9의 발현이 감소하였다(Fig. 4).

5. 닥나무 근피추출물의 ASK1의 활성화

ASK1은 세포고사의 세포 신호전달 과정에 작용하는 단백질 인산화 효소로 TNF- α , Fas/FasL, ROS 등의 자극에 의해 활성화 된다. 활성화된 ASK1은 세포고사와 연관된 하위 신호인 JNK, p38의 인산화를 유도하여 MAPK의 활성을 조절하는 것으로 알려져 있다^{9,10}). 닥나무 근피추출물이 ASK1 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 A549 세포에 시료를 100 µg/mL 농도로 처리하고 시간별(0, 15, 30, 60, 180분)로 수거하여 western blotting을 실시하였다. 실험결과 닥나무 근피추출물 처리 후 30분에 p-ASK1의 발현이 증가된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

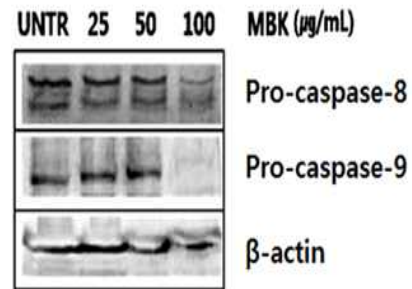


Fig. 4. Dose-dependent effects of MBK on the protein expression levels of pro-caspase-8 and -9 in A549 cells. Cells were treated with various concentrations of MBK for 24 h. Cells were lysed and cellular proteins were then separated by SDS-PAGE, followed by western blot analysis using antibody against pro-caspase-8 and -9. Actin was used as an internal control.

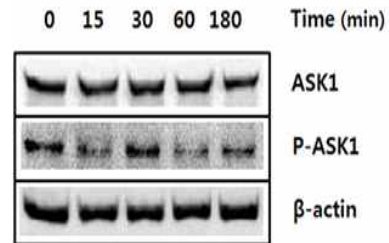


Fig. 5. Effect of MBK on the protein expression level of phospho-ASK1 in A549 cells. Cells were incubated for time-dependent at 37°C with the 100 µg/mL of MBK. Cells were lysed and cellular proteins were then separated by SDS-PAGE, followed by western blot analysis using antibody against ASK1 and phospho-ASK1 (P-ASK1). Actin was used as an internal control.

6. p38, JNK의 활성화

MAPKs는 세포증식과 분화, 세포사멸과 생존 등에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. MAPKs는 p38 MAPK, c-Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase(JNK/SAPK), extracellular signal regulated kinase 1/2(ERK1/2) 등이 있다. 그 중 JNK/SAPK, p38 MAPK는 염증성 cytokine, 산화적 스트레스에 의해 발현되며 세포 성장을 억제하고 apoptosis 신호로서 작용한다고 알려져 있다^{11,12}). 닥나무 근피추출물이 p38, JNK MAPK 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 A549 세포에 시료를 100 µg/mL 농도로 처리하고 시간별(0, 15, 30, 60, 180분)로 수거하여 western blotting을 실시하였다. 실험결과 닥나무 근피추출물 처리 후 30분에 p-p38의 발현이 증가하였고 p-JNK의 발현도 증가된 것

을 관찰할 수 있었다(Fig. 6).

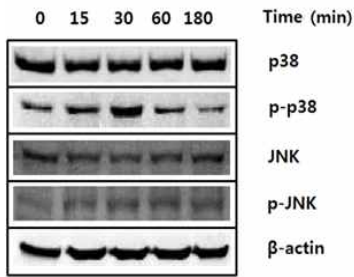


Fig. 6. Effect of MBK on the protein expression level of MAPKs in A549 cells. Cells were incubated for time-dependent at 37°C with the 100 μ g/mL of MBK. Cells were lysed and cellular proteins were then separated by SDS-PAGE, followed by western blot analysis using antibody against p38, phospho-p38 (p-p38), JNK, phospho-JNK (p-JNK). Actin was used as an internal control.

고찰

최근 식생활 습관의 변화와 환경오염 등으로 암환자의 수는 증가하고 있으며, 이러한 질환의 치료제로서 다양한 항암제가 개발되어 있다. 그러나 현재 임상적으로 사용되고 있는 대부분의 항암제는 선택성이 매우 낮아 암세포뿐만 아니라 정상세포에도 영향을 주어 많은 부작용을 나타내며, 장기치료를 할 경우 암세포에 대한 내성이 형성되는 문제점을 가지고 있다. 따라서 부작용이 적고 항암제와 병용 투여함으로써 항암성을 증가시킬 수 있는 면역요법이나 apoptosis, 세포분화유도법, 혈관형성저해법 등과 관련한 연구가 활발히 진행 중 이다¹⁻³.

Programmed cell death라고도 알려져 있는 apoptosis는 능동적인 기작으로 정상적인 세포의 수를 조절하는데 있어 필요한 과정이며 다양한 원인의 손상에 의해 유도된다. 그리고 유해한 세포의 제거 등에 관여하여 개체의 항상성을 유지하는 중요한 조절 기구로 작용 하고 있으며 이는 내-외부적인 신호전달에 의해 일어나는 과정이다. Apoptosis가 일어났을 때 세포의 형태학적인 특징으로는 세포막 박리, 세포막 융기가 돌출하는 현상(membrane blebbing), 핵의 응축(nuclear condensation), 포스파티딜 세린(phosphatidyl serine)의 외부로의 노출, DAN의 분절(DNA fragmentation) 등이 있다^{18,19}.

항암제의 효율성은 apoptosis 유도능력과 밀접한 관련성이 있기 때문에 apoptosis의 정확한 생화학적 기전을 밝혀 암치료과정을 도입하기 위한 연구가 빠르게 진행되고 있는 실정이다. 이에 항암 효능에 관한 지속적인 연구의 하나로 닥나무 근피 추출물은 A549 세포에 정확한 세포고사 기전에 대해 알려진 바가 없기 때문에 A549 세포에 대한 세포고사 효과와 그 신호기전을 조사하였다.

닥나무 근피 추출물이 A549 세포의 생존에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시한 결과 농도 의존적으로 생존율이 현저히 감소하였다. 이러한 생존율의 변화가 apoptosis와 관련되어 있는지 알아보기 위하여 광학현미경과 DAPI 염색을 통해 세포의 형태학적 관찰을 실시한 결과 닥나무 근피 추출물은 농도 의존적으로 세포의 수가 현저하게 감소함을 보였고 전체적인 핵의 밀

도 감소와 더불어 염색질 응축에 의한 apoptotic body가 관찰되었다. 따라서 닥나무 근피 추출물에 의한 세포독성은 apoptosis 경로를 통한 세포고사가 원인이라 예상할 수 있었다.

Bcl-2 family of proteins은 구조적 및 기능적 유사성에 따라, anti-apoptotic proteins(Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1), pro-apoptotic proteins(Bax, Bak) 및 BH3 only proteins(e.g. Bim, Bad, Bid, Puma, Noxa), 세 그룹으로 구성되어 있다²⁰. Bax와 Bak 단백질은 명백하게 세포를 사멸하는 것으로 알려져 있으며²¹ Bcl-2 family에 속하는 단백질들의 발현 변화는 미토콘드리아 외막에서 Bcl-2 family 간의 dimer 형성에 이상을 초래하여 cytochrome c, Apaf-1, Smac/Diablo, AIF등 미콘드리아 내부물질들의 방출을 유도하여 세포고사를 촉진시킨다^{6,21,22}.

본 실험에서는 닥나무 근피 추출물이 Bcl-2 family에 미치는 영향을 조사한 결과 50과 100 μ g/mL의 농도에서 Bcl-2 단백질 발현이 현저히 감소하였다. Bax, Bak, Bid의 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 농도의존적으로 Bax와 Bak의 발현은 증가하였으나 BH-3 only pro-apoptotic 단백질인 Bid의 발현은 변화가 없었다.

Bid는 caspase-8의 활성화에 의해 tBid로 절단되어 미토콘드리아로 유입되지만 본 실험에서는 Bid의 발현에 변화가 없었기에 tBid로의 전환 가능성을 알 수 없었다. 그러나 Bax와 Bak의 발현 증가는 미토콘드리아 막전위를 소실시켜 cytochrome c의 방출을 유도하였다고 사료된다. cytochrome c는 caspase-9를 활성화시키고 caspase-9는 하위 신호인 caspase-3, -6, -7의 활성을 유도한다.

Caspase-3는 세포 내에서 32 kDa의 비활성형(pro-caspase-3)으로 존재하고 death signal에 의해 활성화되어 apoptosis specific marker로 간주되는²³ PARP(poly ADP ribose polymerase)를 분해한다. 본 실험에서 닥나무 근피추출물이 caspase-3에 미치는 영향을 Western blotting을 이용하여 확인한 결과 농도의존적으로 활성화형 caspase-3의 발현이 증가하였고 116 kDa의 PARP 단백질이 100 μ g/mL 농도에서 89 kDa으로 분절되는 것으로 나타났다.

caspase-8과 -9의 발현을 western blotting을 이용하여 확인한 결과 농도의존적으로 불활성형 caspase-8과 caspase-9의 발현이 감소하였다.

ASK1은 170 kD의 단백질로 산화적 스트레스, TNF alpha, endoplasmic reticulum stress 등에 의해 활성화 되어 하위 신호인 p38, JNK의 인산화를 유도 한다고 알려져 있다²⁴. Mitogen activated protein kinases (MAPKs)는 세포증식과 분화, 세포사멸과 생존 등에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며 그중 JNK/SAPK, p38 MAPK는 염증성 cytokine, 산화적 스트레스에 의해 발현되며 세포 성장을 억제하고 apoptosis 신호로서 작용한다고 알려져 있다²⁵⁻²⁷. 본 실험에서는 닥나무 근피 추출물이 ASK1를 활성화 시켰으며 활성화된 ASK1은 JNK, p38 MAPK의 인산화를 유도하였다.

이상의 결과를 통해 닥나무근피추출물은 미토콘드리아 막 투과성을 조절하는 Bcl-2 family 중 Bcl-2의 발현을 현저하게 감소시키고 Bax와 Bak의 발현은 증가시켜 cytochrome c의 방출을 유도하였다. pro-caspase -8, -9, -3 단백질 발현 조사에서는 모든

pro-caspase의 단백질 발현을 억제하였으며 caspase-3의 표적 단백질인 PARP의 분절현상도 관찰되었다. 또한 ASK1을 활성화 시키고 하위 신호전달 물질인 JNK, p38 MAPK를 활성화가 Bcl-2 family 발현에 영향을 주어 A549 세포의 apoptosis가 유도되는 것으로 볼 수 있다.

결 론

본 연구에서는 천연물질을 응용한 항암제, 천연물의 apoptosis를 유도하는 효능에 관한 연구의 일환으로 인체 폐암세포인 A549 세포에 대한 닥나무 근피추출물의 항암활성을 조사하여 유의한 결과를 얻었으며, 그 기전을 조사하여 다음과 같은 결과를 알 수 있었다.

닥나무 근피추출물은 농도 의존적으로 A549 세포의 핵의 응축 및 분절을 유도하였으며 세포 증식을 억제하였다. 닥나무 근피추출물은 caspase-3의 발현과 PARP의 분절을 유도하였으며 불활성형 caspase-8과 caspase-9 그리고 Bcl-2 단백질의 발현을 감소시켰고, Bax, Bak의 발현과 ASK1, JNK 그리고 p38의 인산화를 촉진시켰다.

이상의 결과를 통해 닥나무 근피추출물은 A549 세포에서 ASK1/MAPK의 인산화를 유도하였으며, anti-apoptotic Bcl-2 단백질 발현을 억제하고 pro-apoptotic Bcl-2 단백질 발현을 촉진함으로써 미토콘드리아/Caspase pathway를 경유하여 apoptosis를 유도한 것으로 판단되며, 따라서 임상에서의 종양 질환에 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. Wylie, A.H., Derr, J.F.R., Currie, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 68: 251-306, 1980.
2. Searle, J., Kerr, J.F., Bishop, C.J. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu.* 17 pt 2: 229-259, 1982.
3. Im, S.Y., Han, S.J., Ko, H.M., Choi, J.H., Chun, S.B., Lee, D.G., Ha, T.Y., Lee, H.K. Involvement of nuclear factor-kappa B in platelet-activating factor-mediated tumor necrosis factor-alpha expression. *Eur J Immunol.* 27(11):2800-2804, 1997.
4. Yang, B.K., Hwang, S.L., Yun, I.J., Do, E.J., Lee, W.H., Jung, Y.M., Hong, S.C., Park, D.C. Antitumor effects and immunomodulating activities of phellinus linteus extract in a CT-26 cell-injected colon cancer mouse model. *Mycobiology.* 37(2):128-132, 2009.
5. Yiu, H.Y., Whittemore AS, Shibata A. Increasing colorectal cancer incidence rates in Japan. *Int J Cancer.* 109(5):777-781, 2004.
6. Jeon, B.K. Extract of *Alnus japonica* Induces Apoptosis of HT-29 Cells through the Mitochondria/Caspase Pathway. *Wonkwang University.* 26(2):199-205, 2009.
7. Liu, J.J., Nilsson, A., Oredsson, S., Badmaev, V., Zhao, W.Z., Duan, R.D. Boswellic acids trigger apoptosis via a pathway dependent on caspase-8 activation but independent on Fas/Fas ligand interaction in colon cancer HT-29 cells. *Carcinogenesis.* 23(12):2087-2093, 2002.
8. Pathak, S., Sharma, C.H., Jayaram, H.N., Singh, N. Apoptotic signaling induced by benzamide riboside: an in vitro study. *Mol Cell Biochem.* 328(2):67-73, 2009.
9. Lee, I.S. Functional regulation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) and protein tyrosine phosphatases (PTPs) in cell survival and death signal transduction. *Chung-Ang University,* 2014.
10. Pan, J., Chang, Q., Wang, X., Son, Y., Zhang, Z., Chen, G., Luo, J., Bi, Y., Chen, F., Shi, X. Reactive oxygen species-activated Akt/ASK1/p38 signaling pathway in nickel compound-induced apoptosis in BEAS 2B cells. *Chem Res Toxicol.* 23(3):568-577, 2010.
11. Heath-Engel, H.M., Chang, N.C., Shore, G.C. The endoplasmic reticulum in apoptosis and autophagy: role of the BCL-2 protein family. *Oncogene.* 27(50):6419-6433, 2008.
12. Suzuki, T., Tsukamoto, I. Arsenite induces apoptosis in hepatocytes though an enhancement of the activation of Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase caused by partial hepatectomy. *Toxicol Lett.* 10:165(3):257-264, 2006.
13. Bae, U.J., Lee, D.Y., Song, M.Y., Lee, S.M., Park, J.W., Ryu, J.H., Park, B.H. A prenylated flavan from *Broussonetia kazinoki* prevents cytokine-induced β -cell death through suppression of nuclear factor-kB activity. *Biol Pharm Bull.* 34(7):1026-1031, 2011.
14. Min, K.J., Choung, S.H., Koo, S.J. Studies on the Anticancer Effect of *Broussonetia kazinoki* Extracts. *Korean J. Soc. Food. Sci. industrial chemistry.* 15(3):231-237, 1999.
15. Steller, H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science.* 276: 1445-1449, 1995.
16. Chen, Y.C., Lin-Shiau, S.Y., Lin, J.K. Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis. *J. Cell. Physiol.* 177: 324-333, 1998.
17. Hui, H., Dotta, F., Di Mario, U., Perfetti, R. Role of caspases in the regulation of apoptotic pancreatic islet beta-cells death. *J. Cell. Physiol.* 200: 177-200, 2004.
18. Vazquez, A., Bond, E.E., Levine, A.J., Bond, G.L. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer

- therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 7(12):979-987, 2008.
19. Pathak, S., Sharma, C.H., Jayaram, H.N., Singh, N. Apoptotic signaling induced by benzamide riboside : an in vitro study. *Mol Cell Biochem.* 328(2):67-73, 2009.
 20. Alves, N.L., Van, R.A., Eldering, E. Withdrawal symptoms on display: Bcl-2 members under investigation. *Trends Immunol.* 28(1):26-32, 2007.
 21. Wei, M.C. et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292: 727-730, 2001.
 22. Huang, D.C., Strasser A. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *cell.* 103(6):839-842, 2000.
 23. Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M. and Lazebnik, Y.A. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature.* 376(6535):37-43, 1995.
 24. Kim, J.W., Cho, C.O. Control Mechanism of Apoptosis. *Ajou Med J.* 3(1):1-11, 1998.
 25. Tsang, W.P., Kwok, T.T. Let-7a microRNA suppresses therapeutics-induced cancer cell death by targeting caspase-3. *Apoptosis.* 13(10):1215-1222, 2008.
 26. Kim, R., Emi, M., Tanabe, K. Caspase-dependent and -independent cell death pathways after DNA damage. *Oncol Rep.* 14(3):595-599, 2005.
 27. Selvakumar, P., Sharma, R.K. Role of calpain and caspase system in the regulation of N-myristoyltransferase in human colon cancer. *Int J Mol Med.* 19(5):823-827, 2007.