

와송이 인간 백혈병 세포주 THP-1에서 NF- κ B 활성 억제와 p38 활성을 통해 세포사멸과 자가포식에 미치는 영향

주성희, 장은경, 김영철*
경희대학교 한의과대학 간계내과교실

Effect of *Orostachys japonicus* on Apoptosis and Autophagy in Human monocytic leukemia Cell line THP-1 via Inhibition of NF- κ B and Phosphorylation of p38 MAPK

Seonghee Joo, Eungyeong Jang, Youngchul Kim

Department of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Kyung Hee University

Objectives: *Orostachys japonicus* (*O. japonicus*) has been known for its anti-tumor effect. In the present study, it was investigated whether *O. japonicus* EtOH extracts could induce apoptosis and autophagy which are part of the main mechanism related to anti-tumor effect in THP-1 cells.

Methods: Cells were treated with various concentrations of *O. japonicus* EtOH extracts (0-300 μ g/ml) for 24, 48, and 72h. Cell viability was evaluated by MTS/PMS assay and apoptosis rate was examined by flow cytometry and ELISA assay. The mRNA expression of apoptosis-related genes (Bcl-2, Mcl-1, Survivin, Bax) and autophagy-related gene (mTOR) was evaluated using real-time PCR. The protein expression of Caspase-3, Akt, LC3 II, Beclin-1, Atg5, NF- κ B, p38, ERK was evaluated using western blot analysis.

Results: *O. japonicus* EtOH extracts inhibited cell proliferation and apoptosis rate was increased in both flow cytometry and ELISA assay. Bcl-2, Mcl-1, Survivin (anti-apoptosis factors) mRNA expressions were decreased and Bax (pro-apoptosis factor) mRNA level was increased. mTOR mRNA expressions was decreased and LC3 II protein expressions was increased. Activation of NF- κ B was decreased and phosphorylation of p38 was increased.

Conclusion: *O. japonicus* is regarded to inhibit cell proliferation, to induce apoptosis and to regulate autophagy-related genes in THP-1 cells via NF- κ B and p38 MAPK signaling pathway. This suggests *O. japonicus* could be an effective herb in treating acute myeloid leukemia.

Key Words : *Orostachys japonicus*, THP-1, acute myeloid leukemia, apoptosis, autophagy

서론

급성 골수성 백혈병은 성인에게서 가장 흔히 발생하는 백혈병으로 미국 내 평균 발생률은 10만 명 당 3-5명이다¹⁾. 국내의 통계자료에 따르면 2012년에 발

생한 224,771건의 신생물질환 중 혈액 관련 종양은 3,771건으로 1.7%를 차지하였고 남자와 여자의 성비는 1.3:1이었으며 그 중 급성 골수성 백혈병은 33.3%로 가장 빈도가 높았다²⁾.

급성 골수성 백혈병의 주된 임상증상은 정상 적혈

• Received : 2 April 2019

• Revised : 23 May 2019

• Accepted : 23 May 2019

• Correspondence to : 김영철

서울시 동대문구 경희대로 23 경희의료원 간장조혈내과

Tel : +82-2-958-9118, Fax : +82-2-958-9258, E-mail : yckim@khmc.or.kr

구, 혈소판, 백혈구의 감소로 인한 빈혈, 출혈, 감염 혹은 발열이다³⁾. 치료법의 발달로 젊은 연령의 환자들의 치료율은 상당히 증가하였지만 고령의 환자들의 예후는 좋지 않으며⁴⁾ 65세 이상 환자의 70%는 진단으로부터 1년 이내에 사망한다⁵⁾. 고용량의 화학요법 혹은 조혈모세포이식 등이 효과가 있는 치료법이라고 인정되고 있지만 환자의 연령, 건강상태, 합병증 등을 고려했을 때 고령의 환자들에게는 적용하기 어려운 경우가 많으며 이에 위험도는 낮고 효과는 뛰어난 치료법에 대한 개발이 지속적으로 요구되고 있는 실정이다.

와송(*Orostachys japonicus*, 생약명: *Orostachydis Herba*)은 오래된 기와 지붕 혹은 높은 산에 위치한 바위에서 자라나는 다년생 식물로 한국과 중국 등에 분포한다. 돌나물과(*Crassulaceae*)의 여러해살이풀인 바위솔(*Orostachys japonica* A. Berger)과 동속 식물의 전초로 여름과 가을에 채취하며 약성은 酸, 苦, 涼하고 항암, 지혈, 해열, 해독, 수렴 작용이 있는 본초이다⁶⁾. 최근에 와송과 관련한 실험 연구들을 살펴보면 와송의 항암 효과⁷⁻¹⁰⁾ 뿐만 아니라 항섬유화 효과¹¹⁾, 항염증 효과¹²⁾, 항산화 효과¹³⁾ 등이 보고되고 있다.

세포자멸(apoptosis)은 노화를 비롯한 다양한 이유에 의해 정상적으로 기능을 하지 못하는 세포에서 발생하며 암 치료에 있어서 중요한 기전으로 작용한다. 항암제는 종양세포에서 세포자멸을 유도하거나 종양세포에게 직접적인 독성 물질로 작용하여 치료 효과를 발휘한다¹⁴⁾. 한편 자가포식(autophagy)은 세포 내부의 손상되거나 필요하지 않은 단백질 혹은 소기관(organelles)을 스스로 분해하는 현상을 말하며 이를 통해 암세포의 사멸을 유도할 수 있다¹⁵⁾.

기존의 연구들을 조사해보면 최 등¹⁶⁾의 논문을 포함하여 와송과 세포자멸의 연관성에 대한 연구는 다수였으나 와송과 자가포식의 연관성을 살핀 연구는 부재하였다. 본 연구에서는 와송의 항암효과를 살펴 보기 위해 급성 골수성 백혈병 환자의 혈액으로부터

배양된 인간 단핵구 백혈병 세포주(THP-1)에 와송 에탄올 추출물을 처리하여 세포자멸과 더불어 자가포식과 관련한 인자들을 살펴보았다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에서 사용한 약재인 와송은 대한약전의 한약규격집¹⁷⁾에 근거하여 경희대학교 부속 한방병원에서 구입하여 사용하였다.

HPLC (high-performance liquid chromatography)를 통해 성분 분석을 하였으며 HPLC 분석 샘플로 와송 에탄올 추출물을 50mg/ml의 농도로 메탄올에 용해하여 초음파 처리(sonication) 한 후, 0.45 μ m PVDF membrane filter로 여과시켰다. Standard로 Epicatechin gallate (ECG), Quercetin과 Kaempferol (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A)을 사용하였다 (Figure 1A).

HPLC 분석은 Alliance 2690 기기를 이용하였으며 검출기는 Waters 996 Photodiode Array Detector를 사용하였고 Column은 C18 column (5 μ m, 4.6mm \times 250mm I.D.; Macherey-Nagel, Dueren, Germany)을 사용하였다. 이동상으로 0.05M NH₄HCO₂ (A)와 메탄올(B)을 이용하였으며 0분에서는 10%로 B용매를 흘리다가 40분에서는 90%가 되도록 직선성의 용매 변화를 주는 gradient mode로 진행하였고 유속은 1 ml/min로 하였다. 검출 파장은 280 nm이었다.

Epicatechin gallate (ECG), Quercetin과 Kaempferol을 Standard로 사용하여 정량한 결과, 와송 에탄올 추출물에는 Epicatechin gallate이 1.2%, Quercetin이 1.3%, Kaempferol이 0.2% 함유되어 있었다(Figure 1B).

2) 검액의 조제

와송 100 g을 80% 에탄올 1000 ml에 넣고 2시간

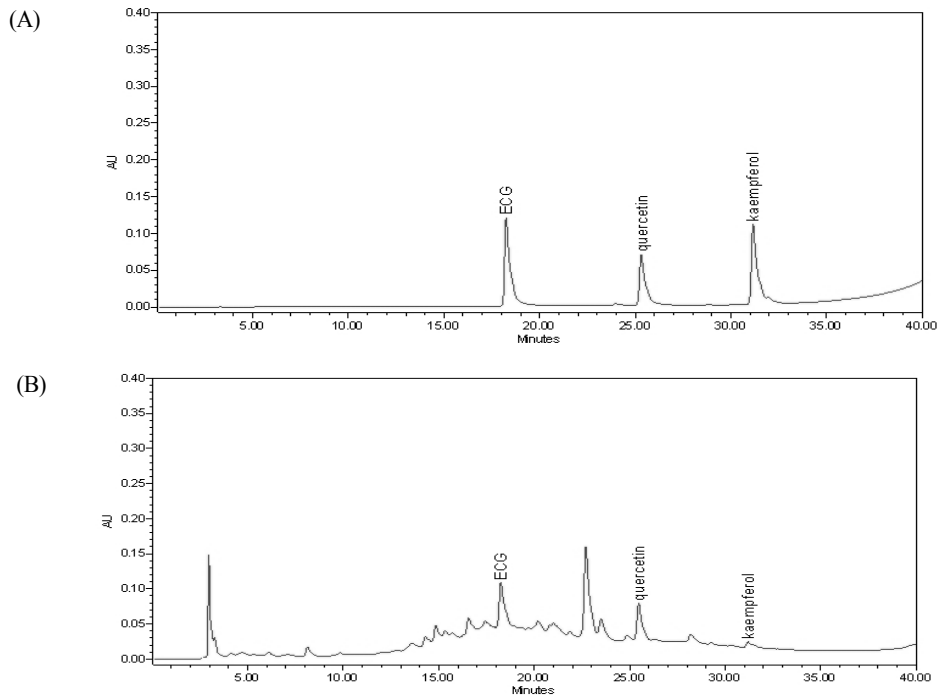


Fig. 1. HPLC chromatograms of the representative standards (epicatechin gallate (ECG), quercetin and kaempferol)(A) and the *O. japonicus* EtOH extracts(B)

씩 2회 환류추출한 후 추출액을 Whatmann Paper를 통해 여과시킨 후 감압농축기를 사용해서 농축하였다. 다음으로 농축액을 동결건조기(EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 건조시켰으며 총 6.5g의 건조추출물을 얻었다(수율 6.5%). 얻어진 추출물을 RPMI-1640 배지에 10mg/ml의 농도로 녹여서 100°C에서 1시간 동안 끓인 다음 14,000g에서 30분간 원침한 후 상청액을 0.2 μ m의 syringe filter로 여과 멸균하여 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) 세포 배양

인간 단핵구 백혈병 세포주(THP-1)은 한국세포주은행(Cancer Research Institute, Seoul National University, Seoul, Korea)으로부터 분양을 받았다. 세포 배양을 위한 재료로 DMEM (Dulbecco's Modified

Eagle Medium, High glucose)는 웰진(Welgene, Daegu, Korea)에서 구입하였다. THP-1 세포는 10%의 FBS (Hyclone, Logan, USA)와 1%의 antibiotics (Gibco-BRL, NY, USA)가 첨가된 RPMI-1640 배양액으로 배양하였다. 외송 에탄올 추출물을 투여하기 전에 100nM의 PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate) (Sigma-Aldrich, MO, USA)을 첨가하여 72시간 동안 배양하여 대식유사세포(macrophage-like cell)로 분화시켰다. 세포 배양은 5%의 CO₂, 37°C 환경의 배양기에서 배양하였다.

2) 세포 생존율 분석

세포 생존율(cell viability)를 분석하기 위해 제작사의 방법에 따라 CellTiter 96 AQueous One solution Cell Proliferation assay (MTS/PMS assay) (Promega, WI, USA)를 시행하였다. THP-1 세포를

96-well cell culture plates (2×10^4 cells/well)에 분주하고 100nM PMA를 첨가하여 72시간 동안 분화시킨 다음 세포배양액을 제거한 후 200 μ l의 새로운 배양액으로 3회 세척하였다. 다음으로 100 μ l의 외송 에탄올 추출물(0~500 μ g/ml)을 넣고 24, 48, 그리고 72시간 동안 배양한 후 20 μ l의 MTS/PMS 용액을 첨가하였고 4시간 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

또한 THP-1 세포(2×10^4 cells/well)에 pan-caspase 억제제인 Z-VAD-FMK 또는 caspase-3 특이 억제제인 Z-DEVD-FMK (R&D Systems, MN, USA)를 농도별(25, 50, 100 μ M)로 처리한 후, 2시간 후에 300 μ g/ml의 외송 에탄올 추출물을 투여하였고 72시간 후에 20 μ l의 MTS/PMS 용액을 첨가하여 4시간 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 유동세포 분석

THP-1 세포를 60mm cell culture dish (1×10^6 cells)에 분주하고 100nM의 PMA를 첨가하여 72시간 동안 분화시킨 다음 세포배양액을 제거한 후 200 μ l의 새로운 배양액으로 3회 세척하였다. 다음으로 외송 에탄올 추출물(0, 100, 200, 300 μ g/ml)을 투여하여 24, 48, 그리고 72 시간 동안 배양하였다. 반응이 끝난 후에 Trypsin-EDTA (Gibco-BRL, NY, USA)를 이용하여 세포를 모은 다음 PBS로 3회 세척한 후 세포 침전물에 100 μ l의 binding 용액을 첨가하여 재부유시켰다. 다음으로 5 μ l의 Annexin V-FITC (10mg/ml)와 5 μ l의 Propidium iodide (PI) (50mg/ml) (BD Biosciences, CA, USA)를 혼합하여 15분간 빛을 차단한 상태로 실온에서 반응시켰다. 400 μ l의 binding 용액을 첨가하여 혼합한 후, 염색된 세포를 FACS Calibur (Becton Dickinson Immunocytometry System, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

FITC에만 양성반응을 보이는 세포는 초기 세포자

멸을 나타내고 FITC와 PI에 모두 양성반응을 보이는 세포는 후기 세포자멸을 나타내므로 이 두 가지 분석에 해당하는 세포 비율의 합으로 세포자멸 정도를 평가하였다.

4) 효소면역 분석

Cell death detection ELISA kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 이용하여 세포자멸 세포의 양을 측정하였다. THP-1 세포를 96-well cell culture plate (2×10^4 cells)에 분주하고 100nM의 PMA를 첨가하여 72시간 동안 분화시킨 다음 세포배양액을 제거한 후 200 μ l의 새로운 배양액으로 3회 세척하였다. 다음으로 100 μ l의 외송 에탄올 추출물(0, 100, 200, 300 μ g/ml)을 처리하여 24, 48, 그리고 72시간 동안 배양하였다. 세포 배양액을 제거한 후 200 μ l의 용해완충액을 첨가하여 30분 간 방치하고 200xg에서 10분 간 원심분리 한 후, 20 μ l의 상층액을 얻은 뒤 제조사의 방법에 따라 ELISA reader를 이용하여 405nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

5) RNA 분리와 real-time PCR

Total RNA는 세포 배양이 끝난 후 Trizol 용액 (Invitrogen, CA, USA)을 이용하여 제조사의 방법에 따라 분리하였다. 1 μ g의 Total RNA와 0.5 μ g의 Random hexamers를 이용하여 Reverse-transcription system (Promega, WI, USA)으로 cDNA를 합성하였다. 실험에 사용된 Primer 종류와 Sequence는 Table 1과 같다. Real-time PCR은 StepOnePlus real-time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA)을 사용하여 진행하였고 10 μ l의 2x SYBR green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA), 1 μ l의 cDNA, 각각 1 μ l의 primer (sense and antisense) (Bioneer, Daejeon, Korea), 7 μ l의 증류수를 혼합하여 전체 용량을 20 μ l로 조절하여 진행하였다. PCR 반응은 초기에는 95 $^{\circ}$ C에서 10분 간 초기 변성을 시

Table 1. Primer Sequences for Real-Time PCR

Gene	Primer sequence	Size (bp)
Bcl-2	5' GAT TGA TGG GAT CGT TGC CTT A 3' 5' CCT TGG CAT GAG ATG CAG GA 3'	200
Bax	5' GGA TGC GTC CAC CAA GAA G 3' 5' GCC TTG AGC ACC AGT TTG C 3'	216
Mcl-1	5' CTC ATT TCT TTT GGT GCC TTT 3' 5' CCA GTC CCG TTT TGT CCT TAC 3';	117
Survivin	5' GGC CCA GTG TTT CTT CTG CTT 3' 5' GCA ACC GGA CGA ATG CTT T 3'	91
mTOR	5' CCT GCC ACT GAG AGA TGA CA 3' 5' TCC GGC TGC TGT AGC TTA TT 3'	168
β -actin	5' GCG AGA AGA TGA CCC AGA TC 3' 5' GGA TAG CAC AGC CTG GAT AG 3'	77

킨 후, 95°C에서 15초 간, 60°C에서 1분 간, 40주기로 시행하였다. 각 유전자의 mRNA 발현 결과는 β -actin mRNA level을 기준으로 하여 상대적인 값으로 나타내었다.

6) 단백질 분석

THP-1 세포를 100mm cell culture dish (1×10^6 cells)에 분주하고 100nM의 PMA를 첨가하여 72시간 동안 분화시킨 다음 세포배양액을 제거한 후 200 μ l의 새로운 배양액으로 3회 세척하였다. 다음으로 와송 에탄올 추출물(0, 100, 200, 300 μ g/ml)을 투여하여 24, 48, 그리고 72시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 상층액을 제거하고 차가운 PBS로 3회 세척하였다. 다음으로 400 μ l의 용해완충액(Cell Signaling Technology, MA, USA)을 가하여 세포를 용해시킨 다음 Cell Scraper를 사용하여 세포를 긁어낸 후 1.5ml tube에 옮겼다. 얼음에 10분간 둔 다음 13,000 xg에서 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 얻은 뒤 단백질을 분리하였다. 단백질 정량분석을 위해 Pierce BCA Protein Assay Kit를 이용하였다. 10 μ g의 단백질을 sample buffer (100mM DTT, 30% glycerol, 0.3% bromophenol blue, 187mM Tris-HCL pH 6.8)에 희석해 95°C에서 5분간 열처리한 후 10~15% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하였다. 겔에

서 단백질을 nitrocellulose membrane으로 이동시키고 1시간 동안 상온에서 5% nonfat dry milk로 blocking 하였다. Caspase-3, Akt, LC3II, Beclin-1, Atg5, NF- κ B, p38, ERK, β -actin의 일차항체를 5% nonfat dry milk에 1:1,000으로 희석하여 넣고 4°C에서 overnight 하여 반응시켰다. 반응이 끝난 후에 TBS-T (Sigma-Aldrich, MO, USA)로 15분간 3회 세척한 다음 1: 2,500으로 희석된 horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체를 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 다음으로 TBS-T로 15분간 3회 세척하였다. 단백질 발현은 Amersham ECL (Enhanced Chemiluminescence) Prime reagent (GE Healthcare Life Sciences, UK)를 사용하여 검출하였고 단백질 발현의 분석에는 Amersham 600 (GE Healthcare Life Sciences, UK)을 이용하였다. 단백질 band의 intensity는 ImaJ program (NIH, USA)을 사용하여 측정하였다.

3. 통계 분석

Excel과 Prism program의 Student's t-test를 이용해 대조군과 실험군의 결과값을 비교하였다. 통계적 유의성은 P값 ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$)을 기준으로 평가하였다.

결 과

1. 외송 에탄올 추출물의 세포 증식 억제

THP-1 세포에 외송 에탄올 추출물을 농도별(0-500 μ g/ml)로 처리하여 24, 48, 그리고 72 시간 동안 배양하였다. MTS/PMS assay를 통해 세포 생존율을 평가하였고 그 결과, 외송 에탄올 추출물은 THP-1 세포의 증식을 억제하였다(Figure 2).

300 μ g/ml 이상의 농도에서 세포 생존률의 뚜렷한 차이를 보이지 않았기 때문에 이후 실험에서 외송 에탄올 추출물의 최고 투여 농도는 300 μ g/ml로 설정하였고 농도별 세포 생존률의 차이가 비교적 뚜렷했던 100, 200, 300 μ g/ml를 실험 농도로 선택하여 실험을 진행하였다.

2. 외송 에탄올 추출물의 초기와 후기 세포자멸 유도 (유동세포 분석)

THP-1 세포에 외송 에탄올 추출물을 농도별(0, 100, 200, 300 μ g/ml)로 처리하여 24, 48, 그리고 72 시간 동안 배양하였다. 세포자멸 정도를 평가하기 위해 Annexin V-FITC와 PI 염색법을 이용하여 유동세포 분석을 진행하였다. 실험 결과 초기 세포자멸과

후기 세포자멸이 농도 및 시간 의존적으로 증가하였다(Figure 3).

3. 외송 에탄올 추출물의 세포자멸 유도 (효소면역 분석)

THP-1 세포에 외송 에탄올 추출물을 농도별(0, 100, 200, 300 μ g/ml)로 처리하여 24, 48, 그리고 72 시간 동안 배양하였다. 세포자멸 세포의 양을 확인하기 위해 효소면역 분석을 시행하였다. 그 결과, 외송 에탄올 추출물을 처리한 THP-1 세포에서 세포자멸 세포의 양이 농도 및 시간에 의존적으로 유의하게 증가하였다(Figure 4).

4. 외송 에탄올 추출물의 세포자멸과 관련한 유전자 mRNA 발현 조절

THP-1 세포에 외송 에탄올 추출물을 농도별(0, 100, 200, 300 μ g/ml)로 처리하여 24, 48, 그리고 72 시간 동안 배양하였다. 세포자멸과 관련한 mRNA 유전자 발현 정도를 평가하기 위해 real time PCR를 시행하였다. 그 결과 anti-apoptotic 유전자인 Bcl-2, Mcl-1, Survivin의 mRNA 발현은 감소한 반면 pro-apoptotic 유전자인 Bax의 mRNA 발현은 증가하였다(Figure 5).

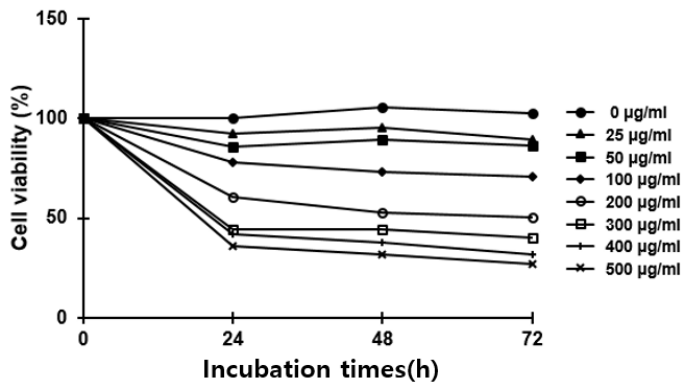


Fig. 2. Effects of *O. japonicus* EtOH extracts on the cell viability in THP-1 cells

Cells were treated with various concentrations of *O. japonicus* EtOH extracts (0-500 μ g/ml) for 24, 48, and 72 h. Cell viability was evaluated using MTS/PMS assay. The control group was assigned a value of 100%. The data are the mean \pm SD of triplicate samples.

5. 와송 에탄올 추출물의 Caspase-3와 Akt 단백질 발현 조절

THP-1 세포에 와송 에탄올 추출물을 농도별(0, 100, 200, 300 μ g/ml)로 처리하여 24, 48, 그리고 72 시간 동안 배양하였다. Western blot 방법으로 Caspase-3와 Akt의 단백질 발현을 분석하였다. 그

결과, 와송 에탄올 추출물을 처리한 THP-1 세포에서 Caspase-3의 단백질 발현은 증가하였고 Akt 인산화는 증가하는 양상을 보였으나 농도 및 시간에 따른 일관된 경향성은 없었다(Figure 6).

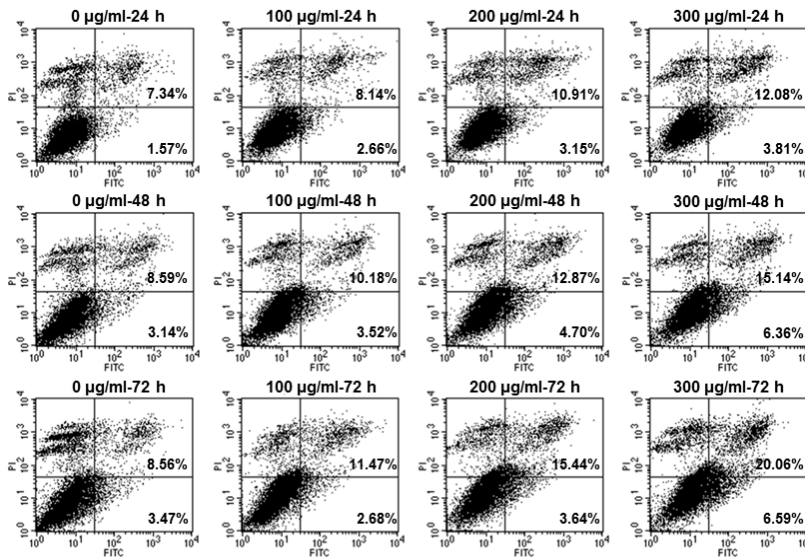


Fig. 3. The early and late apoptosis of *O. japonicus* EtOH extracts in THP-1 cells

Cells were treated with various concentration *O. japonicus* EtOH extracts (0, 100, 200, 300 μ g/ml) for 24, 48, and 72h. The apoptosis rate was analyzed using flow cytometry with Annexin V-FITC and PI staining.

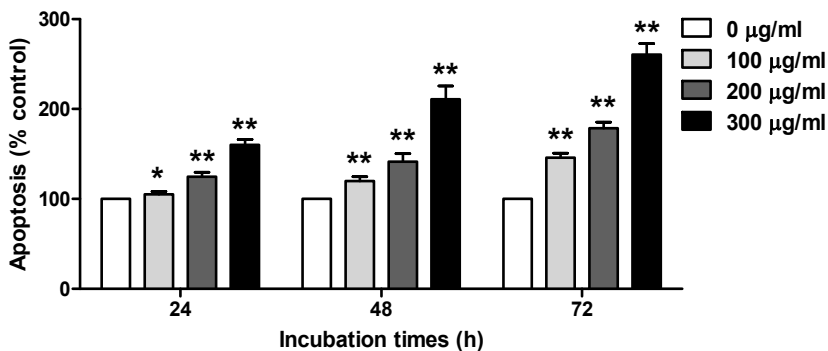


Fig. 4. Apoptosis rate of *O. japonicus* EtOH extracts in THP-1 cells

Cells were treated with various concentration *O. japonicus* EtOH extracts (0, 100, 200, 300 μ g/ml) for 24, 48, and 72h. Apoptotic cells were measured using a cell death detection ELISA. The control group was assigned a value of 100%. The data are the mean \pm SD of triplicate samples. (* χ 0.05 and ** χ 0.01 compared to the control.)

6. Caspase 억제제 처리 후 와송 에탄올 추출물 투여 시 세포 증식 유도

Caspase 억제제 처리 후 와송 에탄올 추출물 투여

시 세포 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위해 pan-caspase 억제제(Z-VAD-FMK) 또는 caspase-3 억제제(Z-DEVD-FMK)를 농도별(25, 50, 100 μ M)로

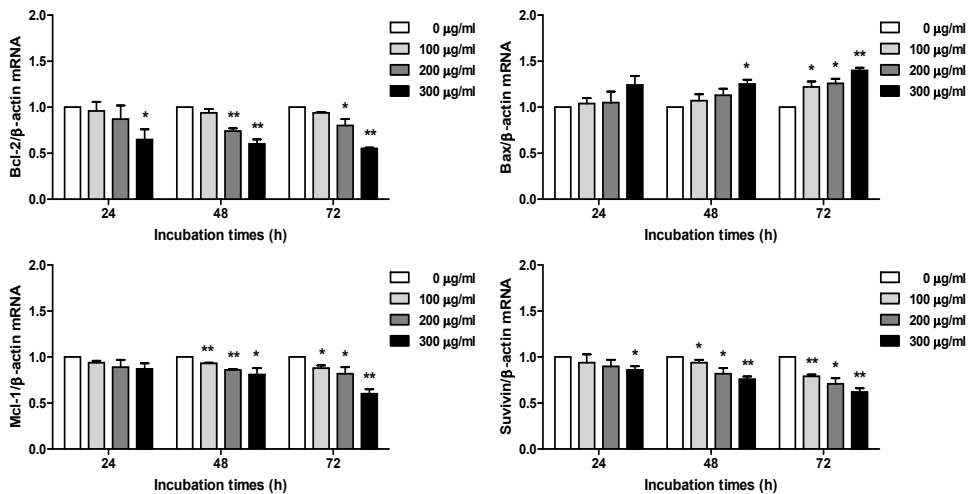


Fig. 5. Expression of apoptosis-related genes in *O. japonicus* extract treated THP-1 cells

Cells were treated with various concentration *O. japonicus* EtOH extracts (0, 100, 200, 300 μ g/ml) for 24, 48, and 72h. The mRNA levels were measured by real-time PCR. The crossing point of Bcl-2, Bax, Mcl-1, Survivin with β -actin was applied to the formula, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (target gene- β -actin), and relative amounts were quantified. The data are the mean \pm SD of triplicate samples. (* p <0.05 and ** p <0.01 compared to the control.)

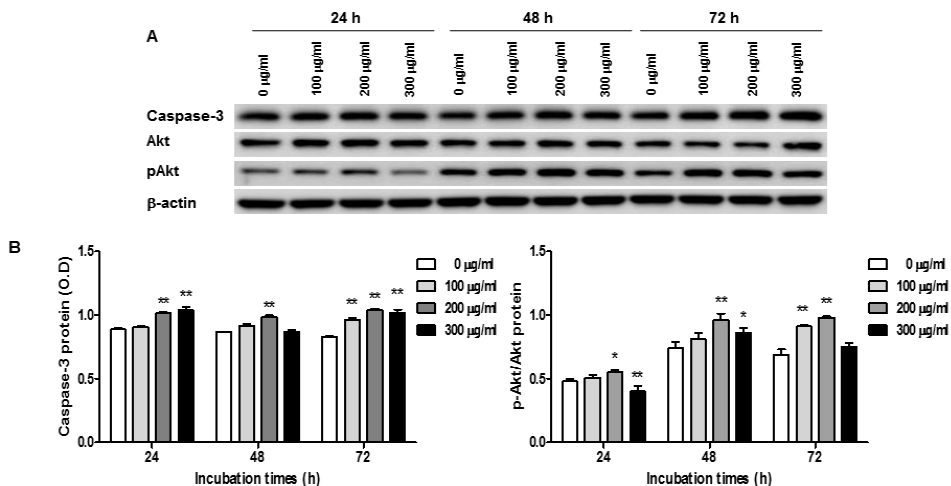


Fig. 6. Expression of Caspase-3 and Akt in *O. japonicus* extract treated THP-1 cells

Cells were treated with various concentration *O. japonicus* EtOH extracts (0, 100, 200, 300 μ g/ml) for 24, 48, and 72h. The protein levels were measured by western blot analysis. Cells were lysed and 10 μ g of soluble protein was separated by electrophoresis on a 10 % SDS-PAGE gel. Densitometry analyses are presented as the relative ratios of caspase-3 and Akt to β -actin. The data are the mean \pm SD of triplicate samples. (* p <0.05 and ** p <0.01 compared to the control.)

처리한 후, 2시간 후에 와송 에탄올 추출물 300 μ g/ml를 투여하였다. 72시간 후에 MTS/PMS assay를 통해 세포 생존율을 확인한 결과, 와송 에탄올 추출물만 투여한 군과 비교하였을 때 caspase 억제제를 처리한 군에서 세포 증식이 증가하였다(Figure 7).

7. 와송 에탄올 추출물의 자가포식과 관련된 유전자 mRNA 및 단백질 발현 조절

THP-1 세포에 와송 에탄올 추출물을 농도별(0, 100, 200, 300 μ g/ml)로 처리하여 24, 48, 그리고 72 시간 동안 배양하였다. 자가포식과 관련한 유전자의 mRNA 발현 정도를 평가하기 위해 real time PCR를 시행하였다. 그 결과, mTOR (mammalian target of rapamycin) mRNA의 발현은 농도 및 시간 의존적으로 감소하였다.

한편 LC3II, Beclin-1, Atg5 단백질 발현은 Western blot 방법으로 분석하였다. 그 결과, LC3II 단백질 발현량은 유의하게 증가하였고 Beclin-1은 24시간, 200 μ g/ml과 300 μ g/ml 그룹 그리고 72시간, 100 μ g/ml 그룹에서 유의하게 증가하였으며 Atg5 단

백질 발현은 300 μ g/ml 그룹에서 시간 의존적으로 감소하였다(Figure 8).

8. 와송 에탄올 추출물의 NF- κ B 활성 억제와 p38 활성 유도

THP-1 세포에 와송 에탄올 추출물을 농도별(0, 100, 200, 300 μ g/ml)로 처리하여 24, 48, 그리고 72 시간 동안 배양하였다. Western blot 방법으로 NF- κ B, p38, ERK의 인산화 정도를 분석하였다. 그 결과, NF- κ B의 인산화는 의미 있게 억제되었고 p38의 인산화는 의미 있게 증가하였으며 ERK의 인산화는 유의미한 변화를 보이지 않았다(Figure 9, Table 8).

고 찰

급성 골수성 백혈병은 기저 요인으로 혈액학적 이상이 있거나 DNA의 이중나선 꼬임과 관련되는 topoisomeraseII의 이상, 주로 항암제로 사용되는 알킬화 약물(alkylating agents)의 사용 혹은 방사선 치료 요인이 되어 발생¹⁸하기도 하지만 대부분의 경

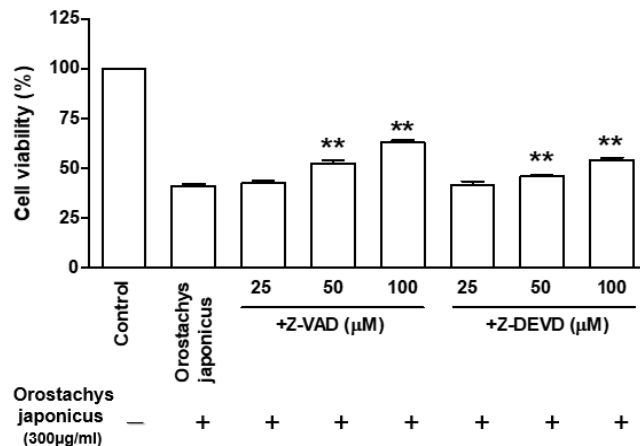


Fig. 7. Cell viability in the presence of caspase inhibitors in *O. japonicus* EtOH extracts treated THP-1 cells
Cells were treated with pan-caspase inhibitor (Z-VAD-FMK) (25–100 μ M) or caspase-3 inhibitor (Z-DEVD-FMK) (25–100 μ M) 2h before *O. japonicus* EtOH extracts treatment (300 μ g/ml). Cells were incubated for 72h and cell viability was measured by MTS/PMS assay. The data are the mean \pm SD of triplicate samples. (* p <0.05 and ** p <0.01 compared to *O. japonicus* EtOH extracts-treated cells vs. caspase inhibitor-treated cells with *O. japonicus* EtOH extracts.)

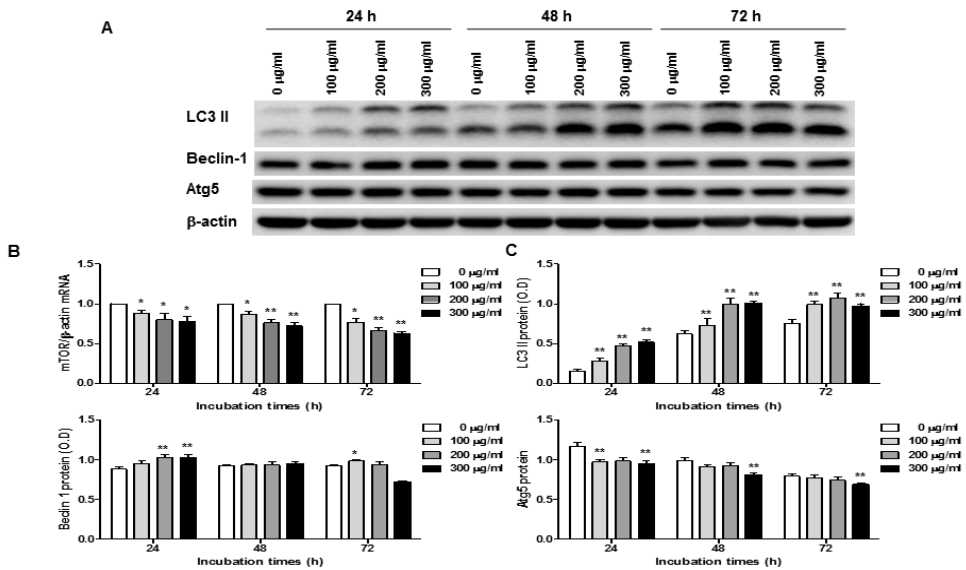


Fig. 8. Expression of autophagy-related genes in *O. japonicus* EtOH extracts treated THP-1 cells

Cells were treated with various concentration *O. japonicus* EtOH extracts (0, 100, 200, 300µg/ml) for 24, 48, and 72h. The mRNA levels were measured by real-time PCR. The crossing point of mTOR with β-actin was applied to the formula, 2^{-(target gene-β-actin)}, and relative amounts were quantified. The protein levels were measured by western blot analysis. Cells were lysed and 10µg of soluble protein was separated by electrophoresis on a 10% SDS-PAGE gel. Densitometry analyses are presented as the relative ratios of LC3 II, Beclin-1 and Atg5 to β-actin. The data are the mean±SD of triplicate samples. (*p<0.05 and **p<0.01 compared to the control.)

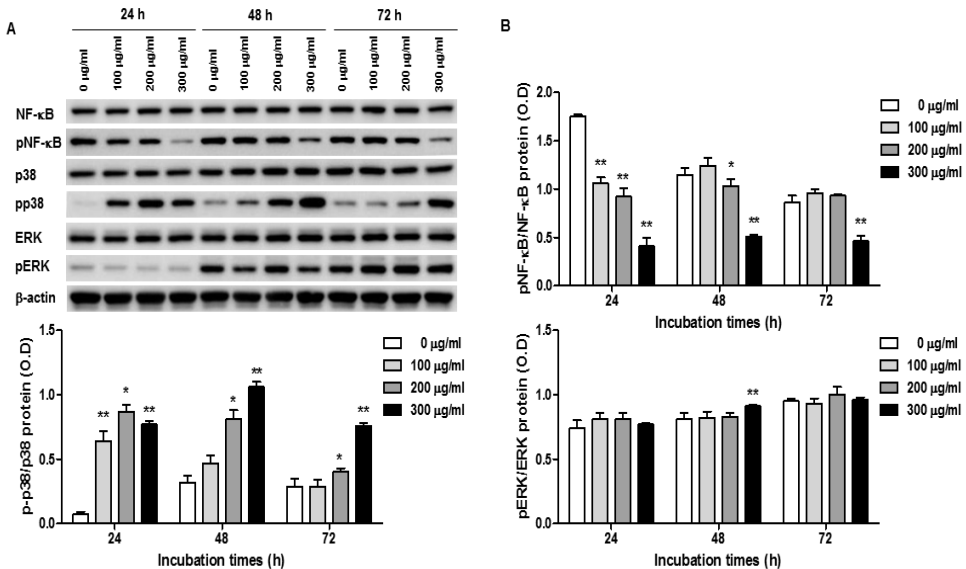


Fig. 9. Expression of NF-κB and MAPK signaling pathway in *O. japonicus* EtOH extracts treated THP-1 cells

Cells were treated with various concentration *O. japonicus* EtOH extracts (0, 100, 200, 300µg/ml) for 24, 48, and 72h. The protein levels were measured by western blot analysis. Cells were lysed and 10µg of soluble protein was separated by electrophoresis on a 10% SDS-PAGE gel. Densitometry analyses are presented as the relative ratios of NF-κB, p38 and ERK1/2 to β-actin. The data are shown as means±SD of three independent samples. (*p<0.05 and **p<0.01 compared to the control.)

우 이전에 건강한 사람들에게 발생하는 신생 종양이다¹⁾. 급성 골수성 백혈병의 임상증상은 골수, 말초혈액 혹은 드물게는 기타 기관 내에서 미분화된 악성 골수성 세포의 축적으로부터 기인한다. 대부분의 환자들은 백혈구증가증과 더불어 빈혈, 혈소판감소증과 같은 골수부전(bone marrow failure)을 보이며 피로, 식욕부진, 체중감소 등을 호소한다¹⁾. 급성 백혈병의 진단은 골수 혹은 말초혈액에서 20% 이상의 모세포(blast)가 존재할 때¹⁹⁾ 혹은 모세포의 비율과 상관없이 관련된 임상증상이 있고 골수 외 조직 침투 혹은 관련된 염색체 전좌(translocation) 또는 역위(inversion)가 확인될 때 가능하다²⁰⁾.

급성 골수성 백혈병 치료의 기본적인 목표는 관해(remission)를 유도하고 재발을 막는 것이다. 관해는 말초혈액 수치의 회복과 함께 골수에서 5% 이하의 모세포가 존재할 때로 정의한다³⁾. 치료 과정 또한 치료 목표에 부합하여 관해를 유도하는 과정과 관해 후 재발을 막는 과정, 두 가지로 나눌 수 있다. 관해를 유도하기 위해서는 안트라사이클린(anthracycline) 계열의 약제와 시타라빈(cytarabine)을 혼용하여 투여하며 관해에 도달한 후에는 재발 방지를 목적으로 고용량의 화학요법을 지속하거나 동종조혈모세포이식과 같은 방법을 적용해 볼 수 있다. 한편 65세 이상의 환자들에게는 위와 같은 치료를 진행하더라도 젊은 연령의 환자와 비교하여 치료 반응이 더디고 치료제와 관련한 독성에 더욱 취약한 특성이 있어 현재까지 고령의 환자군을 대상으로 한 이상적인 치료법이 규정되지 않은 상태이다¹⁾. 그럼에도 불구하고 관해유도치료를 진행하는 것이 보존요법(supportive care)이나 임시 방편의 화학요법(palliative chemotherapy)을 진행하는 것과 비교하여 생존률을 높인다는 연구 결과가 있었다²¹⁾.

외송은 바위솔이라고도 불리며 길이 10-30cm, 지름 3-6mm의 원주형 식물로 색은 초록색 혹은 붉은 보라색이다. 涼血止血, 清熱解毒, 收濕斂瘡 등의 효능이 있으며 주로 탕제 혹은 외용제로 사용되며 탕제

로 사용할 때는 햇볕에 말린 후 뿌리를 제거하여 사용하며 외용제로 사용할 때는 그늘에 말린 후 짓뭇어 붙이거나 달인 물로 씻는다²²⁾. 용량은 일반적으로 5-15g 정도 사용하며 암 치료를 목적으로 사용할 때는 300g까지 사용하기도 한다⁶⁾. 외송의 항암 효과에 대해서는 지속적으로 연구⁷⁻¹⁰⁾가 이루어지고 있으며 기존 연구를 살펴본 결과, 급성 골수성 백혈병 세포와 세포사멸 및 자가포식과의 연관성을 관찰한 연구는 부재하였기에 본 연구를 시행하였다.

본 연구에서는 인간 단핵구 백혈병 세포(THP-1)에 외송 에탄올 추출물을 투여하여 세포사멸과 자가포식에 미치는 영향에 대해 살펴보았다. 가장 먼저 외송 에탄올 추출물을 농도별(0-500 μ g/ml)로 투여하며 THP-1 세포의 생존률을 확인하였다. 외송 에탄올 추출물 투여 시 THP-1 세포의 생존률이 감소하는 것을 확인하였으며 각 그룹(24시간, 48시간, 72시간)의 300 μ g/ml 이상 농도에서는 세포 생존률의 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 이에 이후의 실험을 진행할 때 외송 에탄올 추출물의 최고 투여 농도는 300 μ g/ml로 설정하였고 농도별 세포 생존률의 차이가 비교적 뚜렷했던 100, 200, 300 μ g/ml를 실험 농도로 선택하여 실험을 진행하였다.

다음으로 Annexin V-FITC와 PI의 염색을 통한 유동세포 분석으로 초기 및 후기 세포사멸을 관찰하였다. Figure 2에 초기 및 후기 세포사멸 정도를 백분율로 표시하였는데 Annexin-V(+), PI(-)는 초기 세포사멸 세포를 의미하고 Annexin-V(+), PI(+)는 후기 세포사멸 세포를 의미한다. 실험 결과, 초기와 후기 세포사멸 모두 농도 및 시간 의존적으로 증가하였다. 효소면역 분석에서도 THP-1 세포에 외송 에탄올 추출물을 투여하였을 때, 세포사멸이 농도 및 시간 의존적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 외송이 세포사멸을 유도할 수 있음을 시사한다. 이 등²³⁾의 연구에서도 외송 에틸아세테이트 추출물(0, 50, 100 μ g/ml)을 HepG2 세포에 투여하였을 때 Annexin V-FITC와 PI 염색을 통한 유동세포

분석 결과, 초기 세포자멸이 농도 의존적으로 증가하였음을 확인하였다.

다음으로 세포자멸과 관련한 유전자의 mRNA 발현량을 조사하였다. 그 결과, 세포자멸을 억제하는 유전자인 Bcl-2, Mcl-1, Survivin의 mRNA 발현량은 감소하였고 세포자멸을 유도하는 유전자인 Bax의 mRNA 발현량은 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 와송 에탄올 추출물이 anti-apoptotic과 pro-apoptotic 유전자의 조절을 통해 세포자멸을 유도함을 시사한다.

다음으로 와송 에탄올 추출물을 투여한 THP-1 세포에서의 Caspase-3와 Akt 단백질 발현량을 살펴보았다. 실험 결과로 Caspase-3 단백질 발현량이 증가하였음을 확인하였다. 한편 Akt는 신호전달에 관여하는 물질로 Akt가 인산화 되면 크게 3가지 방향으로 암 세포 성장에 도움을 주는데 첫 번째는 세포의 생존력(survival) 자체를 증가시키고, 두 번째는 세포 수를 늘리고, 세 번째는 세포의 크기를 증가시킨다²⁴⁾. 한 연구에서는 인간 전립선암 세포(LnCaP cell)에 와송에서 추출한 플라보노이드(200 μ g/ml)를 투여한 결과, PI3K/AKT 경로의 활성 억제를 통한 MMP-2와 MMP-9 발현의 억제로 암세포의 침입(invasion)이 감소한다는 것을 보여주며 와송의 항암 효과에 대해 밝힌 바 있다²⁵⁾. 본 연구에서는 THP-1 세포에 와송 에탄올 추출물 투여 시 Akt 인산화가 다소 증가한 경향을 보였으나 농도 및 시간에 따른 일관된 경향성을 보이지는 않았다.

다음으로 THP-1 세포에 와송 에탄올 추출물 투여 시 발생한 세포자멸과 Caspase의 연관성을 확인하고자 Caspase 억제제 처리 후 와송 에탄올 추출물을 투여하였을 때의 세포 생존율을 관찰하였다. THP-1 세포에 Caspase 억제제를 농도별(25, 50, 100 μ M)로 처리하고 2시간 후에 와송 에탄올 추출물 300 μ g/ml을 투여하였으며 72시간 경과 후 MTS/PMS assay를 통해 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과, Caspase 억제제의 농도가 증가할수록 세포 생존율이 증가하

였으며 이러한 결과는 THP-1 세포에 와송 에탄올 추출물 투여 시 발생한 세포자멸이 Caspase 의존적이었음을 시사한다.

본 연구에서는 세포자멸과 더불어 자가포식과 관련한 인자들의 mRNA 및 단백질 발현량을 살펴보았다. mTOR (mammalian target of rapamycin)는 주로 영양 상태, 성장 인자(growth factor), stress에 대한 반응으로 세포 성장과 자가포식 사이의 균형을 조절하는 중요한 역할을 하는 물질로 mTOR가 억제 되면 세포에서 자가포식이 유도되는 방향으로 반응이 진행된다²⁶⁾. LC3 (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3)는 포유류의 조직과 세포에 존재하는 용해성 단백질로 LC3 I은 자가포식 과정에서 포스파티딜에틸올아민(phosphatidylethanolamine)과 결합한 LC3II (LC3-phosphatidylethanolamine conjugate)로 바뀌며 자가포식소체(autophagosome)의 막 형성에 관여한다²⁷⁾. 실험 결과, mTOR mRNA 발현량은 농도와 시간 의존적으로 감소하고 LC3II 단백질 발현량은 의미 있게 증가하였으며 이러한 결과를 통해 와송 에탄올 추출물을 투여한 THP-1 세포에서 자가포식이 유도되었음을 추정해 볼 수 있다.

한편 Beclin-1은 전자가포식소체 구조(pre-autophagosomal structure, PAS)에서 자가포식 관련 단백질들의 위치 조정(localization)에 중요한 역할을 하는 물질²⁸⁾이고 Atg5 (autophagy related 5)는 자가포식소체 형성 초기에 관여하는 물질로 Atg12 (autophagy related 12)와 결합체를 형성하여 자가포식소체 막 형성에 관여하는 물질이다²⁹⁾. 와송 에탄올 추출물을 투여한 THP-1 세포에서 Beclin-1과 Atg5의 단백질 발현량을 측정한 결과, Beclin-1 단백질 발현량은 농도 및 시간에 따른 유의미한 경향성을 보이지 않았고 Atg5 단백질 발현량은 300 μ g/ml 농도에서 시간 의존적으로 감소하는 경향을 보여 자가포식 유도와는 연관성을 보이지 않았다.

본 연구와 유사한 연구로 삼소음을 인간 위암 세포(AGS cell)와 피부암 세포 (B16F10 cell)에 투여

하였을 때 세포사멸과 자가포식에 미치는 영향에 대해 관찰한 결과, Bcl-2의 하향 조절 및 Bax의 상향 조절이 일어났고 Beclin-1과 LC3 II의 단백질 발현이 증가하였으며 이와 같은 반응은 AMPK 활성화를 통한 Akt/mTOR 신호 전달 경로의 억제를 통해 나타났음을 확인하였다³⁰⁾.

마지막으로 본 연구에서도 세포사멸과 자가포식과 관련한 신호 전달 경로를 확인하고자 NF- κ B와 MAPK의 단백질 발현량을 측정해보았다. NF- κ B는 세포사멸에 관련된 단백질 발현을 조절하는 중요한 전사 인자³¹⁾로 세포사멸을 억제하는 방향으로 작용한다. 실험 결과, 외송 에탄올 추출물을 투여한 THP-1 세포에서 NF- κ B 활성이 억제되었고 이는 세포사멸이 유도되는데 도움이 되었으리라 사료된다.

한편 MAPK는 p38, JNK 및 ERK를 포함하며 세포 증식, 세포 분화, 세포 사멸 및 자가포식 등을 조절하는 물질로 세포 외 신호에 의해 활성화된다³²⁾. 실험 결과, 외송 에탄올 추출물을 투여한 THP-1 세포에서 p38의 인산화가 증가하였고 ERK의 유의미한 변화는 나타나지 않았다. 이를 통해 THP-1 세포에서 외송 에탄올 추출물이 유도한 세포사멸과 자가포식에는 p38의 인산화가 관여했음을 추정해 볼 수 있다.

결론적으로 외송 에탄올 추출물이 인간 단핵구 백혈병 세포(THP-1)의 증식을 억제하였으며 세포사멸을 유도하고 자기포식 유전자를 조절을 한다는 것을 알 수 있었다. 또한 이러한 과정에 NF- κ B 활성의 억제와 p38 활성이 관여하는 것을 추정해 볼 수 있었다.

결론

본 연구에서는 외송 에탄올 추출물이 인간 단핵구 백혈병 세포(THP-1)에서 세포사멸 및 자가포식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 분자생물학적 기전을 살펴보고자 MTS/PMS assay, 유동세포 분석, 효소면역 분석, real-time PCR, Western Blot을 시행하

였고 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 외송 에탄올 추출물은 MTS/PMS assay 결과, THP-1 세포 증식을 억제하였다.
2. 외송 에탄올 추출물은 Annexin V와 PI 염색법을 사용한 유동세포 분석 결과, THP-1 세포의 초기와 후기 세포사멸을 유도하였다.
3. 외송 에탄올 추출물은 효소면역 분석 결과, THP-1 세포의 세포사멸을 유도하였다.
4. 세포사멸과 관련한 유전자의 mRNA 발현을 살펴본 결과, Anti-apoptotic 유전자인 Bcl-2, Mcl-1, Survivin mRNA 발현은 감소하였으며 Pro-apoptotic 유전자 Bax인 mRNA의 발현은 증가하였다.
5. 외송 에탄올 추출물 투여 시 Western Blot 결과, Caspase-3 단백질 발현은 증가하였으며 Akt의 인산화는 증가하는 양상을 보였으나 농도 및 시간에 따른 일관된 경향성을 보이지 않았다.
6. Caspase inhibitor 처리 후 외송 에탄올 추출물을 투여하였을 때 MTS/PMS assay 결과, 세포 증식이 증가하였다.
7. 자가포식과 관련한 유전자의 mRNA 발현과 단백질 발현을 살펴본 결과, mTOR mRNA의 발현은 감소하였고 LC3 II의 단백질 발현은 증가하였다. Beclin-1 단백질 발현은 일부 그룹에서 증가하였으며 Atg5 단백질 발현은 300 μ g/ml 그룹에서 시간에 따라 감소하는 경향을 보였다.
8. 외송 에탄올 추출물 투여 시 Western Blot 결과, NF- κ B의 활성은 억제되었고 p38의 인산화는 증가하였다.

이상의 결과들을 종합해보면 외송 에탄올 추출물은 인간 단핵구 백혈병 세포(THP-1)에서 세포사멸을 유도하고 자기포식 관련 유전자를 조절하였으며 이러한 과정에는 NF- κ B의 활성 억제와 p38의 활성이 관여한다는 것을 추정해 볼 수 있다.

외송은 본 연구를 포함하여 기존의 다양한 세포 실험을 통해 항암제로서의 가능성이 밝혀져 온 약제이다. 본 연구에서는 외송의 항암효과를 살펴보기 위

해 세포자멸 및 자가포식과 관련한 일부 인자들을 살펴보았으며 향후 외송과 자가포식의 관련성에 대한 심도 있는 연구가 진행될 필요가 있다고 사료된다. 또한 실험 모델의 확장으로 세포 실험에서 나아가 다수의 동물 실험 모델에서도 외송의 항암 효과를 밝히는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay, M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. *Blood cancer journal*. 2016;6(7): e441.
2. Park EH, Lee H, Won YJ, Ju HY, Oh CM, Ingabire C, et al. Nationwide statistical analysis of myeloid malignancies in Korea: incidence and survival rate from 1999 to 2012. *Blood research*. 2015;50(4):204-217.
3. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 1999;341(14):1051-1062.
4. Shah A, Andersson TML, Racht B, Björkholm M, Lambert PC. Survival and cure of acute myeloid leukaemia in England, 1971-2006: a population-based study. *British journal of haematology*. 2013;162(4):509-516.
5. Meyers J, Yu Y, Kaye JA, Davis KL. Medicare fee-for-service enrollees with primary acute myeloid leukemia: an analysis of treatment patterns, survival, and healthcare resource utilization and costs. *Applied health economics and health policy*. 2013;11(3):275-286.
6. Ahn DG. Illustrated guide to clinical medicinal herbs. Seoul:Hyun-am-sa. 2012:697-698.
7. Ryu DS, Baek GO, Kim EY, Kim KH, Lee DS. Effects of polysaccharides derived from *Orostachys Japonicus* on induction of cell cycle arrest and apoptotic cell death in human colon cancer cells. *BMB reports*. 2010;43(11):750-755.
8. Shin DY, Lee WS, Jung JH, Hong SH, Park C, Kim HJ, et al. Flavonoids from *Orostachys japonicus* A. Berger inhibit the invasion of LnCaP prostate carcinoma cells by inactivating Akt and modulating tight junctions. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(9): 18407-18420.
9. Ryu DS, Lee HS, Lee GS, Lee DS. Effects of the ethylacetate extract of *Orostachys japonicus* on induction of apoptosis through the p53-mediated signaling pathway in human gastric cancer cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2012;35(5):660-665.
10. Kim YI, Park SW, Choi IH, Lee JH, Woo HJ, Kim Y. Effect of *Orostachys japonicus* on cell growth and apoptosis in human hepatic stellate cell line LX2. *The American journal of Chinese medicine*. 2011;39(03):601-613.
11. Koppula S, Yum MJ, Kim JS, Shin GM, Chae YJ, Yoon T, et al. Anti-fibrotic effects of *Orostachys japonicus* A. Berger (*Crassulaceae*) on hepatic stellate cells and thioacetamide-induced fibrosis in rats. *Nutrition research and practice*. 2017;11(6):470-478.
12. Lee HS, Ryu DS, Lee GS, Lee DS. Anti-inflammatory effects of dichloromethane fraction from *Orostachys japonicus* in RAW 264.7 cells: suppression of NF- κ B activation and MAPK signaling. *Journal of ethnopharmacology*. 2012;140(2):271-276.
13. Lee HS, Lee GS, Kim SH, Kim HK, Suk DH, Lee DS. Anti-oxidizing effect of the dichloromethane and hexane fractions from

- Orostachys japonicus in LPS-stimulated RAW 264.7 cells via upregulation of Nrf2 expression and activation of MAPK signaling pathway. *BMB reports*. 2014;47(2):98.
14. Gerl R, Vaux DL. Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis*. 2005;26(2):263-270.
 15. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2007;7(12):961.
 16. Choi ES, Lee JH. Orostachys japonicus DW and EtOH extracts Induce Apoptosis in Cholangiocarcinoma Cell Line SNU-1079. *Journal of Korean Medicine*. 2015;36(4):19-34.
 17. “Korean traditional herbal medicine standard book”, Korea national legal information center. [cited 2018 December 10]. Available from: <http://www.law.go.kr/admRulSc.do?tabMenuId=tab107>
 18. Sill H, Olipitz W, Zebisch A, Schulz E, Wölfler A. Therapy-related myeloid neoplasms: pathobiology and clinical characteristics. *British journal of pharmacology*. 2011;162(4):792-805.
 19. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010;115(3):453-474.
 20. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 2009;114(5):937-951.
 21. Löwenberg, B, Zittoun R, Kerkhofs H, Jehn U, Abels J, Debusscher L, et al. On the value of intensive remission-induction chemotherapy in elderly patients of 65+ years with acute myeloid leukemia: a randomized phase III study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Leukemia Group. *Journal of Clinical Oncology*. 1989;7(9): 1268-1274.
 22. Cho CS, Cho JG. A literature review of Orostachys japonicus. *Collection of dissertations from Korean Medicine Laboratory*. 1994;2(2): 83-98.
 23. Lee GS, Lee HS, Kim SH, Suk DH, Ryu DS, Lee DS. Anti-cancer activity of the ethylacetate fraction from Orostachys japonicus for modulation of the signaling pathway in HepG2 human hepatoma cells. *Food Science and Biotechnology*. 2014;23(1):269-275.
 24. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(7):489.
 25. Shin DY, Lee WS, Jung JH, Hong SH, Park C, Kim HJ, et al. Flavonoids from Orostachys japonicus A. Berger inhibit the invasion of LnCaP prostate carcinoma cells by inactivating Akt and modulating tight junctions. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(9): 18407-18420.
 26. Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. mTOR regulation of autophagy. *FEBS letters*. 2010;584(7):1287-1295.
 27. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. In *Autophagosome and Phagosome*. Humana press. 2008;77-88.
 28. Kang R, Zeh H, Lotze M, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis.

- Cell death and differentiation. 2011;18(4):571.
29. Codogno P, Meijer AJ. Atg5: more than an autophagy factor. *Nature cell biology*. 2006;8(10):1045.
30. Kim A, Yim NH, Ma JY. Samsoeum, a traditional herbal medicine, elicits apoptotic and autophagic cell death by inhibiting Akt/mTOR and activating the JNK pathway in cancer cells. *BMC complementary and alternative medicine*. 2013;13(1):233.
31. Reed JC. Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer cell*. 2003;3(1):17-22.
32. Murphy LO, Blenis J. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends in biochemical sciences*. 2006;31(5):268-275.

ORCID

- 주성희 <https://orcid.org/0000-0002-2634-1263>
장은경 <https://orcid.org/0000-0002-9992-3942>
김영철 <https://orcid.org/0000-0002-2090-8062>