

Induction of Tumor Suppressor Gene p53-dependent Apoptosis by Sanguinarine in HCT116 Human Colorectal Cancer Cells

Yung Hyun Choi^{1,2*}

¹Department of Biochemistry, Dong-eui University College of Korean Medicine, Busan 47227, Korea

²Anti-Aging Research Center, Dong-eui University, Busan 47340, Korea

Received December 2, 2020 / Revised December 29, 2020 / Accepted December 29, 2020

Sanguinarine, a natural benzophenanthridine alkaloid, has been considered a potential therapeutic target for the treatment of cancer because it can induce apoptosis in human cancer cells; however, the underlying mechanisms of action still remain unclear. Tumor suppressor p53 deletion or mutation is an important reason for the resistance of colorectal cancer cells to anticancer agents. Therefore, in the present study, the role of p53 during apoptosis induced by sanguinarine was investigated in p53 wild type (WT, p53+/+) and p53 null (p53-/-) HCT116 colon carcinoma cells. Sanguinarine significantly caused greater reductions in cell viability in HCT116 (p53+/+) cells than in HCT116 (p53-/-) cells. Consistently, sanguinarine promoted more DNA damage and apoptosis in HCT116 (p53+/+) cells than in HCT116 (p53-/-) cells while increasing the expression of p53 and cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{WAF1/CIP1}. Sanguinarine increased the activity of caspase-8 and caspase-9, which are involved in the initiation of extrinsic and intrinsic apoptosis pathways, respectively, and it activated caspase-3, a typical effect caspase, in HCT116 (p53+/+) cells. Sanguinarine also increased the generation of reactive oxygen species (ROS), and the Bax/Bcl-2 ratio, while destroying the integrity of mitochondria in HCT116 (p53+/+) cells, but not in HCT116 (p53-/-) cells. Overall, the results indicate that sanguinarine induced p53-dependent apoptosis through ROS-mediated activation of extrinsic and intrinsic apoptotic pathways in HCT116 colorectal cancer cells.

Key words : Apoptosis, colorectal cancer cells, DNA damage, p53, sanguinarine

서 론

암세포의 제거를 위한 세포사멸(apoptosis)의 유도는 항암제 개발에서 핵심적인 전략이다. 세포 운명의 "master regulator"로 간주되는 종양억제 유전자 p53 (tumor suppressor p53)은 세포주기 진행 조절과 DNA 손상뿐만 아니라 세포사멸 유도에 중추적인 역할을 한다[8, 44]. p53은 주로 세포의 증식억제에 관여하는 표적 유전자의 조절을 통해 항암 잠재력에 관여하며, 이는 결국 암 진행의 억제에 기여한다[9, 46]. 그러나 p53은 결장암을 포함한 인간 암의 50% 이상에서 변이되거나 결실되어 암 치료의 주요 장애가 되고 있다[43, 44, 50]. 따라서 항암 활성을 지니는 특정 후보물질의 검색 과정에서 그들의 항암 활성이 p53 의존적인지의 여부는 임상적 활용을 위한 주요한 정보로 제공될 수 있다.

오랫동안 천연물은 다양한 질환의 치료를 위한 중요한 공급

원으로 역할을 하고 있으며, 현재 이용 가능한 약물의 50% 이상이 실제로 천연 물질 또는 그들의 유도체이다. 수많은 천연물은 서로 다른 기전을 통하여 암세포에 대해 광범위한 세포독성 효과를 발휘한다[33, 34]. Sanguinarine은 *Sanguinaria canadensis*에 주로 존재하지만 *Chelidonium majus*와 *Macleaya cordata*와 같은 식물에서도 발견되는 benzophenanthridine alkaloid 계열에 속하는 주요 생리활성 물질로서 항균 활성, 고혈압 및 골다공증 억제 등을 포함한 광범위한 약리학적 활성을 나타내는 것으로 입증되었다[7, 19, 42, 53]. 특히 sanguinarine은 다양한 암세포에서 세포사멸을 유도하는 것으로 알려지면서 그와 연관된 분자 생물학적 기전 연구가 최근까지 집중적으로 이루어져 왔다[13, 15, 16]. 예를 들어, sanguinarine에 의한 암세포의 세포사멸은 세포의 증식에 중요한 역할을 하는 nuclear factor- κ B, phosphoinositide 3-kinase/Akt 신호계의 활성 억제와 연관성이 있었으며[21, 30, 53], 세포사멸에 핵심적인 역할을 하는 caspase cascade의 활성화와 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성 의존적인 현상과 연관된 것으로 보고되고 있다[10, 20, 22, 27, 29]. 아울러 ROS 생성에 따른 미토콘드리아 기능의 손상은 Bcl-2 family에 속하는 단백질들의 발현 변화와 미토콘드리아에서 세포질로의 cytochrome c 유리와 연계성이 있었다[1, 26, 29].

Sanguinarine에 의한 암세포의 증식억제와 연관된 p53의 역할에 관한 최초의 연구는 Malíková et al. [31]에 의하여 이루어

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-3319, Fax : +82-51-890-3333

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.

어졌으며, 그들의 결과에 의하면 인간 전립선 암세포에서 sanguinarine은 p53의 유무에 상관없이, DNA 손상과 세포사멸을 유도하였으며, cyclin-dependent kinase (Cdk) 억제제의 발현을 증가시켰다. 그러나, Ahsan et al. [4]는 인간 췌장암세포에서 sanguinarine에 의한 세포사멸에서는 p53의 활성이 증가되었다고 보고한 바는 있으며, 이와 유사하기 마우스 흑색종에서 sanguinarine에 의한 DNA 손상 및 세포사멸 유도에서 p53의 발현이 증가되었다고 보고된 바 있다[39], 최근 Zhang et al. [55]은 간암의 진행에 관여하는 microRNA (miRNA)를 표적화하는 과정에서 sanguinarine이 종양억제자로서 기능을 하는 miR-16이 p53이 결손된 간암세포에서는 활성이 되지 않았음을 보고한 바 있다. 또한 그들의 결과에 의하면, sanguinarine은 p53 의존적으로 세포주기 정지(cell cycle arrest)와 함께 ROS 매개 세포사멸이 유도하였다. 비록 인간 결장암세포에서 sanguinarine에 의한 세포사멸에 p53의 연계성이 낮다는 보고는 있었지만[32], 그들의 연구 결과는 단순 현상만을 제시하였기에 DNA 손상 및 세포사멸에서 p53의 중요성을 파악하기에는 충분하지 못하다. 따라서 본 연구에서는 sanguinarine의 항암 활성에서 p53의 역할을 명확히 규명하기 위하여 정상 p53 유전자를 가진 결장암세포와 p53이 결여된 결장암세포[HCT116 (p53+/+) 및 HCT116 (p53-/-)]를 대상으로 sanguinarine 처리에 따른 DNA 손상 및 세포사멸의 유도 현상을 비교하였고, sanguinarine에 의한 세포사멸에 관여하는 기전을 조사하였다.

재료 및 방법

세포 배양 및 sanguinarine의 처리

본 연구에 사용한 HCT116 (p53+/+ 및 p53-/-) 세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 분양받았으며, RPMI1640 배지(WelGENE Inc., Daegu, Republic of Korea)에 10% fetal bovine serum, 1% penicillin 및 streptomycin (WelGENE Inc.)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. Sanguinarine은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 10 mM 농도로 methanol에 녹인 후 세포 배양용 배지에 희석하여 처리하였다.

세포 생존율 측정

Sanguinarine 처리에 따른 두 세포주에서의 세포독성을 비교하기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 분석을 수행하였다. 이를 위하여 6 well plate에 각 세포를 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 후, 1 µM의 sanguinarine을 적정 시간 동안 처리하였다. 처리가 끝난 후, 선행 방법[30]에 준하여 0.5 mg/ml MTT 용액 (Amresco Inc., Solon, OH, USA)를 첨가하여 30분 동안 반응시킨 후, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) read-

er (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아울러 sanguinarine 처리에 따른 세포의 형태 변화는 도립현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 하에서 관찰하였다.

핵의 형태적 변화 조사

Sanguinarine 처리에 따른 세포사멸 유발 여부를 확인하기 위한 핵의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 준비된 세포를 상온에서 10분간 3.7% formaldehyde 용액을 세포를 처리하고 고정하였다. 이들 세포를 phosphate buffered saline (PBS)로 수세 후 1 mg/ml의 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich Chemical Co. St. Louis, MO, USA) 용액으로 10분간 염색하였다. PBS 및 증류수로 다시 수세 후 형광 현미경(Carl Zeiss)을 이용하여 핵의 형태적 변화를 관찰하였다.

Comet 분석

Sanguinarine 처리에 따른 DNA 손상의 정도를 분석하기 위해서 Comet 분석법을 적용하였다. 선행 방법[6]에 준하여 준비된 세포를 37°C에서 low melting point agarose (LMA)에 부유시킨 후, normal melting agarose로 coating된 슬라이드에 옮겼다. 암 하에서 agarose가 고형화된 후, 슬라이드를 LMA로 덮고 용해 용액에 4°C에서 1시간 동안 침지시켰다. 이어서 슬라이드를 gel 전기 영동 장치에서 30분 동안 incubation하고 30 V (1 V/cm) 및 300 mA에서 20분 동안 전기 영동하였다. 전기 영동 후, 슬라이드를 중화 완충액으로 3회 세척하고 20 µg/ml propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액으로 염색한 후 형광현미경(Carl Zeiss) 하에서 DNA 손상 여부를 분석하였다.

단백질의 분리 및 Western blot 분석

선행 방법[30]에 준하여 sanguinarine이 48시간 동안 처리된 세포를 PBS로 수세하고 용해시킨 후 상층액을 얻었다. Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA)을 사용하여 단백질 농도는 정량하고, 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel을 이용하여 전기 영동을 한 후 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 전이시켰다. 이어서 5% skim milk를 30분간 처리하고 적정 1차 항체(Santa Cruz Biotechnology, Inc. 및 Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)를 2시간 이상 처리한 후 PBS-T (PBS with Tween 20)를 사용하여 10분간 3번 세척하였다. 그 후 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)를 상온에서 1시간 이상 반응시킨 후 PBS-T로 수세 후 enhanced chemiluminescence (ECL) solution (Amersham Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 후 단백질들의 발현 변화를 분석하였다.

ROS 생성 관찰

Sanguinarine 처리에 따른 ROS 생성의 정도를 측정을 위하여 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) 염색법을 이용하였다. 이를 위하여 sanguinarine이 1시간 동안 처리된 세포들을 모아 10 µM의 DCF-DA 용액(Molecular Probes Inc., Leiden, Netherlands)을 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 20분 염색하고 PBS 및 증류수로 수세 후 형광 현미경(Carl Zeiss)을 이용하여 DCF의 강도를 관찰하였다.

미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential, MMP) 분석

Sanguinarine 처리에 따른 미토콘드리아 기능 손상의 정도를 확인하기 위하여 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylimidacarbocyanine iodide (JC-1) 염색을 실시하였다. 이를 위하여 sanguinarine이 48시간 동안 처리된 세포에 10 µM의 JC-1 (Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액을 처리하고 20분 동안 염색 후 PBS로 세포를 수세 후 동의대학교 생체조직재생학 심연구지원센터의 flow cytometry (Beckman Coulter Inc., Brea, USA)를 이용하여 MMP의 변화를 분석하였다.

Caspase 활성 측정

Sanguinarine 처리에 의한 caspase의 활성 변화는 colorimetric assay kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다. 이를 위하여 준비된 세포에서 총 단백질을 추출하고 정량하여 각각 150 µg의 단백질을 fluorogenic peptide 기질 100 µM이 함유된 extraction buffer 50 µl에 혼합하였다. 이어서 microtiter plate에 다시 extraction buffer에 희석하여 각 sample 당 총 volume이 100 µl가 되게 하였다. 실험에 사용된 기질은 caspase-3의 경우에는 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-p-nitroaniline (pNA)이었고 caspase-8의 경우에는 Ile-Glu-Thr-Asp (IETD)-pNA이었으며, caspase-9은 Leu-Glu-His-Asp (LEHD)-pNA였다. 준비된 plate를 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm의 흡광도에서 각 caspase의 활성의 정도를 측정하였다.

통계분석

GraphPad Prism® version 5.0 (Graphpad Inc., San Diego, CA, USA) one-way ANOVA를 사용하여 통계분석 하였다. 이를 Turkey's test로 사후 검정하여 $p < 0.01$ 값을 유의한 값으로 처리하였다.

결 과

Sanguinarine에 의한 HCT116 결장암 세포의 증식 억제

종양억제 유전자 p53의 유무에 따라 sanguinarine의 처리 따른 인간 결장암세포의 증식 억제에 미치는 영향을 비교하기

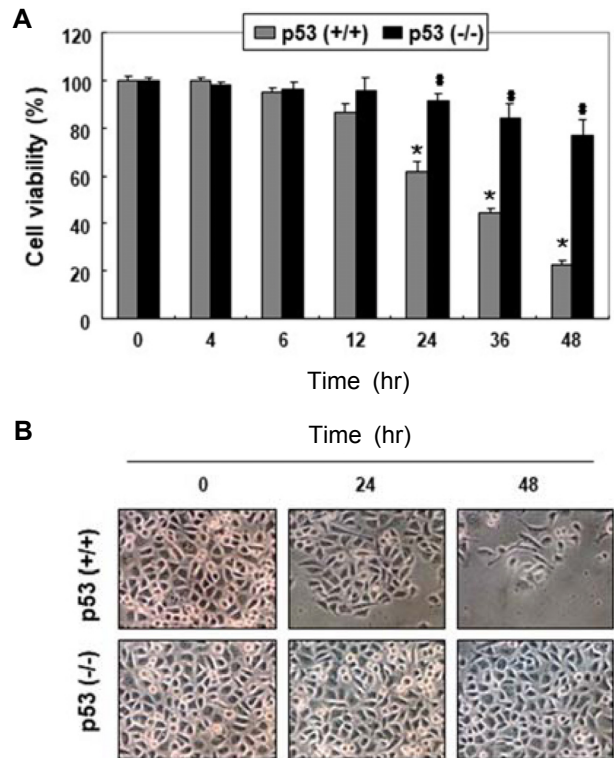


Fig. 1. Comparison of survival rates by sanguinarine between HCT116 cells (p53+/+) and HCT116 p53 null cells (p53-/-). Cells were treated with 1 µM sanguinarine for the indicated times. The cell viability was assessed by an MTT assay. Each bar represents the mean ± SD of three independent experiments (* $p < 0.05$ compared to control; # $p < 0.05$ compared to p53(+/+)). (B) Morphological changes of cells were observed by a phase-contrast microscope.

위하여, 정상 p53을 가진 HCT116 (p53+/+) 및 p53이 결여된 HCT116 (p53-/-) 세포에 1 µM의 sanguinarine을 처리하였다. Fig. 1A에 나타난 MTT 분석 결과에서 알 수 있듯이, HCT116 (p53+/+) 및 HCT116 (p53-/-) 세포 모두에서 sanguinarine 처리 시간이 증가할수록 생존율이 감소되었으나, sanguinarine에 의한 세포독성은 HCT116 (p53-/-) 세포에 비하여 HCT116 (p53+/+) 세포에서 매우 높게 나타났다. 아울러 세포의 형태적 변화 및 밀집도 감소 또한 이와 유사한 경향성을 보였다(Fig. 1B).

Sanguinarine에 의한 HCT116 결장암 세포의 세포사멸 유도

Sanguinarine의 처리에 따른 생존율 감소가 세포사멸과 밀접한 관련성이 있을 것으로 추정되어 DAPI 염색에 따른 핵의 형태적 변화를 관찰하였다. Fig. 2A에 나타난 결과에서 알 수 있듯이, sanguinarine이 처리된 HCT116 (p53+/+) 세포에서 세포사멸이 유발되었을 경우 관찰되는 염색질의 응축과 단편

화 현상이 HCT116 (p53^{-/-}) 세포보다 매우 높게 관찰되었으며 (Fig. 2B), 이는 증식 억제 결과와 매우 일치되는 것이다.

Sanguinarine에 의한 HCT116 결장암 세포의 DNA 손상 유발

Sanguinarine의 처리에 의한 세포사멸 유도에 DNA 손상이 동반되는지를 조사하기 위하여 먼저 comet 분석을 수행하였다. Fig. 3A의 결과에서 알 수 있듯이, sanguinarine이 처리된 HCT116 (p53^{+/+}) 세포에서 DNA 손상을 의미하는 핵으로부터 이동한 DNA 파편의 거리 및 형광 강도가 HCT116 (p53^{-/-}) 세포에 비하여 매우 높게 관찰되었다. 그리고 또 다른 DNA 손상의 지표인 H2A histone family member X (γ H2AX)의 인산화(p- γ H2AX)의 정도 또한 sanguinarine이 처리된 HCT116 (p53^{+/+}) 세포에서 높게 발현이 되었다. 이는 sanguinarine에 의한 세포독성 및 세포사멸의 유도에 DNA 손상이 매개되어 있음을 의미하며, p53 유전자가 존재하는 HCT116 세포에서 더 많은 DNA 손상이 유발되었음을 알 수 있었다.

HCT116 결장암 세포에서 p53 및 p21^{WAF1/CIP1}의 발현에 미치는 sanguinarine의 영향

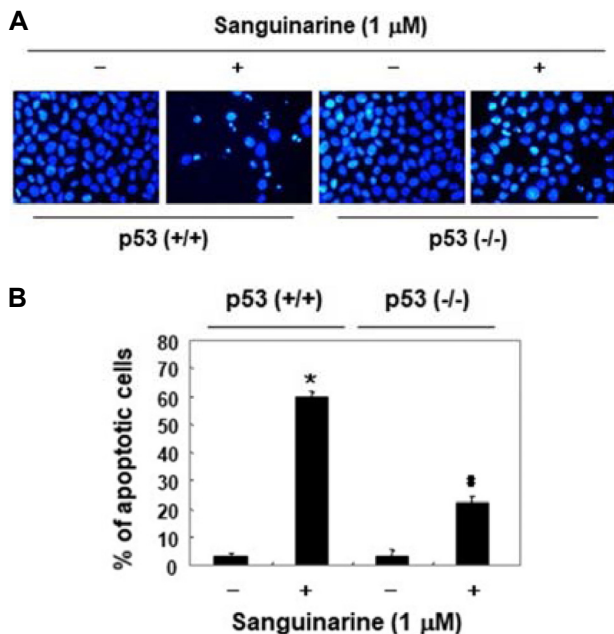


Fig. 2. Comparison of sanguinarine-induced apoptosis between HCT116 cells (p53^{+/+}) and HCT116 p53 null cells (p53^{-/-}). Cells were treated with 1 μ M sanguinarine for 48 hr. (A) The DAPI-stained nuclei were pictured under a fluorescence microscope (original magnification, \times 400). (B) Quantitative results for the number of apoptotic cells per 100 cells in total. Data were expressed as the mean \pm SD of three independent experiments (* p <0.05 compared to control; # p <0.05 compared to p53 (+/+)).

이상의 결과에서 나타난 HCT116 (p53^{+/+}) 세포에서 sanguinarine의 세포독성 증가 현상이 p53의 발현과 관련이 있는지를 조사한 결과, HCT116 (p53^{+/+}) 세포에서 sanguinarine의 처리 시간이 증가할수록 p53의 발현이 점차 증가되었음을 알 수 있었다(Fig. 4A). 그리고 p53 활성화의존적 하위 유전자 중에서 세포의 증식을 억제하는데 관여한 대표적인 유전자인 cyclin-dependent kinase (Cdk) 억제제 p21^{WAF1/CIP1}의 발현도 sanguinarine 처리에 따라 증가되었다. 그러나 이러한 현상은 HCT116 (p53^{-/-}) 세포에서는 관찰되지 않았다(Fig. 4B). 아울러 활성화된 caspase의 기질 단백질로서 세포사멸 유도 마크 단백질인 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)의 단편화 현상 또한 HCT116 (p53^{+/+}) 세포에서만 관찰되었다.

HCT116 결장암 세포에서 ROS의 생성 및 미토콘드리아 기능 손상에 미치는 sanguinarine의 영향

다음은 sanguinarine에 의한 HCT116 결장암 세포의 세포사멸 유도에 ROS의 생성이 관여하는지를 조사하였다. 이를 위하여 sanguinarine이 1시간 처리된 세포를 대상으로 DCF-DA 염색을 수행하였으며, Fig. 5A에 나타난 바와 같이, DCF의 형광 강도가 HCT116 (p53^{-/-}) 세포에 비하여 HCT116

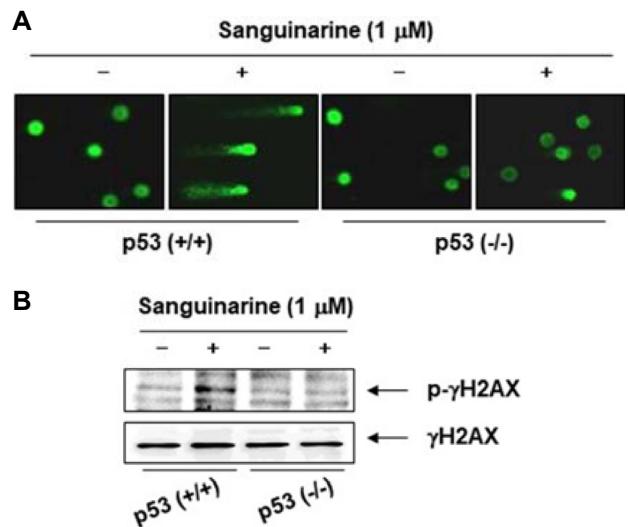


Fig. 3. Comparison of sanguinarine-induced DNA damage between HCT116 cells (p53^{+/+}) and HCT116 p53 null cells (p53^{-/-}). After treatment with 1 μ M sanguinarine for 48 hr, comet assay was performed, and representative images were captured by a fluorescence microscope (original magnification, \times 400). (B) Total cell lysates from two cell lines were prepared, and p- γ H2AX and γ H2AX expressions were identified by Western blot analysis using an ECL detection system. (C) The expression of each protein was indicated as a fold change relative to the control. Quantitative analysis of mean pixel density was performed using the ImageJ® software (* p <0.05 compared to control; # p <0.05 compared to p53 (+/+)).

(p53+/+) 세포에서 강하게 검출되었다. 이러한 ROS의 생성 증가가 미토콘드리아 매개 세포사멸과 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 Bcl-2 family 단백질 중에서 대표적인 세포사멸 억제 및 유도에 관여하는 Bcl-2 및 Bax의 발현을 조사한 결과, HCT116 (p53+/+) 세포에서 sanguinarine 처리에 의하여 Bcl-2의 발현은 감소된 반면, Bax의 발현은 증가되었다(Fig. 5B). 아울러 미토콘드리아의 기능 손상을 대별하는 MMP의 감소가 HCT116 (p53+/+) 세포에서 매우 증가되었다(Fig. 5C). 그러나 Bcl-2 및 Bax의 발현 및 MMP의 값에 대한 sanguinarine의 영향이 HCT116 (p53-/-) 세포에서는 상대적으로 미비하게 나타났다.

HCT116 결장암 세포에서 caspase의 활성화에 미치는 sanguinarine의 영향

Sanguinarine의 처리에 의한 세포사멸 유도에 caspase cascade의 활성이 관여하는지를 조사하기 위하여 3가지 종류의 caspase 발현 및 활성화에 미치는 sanguinarine의 영향을 조사하

였다. Fig. 6A의 결과에서 알 수 있듯이, sanguinarine이 처리된 조건에서 배양된 HCT116 (p53+/+) 세포에서는 조사된 3가지 caspase의 비활성형이 발현이 대조군에 비하여 다소 감소되었으며, 그들의 효소적 활성은 대조군에 비하여 유의적으로 증가되었다(Fig. 6B). 아울러 caspase에 직간접적으로 결합하여 그들의 활성을 저해하는 inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) 중에서 cIAP-1 및 XIAP의 발현이 sanguinarine이 처리된 HCT116 (p53+/+) 세포에서 감소되는 경향성을 보여주었다. 그러나 이러한 변화가 HCT116 (p53-/-) 세포에서는 크게 나타나지 않았다.

고찰

본 연구에서는 sanguinarine의 항암 활성에서 종양억제 유

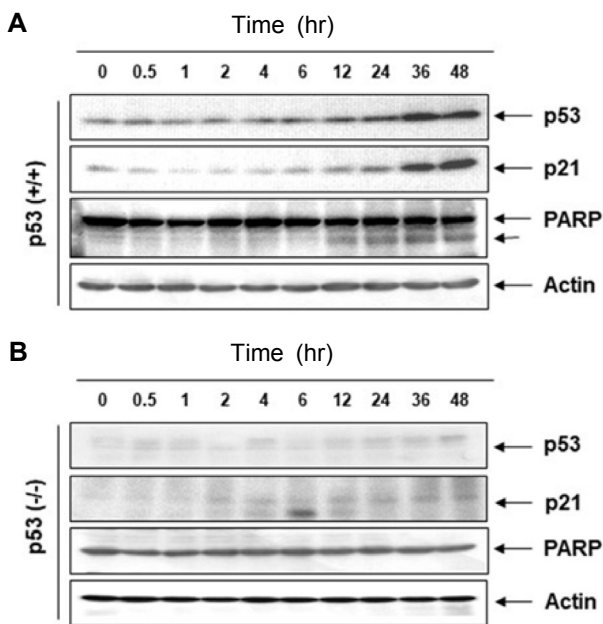


Fig. 4. Effect of sanguinarine on the expression of p53, p21 and PARP in HCT116 cells (p53+/+) and HCT116 p53 null cells (p53-/-). Cells were treated with 1 μM sanguinarine for 48 hr, and then total cell lysates were prepared. (A and C) Western blot analysis in HCT116 cells (p53+/+, A) and HCT116 p53 null cells (p53-/-, C) was then performed using the indicated antibodies and an ECL detection system. Actin was used as an internal control. (B) The expression of each protein in HCT116 cells (p53+/+) was indicated as a fold change relative to the control. Quantitative analysis of mean pixel density was performed using the ImageJ® software (**p*<0.05 compared to control; #*p*<0.05 compared to p53+/+).

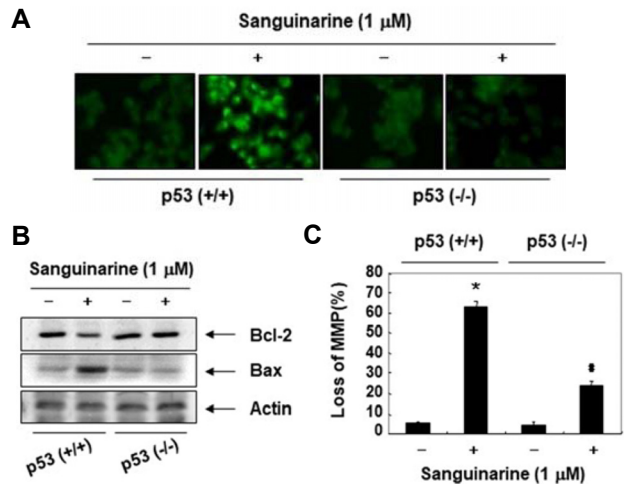


Fig. 5. Effect of sanguinarine on the generation of ROS, expression of Bcl-2 and Bax, and the loss of MMP in HCT116 cells (p53+/+) and HCT116 p53 null cells (p53-/-). Cells were treated with 1 μM sanguinarine for 30 min (A) or 48 hr (B and C). (A) The cells were incubated for 20 min with medium containing DCF-DA. DCF fluorescence images of cells were captured by a fluorescence microscope (original magnification, ×200). Each image is representative of at least three independent experiments. (B) Whole cell lysates of two cell lines were subjected to Western blot analysis against Bcl-2 and Bax, and actin which was used as an internal reference protein for normalization. (C) The expression of each protein was indicated as a fold change relative to the control. Quantitative analysis of mean pixel density was performed using the ImageJ® software (**p*<0.05 compared to control; #*p*<0.05 compared to p53+/+). (D) The cells were stained with JC-1 dye, and were then analyzed by flow cytometry, in order to evaluate the changes in MMP. Each bar represents the percentage of cells with JC-1 monomers (mean ± SD of triplicate determinations, **p*<0.05 compared to control; #*p*<0.05 compared to p53+/+).

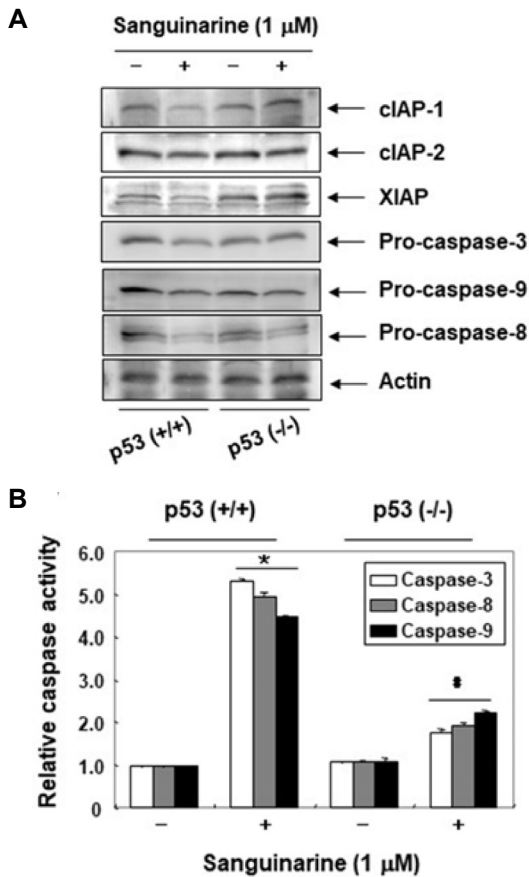


Fig. 6. Comparison of sanguinarine-induced activation of caspases between HCT116 cells (p53+/+) and HCT116 p53 null cells (p53-/-). (A) After treatment with 1 μM sanguinarine for 48 hr, Western blot analysis was performed using the indicated antibodies, and an ECL detection system. Actin was used as an internal control. (B) The expression of each protein was indicated as a fold change relative to the control. Quantitative analysis of mean pixel density was performed using the ImageJ® software (**p*<0.05 compared to control; #*p*<0.05 compared to p53(+/+)). (C) The activities of caspases were evaluated using caspases colorimetric assay kits. The data were expressed as the mean ± SD of three independent experiments (**p*<0.05 compared to control; #*p*<0.05 compared to p53 (+/+)).

전자 p53의 역할을 명확히 규명하기 위하여 정상 p53 유전자를 가진 결장암세포와 p53이 결여된 결장암세포를 대상으로 sanguinarine 처리에 따른 세포 생존율, DNA 손상 및 세포사멸의 유도 현상 등을 비교하였다. MTT 분석의 결과에 의하면 sanguinarine의 처리 시간의 증가에 따라 HCT116 결장암세포의 증식이 유의적으로 감소되었지만, 정상 p53을 가진 HCT116 (p53+/+) 세포가 p53이 결여된 HCT116 (p53-/-) 세포에 비하여 sanguinarine에 대한 감수성이 높았음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 HCT116 결장암세포에서 sanguinarine에 의한 항

암 활성이 p53이 존재하는 세포에서 더 높을 가능성이 보여주는 것이었다. 이미 많은 선행 연구에서 sanguinarine에 의한 암세포의 증식억제는 세포사멸과 밀접한 연관성이 있음이 잘 알려져 있기에, HCT116 결장암세포에서 sanguinarine에 의한 세포사멸이 p53이 존재하는 조건에서 더 많이 유도될 것으로 예측되었기 이를 확인한 결과, HCT116 (p53-/-) 세포보다 HCT116 (p53+/+) 세포에서 세포사멸 유도 빈도가 매우 높게 나타나 MTT 분석의 결과와 잘 일치되었다. 이러한 결과가 비록 부분적으로 선행 결과와 일치되지는 않으나, 최소한 간암세포에서 관찰된 Zhang et al. [55]의 결과와는 매우 유사하였다.

잘 알려진 바와 같이 p53은 항암 활성과 연계하여 DNA 손상 유도에도 매우 중요한 역할을 한다[37, 51]. 특히 유전 독성 스트레스는 p53을 활성화시키는 핵심 신호이며, p53은 낮은 수준의 DNA 손상에도 매우 민감하게 활성화된다[35, 37]. 따라서 돌연변이되거나 p53의 부재 또는 기능을 하지 않는 p53을 가진 암세포는 일반적으로 사용되는 화학요법에 더 저항성을 가지며, 기능적 p53과는 독립적으로 항암활성을 가지는 약물에 대한 감수성이 높아 암치료에 일반적으로 보다 효율적이다[47, 48]. 다발성 골수종세포, 유방암세포, 악성 신경교종세포 및 결장암세포 등을 대상으로 한 선행 연구들에서 sanguinarine에 의한 암세포의 증식억제에 따른 세포사멸 유도에는 DNA 손상이 동반되었다[5, 18, 32]. 비록 어떤 종류의 암세포에서는 sanguinarine에 의한 DNA 손상의 정도가 p53과는 유의적인 차이가 없는 것으로 보고된 바도 있으나[32], Hammerová et al. [18]은 본 연구에서 사용된 p-γH2AX의 발현을 기준으로 다양한 benzophenanthridine alkaloid 계열 물질들이 p53이 정상적으로 기능하지 않는 악성 흑색종세포에서의 세포독성은 정상 세포와 비슷했음을 보고한 바 있다. 즉 본 연구의 결과와 유사하게 정상 p53을 가진 악성 흑색종세포에서 항암 활성이 높게 나타난 것은 DNA 손상의 정도와 연계성이 있음을 의미한다.

Sanguinarine에 의한 HCT116 결장암세포의 세포사멸 유도가 p53의 발현 증가와 연관성이 있는지를 조사한 결과, HCT116 (p53+/+) 세포에서 sanguinarine 처리 시간 의존적으로 p53의 발현이 점차 증가되었으며, 대표적인 p53의 하위 유전자인 p21^{WAF1/CIP1}의 발현 또한 유사하게 증가되었다. 그러나 HCT116 (p53-/-) 세포에서는 p21^{WAF1/CIP1}의 발현이 증가되지 않았으며, 이는 sanguinarine에 의한 p21^{WAF1/CIP1}의 발현 증가가 HCT116 세포에서 p53 의존적임을 의미한다. p21^{WAF1/CIP1}은 Cdk 억제제로서 p53 의존적으로 발현이 증가되는 것으로 처음 보고되었으나, 많은 선행 연구에서 특정 외인성 자극은 p53 비의존적으로 p21^{WAF1/CIP1}의 전사 활성을 촉진시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다[28, 36]. 이러한 p21^{WAF1/CIP1}의 발현 증가는 일련의 세포 내 신호계의 활성 조절을 통하여 궁극적으로 세포주기 정지 또는 세포사멸을 초래할 수 있다[12, 40]. 비록 sanguinarine에 의한 암세포의 세포주기 정지에 p21^{WAF1/CIP1}

의 발현 증가가 관여함이 보고된 바 있으나, 이러한 현상이 p53 의존적이지는 아직까지 확실하지 않다[2, 25]. 그러나 본 연구의 결과는 sanguinarine에 의한 암세포의 증식억제와 동반된 p21^{WAF1/CIP1}의 발현 증가가 최소한 HCT116 결장암세포에서는 p53 의존적인 현상임을 의미한다.

현재까지 sanguinarine 처리에 따른 다양한 암세포의 세포사멸 유도에는 ROS 생성이 핵심적인 인자로 작용하는 것으로 나타났다[15, 17, 27, 55]. ROS는 세포의 정상적인 대사 산물로서 적정 수준에서는 신호 전달 주요 조절자로서 작용한다. 그러나 비정상적으로 높은 수준의 ROS 축적은 산화적 스트레스를 유발하고 궁극적으로 세포사멸 신호 경로를 활성화시킨다[3, 54]. HCT116 결장암세포에서도 sanguinarine에 의한 세포사멸 유도에 ROS 생성이 관여하는지를 조사한 결과, HCT116 (p53^{-/-}) 세포보다 HCT116 (p53^{+/+}) 세포에서 sanguinarine 처리에 따라 ROS 생성이 매우 증가되었다. 비록 현재까지 sanguinarine 처리에 의한 암세포의 사멸 유도에 관여하는 ROS가 p53 의존적이지는 확실하지는 않지만, 본 연구의 결과는 간암세포에서 보고된 Zhang et al. [55]의 결과와 잘 일치된다. 세포 내에서 ROS의 생성은 대부분 미토콘드리아 전자전달계의 기능 결손에 따른 결과이며, 과잉의 ROS는 미토콘드리아의 기능 손상을 촉진하는 가속화시킨다[3, 41]. 현재 미토콘드리아의 기능 손상을 평가하는 가장 보편적인 방법이 MMP의 소실 여부를 측정하는 것이며, 본 연구의 결과에 의하면 sanguinarine은 p53이 정상적인 기능을 하는 HCT116 (p53^{+/+}) 세포에서 MMP의 소실을 유의적으로 증가시켰다. 이러한 결과는 sanguinarine에 의한 p53 의존적 ROS의 생성과 DNA 손상 및 세포사멸이 HCT116 (p53^{-/-}) 세포에 비하여 HCT116 (p53^{+/+}) 세포에서 높게 나타난 결과와 잘 연계된다.

한편 세포사멸 촉진 및 억제 인자로 구성된 Bcl-2 family에 속하는 단백질들은 미토콘드리아를 중심으로 이루어지는 내재적 세포사멸 경로(intrinsic apoptosis pathway)의 조절인자로서 작용한다[11, 24]. 그 중에서 Bax는 대표적인 세포사멸 유도 인자로서 Bcl-2와 같은 세포사멸 억제 인자와 비교하여 상대적으로 발현이 증가하면 미토콘드리아로 이동하여 내재적 세포사멸 개시 핵심 인자인 cytochrome c 방출을 유도하기 위하여 MMP의 소실을 촉진시키며[14, 24], 이 과정에서 p53은 Bax의 활성화에 기여한다[38, 41]. 본 연구의 결과에 의하면, 다양한 암세포를 이용한 선행 연구들의 결과와 유사하게[10, 23, 30, 49, 52, 55], sanguinarine은 HCT116 (p53^{+/+}) 세포에서 Bax의 발현을 증가시킨 반면, Bcl-2의 발현은 감소시켰으며, 이는 MMP의 소실과 연관이 있었다. 그러나 HCT116 (p53^{-/-}) 세포에서는 이러한 변화가 상대적으로 미비하게 관찰되었다. 따라서 활성화형 p53을 가진 HCT116 결장암세포에서 sanguinarine은 미토콘드리아 기능 손상과 연계된 내재적 세포사멸 경로를 더욱 활성화시켰으며, 이 과정에는 p53 의존적 ROS가 중요한 역할을 하고 있음을 유추할 수 있다.

선행 연구들에 의하면 sanguinarine에 의한 암세포의 세포사멸 유도에서 내재적 경로 활성화와 동시에 외재적 세포사멸 경로(extrinsic apoptosis pathway)가 관여할 수 있음을 알 수 있다[10, 20, 27, 30]. 진핵세포의 세포사멸 유도에서 외재적 경로는 세포막에 존재하는 죽음의 수용체(death receptor)에 해당 리간드(death ligand)의 결합에 따른 caspase-8의 활성화에 의하여 개시되며, 이는 caspase-3 및 -7과 같은 effect caspase의 활성을 통하여 PARP을 포함한 다양한 세포 내 기질 단백질의 분해를 유도한다[14, 24]. 반면 미토콘드리아를 중심으로 시작되는 내재적 경로는 미토콘드리아에서 세포질로 유출된 cytochrome c가 caspase-9를 활성화시키며, 이로 인하여 effect caspase의 활성이 촉진되어 세포사멸을 종결하는 공동 경로로 유입된다[11, 24]. 본 연구의 결과에 의하면 sanguinarine은 HCT116 (p53^{+/+}) 세포에서 caspase-8 뿐만 아니라 caspase-9의 활성을 유도하였으며, 아울러 caspase-3의 활성 및 PARP의 단편화를 유도하였다. 또한 caspase의 활성을 억제하는 IAP family에 속하는 단백질들의 발현 또한 감소시켰다. 따라서 활성화형 p53을 가진 HCT116 결장암세포에서 sanguinarine에 의한 세포사멸에는 내재적 경로와 외재적 경로의 활성이 동시에 관여하고 있음을 알 수 있다. 한편, Zhang et al. [55]은 sanguinarine에 의한 간암세포의 증식억제에 따른 세포주기 정지 및 세포사멸 유도에는 p53 의존적 ROS 생성이 관여함을 보고한 바 있다. 아울러 sanguinarine에 의한 인간 구강 편평 세포암종의 세포사멸에는 caspase 의존적 내재적 및 외재적 경로의 활성화가 관여하고 있었으며[30], 방광암, 결장암 및 유방암세포에서도 ROS 의존적으로 세포사멸을 유도하였다[10, 20, 22]. 그러나 sanguinarine에 의한 이 과정이 p53이 관여된 ROS 의존적인 현상인지에 대한 구체적인 연구와 ROS의 생성에 세포 내 어떤 소기관이 직접 관여하는지에 대한 추가적인 연구가 수행되어야 할 것이다.

결론적으로, 본 연구의 결과에 의하면 sanguinarine은 활성화형 p53을 가진 HCT116 (p53^{+/+}) 결장암세포에서 항암 활성이 유의적으로 높게 나타났다. Sanguinarine의 항암 활성은 세포사멸 유도 및 밀접한 연관성이 있었으며, 내재적 및 외재적 경로가 동시에 관여하였을 것으로 추정된다. 또한 sanguinarine에 의한 세포사멸 유도 과정에는 p53 및 p21^{WAF1/CIP1}의 발현 증가와 DNA 손상이 매개되었으며, 이는 ROS의 생성 증가와 연관성이 있었다. 현재까지 sanguinarine의 항암 활성과 연관된 암세포의 세포사멸 유도 현상이 p53 또는 ROS 의존적인 현상인지는 명확하지 않다. 비록 본 연구의 결과에서 sanguinarine에 의한 HCT116 결장암세포의 세포사멸 유도가 p53 의존적으로 높게 나타났으며, 이 과정에서 ROS의 생성 증가가 동반됨을 확인하였지만, 이러한 현상이 HCT116 결장암세포 특이적인 현상인지는 향후 추가 연구를 통하여 확인해야 할 과제이다.

감사의 글

이 논문은 2020학년도 동의대학교 연구년 지원에 의하여 연구되었음.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Adhami, V. M., Aziz, M. H., Mukhtar, H. and Ahmad, N. 2003. Activation of prodeath Bcl-2 family proteins and mitochondrial apoptosis pathway by sanguinarine in immortalized human HaCaT keratinocytes. *Clin. Cancer Res.* **9**, 3176-3182.
- Adhami, V. M., Aziz, M. H., Reagan-Shaw, S. R., Nihal, M., Mukhtar, H. and Ahmad, N. 2004. Sanguinarine causes cell cycle blockade and apoptosis of human prostate carcinoma cells *via* modulation of cyclin kinase inhibitor-cyclin-cyclin-dependent kinase machinery. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 933-940.
- Aggarwal, V., Tuli, H. S., Varol, A., Thakral, F., Yerer, M. B., Sak, K., Varol, M., Jain, A., Khan, M. A. and Sethi, G. 2019. Role of reactive oxygen species in cancer progression: Molecular mechanisms and recent advancements. *Biomolecules* **9**, 735.
- Ahsan, H., Reagan-Shaw, S., Breur, J. and Ahmad, N. 2007. Sanguinarine induces apoptosis of human pancreatic carcinoma AsPC-1 and BxPC-3 cells *via* modulations in Bcl-2 family proteins. *Cancer Lett.* **249**, 198-208.
- Almeida, I. V., Fernandes, L. M., Biazi, B. I. and Vicentini, V. E. P. 2017. Evaluation of the anticancer activities of the plant alkaloids sanguinarine and chelerythrine in human breast adenocarcinoma cells. *Anticancer Agents Med. Chem.* **17**, 1586-1592.
- Aristizabal-Pachon, A. F. and Castillo, W. O. 2019. Genotoxic evaluation of occupational exposure to antineoplastic drugs. *Toxicol. Res.* **36**, 29-36.
- Basu, P. and Kumar, G. S. 2016. Sanguinarine and its role in chronic diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **928**, 155-172.
- Beckta, J. M., Ahmad, S. F., Yang, H. and Valerie, K. 2014. Revisiting p53 for cancer-specific chemo- and radiotherapy: Ten years after. *Cell Cycle* **13**, 710-713.
- Chen, J. 2016. The cell-cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, 026104.
- Choi, W. Y., Kim, G. Y., Lee, W. H. and Choi, Y. H. 2008. Sanguinarine, a benzophenanthridine alkaloid, induces apoptosis in MDA-MB-231 human breast carcinoma cells through a reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Chemotherapy* **54**, 279-287.
- Dorstyn, L., Akey, C. W. and Kumar, S. 2018. New insights into apoptosome structure and function. *Cell Death Differ.* **25**, 1194-1208.
- Engeland, K. 2018. Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM. *Cell Death Differ.* **25**, 114-132.
- Fu, C., Guan, G. and Wang, H. 2018. The anticancer effect of sanguinarine: A review. *Curr. Pharm. Des.* **24**, 2760-2764.
- Fulda, S. and Debatin, K. M. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**, 4798-4811.
- Galadari, S., Rahman, A., Pallichankandy, S. and Thayyullathil, F. 2017. Molecular targets and anticancer potential of sanguinarine-a benzophenanthridine alkaloid. *Phytomedicine* **34**, 143-153.
- Gaziano, R., Moroni, G., Buè, C., Miele, M. T., Sinibaldi-Vallebona, P. and Pica, F. 2016. Antitumor effects of the benzophenanthridine alkaloid sanguinarine: Evidence and perspectives. *World J. Gastrointest. Oncol.* **8**, 30-39.
- Gong, X., Chen, Z., Han, Q., Chen, C., Jing, L., Liu, Y., Zhao, L., Yao, X. and Sun, X. 2018. Sanguinarine triggers intrinsic apoptosis to suppress colorectal cancer growth through dissociation between STRAP and MELK. *BMC Cancer* **18**, 578.
- Hammerová, J., Uldrijan, S., Táborská, E. and Slaninová, I. 2011. Benzo[c]phenanthridine alkaloids exhibit strong anti-proliferative activity in malignant melanoma cells regardless of their p53 status. *J. Dermatol. Sci.* **62**, 22-35.
- Hamoud, R., Reichling, J. and Wink, M. 2014. Synergistic antimicrobial activity of combinations of sanguinarine and EDTA with vancomycin against multidrug resistant bacteria. *Drug Metab. Lett.* **8**, 119-128.
- Han, M. H., Kim, G. Y., Yoo, Y. H. and Choi, Y. H. 2013. Sanguinarine induces apoptosis in human colorectal cancer HCT-116 cells through ROS-mediated Egr-1 activation and mitochondrial dysfunction. *Toxicol Lett.* **220**, 157-166.
- Han, M. H., Kim, S. O., Kim, G. Y., Kwon, T. K., Choi, B. T., Lee, W. H. and Choi, Y. H. 2007. Induction of apoptosis by sanguinarine in C6 rat glioblastoma cells is associated with the modulation of the Bcl-2 family and activation of caspases through downregulation of extracellular signal-regulated kinase and Akt. *Anticancer Drugs* **18**, 913-921.
- Han, M. H., Park, C., Jin, C. Y., Kim, G. Y., Chang, Y. C., Moon, S. K., Kim, W. J. and Choi, Y. H. 2013. Apoptosis induction of human bladder cancer cells by sanguinarine through reactive oxygen species-mediated up-regulation of early growth response gene-1. *PLoS One* **8**, e63425.
- Han, M. H., Yoo, Y. H. and Choi, Y. H. 2008. Sanguinarine-induced apoptosis in human leukemia U937 cells *via* Bcl-2 downregulation and caspase-3 activation. *Chemotherapy* **54**, 157-165.
- Hata, A. N., Engelman, J. A. and Faber, A. C. 2015. The BCL2 family: Key mediators of the apoptotic response to targeted anticancer therapeutics. *Cancer Discov.* **5**, 475-487.
- Holy, J., Lamont, G. and Perkins, E. 2006. Disruption of nucleocytoplasmic trafficking of cyclin D1 and topoisomerase II by sanguinarine. *BMC Cell Biol.* **7**, 13.
- Hussain, A. R., Al-Jomah, N. A., Siraj, A. K., Manogaran, P., Al-Hussein, K., Abubaker, J., Plataniyas, L. C., Al-Kuraya,

- K. S. and Uddin, S. 2007. Sanguinarine-dependent induction of apoptosis in primary effusion lymphoma cells. *Cancer Res.* **67**, 3888-3897.
27. Khan, A. Q., Mohamed, E. A. N., Hakeem, I., Nazeer, A., Kuttikrishnan, S., Prabhu, K. S., Siveen, K. S., Nawaz, Z., Ahmad, A., Zayed, H. and Uddin, S. 2020. Sanguinarine induces apoptosis in papillary thyroid cancer cells *via* generation of reactive oxygen species. *Molecules* **25**, 1229.
 28. Kreis, N. N., Louwen, F. and Yuan, J. 2019. The multifaceted p21 (Cip1/Waf1/CDKN1A) in cell differentiation, migration and cancer therapy. *Cancers (Basel)* **11**, 1220.
 29. Kuttikrishnan, S., Siveen, K. S., Prabhu, K. S., Khan, A. Q., Akhtar, S., Mateo, J. M., Merhi, M., Taha, R., Omri, H. E., Mraiche, F., Dermime, S. and Uddin, S. 2019. Sanguinarine suppresses growth and induces apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Lymphoma* **60**, 782-794.
 30. Lee, T. K., Park, C., Jeong, S. J., Jeong, M. J., Kim, G. Y., Kim, W. J. and Choi, Y. H. 2016. Sanguinarine induces apoptosis of human oral squamous cell carcinoma KB cells *via* inactivation of the PI3K/Akt signaling pathway. *Drug Dev. Res.* **77**, 227-240.
 31. Malíková, J., Zdarilová, A., Hlobilková, A. and Ulrichová, J. 2006. The effect of chelerythrine on cell growth, apoptosis, and cell cycle in human normal and cancer cells in comparison with sanguinarine. *Cell. Biol. Toxicol.* **22**, 439-453.
 32. Matkar, S. S., Wrischnik, L. A. and Hellmann-Blumberg, U. 2008. Sanguinarine causes DNA damage and p53-independent cell death in human colon cancer cell lines. *Chem. Biol. Interact.* **172**, 63-71.
 33. Mishra, B. B. and Tiwari, V. K. 2011. Natural products: an evolving role in future drug discovery. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 4769-4807.
 34. Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E. and Capaccioli, S. 2009. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol. Res.* **59**, 365-378.
 35. Ou, H. L. and Schumacher, B. 2018. DNA damage responses and p53 in the aging process. *Blood* **131**, 488-495.
 36. Parveen, A., Akash, M. S., Rehman, K. and Kyunn, W. W. 2016. Dual role of p21 in the progression of cancer and its treatment. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **26**, 49-62.
 37. Pitolli, C., Wang, Y., Candi, E., Shi, Y., Melino, G. and Amelio, I. 2019. p53-mediated tumor suppression: DNA-damage response and alternative mechanisms. *Cancers (Basel)* **11**, 1983.
 38. Schuler, M. and Green, D. R. 2001. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 684-688.
 39. Serafim, T. L., Matos, J. A., Sardão, V. A., Pereira, G. C., Branco, A. F., Pereira, S. L., Parke, D., Perkins, E. L., Moreno, A. J., Holy, J. and Oliveira, P. J. 2008. Sanguinarine cytotoxicity on mouse melanoma K1735-M2 cells--nuclear vs. mitochondrial effects. *Biochem. Pharmacol.* **76**, 1459-1475.
 40. Shamloo, B. and Usluer, S. 2019. p21 in cancer research. *Cancers (Basel)* **11**, 1178.
 41. Shen, Y. and White, E. 2001. p53-dependent apoptosis pathways. *Adv. Cancer Res.* **82**, 55-84.
 42. Singh, R., Mackraj, I., Naidoo, R. and Gathiram, P. 2006. Sanguinarine downregulates AT1a gene expression in a hypertensive rat model. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **48**, 14-21.
 43. Speidel, D. 2015. The role of DNA damage responses in p53 biology. *Arch. Toxicol.* **89**, 501-517.
 44. Sullivan, A. and Lu, X. 2007. ASPP: a new family of oncogenes and tumour suppressor genes. *Br. J. Cancer* **96**, 196-200.
 45. Takayama, T., Miyanishi, K., Hayashi, T., Sato, Y. and Niitsu, Y. 2006. Colorectal cancer: Genetics of development and metastasis. *J. Gastroenterol.* **41**, 185-192.
 46. Tokino, T. and Nakamura, Y. 2000. The role of p53-target genes in human cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **33**, 1-6.
 47. Toledo, F. and Wahl, G. M. 2006. Regulating the p53 pathway: *in vitro* hypotheses, *in vivo* veritas. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 909-923.
 48. Vousden, K. H. and Lane, D. P. 2007. p53 in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 275-283.
 49. Xu, J. Y., Meng, Q. H., Chong, Y., Jiao, Y., Zhao, L., Rosen, E. M. and Fan, S. 2012. Sanguinarine inhibits growth of human cervical cancer cells through the induction of apoptosis. *Oncol. Rep.* **28**, 2264-2270.
 50. Yang, B., Eshleman, J. R., Berger, N. A. and Markowitz, S. D. 1996. Wild-type p53 protein potentiates cytotoxicity of therapeutic agents in human colon cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **2**, 1649-1657.
 51. Yogosawa, S. and Yoshida, K. 2018. Tumor suppressive role for kinases phosphorylating p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Sci.* **109**, 3376-3382.
 52. Zhang, R., Wang, G., Zhang, P. F., Zhang, J., Huang, Y. X., Lu, Y. M., Da, W., Sun, Q. and Zhu, J. S. 2017. Sanguinarine inhibits growth and invasion of gastric cancer cells *via* regulation of the DUSP4/ERK pathway. *J. Cell. Mol. Med.* **21**, 1117-1127.
 53. Zhang, S., Leng, T., Zhang, Q., Zhao, Q., Nie, X. and Yang, L. 2018. Sanguinarine inhibits epithelial ovarian cancer development *via* regulating long non-coding RNA CASC2-EIF4A3 axis and/or inhibiting NF- κ B signaling or PI3K/AKT/mTOR pathway. *Biomed. Pharmacother.* **102**, 302-308.
 54. Zhang, Z. J., Wang, K. P., Mo, J. G., Xiong, L. and Wen, Y. 2020. Photodynamic therapy regulates fate of cancer stem cells through reactive oxygen species. *World J. Stem Cells* **12**, 562-584.
 55. Zhang, B., Wang, X., Deng, J., Zheng, H., Liu, W., Chen, S., Tian, J. and Wang, F. 2019. p53-dependent upregulation of miR-16-2 by sanguinarine induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* **459**, 50-58.

초록 : 결장암세포에서 sanguinarine에 의한 종양억제 유전자 p53 의존적 apoptosis 유도

최영현^{1,2*}

(¹동의대학교 한의과대학 생화학교실, ²동의대학교 항노화연구소)

천연 benzophenanthridine alkaloid의 일종인 sanguinarine에 의한 인간 암세포에서의 세포사멸 유도는 암 치료를 위한 잠재적 치료 가능성으로 여겨져 왔으나 기본적인 항암 기전은 여전히 불분명하다. 종양 억제제 p53의 결실 또는 돌연변이는 결장암세포의 항암제 내성에 대한 주요 원인으로 작용한다. 따라서, 본 연구에서는 정상 p53을 가진 HCT116 (p53+/+) 및 p53이 결여된 HCT116 (p53-/-) 결장암세포를 대상으로 sanguinarine에 의해 유도되는 세포사멸에서 p53의 역할을 조사하였다. 본 연구의 결과에 의하면, sanguinarine은 HCT116 (p53-/-) 세포에 비하여 HCT116 (p53+/+) 세포의 생존력을 현저히 감소시켰다. 아울러 sanguinarine은 HCT116 (p53-/-) 세포보다 HCT116 (p53+/+) 세포에서 p53 및 cyclin-dependent kinase 억제제 p21^{WAF1/CIP1}의 발현을 증가시키면서 DNA 손상 및 세포사멸의 유도를 증가시켰다. Sanguinarine은 HCT116 (p53+/+) 세포에서 외인성 및 내인성 세포사멸의 개시에 관여하는 caspase-8 및 caspase-9의 활성을 증가시켰으며, 전형적인 효과기 caspase인 caspase-3을 활성화시켰다. 또한, sanguinarine은 HCT116 (p53+/+) 세포에서 Bax/Bcl-2의 발현 비율을 증가시키고 미토콘드리아 손상을 유발하였지만, HCT116 (p53-/-) 세포에서는 이러한 현상이 관찰되지 않았다. 결론적으로 본 연구의 결과는 sanguinarine은 HCT116 결장암세포에서 p53 의존적으로 외인성 및 내인성 세포사멸의 경로 활성을 통하여 세포사멸을 유도하였음을 의미한다.