

Jurkat T 임파구의 세포주기 기전에 미치는 저근백피 (*Ailanthus altissima*)의 효과

황상구 · 이형철 · 김춘관 · 김대근 · 이기욱* · 윤용갑* · 전병훈#
원광대학교 한의과대학 병리학교실, *원광대학교 한의과대학 방제학교실
(Received December 18, 2001; Revised January 29, 2001)

Effect of *Ailanthus altissima* Water Extract on Cell Cycle Control Genes in Jurkat T Lymphocytes

Sang-Gu Hwang, Hyung Chul Lee, Chun Kwan Kim, Dae Geun Kim,
Gi Oug Lee*, Young Gab Yun* and Byung Hun Jeon#

Department of Pathology, and *Department of Oriental Prescription, College of Oriental Medicine,
Wonkwang University, Iksan, Chonbuk 570-749, Korea

Abstract — *Ailanthus altissima* has been used to settle an upset stomach, to alleviate a fever, and as an insecticide. We reported that the water extract of *A. altissima* induced apoptotic cell death in Jurkat T-acute lymphoblastic leukemia cells. Here, we showed the dose-dependent inhibitions of cell viability by the extract, as measured by cell morphology. The cell cycle control genes are considered to play important roles in tumorigenesis. The purpose of the present study is also to investigate the effect of *A. altissima* on cell cycle progression and its molecular mechanism in the cells. The level of p21 protein was increased after treatment of the extract, whereas both Bcl-2 and Bax protein levels were not changed. These results suggest that *A. altissima* induces apoptotic cell death via p21-dependent signaling pathway in Jurkat cells which delete wild type p53. G1 checkpoint related gene products tested (cyclin D3, cyclin dependent kinase 4, retinoblastoma, E2F1) were decreased in their protein levels in a dose-dependent manner after treatment of the extract. Taken together, these results indicate that the increase of apoptotic cell death by *A. altissima* may be due to the inhibition of cell cycle in Jurkat cells.

Keywords □ *Ailanthus altissima*, water extract, apoptosis, cell cycle, G1 checkpoint, Jurkat T-ALL cells

저근백피는 소태나무과(Simaroubaceae)에 속하는 낙엽교목인 가중나무(혹은 가죽나무, *Ailanthus altissima* Swingle) 및 동속의 근연식물의 주피를 제거한 수피와 근피를 건조한 것으로서,¹⁾ 다른 약명으로는 화피, 풍안초로 불리운다. 중국원산으로 우리나라에 들여와 전국 각지의 해발 100~400 m 지역 촌락부근에 심고 있는 귀화식물로서 민간 및 한방에서는 이질과 대하증, 치질, 고초열, 설사를 멈추게 하는 지사제, 살충제 등의 목적으로 사용된다.²⁾ 저근백피의 성분에 대해서는 수피, 종자, 잎으로부터 merosin, ailanthone, amarolide, quassin, ailantholide, chaparrinone, shinjuglycoside 등이 분리, 보고되었다.³⁾ 이들 성분의 생리활성에 관한 연구로는 tar의 항균작용,⁴⁾ glaucarubinone과

ailanthone 등의 항아메바작용 및 항말라리아 작용,³⁾ 메탄올추출물의 간기능에 관한 것⁵⁾들이 있으나 항암활성 및 그 신호기전에 관한 연구는 아직까지 보고된 바 없다.

T 임파구는 면역반응의 기전에 중요한 역할을 수행하며, 이들 기능의 영향은 lymphokines로 알려진 성장인자들의 분비에 의해서 주로 중재되어 진다. 또한 성장인자는 세포막의 수용체를 자극하여 세포 내 신호전달 체계를 활성화시키며, 이를 통해 핵 내에서 DNA가 복제되어 G2/M기를 거쳐 새로운 G1기로 접어들어 다음 번 세포분열을 위한 신호를 기다리게 된다.⁶⁾ 이러한 세포분열을 위한 신호전달 cascade는 최소한 100여 개의 유전자 발현을 통하여 G1기 활성을 유도하는 것으로 알려져 있다. 그 중 가장 중심이 되는 신호전달 체계는 G1기 초기에 성장인자 ras의 영향을 받아 D-type cyclins의 발현이 증가되어 cyclin dependent kinase4(CDK4)와 CDK6를 활성화시키는 경로이다. 이는 cyclin D와 CDKs의 결합을 통하여 이루어지며, 활성화된

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 063-850-6835 (팩스) 063-850-6843
(E-mail) omdjhb@wonkwang.ac.kr

cyclin D/CDK4 또는 CDK6 복합체는 retinoblastoma(RB)단백질을 인산화시킨다.⁷⁾ RB는 자체의 인산화에 따라 전사조절인자인 E2F family와의 결합을 통해 E2F 인자들의 활성을 조절하는 중앙억제인자이다. 최근의 연구에 의하면 인산화가 이루어지지 않은 RB는 히스톤 디아세틸아제(HDAC) 1과 복합체를 이루고 있기 때문에 염색질의 구조적인 변형이 유도되어 전사작용을 억제한다는 것이 밝혀졌다.^{8,9)} 반면에 cyclin D 복합체에 의해 RB가 인산화되면 복합체를 형성하고 있는 E2F를 유리시키며, 유리된 E2F 전사인자는 DNA합성과 연관된 많은 유전자들의 발현을 촉진시키게 된다. 이러한 세포주기 조절인자들의 기능에 불균형이 초래된다면 과도한 세포분열이 초래되어 암화과정에 접어들기도 한다.¹⁰⁾ 이외에도 현재까지 알려진 암화과정의 원인인 자로는 세포 외부의 과도한 mitogen의 작용, 세포 내 암 유전자들의 비정상적 활성에 의한 과도한 신호전달, 혹은 중앙바이러스의 감염에 의한 암 단백질들의 작용 등이 있기도 하다.¹¹⁾

이와 같이 세포주기 조절과 암 발생과는 밀접한 관계가 있을 것으로 생각되며, 그 기전을 더욱 깊이 설명하기 위해서는 암세포와 정상세포 사이에서 세포주기 조절이 어떻게 변화되어 있는지를 분자생물학적 및 세포생물학적 수준에서 연구함이 필수적이다.¹²⁾ DNA 손상에 의하여 R-point 또는 Start에서 세포주기가 멈춰지는 현상을 checkpoint라고 하며, 이러한 checkpoint는 세포주기를 정지시켜 세포들이 S기나 유사분열로 들어가기 전에 DNA 수선에 필요한 시간을 확보함으로써 돌연변이를 막는데 필수적인 역할을 한다. 그러므로 세포주기 중 G1 checkpoint와 관련된 유전자들의 변화양상을 조사해보면 세포고사 유도하는 신호기전을 규명할 수 있을 것이다. 본 저자들은 저근백피의 물추출물이 백혈병세포주인 Jurkat T 세포에 대한 apoptosis 유도 효과가 있는지를 이미 알아보았으므로, 본 연구에서는 그 세포사멸의 신호기전을 p53관련 유전자와 세포주기 관련 유전자들의 변화를 통하여 살펴보았다.

실험방법

시료의 제조

저근백피 200 g을 등근 플라스크에 넣고 증류수 2,000 ml을 넣은 후 3시간 동안 가열, 추출하고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 다음 상층액을 3M 여과지로 3회 여과하였다. 이 여과액은 rotary vacuum evaporator에서 감압, 농축하였다. 농축된 용액을 -70°C deep freezer에서 12시간 동안 방치하고, 30시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하여 10%의 수율인 20.3 g의 분말을 얻었다.

세포 배양

사람 T 세포성 유래의 급성 림프성백혈병 세포주인 Jurkat은

미국 세포주 은행인 The American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)로부터 분양 받아, 실험실에서 37°C와 5% CO₂ 공급 조건을 갖춘 Sanyo회사 배양기에서 배양하였다. 부유성 세포인 Jurkat의 배양액은 L-glutamine이 포함된 RPMI 1640 배지에 56°C 수조에서 30분간 가온하여 불활성화시킨 fetal bovine serum(FBS)을 10% 포함하고, 1% 항생제(100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin)와 배지 1 L당 NaHCO₃ 2 g을 첨가하여 제조하였다.

세포사멸 유도

세포들은 plastic culture dish에서 배양되었고, 4×10⁵ cells/ml 정도의 세포 수를 가진 배양 배지에 저근백피 추출물을 처리하였다. 즉, Jurkat 세포들은 여러 농도(20, 40, 60, 80, 100 µg/ml)의 추출물로 24시간 동안 처리되었으며, 저근백피 분말은 4°C에 보관되었고 사용 직전에 필요한 농도로 제조하여 사용하였다.

항체

Polyclonal anti-CDK4, polyclonal anti-RB, polyclonal anti-Bcl-2, monoclonal anti-Bax, monoclonal anti-E2F1, monoclonal anti-cyclin D3 항체들은 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)회사로부터 구입하였다. Monoclonal anti-p21 항체는 PharMingen 회사로부터 구입하였고, 이차 항체인 Peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin와 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin은 Amersham Life Sciences (Cleveland, OH, USA) 회사로부터 구입하였다.

세포 형태학적인 변화

세포 증식에 대한 저근백피의 영향을 알아보기 위하여 6-well plate에 각 well 당 5×10⁵개씩의 세포를 넣고 24시간 경과 후 저근백피의 추출물을 20, 60, 및 100 µg/ml 농도별로 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후 위상차 현미경(Diaphot 300, Nikon, Japan)을 이용하여 100배율하에서 대조군과 실험군의 형태학적 변화를 관찰하였다.

Western Blot Analysis

실험에 이용된 세포를 15 ml tube에 모은 후, 냉장 보관하였던 phosphate-buffered saline(PBS)로 2~3번 씻고 2000 rpm에서 원심분리하였다. 상등액을 없앤 후 cell pellet에 EBC lysis buffer(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 120 mM sodium chloride, 0.5% Nonidet P-40)를 넣고 20분간 얼음 위에 놓아두면서 5분마다 교반 하였다. Lysates는 13,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하였고, 상등액은 실험을 위하여 다른 tube에 옮겼다. 단백질 농도는 Bradford 측정법(Bio-Rad)에 의하여 측정하였으며, 표준 단백질로 bovin serum albumin(BSA)을 이용하였다. 각 실험군

마다 동일량의 단백질이 sodium dodecyl sulphate(SDS)-polyacrylamide gel 전기영동장치를 이용하여 분리되었으며, 젤상에 있는 모든 단백질은 nitrocellulose membrane(Membond C, Amersham Corp.)으로 옮겨졌다. Membrane들은 0.5% Tween-20을 포함한 Tris-NaCl-Tween 20(TNT) buffer를 이용하여 만들어진 5% nonfat milk 용액에 넣어서 선처리하였다. Bcl-2, cyclin D3, RB, CDK4, E2F1, p21 및 Bax 일차 항체들을 nonfat milk 용액에 1 µg/ml 농도로 만든 후 1시간 동안 실온에서 membrane을 반응시켰다. 반응 후 membranes들은 TNT buffer로 10분 동안 3번씩 씻었고 이차 항체로 다시 1시간 동안 실온에서 membrane을 배양하였다. Membranes을 TNT buffer로 다시 세척한 후 enhanced chemiluminescence reagent(Amersham)를 이용하여 2분간 반응시킨 후, X-ray 필름을 이용하여 그 강도를 확인하였다.

실험결과

저근백피 물 추출물에 의한 백혈병세포주 Jurkat의 세포사멸 유도

사람의 급성림프성백혈병 세포주인 Jurkat의 세포사멸에 대한 저근백피 물 추출물의 효과를 알아보기 위하여 추출액을 20, 60 및 100 µg/ml 농도로 증가시키면서 세포 배양배지에 처리하여 24시간 동안 세포를 배양하였다. 위상차현미경을 통하여 저근백피에 노출된 세포들의 외부 형태적인 특징을 관찰한 결과 세포막 외부 융기의 돌출현상을 볼 수 있었다(Fig. 1). 저근백피는 농도 의존별로 세포의 생존율을 급격히 감소시키면서 세포사멸을 점점 증가시켰다.

저근백피로 유도한 Jurkat 세포의 세포사멸(apoptosis) 동안 p53관련 유전자들의 단백질 발현수준의 변화

p21(Waf1)은 cyclin-CDK 복합체에 결합하여 이들 복합체의 활동을 억제함으로써 세포주기를 정지시키거나 혹은 세포주기의

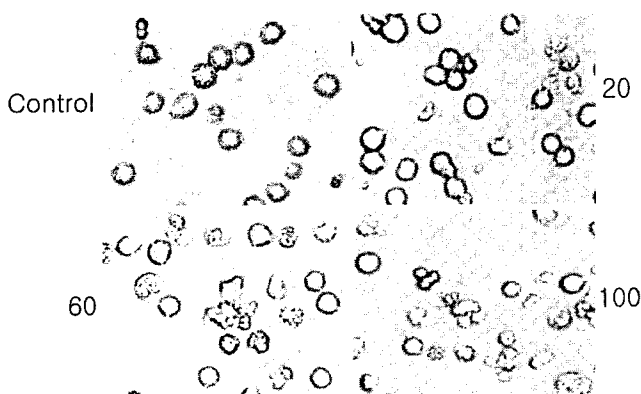


Fig. 1 - Morphology of control and extract-treated Jurkat cells by inverted microscope. Cells were incubated for 24 h at 37°C with the 20, 60, and 100 µg/ml of the extract.

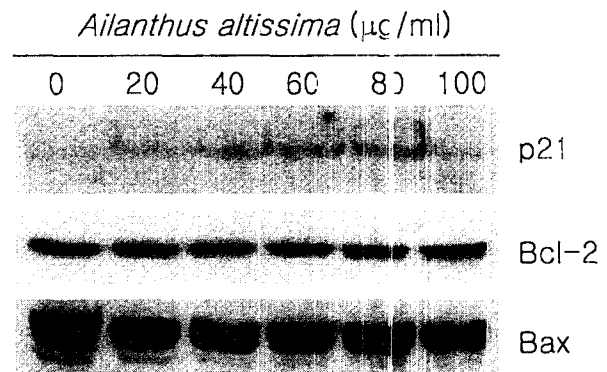


Fig. 2 - Expression levels of p21, Bcl-2, and Bax proteins during apoptosis induced by the extract from *A. altissima* in Jurkat cells. Cells were incubated for 24 h at 37°C with the 20, 40, 60, 80, and 100 µg/ml of the extract. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on 12.5% SDS-PAGE gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and the blots were probed for p21, Bcl-2, or Bax.

진행을 방해하여 결국에는 세포의 사멸을 초래한다.¹³⁾ 이러한 p21 단백질은 암 억제 유전자인 p53에 의해 전사적으로 상승 조절되어 G1기에 발현양이 증가하기도 하며, 다른 여러 가지 신호에 의해서도 발현양이 증가하기도 한다. 본 실험에서는 저근백피에 의해 유도되는 Jurkat 세포고사가 p21과 관련이 있는지를 알아보려고 하였다. 저근백피 추출물을 20, 40, 60, 80 및 100 µg/ml 농도로 증가시키면서 세포 배양배지에 처리하여 24시간 동안 세포를 배양하였다. 그 후 p21의 단백질 발현수준을 확인하기 위하여 Western blot analysis를 실시한 결과, 처리 농도가 높으면 높을수록 그 발현수준이 증가하다가 100 µg/ml 농도에서는 그 증가폭이 줄어들기 시작하였다(Fig. 2). Bcl-2는 다양한 자극으로 유발되는 세포사멸을 억제시키는 유전자로 알려져 있고, Bax는 IL-3 의존성 세포에서 cytokine 결핍에 의해서 유도되어 세포사멸을 촉진시키므로 Bcl-2 유전자와는 상반되는 역할을 한다.¹⁴⁾ 이러한 신호 기전은 세포사멸이 진행되는 세포들에서 p53과 관련되어 있음을 보여주었다.¹⁵⁾ 본 실험은 wild type-p53가 결핍된 Jurkat 세포들이 저근백피에 노출되어 세포사멸을 일으킬 때 Bcl-2 및 Bax들의 관련성이 있는지를 알아보려고 하였다. Fig. 2에서 보여지듯이, 대조군과 비교하여 저근백피를 처리한 실험군들의 Bcl-2 및 Bax 단백질 발현정도는 상호간에 차이점을 발견할 수 없었다. 이상의 결과는 저근백피 추출물이 Jurkat 세포고사를 유도하는데 p21과는 관련이 있지만 Bcl-2와 Bax와는 관련성이 없는 것을 보여준다.

저근백피로 유도한 Jurkat 세포의 세포사멸(apoptosis) 동안 Cyclin D3 및 CDK4 단백질들의 발현수준의 변화

Cyclin D는 CDK4 또는 CDK6와 결합하여 세포주기 중에서

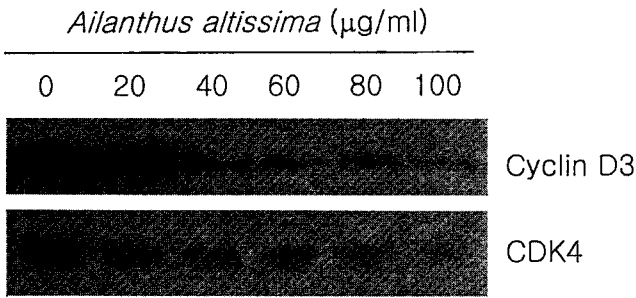


Fig. 3 – Decreases of cyclin D3 and CDK4 protein levels during apoptosis induced by the extract from *A. altissima* in Jurkat T cells. Cells were incubated for 24 h at 37°C with the 20, 40, 60, 80, and 100 µg/ml of the extract. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on a 11% SDS-PAGE gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and the blots were probed for cyclin D3 or CDK4.

도 G1 checkpoint 단계에서 S기로 전이되는데 중요한 역할을 하므로 이들 단백질 발현수준을 알아보기 위하여 추출물의 농도를 20, 40, 60, 80 및 100 µg/ml로 증가시키면서 세포 배양매지에 처리하여 24시간 동안 세포를 배양하였다. Western blot analysis의 결과 cyclin D3의 발현수준은 저근백피의 처리 농도에 의존하여 점점 줄어드는 현상을 보여 주었다. 20 µg/ml 농도로 처리하였을 때 단백질의 발현수준이 대조군에 비교하여 차이점이 적었으나 40 µg/ml 농도 이상을 처리하였을 때는 대조군에 비해 현격한 차이점을 보였다(Fig. 3). CDK4는 D-type cyclin들과 복합체를 형성하여 세포주기의 G1기 동안에 세포 성장을 조절한다.¹⁶⁾ 저근백피 처리 후 Jurkat 세포에서 CDK4의 단백질 변화를 조사해 본 결과, 처리 농도가 높으면 높을수록 단백질 발현수준은 감소하는 것을 보여주었다(Fig. 3). 이러한 결과에서 저근백피 추출물이 Jurkat 세포의 세포고사를 촉진시키는 작용은 cyclin D3와 CDK4 단백질 발현을 억제시킴으로써 복합체 형성을 억제하여 세포주기를 원활히 조절하지 못하여 이루어진다는 것을 보여준다.

저근백피로 유도한 Jurkat 세포의 세포사멸(apoptosis) 동안 RB 및 E2F1 단백질들의 발현 조사

RB 단백질은 초기 G1기에서 전사인자인 E2F1과 결합하고 있다가 cyclin-CDK 복합체에 의해 인산화되면 E2F1을 유리시킨다. 유리된 E2F1은 S기에서 DNA 복제에 필요한 여러 유전자들을 합성하면서 세포주기를 진행시킨다. 이처럼 세포주기 조절에 중요한 역할을 수행하는 유전자의 변화를 살펴보기 위하여 저근백피 추출물의 농도를 20, 40, 60, 80 및 100 µg/ml로 증가시키면서 Jurkat 세포 배양매지에 24시간 동안 처리하였다. 실험 결과 대조군에 비해서 실험군에서의 RB 단백질 발현수준이 감소하였으며 RB의 상태도 인산화된 상태에서 점점 탈인산화가 유

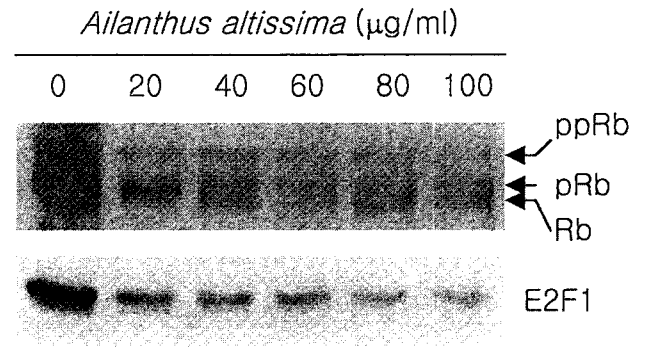


Fig. 4 – Decreases of RB and E2F1 protein levels during apoptosis induced by the extract from *A. altissima* in Jurkat T cells. Cells were incubated for 24 h at 37°C with the 20, 40, 60, 80, and 100 µg/ml of the extract. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on a 7.5% SDS-PAGE gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and the blots were probed for RB or E2F1.

도되는 현상을 보여 주었다(Fig. 4). 이런 결과는 저근백피의 처리 농도가 높을수록 RB 단백질의 탈인산화가 점점 증가하는 것으로 보여진다. 전사인자인 E2F1의 단백질 발현수준도 RB의 경우와 마찬가지로 저근백피의 농도가 높을수록 점점 감소하는 현상이 나타났다(Fig. 4). 이는 저근백피에 의해 활성이 유도되는 특이적인 RB 단백질 가수분해 효소에 의해서 RB 단백질 분해 정도가 증가하고 아울러 탈인산화된 RB 단백질들의 증가로 인해 RB와 복합체를 형성하고 있는 전사인자인 E2F1을 유리시키지 못하기 때문에 DNA합성에 관여하는 유전자들의 발현이 억제되어 결국에는 세포고사가 진행됨을 알 수 있다.

고 찰

한의학에서 癰瘍이란 체내에서 발견되는 질이 堅硬하며 암석과 같은 종괴 등을 일컫는다.¹⁷⁾ 암은 오늘날 인류를 위협하는 주요 난치성 질환의 하나로 암의 발생원인에 대하여 서양의학에서는 내적인자로서의 유전, 인종과 지리학적 요인, 연령, 면역학적 요인에 의하여, 외적인자로서 화학적 발암인자와 자외선조사, 석면, 방사선 등과 같은 물리적 발암인자와 바이러스성 발암인자 등으로 유전자가 손상을 받아 돌연변이 되어 발생하는 것으로 보고 있다.¹⁸⁾ 현재 암의 치료법은 분자생물학 등의 학문발전과 더불어 더욱 발전되면서 많은 치료효과를 거두고 있지만, 항암제는 정상세포에도 독성을 나타내어 다양한 부작용을 초래하는 단점이 있고, 약물에 대한 내성이 증가되고 있는 실정이므로 새로운 방식의 항암제 개발이 요구되고 있다.¹⁹⁾ 따라서 면역기능을 높여주고 암세포에만 선택적으로 작용하는 천연항암제를 생약제로부터 개발하려는 많은 연구가 이루어지고 있는 실정이다. 韓醫藥에서 암의 치료는 환자의 正氣狀態 및 암화의 정도에 따라

크게 益氣養血, 健脾和胃, 健脾益氣, 溫補腎陽, 및 滋補肝腎 등 인체의 항병능력을 증진시키는 扶正法과 清熱解毒, 活血祛瘀, 理氣化血, 化痰利濕 및 以毒攻毒 등 직접 암세포를 살상하는 祛邪法 및 이 두 가지 방법을 배합한 扶正祛邪法 등이 활용되고 있다.²⁰⁾ 본 연구는 소태나무과에 속하는 낙엽교목인 기중나무의 수피를 건조한 저근백피를 이용하여 백혈병 세포주인 Jurkat에 대한 항암효능을 검증하고자 하였다.

Jurkat 세포의 배양매지에 저근백피 물 추출물을 농도별로 처리한 후 세포 생존율 변화를 측정한 결과 Jurkat 세포의 사망율이 저근백피의 농도에 의존하여 점점 증가하였으며, 100 µg/ml 농도에서 대조군에 비해 66%의 사망율을 보여 주었다. Fig. 1과 같이 저근백피에 노출된 세포들의 외부 형태적인 특징을 현미경 하에서 관찰한 결과 세포막이 파괴되어 작은 소체를 이루는 것을 배지 속에서 볼 수 있었다. 이러한 결과는 저근백피의 추출물을 이루는 구성성분이 Jurkat T lymphocytes의 성장을 억제하고 세포독성을 일으켜 세포사멸을 유도하는 효과가 있음을 보여 준다.

Apoptosis가 진행되는 세포는 수많은 신호기전의 경로를 통하여 결국 DNA의 손상에 이르게 되고, 수선할 수 없을 정도로 손상이 많이 일어난 세포는 세포사멸이라는 순서를 거치게 된다. 그 중에서 p53과 관련 유전자들의 발현이 직간접적으로 apoptosis와 밀접히 관련된 유전자로 잘 알려져 있으며 이는 p21, Bcl-2 및 Bax 등이 있다. 암억제유전자인 p53의 일반적인 기능은 세포가 손상을 입으면 G1 또는 G2 checkpoint에서 세포주기를 정지시키는데, 이것은 p53의 축적에 의한 p21 단백질의 증가를 유도함으로써 이러한 기능을 수행한다. p21은 세포주기의 G1기 또는 G2기에서 RB 단백질을 불활성화시키기 위하여 CDK의 기능을 억제시키는 작용을 한다. 이러한 cell cycle arrest와 직접 관련이 있는 p21은 p53-dependent pathway 또는 p53-independent pathway 2가지 경로로부터 유도될 수 있다. 본 연구에서는 저근백피의 처리 후 p21 단백질 발현이 농도에 의존적으로 점점 증가하는 현상을 보여 주었다(Fig. 2). 즉 저근백피에 노출된 Jurkat 세포는 어떤 신호기전의 경로에 의해 p21이 증가하여 CDK에 결합함으로써 세포주기를 정상적으로 진행시키지 못하기 때문에 결국 세포사멸을 초래하게 되었고, Jurkat 세포는 p53가 결핍되어 있으므로 p21의 증가는 p53-independent pathway에 의한 것임을 알 수 있었다. 앞서 언급하였듯이 p53 단백질이 Bcl-2의 단백질 발현량을 억제시키고 Bax의 단백질 발현량을 증가시킴으로써 apoptosis에 직접적으로 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다.¹⁵⁾ 그러나 본 실험에서는 저근백피에 노출된 Jurkat이 세포고사가 진행됨에도 불구하고 Bcl-2 및 Bax 단백질들의 발현이 대조군에 비해서 전혀 차이가 없었다(Fig. 2). 이 현상은 백혈병 세포주인 Jurkat이 wt p53가 결핍되어 있기 때문에 저근백피 처리 후 apoptosis가 진행되는 동안에도 Bcl-2와 Bax를 직접적으로 조절

하지 못한 것으로 사료된다. 또한 세포내 다른 신호기전에 의해서도 Bcl-2와 Bax 단백질은 어떠한 영향도 받지 않는 것으로 나타났다. 결국 저근백피에 의해 초래되는 Jurkat 세포의 생리적 사멸은 p53와 무관한 다른 신호기전의 경로를 통하여 일어남을 의미하고 p21은 관련성이 있으나 Bcl-2와 Bax는 관련성이 없음을 알 수 있었다.

세포증식 촉진인자인 mitogen들의 최종 표적 중의 하나가 cyclin D이며 cyclin E도 관여할 것으로 보인다.²¹⁾ Mitogen들에 의해 cyclin D의 발현이 촉진되어 일정량에 이르면 cyclin D는 CDK4 혹은 CDK6와 결합하고, CDK activating kinase가 CDK의 threonine을 인산화시켜서 CDK가 활성을 띠게 된다. CDK는 RB를 인산화시켜서 불활성화 시킨다. Cyclin E-CDK2 복합체가 활성화됨으로서 cyclin D에 의한 RB의 인산화를 더욱 가속화시키게 되고 결국은 RB에 의해 억제되고 있던 E2F1, E1f-1, c-abl 등의 transcription factor들이 활성을 갖게되어 S기로 이행하게 된다.²²⁾ 이처럼 세포주기의 진행을 이루는 주요 G1 checkpoint 관련 유전자들의 발현 정도를 Western blot analysis를 통하여 살펴보았다. 그 결과 저근백피 처리 후 모든 실험군에서 cyclin D3, CDK4, RB, E2F1의 단백질 발현이 줄어들었다(Figs. 3, 4). 비록 CDK4의 경우는 단백질 발현수준뿐만 아니라 kinase activity도 조사를 하여 그 활성이 떨어졌는지를 살펴보아야 할 것이지만 관련 유전자들의 기능이 현저히 떨어지는 점으로 비추어 볼 때 G1 checkpoint와 관련된 기능이 올바르게 수행되지 못하여 세포주기가 정지되는 것을 알 수 있다. 즉 저근백피에 노출된 Jurkat 세포는 적어도 세포주기의 G1 checkpoint 관련 유전자의 변화에 의한 세포주기의 정지로 인해 결국 사멸하게 되는 기전을 보여준다. 암과 같은 비정상 세포와 정상적인 세포의 성장을 조절하는 기전이 최근 10년 동안 매우 상세하게 밝혀지고 있다. 물론 세포주기와 연관된 전사 조절, 단백질의 인산화, RNA와 단백질의 분해, 조절인자들의 구획화에 포함된 분자들에 대해서는 여전히 많은 연구가 진행되어야 한다. 이들에 대한 최근 그리고 앞으로의 발견은 주요 질병을 이해하고 치료하는데 새로운 접근 방법을 제공하게 될 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 2001년도 보건복지부 한방치료기술연구개발사업(PJ9-PG1-01CO04-0002)과 한국과학재단 지정 전북도청 지원의 원광대학교 의약자원연구센터(MRRC) 연구지원비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) 保健社會部 : 大韓藥典外韓藥(生藥)規格集, 서울 (1984).

- 2) 江蘇新學院(中國) : 中藥大辭典, 제 1 판, 下冊, 상해과학기술출판사, 上海 (1979).
- 3) Tang, W., and Eisenbrand, G. : Chinese drugs of plant origin. Springer-Verlag, New York (1992).
- 4) 주화균, 노영수, 김신규. : 저근백피 Tar의 항균작용에 관한 연구. 경희약대논문집 **12**, 57 (1984).
- 5) 김 중, 최종원, 김혜경, 박수원, 이창규. : 저근백피 성분의 생리활성에 관한 연구 (I): 메탄올 추출물과 클로로포름 분획이 Epoxide 분해계에 미치는 영향. 생약학회지 **25**, 47 (1994).
- 6) Hunter, T. : Braking the cycle. *Cell* **75**, 839 (1993).
- 7) Sherr, C. J. : Mammalian G1 cyclins and cell cycle progression. *Proc. Assoc. Am. Physicians* **107**, 181 (1995).
- 8) Magnaghi-Jaulin, L., Groisman, R., Naguibneva, I., Robin, P., Lorain, S., Le Villain, J. P., Troalen, F., Trouche, D., and Harel-Bellan, A. : Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature* **391**, 601 (1998).
- 9) Zhang, H. S., Gavin, M., Dahiya, A., Postigo, A. A., Ma, D., Luo, R. X., Harbour, J. W., and Dean, D. C. : Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Bb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* **101**, 79 (2000).
- 10) Marx, J. : How cells cycle toward cancer. *Science* **263**, 319 (1994).
- 11) Verma, I. M., and Vogt, P. K. : Oncogene : 20 years later. *Genes Dev.* **9**, 1289 (1995).
- 12) Sherr, C. J. : Cancer cell cycles. *Science* **274**, 1672 (1996).
- 13) Grana, X., and Reddy, E. P. : Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* **11**, 211 (1995).
- 14) Oltvai, Z. N., Milliman, C. L., and Korsmeyer, S. J. : Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609 (1993).
- 15) Agarwal, M. L., Taylor, W. R., Chernov, M. V., Chernova, O. B., and Stark, G. R. : The p53 network. *J. Biol. Chem.* **273**, 1 (1998).
- 16) Serrano, M., Hannon, G. J., and Beach, D. : A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366**, 704 (1993).
- 17) 白洪龍. : 辨證施治概要. 人民出版社, 雲南 (1984).
- 18) Ashall, F., Bramwell, M. E., and Harris, H. : A new marker for human cancer cells. *Lancet* **2**, 1 (1982).
- 19) Suffness, M., and Douros, J. : Current status of the NCI plant and animal product program. *J. Nat. Prod.* **45**, 1 (1982).
- 20) 방약중 : 실용중의내과학. 상해과학기술출판사, 상해 (1986).
- 21) Ohtsubo, M., Theodoras, A. M., Schumacher, J., Roberts, J. M., and Pagano, M. : Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol. Cell Biol.* **15**, 2612 (1995).
- 22) Wang, J. Y., Knudsen, E. S., and Welch, P. J. : The retinoblastoma tumor suppressor protein. *Adv. Cancer Res.* **64**, 25 (1994).