

# 백혈병 세포주 Jurkat의 세포고사 유도 및 세포주기 억제에 미치는 습歡皮 추출물의 효과

박영준 · 정우철 · 정대영 · 이용운<sup>1</sup> · 이 인 · 이기상 · 전병훈<sup>2</sup> · 성강경 · 문병순<sup>1\*</sup>

원광대학교 한의과대학 내과학교실, 1: 원광대학교 한의학전문대학원, 2: 원광대학교 한의과대학 병리학교실

## Effects of the Water Extract from *Albizzia julibrissin* on Apoptosis and Cell Cycle Progression in the Human Leukemic Jurkat Cells

Young Jun Park, Woo Cheol Jung, Dae Young Jeong, Yong Un Lee<sup>1</sup>, In Lee, Key Sang Lee, Byung Hun Jeon<sup>2</sup>, Kang Keyng Sung, Byung Soon Moon<sup>1\*</sup>

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, 1: Professional Graduate School of Oriental Medicine, 2: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Apoptosis is a morphologically and biochemically distinct form of cell death that occurs in many different cell types in a wide variety of organisms. *Albizzia julibrissin* belonging the family Leguminosae has been used for the treatment of contusion, sore throat, amnesia, and insomnia in oriental traditional medicine. This study investigates whether the water extract of *A. julibrissin* induce apoptotic cell death in Jurkat T-acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells. Jurkat cells were increased inhibitions of cell viability in a concentration-dependent manner by *A. julibrissin*. This herbal medicine also caused apoptosis as measured by cell morphology and DNA fragmentation. The capability of *A. julibrissin* to induce apoptosis was associated with proteolytic cleavage of specific target proteins such as poly (ADP-ribose)polymerase (PARP) and beta-catenin proteins suggesting the possible involvement of caspases. Our result showed that Bcl-2 and Bax protein levels were not changed in all *A. julibrissin*-treated groups compared to control group. These results suggest that *A. julibrissin*-mediated apoptosis is independent with Bcl-2 related signaling pathway in this cells. The purpose of the present study is also to investigate the Effect of *A. julibrissin* on cell cycle progression. Our results showed that G1 checkpoint related gene products (cyclin D1, cyclin dependent kinase 4, retinoblastoma, E2F1) were decreased in their protein levels in a dose-dependent manners after treatment of the extract. These results indicate that the increase of apoptotic cell death by *A. julibrissin* may be due to the inhibition of cell cycle progression in wild type p53-lacking Jurkat cells.

Key words : *Albizzia julibrissin*, Apoptosis, Cell Cycle Progression, Human Leukemic Jurkat Cells

### 서 론

습歡皮는 콩과(Leguminosae)식물에 속하는 낙엽교목인 자귀나무(*Albizzia julibrissin* Durazz)의 樹皮를 건조한 것으로서 性은 平無毒하고 味는 甘하며, 安五臟, 和心志, 消癰腫, 續筋骨의 효능이 있어 心神不安, 憂鬱不眠, 肺癰, 癰腫, 瘰癧, 筋骨折傷 등을 치료하는데 널리 사용되어 왔다<sup>1-10)</sup>.

최근 발생빈도가 증가하고 있는 백혈병 등의 암과 그에 대한 항암치료에 관한 연구는 분자생물학적인 기법이 광범위하게 적용된 세포와 유전자 차원의 연구로 진행되고 있으며, 그 중 세포주기 조절인자들의 기능상의 불균형이 과다한 세포분열을 초래하여 암화 과정에 접어들게 할 수 있다는 보고가 있다<sup>11,12)</sup>. 이러한 세포주기에 작용하는 유전인자와 암 발생과의 관계 및 그 기전을 더욱 깊이 설명하기 위해서는 암세포와 정상세포 사이의 세포주기 조절에 대한 분자생물학적 및 세포생물학적 수준의 연구가 필요하며, 이러한 연구는 한의학에서의 항암치료와 그 기전에 대한 검증, 새로운 한의학 치료법의 개발을 위해서도 필수적

\* 교신저자 : 문병순, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 익산한방병원  
· E-mail : mbs@wonkwang.ac.kr · Tel : 063-850-2102  
· 접수 : 2003/08/11 · 수정 : 2003/09/28 · 채택 : 2003/11/01

으로 이루어져야 한다.

암에 관한 한의화적인 治法은 인체의 항병능력을 증진시키는 扶正法과 직접 암세포를 살상하는 祛邪法 및 이 두 가지 방법을 배합한 扶正祛邪法을 들 수 있으며<sup>13-19)</sup>, 合歡皮는 祛邪法에 활용할 수 있는 活血消腫의 효능으로 蒲公英, 連翹 등의 清熱解毒藥類와 함께 임상에서 肺癰, 癰疽瘡腫 등을 치료하는데 이용되고 있으므로<sup>12)</sup> 항암연구에 응용될 수 있다. 최근 合歡皮에 대한 실험적 연구로는 saponin fraction에서 자궁수축작용 증가<sup>20)</sup>, polysaccharide fraction에서 sarcoma 180 solid form에 대한 항암활성<sup>21)</sup>, 항균활성<sup>22)</sup>, 항진균작용<sup>23)</sup>, 부정맥유발<sup>24)</sup> 및 설사억제 효과<sup>25)</sup>, 꽃에서 추출된 flavonol glycoside에 의한 수면 효과를 보고한 것<sup>26)</sup> 등이 있으나, 혈액암인 백혈병에 대한 항암활성 연구는 아직 보고된 바가 없었다.

이에 저자는 合歡皮의 백혈병에 대한 항암활성효과를 究明하기 위하여 급성림프성백혈병 세포주인 Jurkat T lymphocytes에 미치는 合歡皮 추출물의 apoptosis 유도효과와 세포주기에 대한 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 시료의 제조

合歡皮 200g을 둥근 플라스크에 넣고 증류수 2,000ml를 넣은 후 3시간 동안 가열, 추출하고 침전물을 3M 여과지를 이용하여 3회 여과하였다. 이 여과액을 rotary vacuum evaporator에서 감압, 농축하였다. 농축된 용액을 -70℃ deep freezer에서 12시간 동안 방치하고, 30시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하여 10%의 수율인 20g의 분말을 얻었다.

#### 2) 세포 배양

사람 T 세포성 유래의 급성 림프성백혈병 세포주인 Jurkat은 미국세포주 은행인 The American Type Culture Collection 社(ATCC, Rockville, MD, USA)로부터 분양 받아, 실험실에서 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 공급 조건을 갖춘 Sanyo社 배양기에서 배양하였다. 부유성인 Jurkat 세포의 배양액은 L-glutamine이 포함된 RPMI 1640 배지에 56℃ 수조에서 30분간 가온 하여 불활성화시킨 fetal bovine serum(FBS)을 10% 포함하고, 1% 항생제(100units/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin)와 배지 1ℓ 당 NaHCO<sub>3</sub> 2g을 첨가하여 제조하였다.

#### 3) 항체

Monoclonal anti-β-catenin 항체는 Transduction Laboratories 社(Lexington, KY, USA)로부터 구입하였고, monoclonal anti-CPP32, monoclonal anti-Bax, monoclonal anti-cyclin D3, monoclonal anti-E2F1 항체와 polyclonal anti-Bcl-2, polyclonal anti-CDK4, polyclonal anti-RB 항체는 Santa Cruz Biotechnology 社(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. Monoclonal anti-PARP 항체는 Calbiochem 社(San Diego, CA, USA)로부터 구입하였고, peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin과 peroxidase-labeled donkey

anti-rabbit immunoglobulin 이차 항체는 Amersham Life Sciences 社(Cleveland, OH, USA)로부터 구입하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 한약재의 효능 검색

백혈병 세포주의 세포사멸을 유도하는 한약재를 검색하기 위하여 Jurkat 세포를 24 well plate에서 배양하였다. 각각의 한약재를 200µg/ml 농도로 처리한 후 24시간과 48시간 동안 세포를 배양하였다. 그 후 광학현미경을 통하여 세포들의 형태학적 변화를 먼저 관찰하고, trypan blue 용액을 이용하여 혈구계산기로 세포 수를 계산하였다. Jurkat 세포의 경우 한약재 처리 후 24시간 이내에 대조군에 비해 50% 이상의 세포사멸을 일으키는 한약재를 우선적으로 조사하였고, 세포사멸에 효과를 나타내는 약제 중의 하나인 合歡皮를 재료로 이용하여 본 실험을 실시하였다.

#### 2) 세포고사 유도

세포들을 plastic culture dish에서 배양하였고, 4x10<sup>5</sup>cells/ml 정도의 세포 수를 가진 10ml 배양배지에 合歡皮 추출물을 투여하였다. Jurkat 세포들을 여러 가지 농도(5, 10, 20, 30, 40µg/ml)의 추출물로 24시간 동안 처리하였다. 合歡皮 분말을 4℃에 저장하였고 사용 직전에 40mg/ml 농도로 만든 후 실험에 필요한 농도로 RPMI 1640 배지에 희석하여 사용하였다. 세포고사는 아래에 기재된 세포 생존율의 비교, 세포 형태의 변화, 세포 핵 내 염색체 형태의 변화 및 poly(ADP-ribose) polymerase(PARP) 및 beta-catenin 단백질의 가수분해 패턴 등을 고려하여 결정하였다.

#### 3) 형태학적 변화 조사

Jurkat 세포를 각 well당 1x10<sup>5</sup>개씩 넣고 24시간 경과 후 合歡皮 추출물을 농도별로 첨가하여 24시간 동안 배양하였으며, 현미경(Diaphot 300, Nikon, Japan)을 이용하여 100배율 하에서 대조군과 실험군의 형태학적 변화를 관찰하였다.

#### 4) 세포생존율

세포생존율에 대한 合歡皮 추출물의 영향을 알아보기 위하여 Jurkat 세포를 24-well plate에 배양한 후 추출물을 5, 10, 20, 30, 40µg/ml 농도로 24시간 동안 처리하였다. 그 후 각 표본들의 세포를 1.5ml tube에 모았으며, 동일 용량의 trypan blue 용액을 tube에 첨가한 후 부드럽게 섞고 3분간 방치하였다. Trypan blue 용액에 염색되지 않은 살아있는 세포의 수를 혈구계산기를 이용하여 계산하였다. 세포생존율에 대한 合歡皮 추출물의 영향을 알아보기 위하여 MTT 측정법을 실시하였다. 이 방법은 생존한 세포들의 효소활성을 측정하는 것으로서 세포를 96-well plate에 배양한 후 추출물을 위의 실험과 동일한 조건으로 처리하였다. 각 well에 5mg/ml 농도로 저장된 MTT 용액 20µl를 첨가하고 3시간 동안 배양하였다. 그 후 MTT 용액이 포함된 배양액을 제거하고 각 well 당 0.1% isopropanol 150µl를 첨가하여 30분간 배양 후 microplate reader를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 3회의 서로 다른 실험 결과를 종합하여 평균값과 표준편차 값을 그림으로 나타내었다.

#### 5) Western Blot Analysis

실험에 이용된 세포를 15ml tube에 모은 후 냉장 보관하였던 phosphate-buffered saline(PBS)으로 2~3번 씻고 2000rpm에서 3분간 원심분리 하였다. 상등액을 없앤 후 cell pellet에 EBC lysis buffer(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 120mM sodium chloride, 0.5% Nonidet P-40)를 넣고 20분간 얼음 위에 놓아두면서 5분마다 교반하였다. Lysates를 13,000rpm에서 15분 동안 원심분리한 후 상등액만을 취하여 다른 tube에 옮겼다. 단백질 농도는 Bradford 방법(Bio-Rad)에 준하여 측정하였으며, 표준 단백질로 bovin serum albumin (BSA)을 사용하였다. 각 실험군마다 동일한 양의 단백질이 7.5%(PARP, beta-catenin, RB), 10%(cyclin D3, CDK4, E2F1)와 12.5%(CPP32, Bcl-2, Bax) SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 통해 분리되었으며, 젤 상에 있는 모든 단백질은 nitrocellulose membrane(Hybond C, Amersham Corp.)으로 옮겨졌다. Membrane들은 0.5% (v/v) tween-20을 포함한 Tris-NaCl-Tween 20(TNT) buffer를 이용하여 만들어진 5%(w/v) nonfat milk 용액에 넣어서 전처리 하였다. Nonfat milk 용액에 1 $\mu$ g/ml 농도로 만들어져 있는 각각의 PARP, beta-catenin, RB, cyclin D3, CDK4, E2F1, CPP32, Bcl-2 및 Bax 일차 항체를 1시간 동안 실온에서 membrane에 처리하였다. Membrane들을 TNT buffer로 10분 간격으로 3번 세척하였고, 일차 항체에 알맞은 이차 항체(peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin 과 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin)로 1시간 동안 실온에서 membrane에 반응시켰다. 다시 membrane들을 TNT buffer로 세척한 다음, enhanced chemiluminescence reagent(Amersham)를 이용하여 2분간 반응시킨 후 X-ray필름을 이용하여 반응의 강도를 확인하였다.

6) DNA Fragmentation

세포를 PBS 용액으로 세척한 후 원심분리기를 이용하여 순수 세포만을 모았다. DNAzol reagent 1ml를 넣고 pipetting하여 세포 pellet을 분쇄하였다. 그 후 13,000rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 20분간 원심분리 하였으며, 상등액만을 다른 tube에 옮기고 pellet은 버렸다. Lysate에 100% 에탄올 0.5ml를 첨가하여 여러 번 흔들어 DNA를 침전시켰다. 3분 후 DNA pellet만 남기고 상등액을 제거한 다음, DNA precipitate를 95% 에탄올 1ml에 두 번 세척하고 5~15분 정도 실온에서 air dry 시켰다. DNA를 Tris-EDTA buffer를 이용하여 녹인 후 분광광도계를 이용하여 260nm와 280nm의 optical density (OD)값을 측정하여 DNA를 정량하였다. 10 $\mu$ g의 DNA 표본들을 10 $\mu$ g/ml 농도의 ethidium bromide를 포함한 1.0%(w/v) agarose gel로 2시간 정도 전기영동 시킨 후 ultraviolet light에서 DNA 절편들을 관찰하였다.

7) 통계처리

실험결과는 평균  $\pm$  표준편차로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's t-test를 이용하였다.

실험성적

1. 습곡피 추출물이 백혈병 세포 Jurkat의 세포생존율에 미치는 영향

본 실험에서는 사람의 급성림프성백혈병 세포주인 Jurkat의 세포생존율에 대한 습곡피 추출물의 효과를 알아보기 위하여 추출물을 5, 10, 20, 30, 및 40 $\mu$ g/ml 농도로 증가시키면서 세포 배양배지에 처리하여 24시간 동안 세포를 배양하였다. Fig. 1에서 보여지듯이 trypan blue 용액으로 세포생존율 변화를 측정한 결과, 습곡피 추출물은 농도 의존적으로 Jurkat 세포의 생존율을 급격히 감소시켰다.

MTT assay 결과 또한 대조군에 비하여 5 $\mu$ g/ml 농도로 처리한 실험군에서 62%의 세포생존율이 나타났으며, 10, 20, 30, 및 40 $\mu$ g/ml 농도로 처리한 그룹들에서도 각각 45, 27, 22, 및 17%의 세포생존율을 나타내었다(Fig. 2).

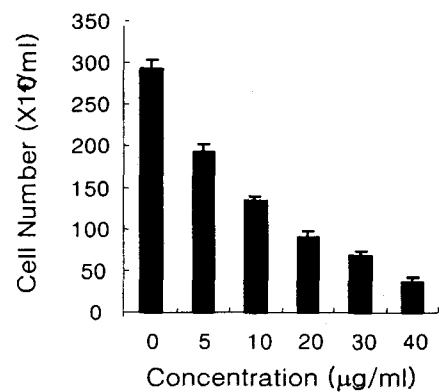


Fig. 1. Induction of concentration-dependent cell death in Jurkat cells by *A. julibrissin*. Cells were incubated for 24 h at 37  $^{\circ}$ C with the 5, 10, 20, 30, and 40  $\mu$ g/ml concentrations of *A. julibrissin*. Cells were harvested into 1.5 ml eppendorf tube and resuspended in 1 ml PBS. Same volume of trypan blue was then added and gently mixed. After 2 min, cells were counted using hemacytometer. Results were expressed as the means  $\pm$  S.D. of three experiments and presented as a total cell number.

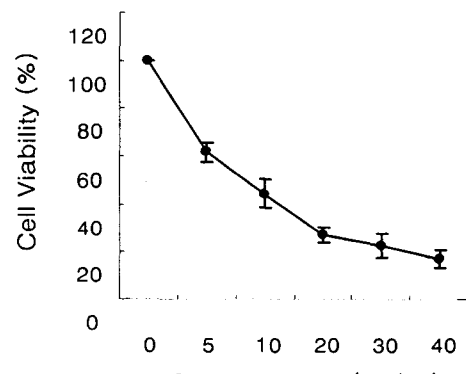
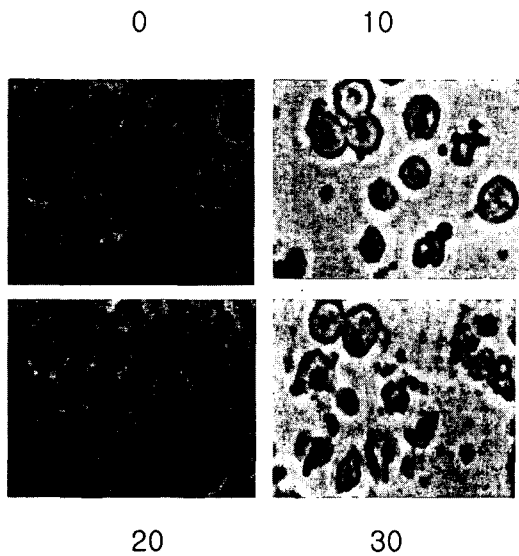


Fig. 2. Induction of concentration-dependent cell death in Jurkat cells by *A. julibrissin*. Cells were incubated for 24 h at 37  $^{\circ}$ C with the 5, 10, 20, 30, and 40  $\mu$ g/ml concentrations of *A. julibrissin*. Cell viability by MTT assay was measured as described in Materials and Methods. Results were expressed as the means  $\pm$  S.D. of three experiments and presented as a percentage of control values.

2. 습곡피 추출물이 Jurkat 세포의 형태학적 변화에 미치는 영향

습곡피 추출물에 노출된 Jurkat 세포의 생존율이 감소한 이유가 세포고사에 기인하는 것인지를 알아보기 위하여 Jurkat 세포의 배양 배지에 습곡피 추출물을 10-30 $\mu$ g/ml의 여러 농도별로

24시간 동안 처리하여 세포를 배양한 후 외부형태학적 변화를 위상차현미경으로 대조군과 비교하여 관찰하였다. 그 결과 대조군은 세포모양에 아무런 변화가 없었으나 *Albizzia julibrissin* 추출물에 노출된 세포는 세포막의 파괴와 외부 용기의 돌출현상을 볼 수 있었다(Fig. 3). 또한 *Albizzia julibrissin* 추출물의 처리 농도가 높아질수록 세포의 밀도는 대조군에 비해 점차 감소하였으며 세포막 용기의 돌출현상을 가진 세포 수는 점점 증가함을 알 수 있었다(Fig. 3). 이러한 결과는 *Albizzia julibrissin* 추출물이 Jurkat 세포의 고사를 유도함으로써 생존율을 저해하는 것으로 보여진다.



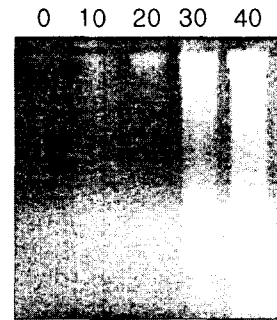
**Fig. 3. Morphology of control and extract-treated Jurkat cells observed by converted microscope.** Cells were incubated for 24 h at 37°C with the 10, 20, and 30  $\mu\text{g/ml}$  of *A. julibrissin* extract. The morphology of extract-treated cells were compared with that of control cells under 100X microscope.

**3. *Albizzia julibrissin* 추출물이 세포고사를 유도한 Jurkat 세포에서 핵 내 DNA의 분절에 미치는 영향**

*Albizzia julibrissin* 추출물에 노출된 Jurkat의 세포사멸이 수동적이고 물리적인 세포괴사인지, 능동적이고 자발적인 생리적 사멸과정인 세포괴사인지를 확인하기 위하여 Fig. 1과 동일한 조건하에서 처리된 표본들을 이용하여 DNA 분절현상에 대한 실험을 실시하였다. 정상세포와 세포사멸이 유도된 세포들로부터 완전한 total DNA를 추출하여 전기영동을 실시하였다.

그 결과 Fig. 4에서 보여주듯이, *Albizzia julibrissin* 추출물을 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 저농도로 처리한 실험군에서도 고분자량의 DNA(50~300kb)와 oligonucleosome 크기의 DNA 분절(180bp)을 포함하는 apoptotic DNA ladder 현상을 agarose gel에서 볼 수 있었다. DNA 분절의 정도는 투여된 *Albizzia julibrissin* 추출물의 농도가 높을수록 점차 증가함을 알 수 있었다(Fig. 4). 이와 같은 DNA 분절 양상은 기존의 연구보고<sup>27)</sup>에 의해 밝혀진 결과와 마찬가지로 세포고사가 진행되는 세포에서 internucleosomal DNA cleavage가 초래되어 나타나는 DNA 크기와 일치함을 보여주므로 *Albizzia julibrissin* 추출물에 의한 Jurkat의 세포사멸은 programmed cell death임을 보여준다.

*Albizzia julibrissin* ( $\mu\text{g/ml}$ )

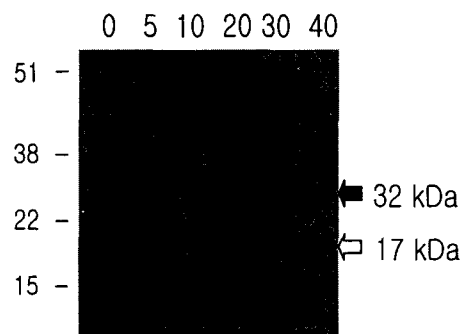


**Fig. 4. Induction of apoptotic DNA fragmentation by *A. julibrissin* in Jurkat cells.** Genomic DNA was extracted from control and *A. julibrissin* treated samples. Ten micrograms of DNA sample was separated on a 1.0% agarose gel containing 10  $\mu\text{g/ml}$  ethidium bromide for 2 h and visualized under ultraviolet light.

**4. *Albizzia julibrissin* 추출물이 세포고사를 유도한 Jurkat 세포에서 단백질 가수분해 효소인 Caspase-3 활성화에 미치는 영향**

최근 연구 결과에 의하면 세포고사를 유도하는 대부분의 약물들이 시스테인 분해효소인 caspase family의 순차적인 신호전달과 활성을 통하여 세포사멸을 일으키는 것으로 알려져 있다<sup>28,29)</sup>. 특히, caspase-3는 효소학적으로 세포고사를 일으키는 데 결정적인 역할을 수행하므로 *Albizzia julibrissin* 추출물의 여러 농도에 24시간 노출되어 세포고사가 일어난 Jurkat 세포의 경우에도 caspase-3의 활성 변화가 있는지를 조사하였다. 그 결과 대조군에서는 pro-caspase-3의 형태인 32 kDa 크기의 분자량이 검출되었으며, 세포고사가 일어나는 세포들에서는 caspase-3의 활성화된 형태인 17kDa 크기의 분자량을 볼 수가 있었다. 이러한 현상은 *Albizzia julibrissin* 추출물의 처리 농도가 높을수록 더욱 증가함을 알 수 있었다(Fig. 5).

*Albizzia julibrissin* ( $\mu\text{g/ml}$ )



**Fig. 5. Induction of CPP32 activation during apoptosis induced by *A. julibrissin* in Jurkat cells.** Cells were incubated for 24 h at 37 °C with the 5, 10, 20, 30, and 40  $\mu\text{g/ml}$  concentrations of *A. julibrissin*. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on 12.5% SDS-PAGE gels, transferred to nitrocellulose membranes, and the blots were probed with CPP32.

**5. *Albizzia julibrissin* 추출물이 세포고사를 유도한 Jurkat 세포에서 PARP 및 beta-catenin 단백질의 가수분해에 미치는 영향**

많은 종류의 세포성 단백질 즉, 세포질과 핵 속에 존재하는 단백질들이 세포고사가 진행되는 동안 caspases에 의해 쪼개짐 현상이 일어남을 보여주고 있다. 현재까지 알려진 기질들을 보면 poly ADP-ribose polymerase(PARP), RB, actin, beta-catenin, lamin, fodrin, PKA, presenilin 등 다양하다<sup>30-32</sup>. 그러므로 습歡皮 추출물이 caspase-3의 주요 기질로 알려진 PARP 및 beta-catenin 단백질 분해에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Jurkat 세포 배양배지에 습歡皮 추출물을 그림과 같이 농도별로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 그 결과 5µg/ml의 저농도에서 116kDa의 완전한 PARP 단백질이 85kDa 크기로 분해되는 양상이 유도되었으며, 처리 농도가 높으면 높을수록 PARP 단백질 가수분해 정도가 증가함을 알 수 있었다(Fig. 6).

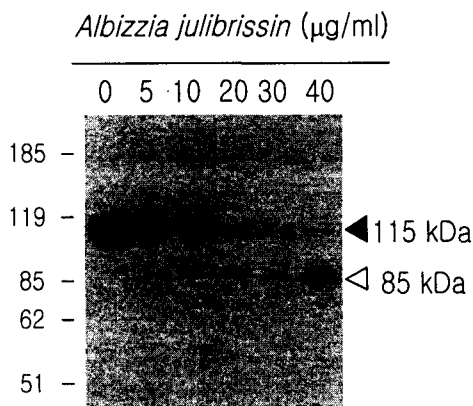


Fig. 6. Induction of PARP cleavage during apoptosis induced by *A. julibrissin* in Jurkat cells. Cells were incubated for 24 h at 37 °C with the 5, 10, 20, 30, and 40 µg/ml concentrations of *A. julibrissin*. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on 7.5% SDS-PAGE gels, transferred to nitrocellulose membranes, and the blots were probed with PARP. Full length of PARP 115 kDa and large fragmented of 85 kDa bands (closed and open triangles respectively) are shown.

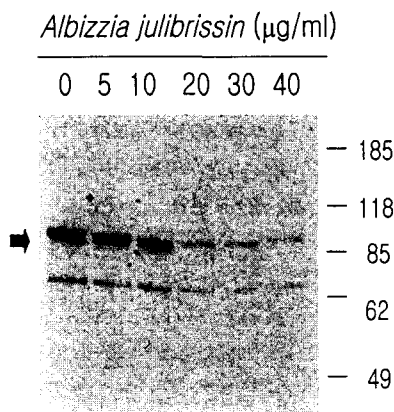


Fig. 7. Induction of beta-catenin cleavage during apoptosis induced by *A. julibrissin* in Jurkat cells. Cells were incubated for 24 h at 37 °C with the 5, 10, 20, 30, and 40 µg/ml of *A. julibrissin*. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on 7.5% SDS-PAGE gels, transferred to nitrocellulose membranes, and the blots were probed with beta-catenin.

Beta-catenin 또한 5µg/ml의 저농도에서 wild type의 beta-catenin 단백질 수준이 감소하는 경향이 나타났으며, 처리

농도가 높으면 높을수록 beta-catenin 단백질 가수분해 정도가 증가함을 알 수 있었다(Fig. 7). 이러한 실험결과는 핵 속에서 일어나는 DNA fragmentation의 경향과 매우 잘 일치함을 보여 주었다. 이런 관점에서 볼 때 습歡皮 추출물 처리에 의한 PARP 및 beta-catenin 단백질의 쪼개짐 현상은 caspase-3 활성화의 가장 주요한 증거 중의 하나이며, 습歡皮로 유도되는 Jurkat 세포고사 현상에 caspase-3의 활성이 일어남을 간접적으로 보여준다.

#### 6. 습歡皮 추출물이 세포고사를 유도한 Jurkat 세포에서 Bcl-2 및 Bax 단백질들의 발현에 미치는 영향

세포고사가 일어나는 경우에는 일반적으로 Bcl-2 단백질 양이 감소하고 Bax 단백질 양이 증가하는 것이 관찰되지만 이런 현상이 모든 세포사멸의 경우에 적용되는 것은 아니다. 세포고사 관련 유전자로 잘 알려진 p53는 세포고사가 진행되는 세포들에서 단백질 발현량이 증가하는 것으로 밝혀졌고, 증가된 p53 단백질이 Bcl-2의 단백질 발현량을 억제시키고 Bax의 단백질 발현량을 증가시키는 것으로 알려져 왔다<sup>33</sup>.

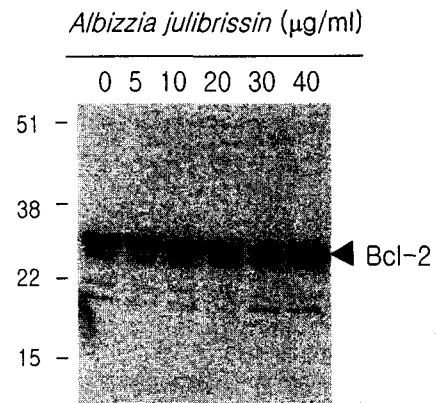


Fig. 8. Expression levels of Bcl-2 protein in *A. julibrissin*-mediated apoptotic Jurkat cells. Cells were incubated for 24 h at 37 °C with the 5, 10, 20, 30, and 40 µg/ml concentrations of *A. julibrissin*. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on a 12.5% SDS-PAGE gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and the blots were probed for Bcl-2.

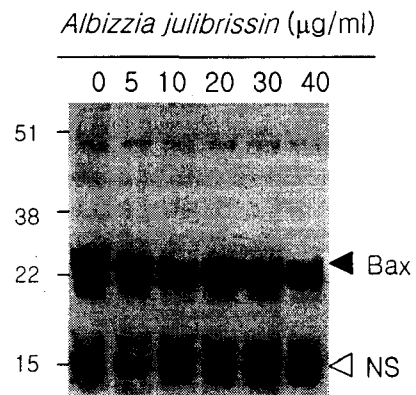


Fig. 9. Expression level of Bax protein in *A. julibrissin*-mediated apoptotic Jurkat cells. Cells were incubated for 24 h at 37 °C with the 5, 10, 20, 30, and 40 µg/ml concentrations of *A. julibrissin*. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on a 12.5% SDS-PAGE gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and the blots were probed for Bax.

본 실험은 wild type-p53가 결핍된 Jurkat 세포에서 Bcl-2 및 Bax가 세포고사와 관련성이 있는지를 알아보고자 하였다. *Albizzia julibrissin* 추출물을 처리하여 세포고사를 유도한 Jurkat 세포에서 Bcl-2 및 Bax의 단백질 발현 정도를 Western blot으로 조사하였다. 그 결과 대조군의 Bcl-2 및 Bax 단백질 발현 정도와 여러 가지 농도의 *Albizzia julibrissin* 추출물을 처리한 실험군 모두에서 Bcl-2 및 Bax 단백질 발현 정도를 비교해 볼 때 차이점을 발견할 수 없었다(Fig. 8, 9).

7. *Albizzia julibrissin* 추출물이 세포고사를 유도한 Jurkat 세포에서 Cyclin D3 및 CDK4 단백질의 발현에 미치는 영향

D-type의 cyclin은 CDK와 결합하여 RB 단백질을 인산화시켜 세포주기 중 G1기에서 S기로의 전이를 촉진하는데 중요한 역할을 한다. 많은 암세포에서 cyclin D1의 과다발현이 관찰되었으며, 이는 끊임없는 세포증식과 관련되어 있음을 보여주었다<sup>34</sup>. 본 연구에서는 Jurkat 세포에서 D-type의 단백질 발현수준을 알아보기 위하여 추출물의 농도를 5, 10, 20, 30 및 40 $\mu$ g/ml로 증가시키면서 세포 배양배지에 처리하여 24시간 동안 세포를 배양하였다. Western blot analysis의 결과 cyclin D1 및 cyclin D2 단백질은 대조군과 실험군 모두에서 검출되지 않았다(data not shown). 이러한 결과는 cyclin D1과 cyclin D2 단백질의 발현수준이 Jurkat 세포에서는 너무 적어 Western blot으로 검출이 되지 않은 것으로 보이며, *Albizzia julibrissin* 추출물의 처리 농도에 의존하여 단백질 발현수준이 증가하지 않고 감소하든지 또는 변화가 없음을 보여준다. 그러나 cyclin D3 단백질의 발현수준은 대조군에서는 많은 양으로 검출되었으나 *Albizzia julibrissin* 추출물을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 단백질 발현수준이 감소하였음을 보여주었다(Fig. 10). 이는 G1기에 관여하는 3종류의 D-type cyclin 중 cyclin D3가 Jurkat T 세포에서 가장 현저하게 발현되는 것으로 볼 수 있으며, cyclin D3의 단백질 발현 감소현상이 Jurkat T 임파구의 세포주기를 억제하여 세포고사를 유도하는 것으로 볼 수 있다. 정상세포에서 대부분의 CDK들은 cyclin, proliferating cell nuclear antigen(PCNA), p21WAF1과 4중 복합체를 형성하여 RB 단백질의 인산화에 관여한다. *Albizzia julibrissin* 추출물을 위와 동일한 조건 하에서 처리한 후 Jurkat 세포에서의 CDK4 단백질 발현수준을 조사해 본 결과 처리 농도가 높을수록 CDK4 단백질 발현수준이 감소하는 것을 보여주었다(Fig 10).

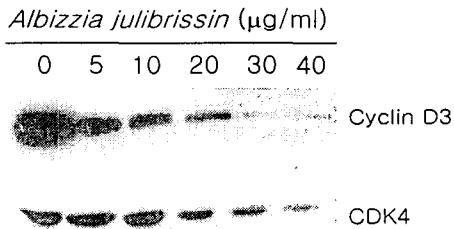


Fig. 10. Expression levels of cyclin D3 and CDK4 proteins during apoptosis induced by *A. julibrissin* in Jurkat cells. Cells were incubated for 24 h at 37 °C with the 5, 10, 20, 30, and 40  $\mu$ g/ml of *A. julibrissin*. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on a 11% SDS-PAGE gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and the blots were probed for cyclin D3 or CDK4.

이상의 결과에서 *Albizzia julibrissin* 추출물이 Jurkat 세포의 고사를 촉진시키는 작용은 cyclin D와 CDK4 단백질의 양적 감소가 cyclin-CDK 복합체 형성을 억제시킴으로써 세포주기를 원활히 조절하지 못하여 일어남을 알 수 있다.

8. *Albizzia julibrissin* 추출물이 세포고사를 유도한 Jurkat 세포에서 RB 및 E2F1 단백질들의 발현에 미치는 영향

세포의 증식을 조절하는 세포주기에서 암억제유전자로 알려진 RB 단백질은 세포주기의 G1기에서 중요한 기능을 수행하고 있다. 즉, 전사인자인 E2F1과 결합하여 E2F1의 기능을 억제하고 있으며, 신호전달 경로 중 cyclin-CDK 복합체에 의해 RB가 과인산화되면 RB는 불활성화 되어 RB의 G1 정지 기능은 상실된다. RB와 결합하고 있던 E2F1을 유리시키고, 활성화된 E2F1은 S기에서 DNA 복제에 필요한 여러 유전자들을 합성함으로써 세포주기는 G1기에서 S기로 진행하게 된다<sup>35</sup>. 이처럼 세포주기 진행의 시작점인 G1기 조절과 관련하여 중요한 역할을 수행하고 있는 이들 유전자들의 변화를 살펴보기 위하여 *Albizzia julibrissin* 추출물의 농도를 5, 10, 20, 30 및 40 $\mu$ g/ml로 증가시키면서 Jurkat 세포들의 배양배지에 24시간 동안 처리하였다.

그 결과 5 $\mu$ g/ml의 저농도에서 과인산화된 RB 단백질 발현수준은 대조군에 비하여 다소 감소하였으며, 추출물의 처리 농도가 높을수록 전체 단백질 발현수준의 비율이 점점 감소함을 볼 수 있었다(Fig. 11). 또한 RB 단백질의 인산화 정도는 E2F1의 기능을 조절하는 중요한 변수로서 *Albizzia julibrissin* 추출물의 처리 농도에 의존적으로 감소되고 특히 30 $\mu$ g/ml 이상의 고농도에서는 탈인산화된 RB의 형태가 현저하게 증가함을 알 수 있었다(Fig. 11). 이는 cyclin D type과 CDK의 발현 감소로 인해 결과적으로 CDK4의 RB 인산화 기능이 감소되어 탈인산화된 RB의 발현이 증가된 것으로 생각된다. 위와 동일한 조건하에서 전사인자인 E2F1의 활성을 단백질 발현 수준에서 측정하기 위하여 Western blot을 조사한 결과, 5 $\mu$ g/ml의 저농도에서는 대조군에 비하여 단백질 발현이 거의 감소되지 않았으나, 그 이후의 처리 농도에서는 *Albizzia julibrissin* 추출물의 처리 농도에 의존적으로 E2F1의 전체적인 단백질 발현수준이 점점 감소하는 현상이 나타났다(Fig. 11).

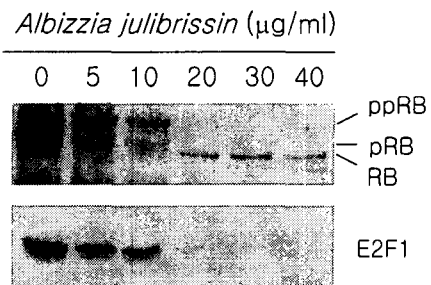


Fig. 11. Increase of RB dephosphorylation and decrease of E2F1 protein level during apoptosis induced by *A. julibrissin* in Jurkat cells. Cells were incubated for 24 h at 37 °C with the 5, 10, 20, 30, and 40  $\mu$ g/ml of *A. julibrissin*. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on a 7.5% (RB) and 10% (E2F1) SDS-PAGE gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and the blots were probed for RB or E2F1.

이러한 결과는 RB 단백질의 dephosphorylation 경향과 매우 유사함을 보여 주었다. 즉 저인산화된 RB의 증가는 전사조절 인자인 E2F1과 계속적으로 복합체를 형성하게 됨으로써 E2F1의 기능을 정지시켜 세포조절 관련 유전자의 DNA 전사를 원활히 이루지 못하게 하며, E2F1 자체의 단백질 감소도 또한 핵 내에서의 기능을 수행하는데 저해되므로 세포주기 이탈에 깊이 관여하는 것으로 사료된다.

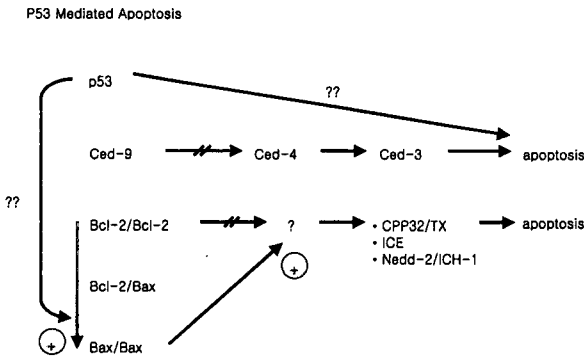


Fig. 12. General schematic diagram of p53-mediated apoptosis in signaling pathway.

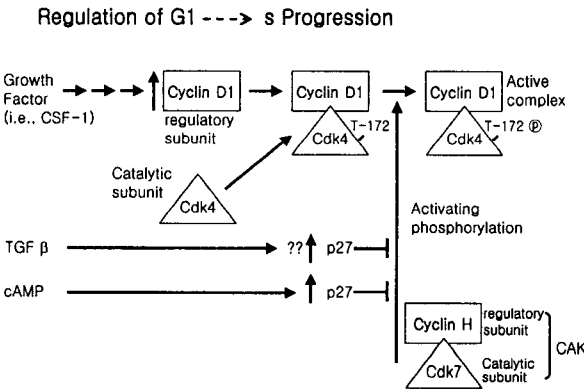


Fig. 13. General schematic diagram on regulation of G1 to S phase progression.

## 고찰

合歡皮는 콩과(Leguminosae)의 落葉喬木인 자귀나무 (*Albizia julibrissin Durazzini*)의 樹皮를 여름과 가을에 채취하여 햇볕에 말린 것이다. 자귀나무는 적응성이 비교적 강하고 耐寒性, 耐乾性이 있어서 중국의 華南, 西南, 華東, 東北, 河北, 河南, 湖北 등지 및 우리나라의 제주도와 황해도 이남에 분포한다. 건조시킨 樹皮는 원통 모양 혹은 반 원통 모양이고 길이는 30cm 이상이며 두께가 1-2mm에 이른다. 겉질이 얇고 균일하며 부드럽고 광택이 있는 것이 양품이다<sup>1,4)</sup>. 『神農本草經』에 “合歡 味甘平 主安五臟 利心志 令人歡樂無憂 久服輕身明目 得所欲”<sup>5)</sup>이라 수록된 후 明代 『本草綱目』에 이르러 “消腫癰 續筋骨”<sup>6)</sup>의 효능이 있는 것으로 기록하고 있다. 현재는 安神解鬱의 효능으로

心神不安, 憂鬱不眠을 치료하고 특히 活血消腫의 효능으로 肺癰, 癰疽瘡腫 등에도 이용되고 있다<sup>1,2)</sup>.

백혈병은 한의학에서 虛勞, 癥積, 熱勞, 急勞, 血證, 溫病, 積聚, 痰核 등의 범주에 속하는 조혈계의 악성질환인 혈액암이다. 그 주요한 病因病機를 살펴보면 內因으로는 勞傷, 饑飽, 房欲, 七情損傷, 外因으로는 溫熱毒邪侵襲 등이 있으며, 正氣가 不足한데 癌毒의 侵襲을 받아 正虛邪實되면 營陰과 骨髓가 損傷되어 生血이 不足하게 되고, 內熱이 薰蒸하고 迫血妄行하여 發生한다고 파악하고 있다<sup>36-38)</sup>. 韓醫學에서의 암치료는 환자의 正氣狀態 및 癌化의 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<sup>13-19)</sup>.

최근 백혈병은 인구 10,000명당 남성 4명, 여성 3명 정도로 추정되며 그 발생 빈도가 높아지고 있으므로 백혈병에 대한 기초적인 연구와 천연 항암물질의 개발이 계속적으로 이루어져야 할 것이다. 현재 기존 항암제의 부작용을 최소화하기 위하여 생약을 이용한 연구가 활발히 진행되어 朱木, 喜樹, 長春花로부터 taxol, camptothecin, vincristine 등의 항암제가 분리되었으며, 이는 항종양 연구에 약용 및 식용으로 이용할 수 있는 식물의 무한한 개발 가능성을 보여주고 있다. 우리나라의 산야에는 약용 및 식용으로 이용할 수 있는 식물이 많이 자생하고 있고, 이들 중에는 항암 효능을 가진 식물이 상당히 많이 있을 것으로 사료되므로 과학적인 실험을 통하여 천연물질의 항암효능을 검증하여야 할 것이다. 한의학에서도 최근 세포생물학적, 분자생물학적인 방법으로 한약재 및 복합처방들을 대상으로 그 유효성과 치료의 기전을 증명하는 실험들이 시행되고 있다. 이는 한의학의 우수성을 과학적으로 검증하는 매우 유익한 일이라 사료된다. 그러므로 본 연구는 콩과에 속하는 낙엽교목인 자귀나무의 樹皮를 건조한 合歡皮를 이용하여 백혈병 세포주인 Jurkat에 대한 apoptosis 유도효과를 살펴보고 그 항암효능을 증명하는 신호기전을 세포주기와 관련지어 밝히고자 하였다.

먼저 合歡皮 추출물이 Jurkat 세포의 세포사멸에 미치는 효과를 알아보기 위하여 合歡皮 추출물에 노출된 Jurkat 세포들의 활성을 trypan blue 용액과 MTT 측정으로 살펴본 결과, 合歡皮 추출물이 Jurkat 세포의 생존율을 처리 농도 의존적으로 점점 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 1, 2). 또한 이러한 세포들의 증식이 감소한 원인이 세포고사에 의한 것인지를 알아보기 위하여 合歡皮 추출물에 노출된 세포들의 외부 형태적인 특징을 현미경 하에서 관찰한 결과 세포막 외부 용기의 돌출현상과 사멸 소체를 배지 속에서 볼 수 있었다(Fig. 3). 이들 결과는 合歡皮 추출물의 성분이 Jurkat 세포의 성장을 억제하고 세포고사를 유도하는 효과가 있음을 보여준다. 일반적으로 세포는 세포독성 유발 물질, 성장 인자의 결핍, 바이러스 감염 등을 포함하는 다양한 종류의 외부자극에 의해 세포고사를 유도하는 것으로 알려져 있다<sup>39)</sup>. 그러나 세포의 종류와 자극물질의 농도에 따라서 물리적인 죽음을 초래하기도 하며 생리적인 죽음을 유도하기도 한다. 능동적인

고 생리적 죽음을 일컫는 apoptosis는 세포에 있어서 다양한 외부 형태적, 내부 생화학적 변화를 동반하는데 그 예로 세포의 크기가 축소되고, 세포막 융기가 돌출하는 현상이 생기며, 핵에서는 염색사 응축과 핵 분절 등의 변화가 동반된다<sup>40)</sup>. Fig. 3의 결과는 세포막의 융기가 돌출 되는 현상으로서 생리적 세포고사가 초래되는 현상과 잘 일치하므로 합歡皮가 Jurkat 세포의 성장을 억제시키면서 세포고사를 유도하는 것은 apoptosis에 의한 가능성이 클 것으로 추측된다. 핵 속에서 일어나는 일련의 염색체 변화로서 DNA의 크기가 180bp 크기의 분절된 형태로 검출되거나 완전한 DNA의 함량이 줄어드는 현상이 나타나면 apoptosis에 의한 세포고사가 진행되는 것으로 보고되고 있다<sup>41)</sup>. DNA fragmentation 실험을 실시한 결과 Fig. 4에서 보듯이 대조군에 비해 합歡皮 추출물을 처리한 실험군에서 oligonucleosome 크기의 DNA 분절(180bp)을 포함하는 apoptotic DNA ladder 현상이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이 결과는 백혈병 세포주인 Jurkat이 합歡皮 추출물에 노출되어 일어나는 세포사멸은 물리적인 세포고사가 아니고 생리적인 세포고사에 의한 것임을 보여주는 예이다. 최근 연구에 의하면 세포고사 유도물질들은 intracellular cysteine proteases인 caspase family를 활성화시켜 세포고사를 초래한다고 보고하였다<sup>28,29)</sup>. 현재 단백질 분해 기능을 가지면서 세포고사의 신호를 실행하는 효소로서 15종류의 caspases가 밝혀져 있고, 세포고사의 신호를 받게되면 caspases 계열이 활성화되는 cascade를 거치게 되고 최종적으로 활성화된 caspase-1, -3, 및 -4 등이 세포내의 생존신호에 관련된 단백질을 분해하여 불활성화 시키고 또한 세포골격단백질을 절단하여 구조적인 변화를 유발하여 세포고사를 실행한다<sup>42)</sup>. 그 중에서도 caspase-3는 caspase 활성화의 최종 단계에서 세포고사와 직접적으로 관련된 효소로서 평상시 불활성화한 zymogen 상태로 존재하다가 세포고사의 신호를 받아 복합체가 분리되어 활성화된 형태로 된다. Fig. 5에서 보듯이 32kDa 크기로 구성된 caspase-3는 합歡皮 추출물에 노출된 후 17kDa 크기의 활성화 된 형태가 증가하는 것을 볼 수 있었다. 활성화 된 이 효소의 표적 기질로는 현재 PARP, retinoblastoma, beta-catenin, fodrin, lamins, gelsolin 등이 알려져 있다<sup>30,32)</sup>. 그 중 PARP 및 beta-catenin의 단백질 분해 양상을 조사하기 위하여 Jurkat 세포 배양배지에 합歡皮 추출물을 농도별로 처리하고 24시간 동안 세포를 배양하였다. 그 결과 PARP는 116kDa의 완전한 크기의 단백질이 85kDa 크기로 분해되는 양상이 유도되었으며, 처리 농도가 높으면 높을수록 PARP 분해 정도가 증가함을 알 수 있었다(Fig. 6). 또한 5 $\mu$ g/ml의 저농도에서 wild type의 beta-catenin 단백질 수준이 감소하는 경향이 나타났으며, 처리 농도가 높으면 높을수록 beta-catenin 단백질 가수분해 정도가 증가함을 알 수 있었다(Fig. 7). 합歡皮 추출물 처리에 의한 PARP 및 beta-catenin 단백질의 분해현상은 caspase-3 활성화의 가장 주요한 증거 중의 하나이며 이를 통하여 세포고사의 현상이 일어남을 보여준다.

세포고사 관련 유전자로 잘 알려진 것으로 p53, Bcl-2 및 Bax들이 있으며, 이들의 단백질발현이 직·간접적으로 세포고사와 깊이 관련되어 있는 것이 알려지고 있다. 마이토콘드리아의

외막, 소포체나 핵막에 위치해 있는 Bcl-2 단백질은 림프종양 세포에서 얻어진 것으로 apoptosis를 억제하는 생리적인 기능이 Vaux(1988)<sup>43)</sup> 등에 의해 처음으로 밝혀졌다. 최근 연구에 의하면 p53가 세포고사가 진행되는 세포들에서 단백질 발현량이 증가하는 것으로 밝혀졌으며, 이 증가된 p53 단백질이 Bcl-2의 단백질 발현량을 억제시키고 Bax의 단백질 발현량을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Fig. 12). 그런데 본 실험에서는 합歡皮 추출물에 노출된 Jurkat 세포의 고사가 진행됨에도 불구하고 Bcl-2 및 Bax 단백질 발현수준의 정도가 대조군에 비해 차이가 없었다(Figs. 8, 9). 이러한 현상은 백혈병 세포주인 Jurkat이 wild type p53가 결핍되어 있기 때문에 apoptosis가 진행되는 동안에도 Bcl-2 및 Bax를 직접적으로 조절하지 못한 것으로 사료되며, 이와 동시에 Bcl-2와 Bax를 조절할 수 있는 다른 여러 경로의 신호기전도 Bcl-2 및 Bax를 조절하는데 관여하지 못하는 것으로 생각된다. 따라서 합歡皮 추출물에 의해 초래되는 Jurkat 세포의 고사는 Bcl-2와 Bax의 신호기전과는 무관한 다른 신호기전의 경로를 통하여 일어남을 의미한다.

D-type의 cyclin은 CDK와 결합하여 RB 단백질을 인산화시켜 세포주기 중 G1기에서 S기로의 전이를 촉진하는데 중요한 역할을 한다. 많은 암세포에서 cyclin D1의 과다발현이 관찰되었으며, 이는 끊임없는 세포증식과 관련되어 있음을 보여주었다(Fig. 13). D-type의 cyclin은 cyclin D1, cyclin D2 및 cyclin D3가 있으며 세포의 종류에 따라서 그 단백질 발현수준이 서로 상이하게 나타난다. 본 연구에서 cyclin D3 단백질의 발현수준은 Fig. 10에서 보여지듯이 대조군에서는 많은 양으로 검출되었으나 합歡皮 추출물을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 단백질 발현수준이 감소하였음을 보여주었다. 이는 G1기에 관여하는 3종류의 D-type cyclin 중 cyclin D3가 Jurkat T 세포에서 가장 현저하게 발현되는 것으로 볼 수 있으며, cyclin D3의 단백질 발현 감소 현상이 Jurkat T 임파구의 세포주기를 억제하여 세포고사를 유도하는 것으로 볼 수 있다. 정상세포에서 대부분의 CDK들은 cyclin, proliferating cell nuclear antigen(PCNA), p21WAF1과 4중 복합체를 형성하여 RB 단백질의 인산화에 관여한다. 이러한 기능을 가지는 CDK4의 단백질 발현수준을 세포고사가 진행되는 Jurkat 세포에서 검증하기 위하여 합歡皮 추출물을 위와 동일한 조건하에서 처리하였다. 그 결과 처리 농도가 높으면 높을수록 CDK4 단백질 발현수준이 감소하는 것을 보여주었다(Fig. 10). 이러한 kinase들은 그 자체의 활성이 저하되어 다른 단백질들에게 인산화를 유도하는 기능을 수행하지 못하기도 하지만 단백질 자체의 전체적인 양적 감소가 CDK4의 기능을 감소시키는 것으로 여겨진다. 이상의 결과에서 합歡皮 추출물이 Jurkat 세포의 고사를 촉진시키는 작용은 cyclin D와 CDK4 단백질의 양적 감소가 cyclin-CDK 복합체 형성을 억제시킴으로써 세포주기를 원활히 조절하지 못하여 일어남을 알 수 있다.

암억제유전자인 RB 단백질은 세포주기의 G1기에서 인산화된 상태로 존재하면서 E2F1과 결합하여 핵 내에서 전사인자로서의 기능을 수행하는데 방해하고 있다. 이러한 RB는 cyclin D-CDK 복합체에 의해 과인산화되어 불활성화되면 RB의 G1 정



지 기능은 상실된다. 물론 E2F1과 heterodimer를 형성하는 DP-1 또는 DP-2의 정상적인 기능을 동반하는 경우를 전제로 했을 때, RB가 결합하고 있던 E2F1을 유리시키게 되고, 활성화된 E2F1은 S기에서 DNA 복제에 필요한 여러 유전자들을 합성함으로써 세포주기는 G1기에서 S기로 진행하게 된다. 이처럼 세포주기 초기의 진행에 관련되어 중요한 역할을 수행하는 이들 유전자들의 변화를 살펴보기 위하여 습곡피 추출물의 농도를 증가시키면서 Jurkat 세포들을 24시간 동안 배양하였다. 그 결과 5 $\mu$ g/ml의 저농도에서 과인산화된 RB 단백질 발현 수준은 대조군에 비하여 다소 감소하였으며, 그 이후의 추출물 처리 농도가 높을수록 전체적인 단백질 발현의 감소비율이 점점 증가하였고, RB 단백질의 인산화 정도는 습곡피 추출물의 처리 농도에 의존하여 점점 감소되었으며, 30 $\mu$ g/ml 이상의 농도에서는 dephosphorylated된 RB의 형태가 현저하게 증가하여 cyclin D와 CDK의 단백질 발현 감소로 인해 결과적으로 CDK4의 기능인 RB 인산화 기능을 수행하지 못함으로써 저인산화된 RB가 증가된 것으로 생각된다. 이러한 저인산화된 RB는 계속적으로 E2F1과 결합하게 되어 세포주기의 진행을 방해하게 된다. 동일한 조건하에서 E2F1의 단백질 발현 수준을 Western blot으로 조사한 결과, 5 $\mu$ g/ml의 저농도에서는 대조군에 비하여 단백질 발현이 거의 감소되지 않았으나, 그 이후의 처리 농도에서는 습곡피 추출물의 처리 농도에 의존적으로 단백질 발현이 점점 감소하는 현상은 RB 단백질이 dephosphorylation 되는 경향과 매우 유사함을 보여 주었다. 즉 저인산화된 RB의 증가와 E2F1 단백질 자체의 발현 감소는 세포주기 조절과 관련된 유전자들을 자유롭게 전사조절하지 못하게 되므로 세포주기 이탈에 깊이 관여하는 것으로 사료된다.

이상으로 한약재인 습곡피가 혈액암인 백혈병을 치료하는데 천연물질로서의 개발 가능성이 있는지를 검증하기 위하여 세포주기 신호기전을 중심으로 실험한 결과 습곡피 추출물이 Jurkat 세포의 고사를 유도하였다. 그러나 습곡피 자체의 독성과 어떤 성분이 활성물질로서의 기능을 수행하는지는 더욱 연구할 필요가 있다고 사료된다. 또한 세포고사가 진행되는 경우 세포주기 조절 기능 이외의 역할을 배제할 수 없기 때문에 앞으로 더 많은 다른 신호기전의 중요성을 인식하고 습곡피와 세포고사 기전에 관한 연구가 계속되어야 할 것이다.

## 결 론

급성 림프성백혈병 세포주인 Jurkat에 대한 습곡피의 apoptosis 유도효과를 究明하고 그 항암효능을 증명하는 신호기전을 세포주기와 관련지어 밝히기 위하여 Jurkat 세포에 습곡피 추출물을 처리하여 세포의 생존률 및 형태학적 변화, DNA분절 현상, caspase-3의 활성 변화, PARP 및 beta-catenin 단백질의 가수분해현상, Bcl-2 및 Bax 유전자의 변화, Cyclin D3, CDK4, RB 및 E2F1 단백질의 발현수준의 변화를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

습곡피 추출물은 Jurkat 세포의 세포사멸을 농도 의존적으로 증가시켰고, Jurkat 세포의 세포막 파괴 및 외부 용기의 돌출

현상을 농도 의존적으로 증가시켰으며, Jurkat 세포의 DNA 분절을 농도 의존적으로 증가시켰다.

습곡피 추출물은 Jurkat 세포의 caspase-3의 활성화와 그에 따른 PARP 및 beta-catenin 단백질의 가수분해를 농도 의존적으로 증가시켰고, Bcl-2 및 Bax의 단백질 발현에 아무런 영향을 미치지 않았다. 또한 습곡피 추출물은 Jurkat 세포에서 cyclin D3와 CDK4 단백질 발현을 농도 의존적으로 감소시켰고, RB 단백질에 대한 저인산화 현상을 농도 의존적으로 증가시켰으며, E2F1의 단백질 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다.

이상의 결과로 볼 때 습곡피 추출물은 급성 림프성백혈병 세포주인 Jurkat 세포의 세포주기 진행을 위해 관여하는 필수적인 유전자들을 전사조절하지 못하게 함으로써 세포주기 이탈에 관여하여 세포고사를 유도하는 것으로 생각된다. 따라서 백혈병과 같은 혈액암을 치료하는데 천연물질로서 개발되어 유효하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 논문은 2001년도 원광대학교 교비 연구비지원에 의해 연구되었음.

## 참고문헌

1. 金昌玟 外, 完譯中藥大辭典, p.4669-4672, 圖書出版 鼎談, 서울, 1997.
2. 高學敏 主編, 中藥學(下冊), p.1323-1325, 人民衛生出版社, 北京, 2000.
3. 申信求, 申氏本草學(各論), p.543-544, 壽文社, 서울, 1988.
4. 鄭普燮 外, 圖解鄉藥大辭典(植物篇), p.660-661, 永林社, 서울, 1990.
5. 吳普 述著, 神農本草經(卷二), p.26, 醫道韓國社, 서울, 1976.
6. 上海中醫學院, 中草藥學, p.327-328, 商務印書館香港分館, 香港, 1983.
7. 圓光大學校第21期 編譯, 本草求真, p.60-61, 木과 土, 서울, 1999.
8. 李時珍, 本草綱目(交點本), p.2013-2014, 人民衛生出版社, 北京, 1978.
9. 謝觀, 中國醫學大辭典, p.982-983, 臺灣商務印書館, 臺灣, 1980.
10. Tang, W., & Eisenbrand, G., Chinese drugs of plant origin, Springer-Verlag, New York, 1992
11. Marx, J., How cells cycle toward cancer, Science, 263, p.319, 1994
12. Gordon, P., Stifled by inhibitions. Nature, 371, p.204, 1994
13. 郁仁存, 中醫腫瘤學, p.120, 176, 177, 306, 科學出版社, 北京, 1983.
14. 李岩, 腫瘤臨證備要, p.1, 11-26, 197, 201, 201, 人民衛生出版社, 北京, 1979.
15. 李岩, 腫瘤學, p.3, 29, 30, 95, 98, 人民衛生出版社, 北京, 1982.

16. 方藥中, 實用中醫內科學, 上海科學技術出版社, 上海, 1986.
17. 錢伯文, 腫瘤的辨證施治, p.1-10,48-63, 上海科學技術出版社, 上海, 1980.
18. 張代釗, 中西醫結合治療癌症, p.11-19, 55, 98, 99, 山西人民出版社, 山西, 1984.
19. 김현아, 임성우, 이철원, 韓藥을 이용한 抗癌 實驗研究의 傾向에 關한 考察, 大韓韓方腫瘍學會誌, 4(1), p.211-232, 1998.
20. Woo, W. S., Lee, E. B., and Shin, K.-H., A Review of research on plants for fertility regulation in Korea, *Kor. J. Pharmacogn.*, 12, p.153, 1981.
21. Moon, C. K., Lee, B. G., & Lee, S. H., Effects of antitumor polysaccharides from *Albizzia julibrissin* on immune function, *Arch. Pharm. Res.*, 8, p.277, 1985.
22. Yang, M. S., Ha, Y. L., Nam, S. H., Choi, S. U., and Jang, D. S., Screening of domestic plants with antibacterial activity, *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 38, p.584, 1995.
23. 李京淳 外, *Albizzia julibrissin* Durazz 엑기스의 抗真菌作用, 忠北大藥學論文集, 1, p.17-22, 1986.
24. Higuchi H, Kinjo J, Nohara T., An arrhythmic-inducing glycoside from *Albizzia julibrissin* Durazz. IV., *Chem. Pharm. Bull(Tokyo)*, 40(3), p.829-31, 1992.
25. Yoo, J. S., Jung, J. S., Lee, T. H., Son, K. H., Suh, H. W., Song, D. K., and Kim, Y. H., Inhibitory Effects of extracts from traditional herbal drugs on 5-Hydroxytryptophan-induced diarrhea in mice, *Kor. J. Pharmacogn.*, 26, p.355, 1995.
26. Kang, T. H., Jeong, S. J., Kim, N. Y., Higuchi, R., and Kim, Y. C., Sedative activity of two flavonol glycosides isolated from the flowers of *Albizzia julibrissin* Durazz, *J. Ethnopharmacol.*, 71, p.321, 2000.
27. Bicknell, G. R., Snowden, R. T., and Cohen, G. M., Formation of high molecular mass DNA fragments is a marker of apoptosis in the human leukaemic cell line. U937., *J. Cell Sci.*, 107, p.2483, 1994.
28. Martin, S. J., O'Brien, G. A., Nishioka, W. K., McGahon, A. J., Sadio, T., and Green, D. R., Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis, *J. Biol. Chem.*, 270, p.6425, 1995.
29. Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., and Yuan, J., Human ICE/CED-3 protease nomenclature, *Cell*, 87, p.171, 1996.
30. Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E., and Poirier, G. G., Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis, *Cancer Res.*, 53, p.3979, 1993.
31. An, B., and Dou, Q. P., Cleavage of retinoblastoma protein during apoptosis: an interleukin 1 beta-converting enzyme-like protease as candidate, *Cancer Res.*, 56, p.438, 1996.
32. Hwang, S. G., Park, J. U., Lee, H. C., Joo, W. H., Cho, Y. K., Moon, J. Y., Proteolysis of beta-catenin in apoptotic Jurkat cells, *J. Life Sci.*, 10, p.57, 2000.
33. Agarwal, M. L., Taylor, W. R., Chernov, M. V., Chernova, O. B., and Stark, G. R., The p53 network, *J. Biol. Chem.*, 273, p.1, 1998.
34. Hunter, T., and Pines, J., Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age, *Cell*, 79, p.573, 1994.
35. Weinberg, R. A., The retinoblastoma protein and cell cycle control, *Cell*, 81, p.323, 1995.
36. 具本泓 外, 東醫內科學, p.436-442, 書苑堂, 서울, 1985.
37. 陣貴廷 外, 實用中西醫結合診斷治療學, p.577 -589, 中西醫藥科技出版社, 北京, 1991.
38. 문구, 정병화, 김병주, 癌東西醫結合治療, 圓光大學校出版局, 익산, 1999.
39. Vaux, D. L., Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, p.786, 1993.
40. Wyllie, A. H., Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview, *Cancer Meta. Rev.*, 11, p.95, 1992.
41. Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S. A. J., Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation, *J. Cell Biol.*, 119, p.493, 1992.
42. Casciola-Rosen, L. A., Miller, D. K., Anhat, G. J., and Rosen, A., Specific cleavage of the 70-kDa protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein is a characteristic biochemical feature of apoptotic cell death, *J. Biol. Chem.*, 269, p.30757, 1994.
43. Vaux, D. L., Cory, S., and Adams, J., Bcl-2 gene promotes hemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells, *Nature*, 335, p.440, 1988.