

# K562세포의 apoptosis 유도에 미치는 저근백피의 효과

박혜련 · 나문희<sup>1</sup> · 윤용갑<sup>2</sup> · 전병훈<sup>2</sup> · 안원근<sup>1\*</sup>

부산대학교 치과대학 구강병리학교실, 1: 경북대학교 자연과학대학 생물학과, 2: 원광대학교 한의과대학

## Aqueous Root Extract of *Ailanthus altissima* Extract Induced Apoptosis in K562 Human Leukemia Cells

Hae Ryoun Park, Mun Hee Na<sup>1</sup>, Young Gab Yun<sup>2</sup>, Byung Hun Jeon<sup>2</sup>, Won Gun An<sup>1\*</sup>

*Department of Oral Pathology, College of Dentistry, Pusan National University,*

*1: Department of Biology, College of Natural Sciences, Kyungpook National University,*

*2: Department of Oriental medicine in Wonkwang University*

An increasing number of natural occurring chemical compounds have been identified to be potent in the treatment of various human diseases including cancer. Many of these substances are found in oriental herbs or plants. Recently, some chemopreventive extracts of herbs or plants have been shown to be anti-tumorigenic. Mixed extract of herbs or plants might contain different chemopreventive or chemotherapeutic effects. It is therefore very attractive and important to identify combination effects of mixed extract of herbs or plants. This study was designed to further investigate the anti-tumor effects of extracts of the aqueous root extract of *Ailanthus altissima* (REA) elucidate the potential mechanisms using an *in vitro* system. We found that the extracts of REA was able to induce cell cycle arrest at G1 phase and induce apoptosis in K562 cells in a time-dependent manner. During induction of apoptosis is accompanied by the cleavage of PARP and DNA fragmentation. The mechanisms mediated through down-regulation of bcl-2 protein and cleavage of caspase-3 in human leukemia HL-60 cells. Our results suggest that REA induces apoptosis in human leukaemic cell lines K562 and HL60

**Key words :** *Ailanthus altissima*; leukemia; apoptosis; PARP cleavage

### 서 론

생물체의 기본 단위인 세포가 죽는 방식에는 두 가지가 있다. 생체 스스로가 사멸 선고를 내리고 세포를 죽이는 apoptosis와 급격한 외부 환경의 변화나 요인에 의해 죽게 되는 necrosis가 있다. 이 중, apoptosis의 과정은 생명체가 태어날 때부터 유전자에 프로그래밍되어져 있다는 사실이 밝혀지면서 세포예정사(programmed cell death)라고도 불린다. Apoptosis는 개체의 발생 및 항상성을 유지하기 위하여 요구되어지는 기작으로서 정상적인 세포수의 조절이나 손상된 세포의 제거는 생체에 있어서 필수적인 과정이라고 할 수 있다<sup>1)</sup>. 세포에서 apoptosis가 유도될 때에는 여러 가지 형태학적 변화와 생화학적 변화를 수반하는

데, 세포막의 농포(membrane blebbing), 핵막의 구조단백질인 lamin-B의 분해에 의한 염색체의 응축<sup>2)</sup>, 미토콘드리아에서의 cytochrome c의 방출이 일어난다<sup>3)</sup>. 그리고 핵 내의 DNA가 분해되어 oligonucleosomal fragmentation이 되는 변화를 수반하여, 최종적으로 세포가 다양한 크기의 작은 세포 덩어리로 떨어져 나가는데 이것을 apoptotic body라 한다<sup>4)</sup>. 또한 최근의 보고에 의하면 세포 내 신호전달에 중요한 역할을 하는 몇몇 단백질이 apoptosis가 진행되는 동안 분해되는 것으로 알려져 있는데, 대표적인 것으로는 protein kinase C 그룹에 속하는  $\delta$  isoform 과 DNA repair 효소인 poly-ADP ribose polymerase (PARP) 단백질이 분해되는 것으로 보고되었다<sup>5)</sup>. 뿐만 아니라 bcl-2, myc, p53, fas 등과 같은 유전자들의 발현이 증감되거나 이들 유전자 관련 단백질의 합성이 조절된다고 보고되고 있다<sup>6-10)</sup>.

세포가 사멸하는 결정적인 요인은 미토콘드리아 내막과 외막이 겹쳐진 부위에 일어나는 세포사멸 유전자에 의하여 일어난다. Bcl-2 그룹은 주로 포유동물 미토콘드리아에서 세포의 운명

\* 교신저자 : 안원근, 부산시 서구 아미동 1가 10, 부산대학교 치과대학

· E-mail : wgan@pusan.ac.kr, · Tel : 051-240-7945

· 접수 : 2004/09/24 · 수정 : 2004/10/21 · 채택 : 2004/11/24

을 결정하는 역할을 한다<sup>11,12</sup>. 핵산손상, 성장인자 결핍 등의 세포죽음을 유도하는 많은 자극이 있으면 Bcl-2 그룹의 구성원들은 미토콘드리아의 막에 작용하여 cytochrome C, Apaf-1과 복합체를 형성하여 활성화되며 세포죽음을 유도한다. Caspases와 Bcl-2 그룹은 동물세포의 생존을 조절하는 신호전달 경로의 중요한 표적이 된다<sup>13-17</sup>. 저근백피(檣楳白皮)는 소태나무과(Simaroubaceae)에 속하는 중국 원산의 낙엽교목인 가중나무(혹은 가죽나무, *Ailanthus altissima*) 및 동속의 근연식물의 주피를 제거한 수피 또는 근피이다. 저근백피는 저(檣), 춘저(檣楳), 호목수(虎目樹), 호안(虎眼), 소백피등(小白皮等)의 이명(異名)을 가지고 있으며 우리나라 전지역에 분포하고 있다. 실험에 사용된 저근백피에는 merosin, tannin, phlobaphene, ailanthone, amarolide, acetylamarolide, quassin, nigakihemiacetal B(neoquassin) 등의 성분이 함유되어 있으며, 민간 및 한방에서 촌충구제, 고초열, 치질, 적백리(赤白痢) 및 지사 등의 목적으로 사용되었다<sup>18,29</sup>. 뿐만 아니라 저근백피는 아시아권에서 인체의 자궁암(子宮癌), 간암(肝癌), 장암(腸癌)을 치료하는데 응용되고, 우리나라에서도 전통적으로 항암 및 여러 질병치료에 많이 이용되고 있다. 그러나 저근백피의 이러한 효능에 대한 정확한 항암기전은 잘 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 저근백피의 항암작용에 대한 문헌을 근거로 저근백피 추출물이 만성 골수성 백혈병 세포주인 K562 세포와 급성 전골수구성 백혈병 세포주인 HL60 세포에서 apoptosis를 유도하는 과정에 관여하는 신호전달체계를 밝히고자 일련의 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. Cell culture

K562 세포주 (human chronic myelogenous leukemia cell line)와 HL-60세포주 (human acute promyelogenous leukemia cell line)는 RPMI-1640 (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL)과 10 mL/L의 antibiotic-antimycotic (GibcoBRL)을 첨가하여  $3 \times 10^6$ /mL 세포의 밀도를 유지하면서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 본 연구에서 사용된 저근백피는 볼로 녹여 그 성분을 추출했다.

### 2. MTT assay

96-well plate에  $2 \times 10^4$  cells/well 세포의 밀도로 100μL씩 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 12 시간 이상 세포를 안정화시켰다. CoCl<sub>2</sub>, DFX(desferrioxamine), 그리고 REA를 함께 처리하고 16 시간 동안 배양한 후 CellTiter 96® Non Radioactive Cell Proliferation Assay kit (Promega, Madison, WI, USA)의 dye solution을 15 μL/well씩 첨가하고 4 시간 더 반응시켰다. Stop solution 100 μL/well을 넣고 1 시간 뒤 570 nm 파장에서 흡광도를 측정했다.

### 3. Cell Cycle Analysis

$1 \times 10^6$ /ml 세포의 밀도로 분배하고 안정화시킨 후, 저근백피

를 처리하였다. 16 시간 후 PBS로 수세하고 75% ice-cold ethanol (EtOH)에서 24 시간 고정된 세포를 2,000 rpm에서 3분간 원심 분리하여 상등액을 제거하고, RNase A (100 μg/mL)를 함유한 propidium iodide (PI : 50 μg/mL of 0.1% NP-40)용액 1 mL에 현탁한 후, 4°C의 암소에서 30분간 반응시켰다. 염색한 각 세포의 DNA 함량은 flow cytometer (Becton Dickinson, FACS Calibur, France)로 분석하였다(PI detect : 발광파장 488 nm, 흡광파장 585 nm).

### 4. Western blot analysis

세포를 ice-cold PBS로 3회 수세한 다음 lysis buffer (protease inhibitor cocktail tablets (Roche, Germany) 1 tablet/50 mL TNES buffer (1 M Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.5 M EDTA, 5 M NaCl))를 100μL씩 첨가하여 단백질을 추출한 다음 4°C, 12,000rpm에서 10분간 원심 분리 (VS 15000CF, Vision Scientific Co., LTD, Korea) 하여 상등액을 모았다. BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, Korea)로 정량하고 동일량의 단백질 (50μg)을 sodium dodecyl sulfate-polyacryl amide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리한 후, nitrocellulose membrane (NC)에 transfer하였다. 이 NC를 5% non-fat dry milk를 함유한 Tris buffered saline-Tween (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 M NaCl, 0.1% Tween 20)으로 30분간 반응시켜 비특이적 단백질에 대한 반응성을 차단한 후 PARP, bcl-2, caspase 3에 대한 항체와 반응시키고, 각 항체들에 대한 2차 항체인 anti-mouse IgG 또는 anti-rabbit IgG 항체로 각각 1 시간씩 반응시켰다. 각 반응사이에서 TBS-T로 10분씩 3회, 30분 동안 수세하였다. 이어서 각 항체에 대한 대응 단백질 band는 enhanced chemiluminescence (ECL) detection 방법으로 확인하였다.

### 5. DNA fragmentation analysis

세포에 lysis buffer (1% NP-40, 20mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 7.5)를 100 μL씩 첨가하여 4°C에서 5분간 반응시킨 후 원심 분리하여 상등액을 분리하였다. 분리된 상등액에 1% SDS와 RNase A를 넣고 56°C에서 두 시간 반응시킨 후 Proteinase K를 50 μL 첨가하여 다시 37°C에서 반응시켰다. 반응된 DNA에 3 M sodium acetate (pH5.2)과 100% EtOH 첨가 후 4°C, 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상등액을 제거하고 1X tris-EDTA buffer (TE buffer)를 넣고 Agarose gel에 loading(50V)한 후 etidium bromide (EtBR)에 반응시킨 후 UV 하에서 확인하였다.

### 6. DNA staining

세포( $1 \times 10^5$  cells)를 PBS로 세 번 수세한 후, cytospin (Shandon, UK)을 이용하여 slide glass에 부착시킨 다음 PBS에 용해시킨 4% paraformaldehyde (pH 7.8) 로 상온에서 10분간 고정하고 PBS로 수세한 다음 DNA에 결합하는 염색약인 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)용액으로 5분간 염색하였다. 염색된 핵의 모양은 형광현미경 (Zeiss Jenaval-GTF-PA,

Germany) 하에서 ultraviolet excitation filter set 02 (excitation BPF 300-500 nm)를 통해 관찰하였다.

### 결과 및 고찰

Apoptosis는 세포 내부에 프로그램 된 신호를 따라 여러 유전자 및 단백질들의 발현과 활성이 조절되는 일련의 과정이다. Apoptosis의 형태적, 생리적 특징으로는 cytoplasm shrinkage, membrane blebbing, chromatin condensation, DNA fragmentation, 세포막을 이루는 지질인 phosphatidylserine의 세포 외부로의 노출, apoptotic body 형성 등이 보고되어 있다. Apoptosis의 세포신호전달 과정에 관여하는 단백질 중 Bcl-2 family에 속하는 여러 단백질들은 중요한 역할을 한다. 이들 중, Bax, Bad, Bid, Bcl-XS 은 apoptosis를 촉진하는 역할을 하며, Bcl-2나 Bcl-XL 등은 apoptosis를 억제한다. 또한 미토콘드리아도 Apoptosis의 과정 중 중요한 역할을 한다. 미토콘드리아는 세포 질에 cytochrome c를 방출하며, 방출된 cytochrome c는 Apaf1과 결합하여 cytochrome c/Apaf1 결합체를 형성한다. 이 결합체에 caspase-9이 결합함으로써 caspase-3 등의 다른 caspase들을 활성화시킴으로써 apoptosis를 유도하게 된다.

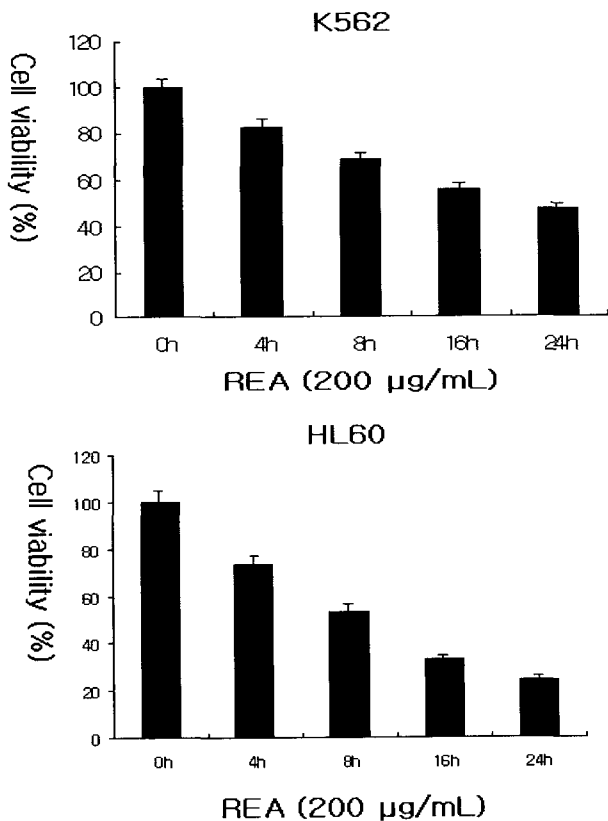


Fig. 1. Cell viability of K562 cells and HL60 cells after exposure of REA. Both cell lines were treated with REA (200 µg/mL) for 16 h and the number of viable cells was examined by MTT assay.

저근백피 (檉根白皮, aqueous root extract of *Ailanthus*

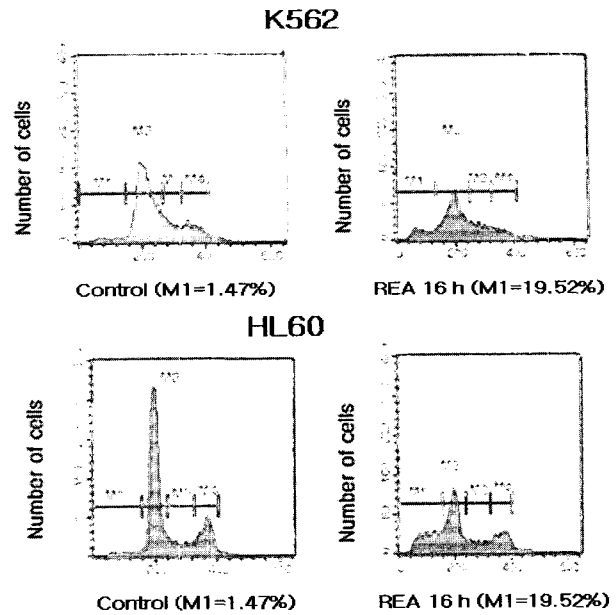


Fig. 2. FACS analysis of K562 cells and HL60 cells stained with PI. K562 cells and HL60 cells were treated with REA (200 µg/mL) for 16 h. (M1 = apoptosis)

altissima (REA))의 처리에 의한 K562 세포와 HL60세포의 생존률을 확인하기 MTT assay를 수행하였다. 세포의 생존률은 REA에 의하여 시간과 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 1). REA에 의한 apoptosis 비율을 확인하기 위해 세포의 주기 분석을 수행하였다. REA 처리 후 16시간이 경과하였을 때 K562 세포에서는 19.52% 그리고 HL-60세포에서는 30.08%의 apoptosis가 일어났다 (Fig. 2).

apoptosis와 관련된 신호전달 단백질들의 발현 양상을 Western blot analysis로 분석해 본 결과 REA의 처리에 의해 apoptosis의 whole marker인 PARP 단백질의 분해가 일어났다.(Fig. 3.).

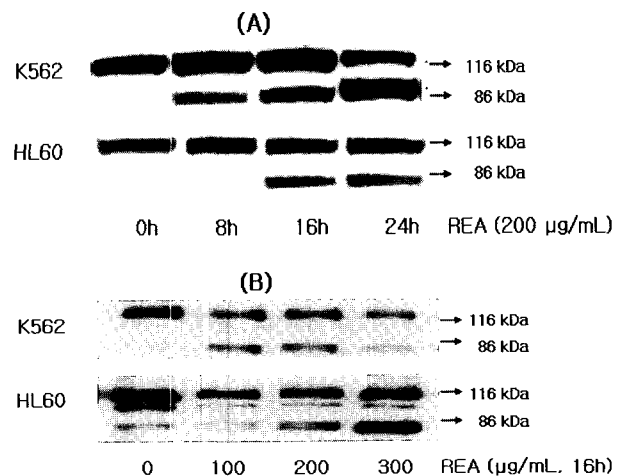


Fig. 3. Western blot analysis of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in K562 cells and HL60 cells. (A) Time-dependent effect of REA on the expressing of PARP in K562 cells and HL-60 cells. K562 cells and HL-60 cells were exposed to 200 µg/mL of REA for indicated time. (B) Dose-dependent effect of REA on the expressing of PARP in K562 cells and HL-60 cells. K562 cells and HL-60 cells were exposed to REA for 16h.

또한 REA에 의해 유도되는 apoptosis 과정에 관여하는 다른 인자인 Bcl-2와 caspase-3의 연관성을 확인하였다. 그 결과 저근백피를 처리하였을 때 HL60 세포주에서 Bcl-2의 활성이 시간이 경과함에 따라 감소되었다(Fig. 4).

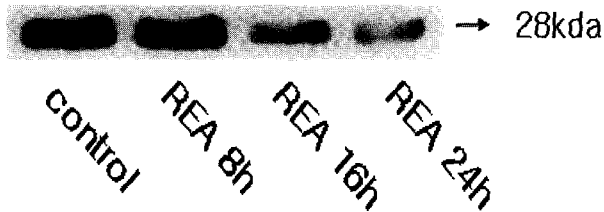


Fig. 4. Expression of bcl-2 in HL60 cells. Time-dependent effect of REA on the expressing of Bcl-2 in HL60 cells. HL-60 cells were exposed to 200 µg/mL of REA for indicated time.

Caspase-3는 세포가 사멸과정을 겪을 때 활성화되는 단백질 분해 효소 중의 하나인데 HL60 세포에서 저근백피에 의해 그 활성이 증가되었다. (Fig. 5). K562 세포에서도 같은 실험을 수행하였으나 이들 단백질의 발현을 확인할 수 없었다.

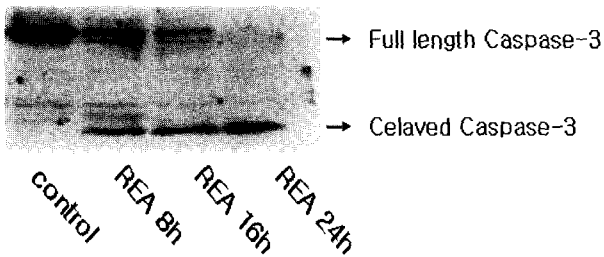


Fig. 5. Expression of caspase-3 in HL60 cells. Time-dependent effect of REA on the expressing of Caspase-3 in HL60 cells. HL-60 cells were exposed to 200 µg/mL of REA for indicated time.

REA의 DNA손상을 측정하기 위해서 DNA fragmentation analysis 실험과 DNA staining 실험을 수행하였다. REA를 K562 세포와 HL60세포에 각각 처리하여 16시간 경과 후 DNA fragmentation이 유도되었다.(Fig. 6). 그리고 REA를 처리하여 DAPI 염색을 통한 핵의 morphology를 확인한 결과 16시간 경과 후 핵의 단편화가 관찰되었다 (Fig. 7).

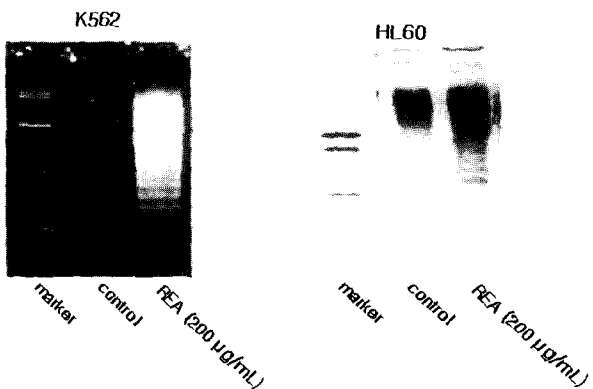


Fig. 6. DNA fragmentation analysis. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from K562 cells and HL60 cells treated with REA (200 µg/mL) for 16 h.

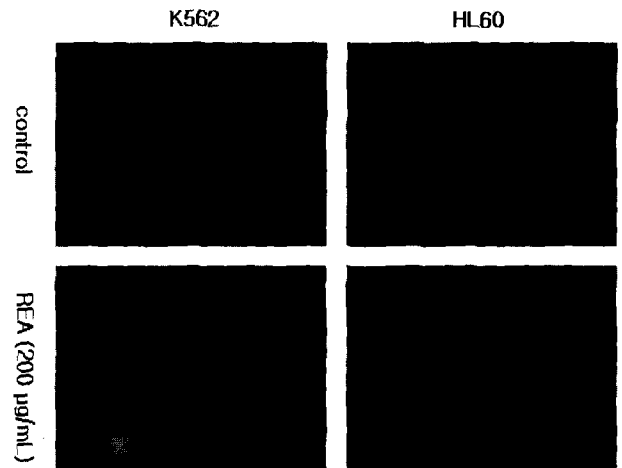


Fig. 7. Induction of apoptosis by REA in K562 cells and HL60 cells. K562 cells and HL60 cells were treated with REA (200 µg/mL) for 16 h. Fluorescent microscopy of cells stained with DAPI.

## 결론

본 연구에서는 저근백피의 항암작용에 대한 문헌을 근거로 저근백피 추출물(REA)로 만성 골수성 백혈병 세포주인 K562 세포와 급성 전골수구성 백혈병 세포주인 HL60 세포에 대한 apoptosis 유도를 조사하였다. REA는 K562 세포와 HL60 세포에 DNA 손상을 주어 세포 내부에 프로그램 된 신호를 따라 여러 유전자 및 단백질들의 발현과 활성을 조절하였다. Apoptosis의 특징인 DNA fragmentation 및 apoptotic body를 형성하였다. 또한 apoptosis의 과정 중 중요한 역할을 하는 Bcl-2를 분해하고 caspase-3를 활성화 시켰다. 본 연구를 통해 만성 골수성 백혈병 세포주인 K562 세포와 급성 전골수구성 백혈병 세포주인 HL60 세포의 사멸에 관련된 REA의 신호전달기전을 밝히기 위한 기초 자료를 제공할 수 있을 것으로 생각되며, 이를 통해 백혈병을 치료할 수 있는 신물질 개발의 기초를 마련할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 저근백피(REA)는 여러 가지 질병 치료제 및 항암제의 개발 가능성을 제시하였다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부의 한방치료연구기술 개발사업(02-PJ9-PG1-CO05-0003)에 의한 것임

## 참고문헌

1. Kerr J.F., Wylie A.H., and Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications tissue kinetics. Br J. Cancer 26, 239-257, 1972.
2. Ellis R.Z., Yuhan J. and Horvitz H.R. Mechanism and function of cell death. Annu. Rev. Cell Biol. 7, 663-98, 1991.
3. Shimizu T., Cao C.X., Shao R.G. and Pommier Y. Lamin B phosphorylation by protein kinase calpha and

- proteolysis during apoptosis in human leukemia HL60 cells. *J. Biol. Chem.* 273, 8869-8674, 1998.
4. Green D. and Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends in Cell Biol.* 8, 267-271, 1998.
  5. Tanaka Y., Yoshihara K., Tsuyuki M. and Kamiya T. Apoptosis induced by adenosine in human leukemia HL-60 cells. *Exp. Cell Res.* 213, 242-252, 1994.
  6. Bouchard V.J., Rouleau M. and Poirier G.G. PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Exp. Hematol.* 31, 446-454, 2003.
  7. Strasser A., Harris A.W., Bath M.L. and Cory S. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature.* 348, 331-333, 1990.
  8. Ehrmann J.J., Galuszkova D., Ehrmann J., Ivo K.R., Jezdinska V., Vojtesek B., Murray P.G. and Kolao Z. Apoptosis-related proteins, BCL-2, BAX, FAS, FAS-L and PCNA in liver biopsies of patients with chronic hepatitis B virus infection. *Pathol Oncol. Res.* 6, 130-135, 2000.
  9. Soengas M.S., Alarcon R.M., Yoshida H., Giaccia, A.J., Hakem R., Mak T.W. and Lowe S.W. Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science* 284, 156-159, 1999.
  10. Heiser D., Labi V., Erlacher M. and Villunger, A. The bcl-2 protein family and its role in the development of neoplastic disease. *Exp. Gerontol.* 39, 1125-1135, 2004.
  11. K.C. Zimmermann, C. Bonzon, D.R. Green. The machinery of programmed cell death, *Pharmacol. Ther.* 92, 57-70, 2001.
  12. J.C. Reed. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies, *Semin. Hematol.* 34, 9-19, 1997.
  13. G.M. Cohen. Caspases: the executioners of apoptosis, *Biochem. J.* 326, 1-16, 1997.
  14. N.A. Thornberry, Y. Lazebnik. Caspases: enemies within, *Science.* 281, 1312-1316, 1998.
  15. Mancini M., Nicholson D.W., Roy S., Thornberry N.A., Peterson, E.P., Casciola-Rosen L.A. and Rosen A. The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: Implications for apoptotic signaling. *J. Cell Biol.* 140, 1485-1495, 1998.
  16. Jung M.Y., Kang H.J. and Moon A. Capsaicin-induced apoptosis in SK-Hep-1 hepatocarcinoma cells involves Bcl-2 downregulation and caspase-3 activation. *Cancer Lett.* 165, 139-141, 2001.
  17. Xiao D, Choi S, Johnson D.E., Vogel V.G., Johnson C.S., Trump D.L., Lee Y.J., Singh S.V. Diallyl trisulfide-induced apoptosis in human prostate cancer cells involves c-Jun N-terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase-mediated phosphorylation of Bcl-2. *Oncogene.* 23, 5594-5606, 2004.
  18. 李尙仁 修書院, 本草學, 154, 1981.
  19. 陸昌洙 外 美丑社, 韓國本草學, 299, 1981.
  20. 전국한약의과대학 교수 공저 영림사, 서울, 본초학, 619-620, 2000.
  21. 안덕균 교회사, 서울, 본초도감, 138, 1988.
  22. 保健社會部 서울, 大韓藥典外韓藥(生藥)規格集, 111, 1984.
  23. 陸昌洙 아카데미서적, 서울, 原色韓國藥用植物圖鑑, 제 4 판, 325, 1993.
  24. 江蘇新醫學原院(中國) 下冊, 上海, 中藥大辭典, 제 1 판, 2587-2589, 1979.
  25. 赤松金芳 醫齒藥出版社, 東京, 新訂和漢藥, 제 1 판, 289-290, 1970.
  26. 許鴻源 台北, 行政院衛生署中醫藥委員會, 少用中藥之研究, 제 1 판, 65-66, 1974.
  27. Kim J., Choi J.W., Kim H.K., Park S.W. and Lee C.K. Studies on the Biologic Activities of the Constituents of Ailanthi Cortex Radicis(1) - Effects of Methanol Extract and its Chloroform Fraction on Expoxide Hydrolyzing System in Liver -. *Kor. J. Pharmacogn.* 25, 47-50, 1994.
  28. Chang Y.S., Moon Y.H. and Woo E.R. Virus-Cell Fusion Inhibitory Compounds from Ailanthus altissima Swingle. *Kor. J. Pharmacogn.* 34, 28-32, 2003.
  29. Choo H.K., Kim S.K. and Rho Y.S. Studies on Antibacterial activities in Ailanthus altissima Swingle Tar. *Bull. K H Pharma Sci.* 12, 57-59, 1984.