섬수 추출물에 의한 T24 인체 방광암세포의 증식억제에 관한 연구

박태열 · 박 철[1] · 윤화정 · 최영현[1] · 고우신*

동의대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실, 1:생화학교실 및 한의학연구소

Growth Arrest by Bufonis Venenum is Associated with Inhibition of Cdc2 and Cdc25C, and Induction of p21WAF1/CIP1 in T24 Human Bladder Carcinoma Cells

Tae Yeol Park, Cheol Park[1], Hwa Jung Yoon, Yung Hyun Choi[1], Woo Shin Ko*

Department of Otorhinolaryngology & Dermatology 1:Department of Biochemistry, Dongeui University College of Oriental Medicine and Research Institute of Oriental Medicine

Bufonis venenum (dried toad venom; Chinese name, Chan su) is a traditional Chinese medicine obtained from the skin venom gland of the toad. It has long been used in treating arrhythmia and other heart diseases in China and other Asian countries. Additionally, Bufonis venenum has been reported to selectively inhibit the growth of various lines of human cancer cells. In the present study, it was examined the effects of extract of Bufonis venenum (EBV) on the growth of human bladder carcinoma cell line T24 in order to investigate the anti-proliferative mechanism and induction of apoptosis by EBV. Treatment of T24 cells to EBV resulted in the growth inhibition, morphological change and induction of apoptotic cell death in a dose-dependent manner. Flow cytometric analysis revealed that EBV treatment caused G2/M phase arrest of the cell cycle and down-regulation of cyclin A, cyclin B1 and Cdc2, which was associated with a marked up-regulation of cyclin-dependent kinases (Cdks) inhibitor p21(WAF1/CIP1) in a p53-independent manner. The Cdc25C expression was also significantly inhibited by EBV treatment, however Wee1 kinase expression was not affected. The induction of apoptotic cell death by EBV was connected with down-regulation of anti-apoptotic Bcl-XS/L expression without alteration pro-apoptotic Bax expression. Taken together, these findings suggest that EBV may be a potential chemotherapeutic agent for the control of human bladder carcinorma cells and further studies will be needed to identify the active compounds that confer the anti-cancer activity of EBV.

Key words : Bufonis Venenum, T24 bladder carcinoma, cell cycle, Cdc2, Cdc25C, inhibitor p21

서 론

방광암(膀胱癌)은 한의학에서 "혈림(血淋)", "뇨혈(尿血)", "융폐(癃閉)", "익혈(溺血)" "소변불통(小便不通)" 등의 범주에 속한다[1,2]. 2001년도 국민건강보험공단의 통계에 의하면 방광암은 우리나라 7대 암 이며 5대 남성 암을 차지할 만큼 많은 환자가 매년 발생되고 있고 발병빈도 또한 점차 증가추세다. 방광암의 원인으로는 인공감미료, 화학물질, 기생충, 만성자극 및 염증, 흡연 등이 거론되고 있으나 아직도 불분명한 점이 많다[3]. 방광암은 크게 '표재성방광암'과 '침윤성방광암'으로 구분하며 재발이 잘되는 특징이 있는데 대개 '표재성방광암'이 '침윤성방광암'으로 진행할 확률은 10~25%정도이고 재발 확률은 약 70%에 이른다[4].

한의학에서 종양의 치료는 청열해독(淸熱解毒), 화담연견(化痰軟堅), 활혈거어(活血祛瘀), 행기산결(行氣散結), 이독제독(以毒除毒), 외치항암법(外治抗癌法) 등의 거사법(祛邪法)과 건비익기(健脾益氣), 건비보신(健脾補腎), 익기보혈(益氣補血), 자음온양(滋陰溫陽) 등의 부정법(扶正法)[5]으로 대별되는데 최근 방광암에

* 교신저자 : 고우신, 부산시 부산진구 양정동 산45-1 동의대학교 한의과대학
· E-mail : wsko@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-8657

· 접수 : 2004/08/03 · 수정 : 2004/09/03 · 채택 : 2004/10/04

대한 한방 치료는 약물 내복법[1-3,5] 및 방광내주입법[1-3,5,6], 첩부법[7], 위법[8], 추나[9], 약침[1,5], 침구[9] 등 다양한 외치법이 사용되고 있고 서양의학에서는 수술 및 각종화학요법, 방광내면역요법[10], 방광내화학요법[10], '방사선요법', '광역학요법' 등으로 치료하고 있으나 동·서양의학을 막론하고 아직까지는 완전히 예방 또는 치료할 수 있는 것은 아니며 치료에 있어서 각종 부작용 및 감수성 차이, 재발 및 합병증의 문제점[11] 등으로 인하여 기존 치료제의 단점을 보완한 새로운 방광암 치료제의 개발이 절실히 요구된다할 것이다.

섬수(또는 섬소, 蟾酥)는 해독소종(解毒消腫)[12], 통규지통(通竅止痛)[5]하는 효능이 있어서 라력(瘰癧), 일절악창(一切惡瘡), 소아감질(小兒疳疾) 등[13]에 효과가 있고, 외용하면 공독요창(攻毒療瘡)한다고 하였다[11]. 최근 연구에 의하면 섬소독소(蟾酥毒素, cinobufotoxin, $C_{40}H_{62}O_{11}N_4$), 화섬소소(華蟾酥素, cinobufalin, $C_{26}H_{36}O_7$), 화섬소차소(華蟾酥次素, cinobufotalodon, $C_{24}H_{34}O_6$) 및 기타 강심작용이 있는 성분 등을 함유하였는데[11] 임상적으로 울혈성 심부전증, 국소마취, 간암, 식도암, 분문암, 위암, 피부암, 유선암 및 백혈병 등에 활용되고 있으며[11,14] 각종 암성 동통에도 응용하였으나[8] 방광암의 치료에 적용한 사례는 접하기 어려웠다.

이에 본 연구자는 이와 같은 항암 및 진통효능이 있는 섬수를 방광암치료제로 개발하여 방광암의 치료에 사용된다면 매우 유의한 항암외치요법제가 될 수 있을 것으로 판단되어 이에 기초가 되기 위하여 섬수의 T24 인체방광암세포에 대한 항암효과를 확인하기위하여 먼저 세포주기에 관여하여 암세포의 증식을 억제하는 항암기전에 관한 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

1. 암세포배양 및 시료의 처리

본 연구에 사용된 T24 인체 방광암세포는 한국생명공학연구소에서 분주 받아 사용하였으며, 암세포의 배양을 위해 90%의 RPMI-1640 배지 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10% fetal bovine serum (FBS)에 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 성장배지를 사용하여 37℃, 5% CO_2 조건 하에서 배양하였다. 본 실험에 사용된 섬수 분말은 정도약업사(서울)에서 구입하였으며 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 적정농도로 희석하였다. 섬수추출물(extract of Bufonis Venenum, EBV)을 암세포에 처리하기 위해서 적정 농도로 성장배지에 다시 희석한 후, 주사기용 필터유닛(pore size; 0.22 ㎛)을 사용하여 불순물을 걸러낸 다음 사용하였다.

2. MTT assay에 의한 세포 성장억제 조사

세포배양용 6 well plate에 well 당 $4x10^4$개의 T24 방광암세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 섬수 추출물을 배지에 희석하여 처리한 후 배양하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Sigma)를 0.5 ㎎/㎖ 농도로 희석하여 200 ㎕씩 분주하고 3시간동안 처리하였다. 3시간 후 MTT 시약을 제거하고 DMSO를 100 ㎕씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 정상 배지에서 배양된 암세포와 섬수 추출물이 처리된 배지에서 배양된 세포들의 성장률을 비교하였다.

3. Flow cytometry를 이용한 세포주기 분석

암세포의 세포주기 분포도에 미치는 섬수 추출물의 영향을 알아보기 위하여 Cycle TEST PLUS kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 사용하였으며, 정상 및 섬수 추출물이 함유된 배지에서 48시간 배양된 암세포들을 buffer solution을 이용하여 두세 번 씻어내고, Cycle TEST PLUS solution A 및 B를 상온에서 각각 10분씩 처리한 후 Cycle TEST PLUS solution C를 처리하여 4℃에서 30분 동안 염색하였다. 이를 nylon mesh로 세포를 하나씩으로 분리시킨 후 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 ModiFit LT (Becton Dickinson) 프로그램으로 분석하였다.

4. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction 분석

동일한 조건에서 준비된 암세포를 대상으로 TRIzol B(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, ONE-STEP RT-PCR PreMix (iNtRON BIOTECHNOLOGY, Korea)를 이용하여 2 ㎍의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 사용하여 관찰 대상 유전자(Table 1)를 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였다. 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)로 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

5. 단백질의 분리, 전기영동 및 Western blotting

선행 방법에 준하여 정상 및 섬수 추출물이 처리된 배지에서 자란 세포들을 lysis buffer로 용해한 후, 고속원심분리로 세포내 잔사물을 분리시킨 후 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다[15]. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 4℃에서 1시간 이상 배양하면서 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하였다. 그리고 특정 단백질에 대한 항체를 membrane에 적용시켜 항원 항체 반응을 일으킨 후, PBS-T로 씻어내고 특정 항체에 대한 이차 항체 반응을 실시한 후 ECL (Enhanced Chemi Luminoesence) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)

및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며, 이차 항체로 사용된 horseradish peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다.

Table 1. Gene-specific primers for RT-PCR

Gene name		Sequence
Cyclin A	Sence	5'-TCC-AAG-AGG-ACC-AGG-AGA-ATA-TCA-3'
	Antisence	5'-TCC-TCA-TGG-TAG-TCT-GGT-ACT-TCA-3'
CyclinB1	Sence	5'-AAG-AGC-TTT-AAA-CTT-TGG-TCT-GGG-3'
	Antisence	5'-CTT-TGT-AAG-TCC-TTG-ATT-TAC-CAT-G-3'
Cdc2	Sence	5'-GGG-GAT-TCA-GAA-ATT-GAT-CA-3'
	Antisence	5'-TGT-CAG-AAA-GCT-ACA-TCT-TC-3'
Cdk2	Sence	5'-GCT-TTC-TGC-CAT-TCT-CAT-CG-3'
	Antisence	5'-GTC-CCC-AGA-GTC-CGA-AAG-AT-3'
p53	Sence	5'-GCT-CTG-ACT-GTA-CCA-CCA-TCC-3'
	Antisence	5'-CTC-TCG-GAA-CAT-CTC-GAA-GCG-3'
p16	Sence	5'-CGG-AAG-GTC-CCT-CAG-ACA-TC-3'
	Antisence	5'-TCA-TGA-AGT-CGA-CAG-CTT-CCG-3'
p21	Sence	5'-CTC-AGA-GGA-GGC-GCC-ATG-3'
	Antisence	5'-GGG-CGG-ATT-AGG-GCT-TCC-3'
p27	Sence	5'-AAG-CAC-TGC-CGG-GAT-ATG-GA-3'
	Antisence	5'-AAC-CCA-GCC-TGA-TTG-TCT-GAC-3'
Bax	Sence	5'-ATG-GAC-GGG-TCC-GGG-GAG-3'
	Antisence	5'-TGG-AAG-AAG-ATG-GGC-TGA-3'
Bcl-2	Sence	5'-CAG-CTG-CAC-CTG-ACG-3'
	Antisence	5'-GCT-GGG-TAG-GTG-CAT-3'
Bcl-XS/L	Sence	5'-CAG-CTG-CAC-CTG-ACG-3'
	Antisence	5'-GCT-GGG-TAG-GTG-CAT-3'
GAPDH	Sence	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	Antisence	5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

결과 및 고찰

1. 방광암세포의 증식에 미치는 섬수 추출물의 영향

준비된 섬수 추출물을 인체 방광암암세포 T24에 48시간 동안 처리한 후, MTT assay에 준하여 섬수 추출물 처리에 의한 T24 방광암세포의 세포증식 억제 정도를 조사하였다. 실험방법에 서술한 것처럼 섬수 추출물이 처리된 T24 세포를 대상으로 ELISA reader를 이용하여 얻은 흡광도 결과는 Fig. 1B와 같다. Fig. 1B에서 알 수 있듯이 50 ng/ml 처리군에서 이미 45% 정도의 성장 억제 효과를 관찰할 수 있었으며, 섬수 추출물 처리 농도가 증가될수록 흡광도는 더욱 감소되어 150 - 200 ng/ml 처리군에서는 정상 배지에서 배양된 암세포에 비하여 30% 이하의 생존율을 보였다. 섬수 추출물 처리에 의한 증식 억제와 연관된 암세포의 형태 변화 관찰을 위하여 다양한 농도 범위로 섬수 추출물을 48시간 동안 처리한 후 위상차 현미경을 이용하여 정상 및 섬수 추출물이 처리된 조건에서 배양된 암세포의 모양을 관찰하였다. Fig. 1A에서 볼 수 있듯이 섬수 추출물의 농도 증가에 따른 암세포의 심한 형태적 변형이 관찰되었는데, 처리된 섬수 추출물의 농도가 증가될수록 전체적으로 세포질이 응축되었다. 또한 세포의 모양이 길어지면서 돌기와 같은 형태가 분지를 이루기 시작하였고, 고농도 처리군에서는 많은 암세포들이 부착 능력이 상실되어 배지위로 부유하기 시작하였으며 배양 접시에 부착된 세포들도 심한 형태적 변이를 수반하였다.

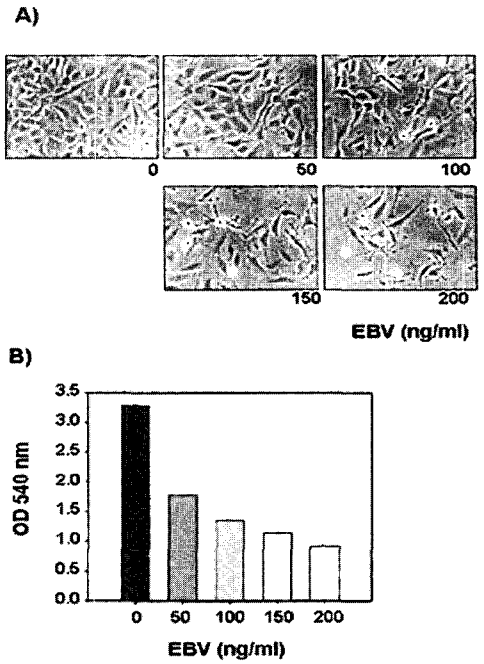

Fig. 1. Anti-proliferative effect and morphological changes in T24 human bladder carcinoma cells following incubation with extract of Bufonis Venenum (EBV). Cells were seeded as described in materials and methods, and treated with various concentrations of EBV. After 48 h incubation with EBV, cell morphology was visualized by light microscopy (A), Magnification, ×200) and MTT assay was performed. Results are expressed as average from two separate experiments (B).

2. 세포주기 분포에 미치는 섬수 추출물의 영향

세포 증식과 연관된 세포주기의 조절은 각 주기별 관여하는 다양한 유전자들에 의해 조절되는데, 기본적으로 세포주기 checkpoint 각 시기에 요구되어지는 양성 조절인자인 cyclins에 의하여 cyclin-dependent kinases (Cdks)의 연속적인 활성과 불활성이 결정되어진다[16,17]. 세포주기 조절의 관점에서 암세포는 세포주기의 비정상화에 기인된 질병으로 정의 될 수 있으며, 특정 시기의 세포주기 억제는 세포주기 조절 양성인자의 발현 저하 또는 음성 조절 인자의 과발현에 의한 것으로 요약될 수 있다[17,18]. 따라서 섬수 추출물의 처리에 의한 방광암세포의 성장억제가 세포주기 특정 시기의 진행억제와 연관성을 지니는지의 여부를 조사하기 위하여 세포주기 분포에 미치는 섬수 추출물의 영향을 조사하였다. 이를 위하여 정상 및 다양한 농도의 섬수 추출물이 처리된 배지에서 48시간 배양한 후 flow cytometry를 이용하여 분석한 결과는 Fig. 3 및 Table 2에 나타낸 바와 같다. 즉 섬수 추출물이 함유되지 않은 정상 배지에서 자란 암세포의 경우 G1, S 및 G2/M기에 해당되는 세포의 빈도는 약 54.04%, 18.24% 및 26.60% 정도였다. 그러나 섬수 추출물이 처리된 암세포의 경우 처리 농도가 증가될수록 G1기에 해당되는 세포군의 빈도는 점차 감소되어 200 ng/ml 처리군의 경우 44.01%였으며, G2/M기에 해당되는 세포의 빈도는 35.39%로 증가되었다. 한편 apoptosis에 의한 암세포의 사멸을 의미하는 sub-G1기에 해당되는 세포의 빈도는 대조군에서 1.12%였으나, 200 ng/ml 처리군에서는 4.93%로 약 4.4배 증가되었다. 즉 섬수 추출물 처리에 의한

T24 방광암세포의 증식 억제는 세포주기 G2/M arrest 및 apoptosis 유발과 다소 연관성이 있음을 알 수 있었다.

Table 2. Fractions of each cell cycle phase of T24 human bladder carcinoma cells cultured in the presence or absence of various concentration of EBV for 48 h.

EBV (ng/ml)	% of the cells			
	sub-G1	G1	S	G2/M
0	1.12	54.04	18.24	26.60
25	2.19	51.29	18.52	28.00
50	4.32	49.91	17.63	28.14
100	4.80	46.03	17.78	31.39
200	4.93	44.01	15.67	35.39

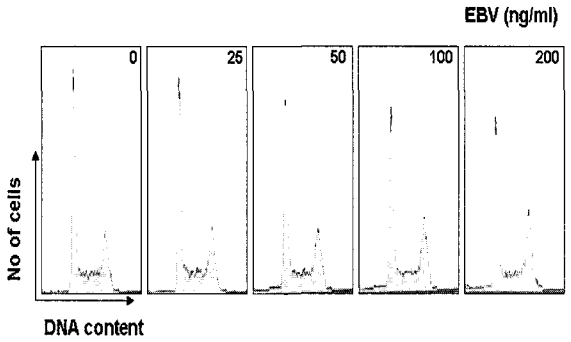

Fig. 2. DNA-flourescence histogram of T24 cell nuclei after treatment with EBV. Exponentially growing cells at 50% confluency were treated for 48 h with indicated concentrations of EBV. Cells were trypsinized and pellets were collected. The cells were fixed and digested with RNase, and then cellular DNA was stained with PI, and analyzed by flow cytometry.

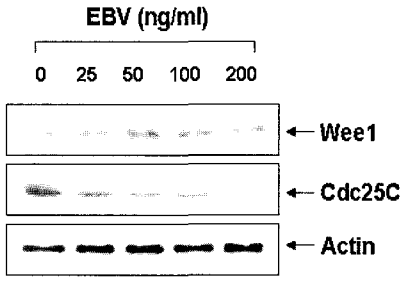

Fig. 3. Effects of EBV treatment on the levels of cyclin A and cyclin B1 in T24 human bladder carcinoma cells. (A) Cells were incubated with EBV for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using cyclin A and cyclin B1 primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with EBV for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10% SDS polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The memoranes were probed with the anti-cyclin A and anti-cyclin B1 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

3. Cyclins 및 Cdks의 발현에 미치는 섬수 추출물의 영향

일반적으로 진핵세포에서 세포주기의 진행을 위해서는 세포주기 특이적인 cyclin의 발현 증가가 우선적으로 이루어져야한다. 즉 mid G1에서 D-type cyclin (cyclin D1, D2 및 D3)의 발현을 필요로 하며, late G1에서 S기로의 진입을 위해서는 cyclin E의 발현이 증가되어야한다[16,17]. 그리고 S기에서 G2기로의 진입 및 G2기와 M기 진행 동안에는 각각 cyclin A 및 B-type cyclin (cyclin B1 및 B2)의 발현이 증가되어야한다. 그리고 이들 cyclin들은 특정 Cdks와 특이적인 결합에 의하여 cyclin/Cdk complex를 형성하여 세포주기진행을 조절한다[18]. 특히 Cdk2는 cyclin A와 결합하여 S기와 G2기 동안 역할을[19,20] 하는 반면 Cdc2는 cyclin B1과 결합하면 핵막의 histone H1과 lamin이 인산화에 의해 kinase 활성이 증가하여 핵막의 붕괴 및 염색체의 재배열이 일어나서 M기로 진행이 된다[21,22]. 상기 결과에서 알 수 있듯이 섬수 추출물의 처리에 의한 인체 방광암세포의 증식 억제효과는 세포주기 G2/M arrest와 연관되어 있었기에, G2/M기 조절관련 cyclins 및 Cdks의 발현에 미치는 섬수 추출물의 영향을 RT-PCR 및 Western immunoblotting 법으로 조사하였다.

Fig. 3의 결과는 cylcin A 및 cyclin B1에 관한 결과로서 섬수 추출물의 처리 농도가 증가될수록 두 유전자의 전사 및 번역 수준 모두에서의 발현의 정도가 다소 감소되는 경향성임을 알 수 있었다. 그리고 cyclin A 및 cyclin B1과의 결합을 통하여 G2/M기 진행 조절에 중요한 역할을 하는 Cdk2 및 Cdc2의 발현에 미치는 섬수 추출물의 영향을 조사한 결과는 Fig. 4에 나타낸 바와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 Cdc2 및 Cdk2 발현 모두가 섬수 추출물의 처리 농도 증가에 따라 점차 감소되었으며, 특히 Cdc2의 단백질 발현은 저농도 처리군(25 및 50 ng/ml)에서 부터 매우 감소되어 고농도 처리군(100 및 200 ng/ml)에서는 거의 발현이 되지 않았음을 알 수 있었다. 이상의 결과에서 T24 방광암세포에서 섬수 추출물 처리에 따라 조사된 4가지 유전자의 발현이 점진적으로 감소되었으나 Cdc2의 단백질 수준이 특이적으로 크게 감소된 점으로 미루어 세포주기의 G2/M기 진행의 억제 현상에 Cdc2의 감소가 아마도 중요한 요인으로 작용한 것으로 추정이 된다.

4. p53 및 Cdk inhibitors의 발현에 미치는 섬수 추출물의 영향

Cdk inhibitors는 cyclin/Cdk complex와 결합하여 그 활성을 억제하는 것으로 알려져 있는데[18,23], 특히 CIP/KIP 군에 속하는 p21은 종양 억제유전자인 p53에 의하여 활성화되어 G1기 뿐만 아니라 G2/M기를 포함한 전체 세포주기의 진행을 억제하는 주요한 조절인자이다[24,25]. p21의 활성화에는 p53이 관여하는 것이 일반적이지만 세포주나 항암제 및 후보물질의 종류에 따라서 p53 비의존적인 경로를 통하여 p21이 활성화된다고도 알려져 있다[26-30]. 그러나 p16의 경우 일반적으로 G1기 arrest에만 관여하는 것으로 알려져 있으며, p27 역시 G1기 arrest에 중요하지만 부분적으로 G2/M기 arrest에도 관여할 수 있는 것으로 보고되어지고 있다[18,23].

따라서 본 연구에서는 섬수 추출물의 처리에 의한 인체 방광암세포의 G2/M기의 억제 유발에 종양 억제 유전자 p53 및 p16, p21 그리고 p27과 같은 Cdk inhibitors들의 관련 여부를 조사하였다. Fig. 5의 결과에서 알 수 있듯이 p53, p16 및 p27은 전사수준과 단백질 발현 모두에서 섬수 추출물의 처리에 따른 변화가 관찰되지 않았으나, p21은 전사 및 번역 수준에서 모두 그 양이 증가하였다. 따라서 T24 방광암세포에서 섬수 추출물에 의한 p21 유전자의 발현 증가는 p53 비의존적인 경로를 통하여 조절될 수 있음을 알 수 있었고, Cdc2의 발현 억제와 함께 G2/M

기 arrest 유발에 p21의 발현 증가가 관여하였음을 알 수 있었다.

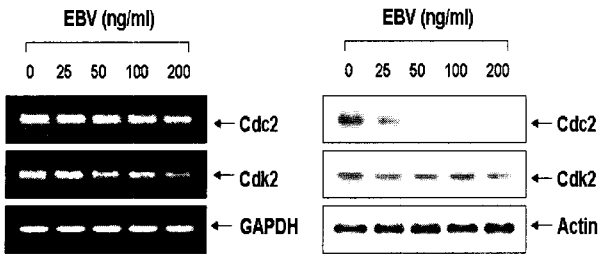

Fig. 4. Effects of EBV treatment on the levels of Cdc2 and Cdk2 in T24 human bladder carcinoma cells. (A) Cells were incubated with EBV for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using Cdc2 and Cdk2 primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with EBV for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-Cdc2 and anti-Cdk2 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

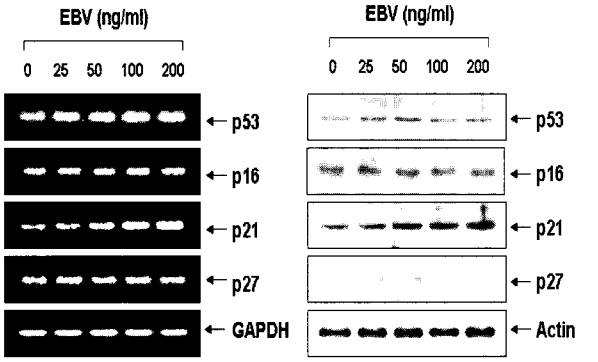

Fig. 5. Induction of Cdk inhibitor p21 by EBV treatment in T24 human bladder carcinoma cells. (A) Cells were incubated with EBV for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using indicated primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with EBV for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10% or 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

5. p53 및 Cdk inhibitors의 발현에 미치는 섬수 추출물의 영향

한편 Cdc2의 활성은 cyclin B와의 결합에 의해서 뿐 만 아니라 Cdc2 자체의 인산화 정도에도 영향을 받는다. 즉 Cdc2의 Tyr15 잔기가 탈인산화된 상태에서 cyclin B와 결합을 할 경우에만 Cdc2는 활성을 띠게 되고 비로소 세포주기는 mitosis로 진행 가능하다. Cdc2를 인산화하여 그 활성을 조절하는 kinase로는 Wee1으로 알려져 있는데[31], Wee1은 세포가 mitosis로 들어갈 수 있는 조건이 될 때까지 Cdc2의 Tyr15 잔기를 인산화하여 그 활성을 억제한다[32,33]. Wee1 또한 mitosis 동안 그 활성이 억제되어야하는데, Wee1의 불활성화를 위하여 작용하는 kinase들은 Cdc2와 nim1/cdr 등으로 알려져 있다. 이렇게 인산화된 Wee1은 late G2와 mitosis 동안 불활성화된 상태로 유지되어진다[34,35]. Cdc2에 대한 Wee1의 작용과는 반대로 작용하여, 세포주기를 G2기로부터 mitosis로 진행하는데 역할을 하는 것이 phosphatase인 Cdc25 단백질이다. Cdc25는 Cdc2의 Tyr15 잔기를 탈인산화하여 Cdc2를 활성화한다[35,36]. 즉 late G2에서 Cdc25의 활성은 증가되고 Wee1의 활성은 억제되어 Cdc2가 탈인산화된 상태로 활성화됨으로써 세포주기는 mitosis로 진행하게 되는 것이다. 따라서 G2/M기 진행 조절의 또 다른 중요한 인자인 Wee1 및 Cdc25의 단백질 발현에 미치는 섬수 추출물의 영향을 조사한 결과는 Fig. 6에 나타낸 바와 같다. Fig. 6에서 알 수 있듯이, Wee1의 경우 전체적인 단백질 발현에 섬수 추출물의 영향은 비교적 미비한 것으로 나타났으나, Cdc25C의 경우 섬수 추출물의 처리 농도 증가에 따라 전체적인 단백질의 발현 정도는 매우 감소되었음을 알 수 있었다. 즉 T24 방광암세포에서 섬수 추출물의 처리에 따라 Wee1의 발현과는 무관하게 Cdc25C의 발현이 급격하게 감소시켰으며, Cdc2의 발현 감소와 함께 Cdc2가 활성화 될 수 없었기 때문에 mitosis로의 진행이 억제됨으로서 암세포의 G2/M기 arrest를 유발한 것으로 추측될 수 있다.

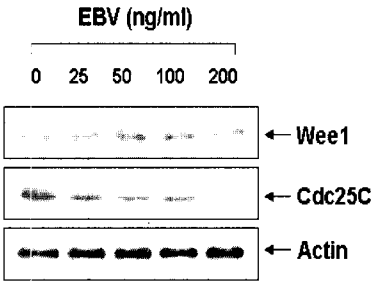

Fig. 6. Down-regulation of Cdc25C expression by EBV treatment in T24 human bladder carcinoma cells. Cells were incubated with EBV for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-Wee1 and anti-Cdc25C antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

6. Bcl-2 family의 발현에 미치는 섬수 추출물의 영향

Fig. 2 및 Table2의 결과에 의하면 섬수 추출물에 의한 T24 방광암세포의 증식억제는 G2/M기 arrest와 연관된 apoptosis 유발과도 어느 정도 연관성이 있음을 알 수 있었다. 이는 또한 실험 과정에 관찰된 섬수 추출물 처리에 의한 암세포의 형태적 변형에서도(Fig. 1A) apoptosis 유발을 충분히 예측할 수 있었기 때문에 섬수 추출물 처리에 의한 apoptosis 유발에 관여하는 대표적인 유전자인 Bcl-2 famil에 속하는 몇 가지 유전자들의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. Bcl-2 family 중 Bcl-2 member에 속하는 Bcl-2 및 Bcl-XS/L은 apoptosis 유발을 억제하는 anti-apoptotic 분자이며, Bax member의 대표적인 유전자인 Bax는 apoptosis 유발을 촉진하는 pro-apoptotic 분자이다[37,38]. 이 두 member에 속하는 유전자들은 세포의 mitochodria로부터 cytochrome c를 유리시켜 apoptosis 유발과 연관된 표적 단백질들을 분해하는 caspase protease 및 DNA 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절한다[37,39,40]. 따라서 Bcl-2 family에 속하는 많은 유전자들은 anti-apoptotic 분자들의 발현에 대한 pro-apoptotic 분자들의 발현이 상대적으로 증가될 경우 세포는 apoptosis라는 세포자살을 통하여 사멸하게 된다. Fig. 7에 나타낸 결과에서 알 수 있듯이 섬수 추출물의 처리에 의하여 Bax 및 Bcl-2의 전사 수준에서의 발현은 큰 변화가 없었으나, Bcl-XS/L

의 발현은 섬수 추출물 처리에 의하여 점차 감소되었음을 알 수 있었다. 비록 본 연구의 조건에서 최고 농도의 섬수 추출물의 처리군에서 약 5% 정도의 세포들에서 apoptosis 유발되었으나, Bcl-XS/L의 발현이 감소되었다는 결과는 섬수 추출물의 처리 농도가 증가되었을 경우 Bcl-2 family에 속하는 이들 유전자의 발현 변화가 더욱 차이가 날 것이며, 이는 apoptosis 유발에 매우 중요한 요인으로 작용할 수 있을 것으로 생각되어진다.

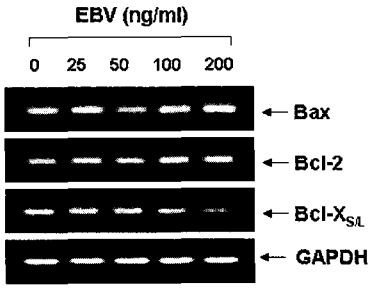

Fig. 7. Down-regulation of Bcl-XS/L mRNA by EBV treatment in T24 human bladder carcinoma cells. Cells were treated with various concentrations of EBV. After 48 h incubation, total RNAs were isolated, and RT-PCR was performed using indicated primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

결 론

본 연구에서는 강력한 항암효과 성분이 함유되어 있을 것으로 예상되지만 그에 관한 기전 연구가 거의 이루어져 있지 않은 섬수 추출물의 암세포의 증식 억제효과에 관하여 조사하였다. 이를 위하여 T24 인체 방광암세포를 사용하였으며, 섬수 추출물의 처리 농도 의존적으로 T24 암세포의 형태적 변형과 함께 암세포의 증식이 강력하게 억제되었다. Flow cytometry 결과에 의하면 섬수 추출물 처리에 의한 T24 세포의 증식억제는 세포주기 G2/기 arrest 및 apoptosis 유발과 연관성이 있었다. 섬수 추출물에 의한 G2/M기 arrest는 세포주기 조절관련 유전자 중 특히 Cdc2 단백질 발현저하, p53 유전자발현 비의존적인 Cdk inhibitor p21의 선택적 발현 증가 및 Cdc25C 단백질 발현 저하에 의한 것으로 추정이 되어진다. 또한 섬수 추출물 처리에 의한 apoptosis 유발에는 Bcl-XS/L의 발현 저하와도 연관성이 있을 것으로 예상되어졌다. 이들 결과로부터 섬수 추출물이 인체암세포에서 효과적인 화학요법제로 사용될 수 있을 가능성을 제시할 수 있었으나, 후속 연구를 통해 항암효과를 지니는 섬수 추출물의 성분 분석과 보다 다양한 접근을 통한 항암효과의 기전에 관한 부가적인 조사가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 편찬위원회, 中國中西醫專科專病臨床大系, p.422, 중국의약과기출판사, 北京, 2001.
2. 張宗岐 外, 臨床腫瘤綜合治療大全, p.356, 奧林匹克出版社, 北京, 1995
3. 조종관, 한방임상종양학, p.1000, 주민출판사, 대전, 2001.
4. 손은호, T1 방광이행상피암세포의 재발 및 진행에 영향을 미치는 인자, 고신대학교 대학원 박사학위논문, 1999.
5. 駱和生, 周岱翰, 常用抗腫瘤中草藥, p.165~169, 廣東科技出版社, 廣東省, 1981.
6. 허준, 동의보감, p.189, 남산당, 서울, 2000.
7. 신광호, 한방외용약, p.155, 열린책들, 서울, 1994.
8. 이윤희, 신민규, 변준철, 중의치험례를 중심으로 살펴본 암성동통의 외치법, 대한한방종양학회지, 6, 113-123, 2000.
9. 陳世偉, 張利民, 腫瘤中西醫綜合治療, p.533, 인민위생출판사, 북경, p.2001.
10. 이성준, 표재성방광암의 방광내주입요법: 최근발전 동향과 미래 대책, 대한비뇨기과학회지, 41, 467-476, 2000.
11. 김동식, 조종관, 항암제로 활용되는 섬여 및 섬수에 관한 문헌적 고찰, 대전대학교 한의학연구소논문집 4, 117-128, 1996.
12. 張民慶, 龔惠明, 抗腫瘤中藥的臨床應用, p.341, 인민위생출판사, 북경, 1998.
13. 이상인, 本草學, p.258~259, 수서원, 서울,1981.
14. 顏正華,王筠默, 中藥現代研究與應用(第5卷), p.5212~5231, 學苑出版社, 북경, 1997.
15. Choi, Y.H., Lee, S.J., Nguyen, P., Jang, J.S., Lee, J., Wu, M.L., Takano, E., Maki, M., Henkart, P.A., Trepel JB. Regulation of cyclin D1 by calpain protease. J Biol Chem. 272, 28479-28484, 1997.
16. Weinberg, R.A., The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell 81, 323-330, 1995.
17. Sherr, C.J., The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. Cancer Res 60, 3689-3695, 2000.
18. Elledge, S.J., Harper, J.W., Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. Curr Opin Cell Biol 6, 847-852, 1994.
19. Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A., Lamb, N.J., Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. Cell 67, 1169-1179, 1991.
20. Guadagno, T.M., Ohtsubo, M., Roberts, J.M., Assoian, R.K., A link between cyclin A expression and adhesion- dependent cell cycle progression. Science 262, 1572-1575, 1993.
21. Krek, W., Nigg, E.A., Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites. EMBO J 10, 305-316, 1991.
22. Ohsumi, K., Katagiri, C., Kishimoto, T., Chromosome condensation in Xenopus mitotic extracts without histone H1. Science 262, 2033-2035, 1993.
23. Harper, J.W., Cyclin dependent kinase inhibitors. Cencer Surv 29, 91-107, 1997.
24. Li, Y., Jenkins, C.W., Nichols, M.A., Xiong, Y., Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. Oncogene 9, 2261-2268, 1994.

25. Taylor, W.R., Stark, G.R., Regulation of the G2/M· transition by p53. Oncogene 20, 1803-1815, 2001.
26. Datto, M.B., Yu, Y., Wang, X.F., Functional analysis of the transforming growth factor β responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. J Biol Chem 270, 28623-28628, 1995.
27. Jiang, H., Lin, J., Su, Z.Z., Collart, F.R., Huberman, E., Fisher, P.B., Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21, WAF1/CIP1, expression in the absence of p53. Oncogene 9, 3397-3406, 1994.
28. Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D., p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. Nature 366, 701-704, 1993.
29. Zeng, Y.X, El-Deiry, W.S., Regulation of p21WAF1/CIP1 expression by p53-independent pathways. Oncogene 12, 1557-1564, 1996.
30. Choi, Y.H., Lee, W.H., Park, K.Y., Zhang L., p53-independent induction of p21 (WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells. Jpn J Cancer Res 91, 164-173, 2000.
31. Kornbluth, S., Sebastian, B., Hunter, T., Newport, J., Membrane localization of the kinase which phosphorylates p34cdc2 on threonine 14. Mol Biol Cell 5, 273-282, 1994.
32. Sanchez, V., McElroy, A.K., Spector, D.H., Mechanisms governing maintenance of Cdk1/cyclin B1 kinase activity in cells infected with human cytomegalovirus. J Virol 77, 13214-13224, 2003.
33. Fattaey, A., Booher, R.N., Myt1: a Wee1-type kinase that phosphorylates Cdc2 on residue Thr14. Prog Cell Cycle Res 3, 233-40, 1997.
34. Belenguer, P., Pelloquin, L., Baldin, V., Oustrin, M.L., Ducommun, B., The fission yeast Nim1/Cdr1 kinase: a link between nutritional state and cell cycle control. Prog Cell Cycle Res 1, 207-214, 1995.
35. Berry, L.D., Gould, K.L., Regulation of Cdc2 activity by phosphorylation at T14/Y15. Prog Cell Cycle Res 2, 99-105, 1996.
36. Kumagai, A., Dunphy, W.G., The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. Cell 64,, 903-914, 1991.
37. Antonsson, B., Martinou, J.C., The Bcl-2 protein family. Exp Cell Res 256, 50-57, 2000.
38. Jurgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., Reed, J.C., Bax directly induces release of cytocrome c from isolated mitochondria. Proc Natl Acad Sci USA 95, 4997-5002, 1998.
39. Reed, J.C., Bcl-2 family proteins. Oncogene 17, 3225-3236, 1998.
40. Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., Borner, C., Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. Nature 391, 496-499, 1998.