白屈菜가 Stomach Adenocarcinoma Cell Line의 Apoptosis에 미치는 영향

김상찬*, 이상태, 김대준, 변준석
대구한의대학교 한의과대학 내과학교실, 대구한의대학교 한의과대학 방제학교실*

Abstract

The Effects of *Chelidonii Herba* Extract on Apoptosis in Human Stomach Adenocarcinoma Cell Line

Sang-Chan Kim*, Sang-Tae Lee, Dae-Jun Kim, Joon-Seok Byun
Dept of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University,
Dept of Formulae Pharmacology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University*

Chelidonii Herba (Baekgulchae in Korean: CHE), a commonly used herb in Korea, Japan and China, is widely used in the treatment of stomach cancer, jaundice, gastric ulcer, edema and pain of stomach. In the present study, we demonstrated that CHE induces apoptosis in AGS cells, human stomach adenocarcinoma cell line. One of the most important recent advances in cancer research is the recognition that apoptosis plays a major role in both tumor formation and treatment response.

In this study, CHE caused a decrease of viability in AGC cells. When AGS cells were treated with CHE, cells showed dose-dependent manner apoptotic cell death. Increased apoptotic cell death, exposured to CHE, resulted from induction of Bad translocation to mitochondria, cytochrome-c release from mitochondria to cytosol, activation of caspase-3, 8, 9, and PARP cleavage.

These results suggest that CHE may be potential therapeutic approach in the clinical management of stomach adenocarcinoma.

교신저자 : 변 준 석
대구광역시 수성구 상동 165 대구한의대부속 대구한방병원 비계내과
Tel : 053)770-2113, Fax. 053)770-2169, E-Mail : jsbyun@dhu.ac.kr)
접수 : 2005/ 04/ 02 수정 : 2005/ 04/ 05 채택 : 2005/ 04/ 10

Key Word : AGS cells, apoptosis, *Chelidonii Herba*, stomach adenocarcinoma

Ⅰ. 緖 論

최근 우리나라에서는 각종 암의 발생률이 증가하는 가운데 胃癌은 암발생률에서 1위를 차지하고 있으며, 전체암으로 인한 사망원인 중 2위를 차지하는 가장 흔한 악성 종양이다[1]. 많은 연구를 통해 胃癌을 치료하고 있지만 아직까지 만족할 만한 상태는 아니며, 현재까지는 수술이 가장 根本적인 치료이고, 그 외에 보존적인 치료로 항암 화학요법, 면역요법, 방사선요법 등이 있으며, 최근에 실험적으로 유전자치료를 포함한 새로운 치료방법이 모색되고 있는 실정이다[2].

Apoptosis(세포자멸사)는 조직 항상성 유지의 중요한 조절자로서, 조직항상성은 전적으로 세포증식과 세포사의 균형에 달려있다[3]. 그러므로, 만약 apoptosis가 여러 가지 원인에 의해 제대로 통제되지 못할 경우 개체는 필연적으로 여러 가지 질병상태를 일으키게 된다. 예를 들어 암은 제거되어야 할 세포들이 살아 남게 되어 발생하는 대표적인 질환이라 할 수 있다[4]. 이러한 까닭에 최근 apoptosis는 종양의 형성과 치료에 중요한 역할을 한다고 인식하고 있으며[5-7], 실제로 anticancer drugs, γ-irradiation, suicide genes, immunotherapy 등과 같이 종양세포를 살해하는 것들은 대다수 target cell에서 apoptosis를 유도매개하는 것이 밝혀졌다[8].

白屈菜(*Chelidonii Herba*)는 《救荒本草[9]》에서 처음 기재된 약재로, 양귀비과(Papaveraceae)에 속한 다년생초본인 애기똥풀의 帶花한 全草로 性味는 微溫有毒 苦辛, 歸經은 肝脾胃로[10], 鎭痛·止咳·利尿·解毒·抗癌作用이 있어[11] 胃腸疼痛, 黃疸, 水腫, 疥癬瘡腫, 蛇蟲咬傷, 胃癌, 胃潰瘍을 치료한다[10]. 白屈菜에 대한 최근의 연구보고로는, 白屈菜의 성분중 chelidonine은 細胞有絲分裂毒으로서 체외실험에 있어서 섬유모세포의 유사분열을 억제하였고, 악성종양의 성장을 억제하였으며[12], indomethacin으로 유발된 위궤양을 회복시킨 보고가 있었으나[13], 아직 위암세포의 세포사에 미치는 영향에 대한 연구보고는 없었다.

이에 著者는 임상적으로 胃癌, 胃潰瘍등에 사용되는 白屈菜 水抽出物을 위암세포주(AGS cell)에 처치하여, 이들의 세포사 과정을 관찰하고 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 實 驗 方 法

1. 재료

RPMI 1640과 fetal calf serum은 Bio-Whittaker (Walkersville, MD)와 Life Technologies (Gaithersburg, MD)로부터 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetraz olium bromide (MTT)와 기타 다른 시약은 Sigma Chemical (St. Louis, MO)에서 구입하였다.

白屈菜 水抽出物(CHE)은 白屈菜 [*Chelidonii Herba* (영남약업사, 대구)] 600g을 물 3,000㎖로 3시간 끓인 뒤 0.2㎛ filter (Millipore Corporation, Bedford, MA)로 여과하여 동결건조후 사용할 때까지 -20℃에 보관하였다. CHE의 收率은 14.6%-(8.76/600)였다.

2. 세포배양

Human유래 Stomach Adenocarcinoma Cell Line인 AGS cell은 American Type Culture Collection (Rockville, MD)으로부터 구입하였으며, 10% fetal calf serum, 50units/㎖ penicillin과 50㎎/㎖ streptomycin이 포함된 RPMI 1640배지에서 37℃의 온도와 5%의 CO2가 유지되는 환경에서 배양하였다. 1×106개의 AGS 세포들을 10㎠ plastic dish에 2-3일간 배양하여 (80%이상의 confluency를 유지), 12시간 serum을 고갈한 뒤, 세포들에게 지정된 시간마다 CHE를 농도별로 처치하였다.

3. MTT 세포생존율 측정

96-well plate의 well당 5×104개의 AGS 세포들을 배양하여 confluency가 80% 이상이 된 경우, 12시간 serum을 고갈한 다음, CHE를 농도별(0.03-3.0㎎/㎖), 시간별(6-36hrs)로 처치하여, CHE의 세포사능력을 측정하였다. 세포배양후 생존한 세포를 0.5㎎/㎖의 MTT로 처치한 후, 4시간 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals에 200㎕의 DMSO(dimethylsulfoxide)를 가하여 용해하였다. 흡광도는 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)를 사용하여 540㎚에서 측정하였다. 세포생존율은 어떠한 처치도 가하지 않은 control cells과의 비율로 나타내었다.

[즉, viability (% control) = 100 (absorbance of treated sample) / (absorbance of control)].

4. Flow cytometer 분석

Sub-G1 phase에서의 세포들의 축적을 분석하기 위한 flow cytometric analysis(FACS analysis)를 하였다. 1×106개의 세포들을 10㎠ plastic plate에 깔고 70--80%의 confluency를 유지하였다. 먼저 세포들에게 12시간 serum을 고갈시키고, 다음 12시간 동안 CHE를 농도별로 처치하였다. 부착된 세포들을 trypsin을 처치하여 수거하였다. 부유 세포들과 trypsin처치 세포들을 모두 90% ethanol로 고정시키고, 4',6-diamidino -2-phenylindole (DAPI) solution으로 염색하였다. 염색된 핵들은 flow cytometer (Particle Analysis System, Partec GmbH, Mnster, Germany)로 분석하였다.

5. Cell lysates 및 subcellular fractions 준비

세포들은 10mM의 TrisCl (pH 7.4), 100mM의 NaCl, 30mM의 sodium pyrophosphate, 1mM의 EGTA, 0.5%의 Triton X-100, 10%의 glycerol, 1mM의 phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)와 100μM의 sodium orthovanadate를 함유한 buffer로 녹였다. Cell lysates는 27-gauge needle로 3회 homogenizing하고 15분간 얼음에 방치한 후, 15,000×g에서 15분간 원심분리하여 찌꺼기를 제거하였다.

세포핵추출은 Kim 등[14]의 방법에 따라 시행하였다. 즉, 세포들을 ice-cold PBS(phosphate -buffered saline. pH 7.4)로 2회 세척한 후 PBS를 가하여 수거한 다음 microtubes에 보관하였다. 그 후 세포들을 2,000×g에서 5분간 원심분리하고, 10mM의 HEPES (pH 7.9), 10mM의 KCl, 0.1mM의 EDTA, 0.5%의 Nonidet P-40, 1mM의 DTT와 0.5mM의 PMSF를 함유한 저장액의 buffer를 가하여 세포를 파괴시켰다. Cells lysates를 얼음위에 10분간 방치한 다음 7,200×g로 5분간 4℃에서 원심분리하였다. Crude nuclei를 함유한 pellets에 20mM의 HEPES (pH 7.9), 400mM의 NaCl, 1mM의 EDTA, 10mM의 DTT와 1mM의 PMSF를 함유한 추출 buffer를 50 ㎕를 가하여 현탁시킨 후, 얼음에 30분간 방치하였다. 그 후 15,800×g에서 10분간 원심분리한 후, nuclear fractions을 함유한 상층액을 얻었다. Nuclear fractions은 사용때까지 -70℃에 보관하였다.

Mitochondrial fractions은 세포들을 수거한 후 10mM의 HEPES (pH, 7.9), 200mM의 mannitol과 70mM의 sucrose가 함유된 buffer[15]를 가하고, 이를 500×g에서 원심분리하고, 상등액을 다시 10,000×g로 원심분리하였다. Pellets은 1%의 Triton X-100이 함유된 上記의 buffer로 현탁하였다.

6. Immunoblot 분석

SDS-PAGE 전기영동과 immunoblot analysis는 이미 발표된 방법[16]에 따라 시행하였다. 단백질을 12% gel의 전기영동으로 분리하고, 이것을 nitrocellulose paper로 이전하였다. Nitrocellulose paper에 Bad, Bcl2, Actin (Zymed Laboratory, San Francisco, CA, USA), caspase-9, caspase-8, caspase-3 (Pharmingen, San Diego, CA, USA)등의 antibody를 가하여 배양하였다. 면역반응성 단백질은 ECL chemiluminescence detection kit (Amersham Biosciences, Buck inghamshire, UK)를 사용하여 발색하였다.

7. PARP 분할

Nuclear fractions 50㎍을 7.5% SDS--polyacrylamide gels을 사용하여 분해시키고, nitrocellulose membranes에 이전하였다. 이 membranes을 5%의 BSA를 함유한 PBS tween으로 4℃에서 overnight하여 blocking하였다. 그 후 anti-PARP antibody (1:2000)로 실온에서 배양하였다. 발색은 immunoblot analysis에서 기술한 방법으로 하였다.

8. 통계분석

실험결과는 mean ± S.D.으로 나타내었으며, t-test 통계처리방법으로 유의성을 검정하였다. 유의수준은 $p<0.05$로 하였다.

Ⅲ. 實 驗 結 果

1. CHE 농도에 따른 AGS cell의 cell viability

각기 다른 농도에서의 CHE가 세포의 생존율에 미치는 영향을 분석하기 위하여 CHE를 0.03-3.0㎎/㎖의 농도로 12시간 처치하였다. 결과 control(이하 CON)은 100.00±2.14, 0.03㎎/㎖을 처치한 군에서는

81.37±2.49, 0.1㎎/㎖을 처치한 군에서는 60.84±7.13, 0.3㎎/㎖을 처치한 군에서는 47.51±3.77, 1.0㎎/㎖을 처치한 군에서는 48.06±3.38, 3.0㎎/㎖을 처치한 군에서는 11.50±1.55%를 나타내어, 농도의존적으로 유의한 세포사를 나타내었다.

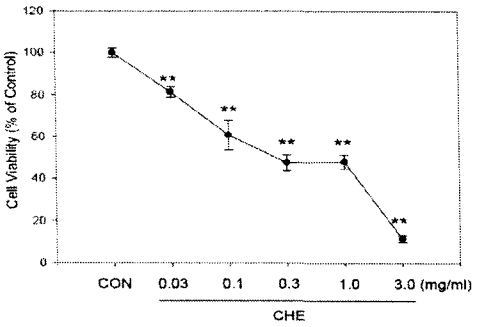


Fig. 1) The Effects of CHE on the Percent Changes in Cell Viability.

AGS cells were exposed to CHE (0.03-3.0㎎/㎖) for 12hrs. Cell viability was assessed by MTT assay. Data represent the mean ± S.D. with eight separate experiments (significant compared with untreated control, **p<0.01. CON: control, CHE: *Chelidonii Herba* extract)

2. CHE의 시간적 변화에 따른 AGS cell의 cell viability

시간적 변화에 따른 CHE의 세포생존율을 분석하기 위하여, CHE를 0.03-0.3㎎/㎖의 농도로 6-36시간 처치하였다. 실험결과 CON을 100으로 하였을 때, CHE를 0.03㎎/㎖을 처치한 군에서의 세포생존율은, 6, 12, 24, 36시간에 각각 92.08 ± 3.60, 77.33 ± 2.78, 78.77 ± 5.16, 67.08 ± 4.41%를 나타내었다. CHE를 0.1㎎/㎖을 처치한 군에서는 각각 75.27 ± 2.87, 65.42 ± 4.12, 60.67 ± 3.97, 56.03 ± 4.00%를 나타내었다. CHE를 0.3㎎/㎖을 처치한 실험군에서는 60.81 ± 2.60, 53.78 ± 2.86, 45.61 ± 2.12, 46.30 ± 1.39%를 나타내었다. 농도별로 모든 경우에 시간의존적으로 유의한 세포사가 유도되었다.

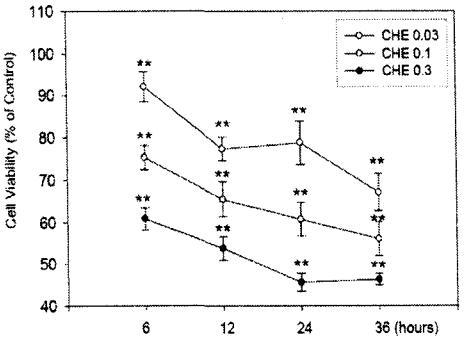


Fig. 2) The Percent Changes in Cell as a Function of Time.

AGS cells were exposed to CHE (0.03-3.0㎎/㎖) for 6-36 hrs. Cell viability was assessed by MTT assay. Data represent the mean ± S.D. with eight separate experiments (significant compared with untreated control, **p<0.01)

3. CHE가 AGS cell의 sub-G1 단계 세포수에 미치는 영향

농도와 시간의 변화에 따른 세포사와 apoptosis와의 관련성을 관찰하기 위하여 AGS cell에 CHE를 0.03-0.3㎎/㎖의 농도로 12시간 처치한 후 DNA를 DAPI로 염색하고, 이를 flow cytometric analysis를 시행하였다. 실험결과 CON에서의 sub-G1은 8.34%, CHE 0.03㎎/㎖에서는 10.31%, CHE 0.1㎎/㎖에서는 14.40%, CHE 0.3㎎/㎖에서는 26.66%로 나타났다. 이는 CHE

가 농도의 증가에 따라 sub-G1기를 연장시켜, 농도의존적으로 apoptosis를 유도함을 나타내었다.

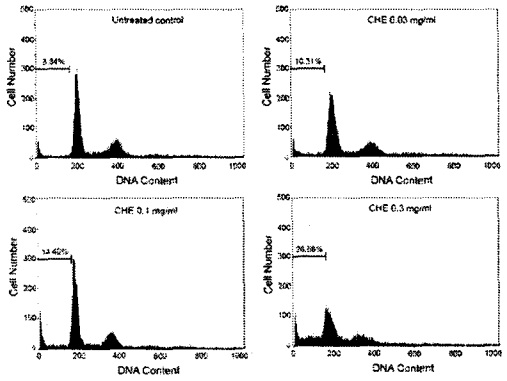


Fig. 3) The Effects of CHE on the Percentage of Cell Numbers in the Sub-G1 Phase.

AGS cells were treated with CHE (0.03-0.3㎎/㎖) for 12hrs. Floating and trypsin-digested cells were stained with DAPI, and analyzed by flow cytometry. The data show the representative flow cytometric histograms in which the nuclear DNA content (x-axis) is plotted against the number of nuclei. The percentages of cell numbers in the sub-G1 phase of cells are indicated.

4. CHE가 AGS cell의 PARP 분할에 미치는 영향

FACS analysis로 확인된 CHE의 세포자멸유도 결과와 관련하여, 세포내 apoptosis관련 단백질중의 하나인 핵내의 PARP의 변화를 관찰하였다. 일반적으로 apoptosis가 유도될 때에는 핵내에서 PARP의 분할이 일어나고, 이러한 PARP의 분할은 DNA fragmentation과 chromosome cond ensation을 유도하면서, 세포자멸사를 일으키는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 농도가 증가할수록 분할된 PARP가 증가하는 것으로 나타났다.

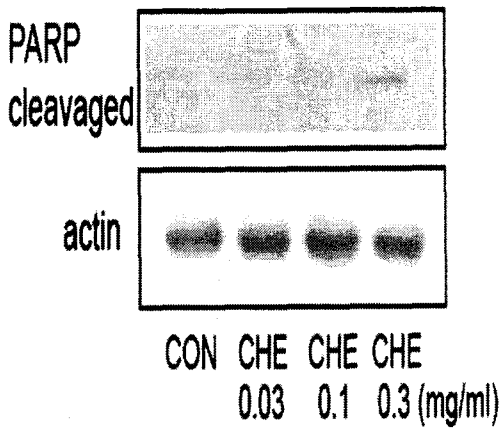


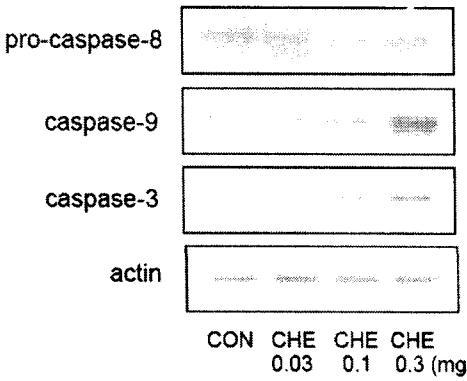
Fig. 4) The Effects of CHE on the Levels of Proteins Associated with Apoptosis in Nuclear Fraction.

AGS cells were exposed to CHE (0.0-3-0.3㎎/㎖) for 12hrs. PARP was immunoblotted using the PARP antibodies in the nuclear fractions. Results were confirmed by repeated experiments.

5. CHE가 AGS cell의 caspase 활성도에 미치는 영향

PARP의 분할에 관여하는 상위단백질은 주로 caspase들이다. CHE를 처치한 군에서는 caspase-3 단백질의 양이 증가되었고, caspase-3 상위의 caspase-9 역시 증가하였다. pro-caspase-8은 CHE농도의 증가에 따라 감소함을 보였으며, 이는 caspase-8의 증가를 의미한다.

Fig. 5. The Effects of CHE on the Levels



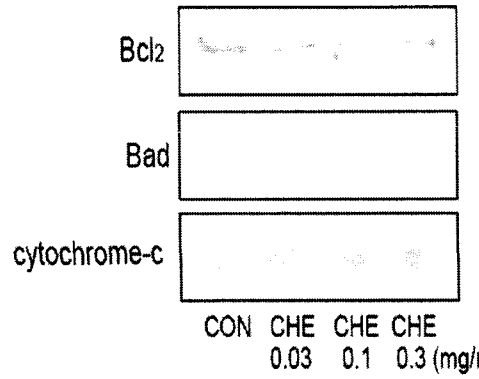
of Proteins Associated with Apoptosis in Total Lysates.

AGS cells were exposed to CHE (0.0-3-0.3㎎/㎖) for 12hrs. Pro-caspase-8, caspase-9, caspase-3 were immunoblotted using the respective antibodies in the cell lysate. Results were confirmed by repeated experiments.

6. CHE가 AGS cell의 mitochondrial protein에 미치는 영향

CHE가 유도하는 세포자멸사에 mitochondria가 관여하는 지를 알아보기 위하여 mitochondrial fraction에서 대표적인 anti-apoptotic 단백질인 Bcl2 와, 14-3-3 단백질이 분할되면서 분리되어 mitochondria의 membrane으로 전위하여 apoptosis를 유도하는 Bad를 관찰하였다. mitochondria의 membrane에서 Bcl2의 양은 CHE에 농도의존적으로 감소하였으며, Bad는 농도의존적으로 점차 증가되는 경향을 나타내었다. Bcl2의 감소에 따라, cytosol에서의 cytochrome-c의 양은 증가하는 경향을 나타내었다.

Fig. 6) The Effects of CHE on the Levels



of Proteins Associated with Apoptosis in Mitochondria.

AGS cells were exposed to CHE (0.-03-0.3㎎/㎖) for 12 hrs. Bcl_2, Bad were immunoblotted using the respective antibodies in the mitochondrial fractions, and cytochrome-c was in cytosolic fraction. Results were confirmed by repeated experiments.

Ⅳ. 考 察

최근에 암에 의한 사망률은 과거에 비해 높은 실정이고 점차 증가되고 있는 추세이다. 그 중에서도 위암은 우리나라에서 가장 흔한 악성종양으로 매년(1999년 기준) 12,000명의 위암환자가 발생되는 것으로 알려져 있다. 많은 연구를 통해 위암의 치료률을 개선시키기 위하여 노력을 하고 있지만 그 치료효과는 아직까지 만족할 만한 상태는 아니다. 현재까지는 수술이 가장 根本적인 치료이고, 그 외에 보존적인 치료로 항암 화학요법, 면역요법, 방사선요법 등이 있으며, 최근에 실험적으로 유전자치료를 포함한 새로운 치료방법이 모색되고 있다[1-2].

인체에서 발생하는 암의 원인을 유전자 변이의 한 스펙트럼으로 이해하게 되면서 암화과정은 다중적인 요인에 의해 다양한 단계의 유전자변이를 거치면서 발생한다고 생각하고 있다. 그리고 세포분화, 노화, 암화 또는 세포증식의 조절이 apoptosis에 의해 진행되는 것을 알게 되었다. 1972년에 처음으로 apoptosis에 대한 개념이 보고되었을 때는 병태 생리학적인 개념으로 생각하였고, 그 후 apoptosis에 관한 많은 연구가 진행되어 암화과정의 조절인자로서 중요하게 작용한다는 것을 알게 되었다[7,8]. 즉, apoptosis는 조직의 항상성유지에 있어서 중요한 조절자로서, 조직항상성은 전적으로 세포증식과 세포사의 균형에 의존하게 된다3).

Apoptosis는 일련의 생화학적, 형태학적 특징을 가진 세포사과정이다. 세포의 발생, 분화, 성장 및 노화 등의 전 과정을 통하여 세포의 생존과 사멸은 균형을 이루며, 개체의 항상성을 유지하게 한다. 따라서 apoptosis가 여러 가지 원인에 의해 제대로 통제되지 못할 경우 개체는 필연적으로 여러 가지 질병상태를 일으키게 된다. 예를 들어 암은 제거되어야 할 세포들이 살아 남게 되어 발생하는 대표적인 질환이라 할 수 있다[4]. 실제로, 위장관 상피세포에는 고도의 세포교체가 일어나며 정상세포나 사멸세포의 평형은 형태와 기능의 유지에 중요한데, 만일 이 세포사에 장애가 있게 되면 前암단계 세포손상에 의해 세포사 유도에 실패하게 되어 질병이 악화되거나 암세포의 치료가 불가능해진다[19].

일반적으로 세포가 apoptosis를 유도하는 물질에 노출되면, apoptosis를 억제하는 경로가 동시에 활성화되어 apoptosis가 최소화되는 경향을 보인다. 따라서, 효과적으로 apoptosis를 유도하기 위해서는 apoptosis를 유도하는 경로의 활성화와 함께 항apoptosis 경로의 억제가 병행되어야 한다[4].

최근 암연구에서 가장 중요한 발전 중의 하나는 apoptosis가 종양의 형성과 치료에 중요한 역할을 한다는 것에 대한 인식이다[5,6]. 이러한 apoptosis와 암과 관련된 연구로는, oncogenic mutations이 apoptosis를 차단하여 tumor initiation과 progression을 유도한다는 보고[7]와, anticancer drugs, γ-irradiation, suicide genes, immunotherapy 등과 같이 종양세포를 살해하는 것들은 대다수 target cell에서 apoptosis를 유도매개한다는 것이 보고되고 있다[8]. 또한 FLIP은 caspase-8의 활성을 억제하는 단백질로서, 많은 종양세포들에게 FLIP이 높게 발현되어 있어 FLIP은 종양 증식인자로서 역할을 한다는 것이 보고되고 있다[20]. 즉, 암치료에서 중요한 목표중의 하나는 종양세포에 선택적인 세포사를 유도하는 것이고[21], 또한 많은 항암제들은 apoptosis inducer로 작용한다는 것이다[22].

白屈菜(*Chelidonii Herba*)는 《救荒本草[9]》에서 처음 기재된 약재로, 예부터 의약품으로 사용하지는 않았지만, 문장가 紅葉山人이 胃癌에 罹患되어 良藥을 찾던 중에 栗本이 白屈菜를 투여하면서 그 이름이 전해지기 시작하였다. 白屈菜는 양귀비과(*Papaveraceae*)에 속한 다년생초본인 애기똥풀의 帶花한 全草로 우리나라 전국 각지의 原野에 분포하고 있으며, 신선한 즙액에는 alkaloid를 함유하고 있으며, 그 주요성분은 chelidonine $C_{20}H_{19}NO_5$ 0.3%,

sanguinarine $C_{20}H_{15}NO_5$, chelerythrine $C_{21}H_{19}NO_5$, homochelidone $C_{21}H_{23}O_5N$, oxychelidonine $C_{20}H_{17}NO_6$, methoxychelidonine $C_{21}H_{21}NO_6$, portopine $C_{20}H_{19}NO_5$, sparteine $C_{15}H_{26}N_2$ 등이다. 淸熱解毒藥으로 性味는 微溫有毒 苦辛하고, 歸經은 入肝脾胃한다. 鎭痛, 止咳, 利尿, 解毒, 抗癌作用이 있어 胃腸疼痛, 黃疸, 水腫, 疥癬瘡腫, 蛇蟲咬傷, 胃癌, 胃潰瘍을 치료한다[10 1].

白屈菜에 대한 최근 연구보고로는, 白屈菜의 성분중 chelidonine은 1종의 세포유사분열독으로서 체외실험에 있어서 섬유모세포의 유사분열을 억제하였고, 악성종양의 성장을 억제하였으며[12], indomethacin으로 유발된 위궤양에 대한 효과등이 있다고 보고된 바가 있지만[13], 아직 위암세포의 세포사에 관련한 연구는 없었다.

이에 본 연구에서는 임상적으로, 胃癌에 빈용되는 白屈菜를 水抽出物 형태로, human유래 Stomach Adenocarcinoma Cell Line인 AGS cell에 처치하여 이후 세포자멸사의 발생 및 이와 관련된 단백질의 변화를 관찰하였다.

먼저, 세포생존율 실험 결과 CHE는 0.03㎎/㎖을 처치한 군에서는 약 19%, 0.1㎎/㎖을 처치한 군에서는 약 40%, 0.3㎎/㎖을 처치한 군에서는 약 53%, 1.0㎎/㎖을 처치한 군에서는 약 52%, 3.0㎎/㎖을 처치한 군에서는 약 89%정도의 세포사를 유도하여 농도의존적으로 유의한 세포사를 나타내었다. 시간적 변화에 따른 세포생존율에서도 CHE는 6-36시간 사이에서 농도 및 시간의존적으로 세포사를 증가시켰다.

다음으로는, 이러한 농도와 시간의 변화에 따른 세포사와 apoptosis와의 관련성을 관찰하기 위하여 AGS cell에 CHE를 0.03-0.3㎎/㎖의 농도로 12시간 처치한 flow cytometric analysis(FACS analysis)를 시행하였다. 실험결과 control, CHE 0.03㎎/㎖, CHE 0.1㎎/㎖, CHE 0.3㎎/㎖의 sub-G1 분율은 각각 8.34%, 10.31%, 14.40%, 26.66%로 나타났으며, 이는 CHE가 농도의 증가에 따라 sub-G1기를 연장시켜, 농도의존적으로 apoptosis를 유도함을 나타낸다.

FACS analysis를 통하여, CHE는 apoptosis를 유도한다는 것을 확인한 후, 다음으로, apoptosis의 경로와 이에 관련되는 단백질의 변화를 관찰하였다. 세포내 apoptosis관련 단백질중의 하나인 핵내의 PARP는 일반적으로 apoptosis가 유도될 때에는 핵내에서 PARP의 분할이 일어나고, 이러한 PARP의 분할은 DNA fragmentation과 chromosome condensation을 유도하면서, 세포자멸사를 일으키는 것으로 알려져 있다[23]. 본 실험에서는 농도가 증가할수록 분할된 PARP가 증가함을 보여주어, CHE가 apoptosis를 유도함을 확인할 수 있었다.

PARP의 분할을 촉진하는 상위단백질은 주로 caspase들로서, 대부분의 apoptosis signaling pathway는 cysteine protease family인 caspase의 activation에 의한 결과이다[24]. Caspase들은 일반적으로 세포자멸사를 억제하고 있는 단백질들을 분해하여 세포자멸사를 진행시키는 역할을 하며, 현재까지 알려진 caspase중 caspase-3가 다양한 세포자멸사 자극에 의하여 공통적으로 활성화 될 수 있으며, 활성화된 caspase-3는 PARP의 분할에 관여한다[25]. 본 연구에서도 CHE는 다른 세포자멸사 유도물질[14,26]과 마찬가지로 농도의존적으로

caspase-3의 활성을 증가시켰다. 또한 caspase-3는 caspase-8에 의하여 활성화되는데[27], 본 연구에서도 pro-caspase-8의 양적 감소를 나타내었고 이것은 caspase-8의 활성도가 상대적으로 증가되었음을 의미하는 것이다.

한편 caspase-3와 caspase-8은, mitochondria에서 분리되는 cytochrome -c와 APAF-1 그리고 caspase-9으로 구성된 apoptosome[28]에 의하여서도 활성화되는데, 본 연구의 결과에서도 caspase-9은 농도의존적으로 활성화되는 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 CHE가 유도하는 apoptosis에는 caspase-3, 8, 9가 관여됨을 의미하는 것이다.

본 연구결과 caspase-9의 활성화는 CHE의 세포자멸사에 mitochondria의 cytochrome-c와 연루 가능성을 시사하고 있으므로, CHE를 처치한 cell의 mitochondrial fraction을 제외한 cytosolic fraction에서 cytochrome-c를 측정하였다. cytochrome-c는 mitochondria에 존재하고 있지만, 세포자멸사의 기작이 활성화되면 cytosolic fraction으로 release되어 caspase의 활성을 증가시킨다[27]. 본 연구의 결과에서 cytochrome-c는 CHE의 농도가 증가함에 따라 cytosolic fraction에서 증가하여, CHE유도 세포자멸사는 mitochondria를 경유하는 apoptotic pathway임을 보여 주었다.

일반적인 경우 mitochondria의 cytochrome-c는 Bcl2, BclXL에 의하여 cytosol로 분리되는 것이 억제되어 있지만, apoptosis 기작이 활성화되면, cytosol에서 14-3-3단백질과 결합되어 있던 Bad단백질이 14-3-3단백질과 분리되고, 분리된 Bad단백질은 mitochondria로 이동하여 Bcl2, BclXL의 활성을 억제하여 cytochrome-c가 쉽게 cytosol로 분리되게 한다[29 30]. 본 연구에서 CHE유도 세포자멸사에 cytochrome-c와 Bad, Bcl2와의 연관성을 관찰하기 위하여 mitochondrial fraction에서 이들 단백질의 변화를 관찰한 결과 Bad단백질은 CHE의 농도에 따라 양적 증가를 나타내었다. 이러한 결과는 14-3-3와 결합해 있던 Bad단백질이 14-3-3와 분리되어 mitochondria로 전위된 양이 많음을 나타내고, 이러한 Bad의 증가에 따라 Bcl2는 CHE의 농도가 증가할수록 점차 활성이 감소하였다.

이상의 연구결과를 종합하여 보면, 白屈菜는 AGS cell에 있어 mitochondria를 경유하는 apoptosis를 유도하고, 이러한 mitochondria경유 apoptosis에 관여하는 단백질의 변화는, 14-3-3과 결합되어 있는 Bad의 mitochondria로의 전위, Bcl2단백질을 억제, cytochrom-c의 분비촉진, caspase의 활성화, PARP의 분할촉진이 연관되는 것으로 보인다. 이러한 실험결과는 白屈菜가 위암에 있어 유효하다는 것을 시사하며, 향후 白屈菜에 대하여 유효한 용해법 및 다양한 동물실험을 통해 적정 유효량에 대한 추가연구가 이루어져야 할 것으로 보인다.

V. 結 論

胃癌, 胃潰瘍등에 사용되는 白屈菜 水抽出物(CHE)을 위암세포주(AGS cell)에 처치하여, 이들의 세포사멸과정을 MTT assay, Flow cytometric analysis, Immu-

noblot analysis로 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CHE는 시간(6-36hrs) 및 농도(0.03-0.3 ㎎/㎖)의존적으로 세포사를 유발하였다. 특히 3.0㎎/㎖의 농도에서는 12시간에 약 89%정도의 세포사를 유도하였다.

2. Flow cytometric analysis 결과 control, CHE 0.03㎎/㎖, CHE 0.1㎎/㎖, CHE 0.3 ㎎/㎖의 sub-G1 분율은 각각 8.34%, 10.31%, 14.40%, 26.66%로 CHE에 대해 농도의존적으로 증가하였다.

3. Nuclear fraction에서 PARP는 CHE의 농도가 증가할 수록 분할된 단백질이 증가하였으며, 특히, 0.3㎎/㎖에서 뚜렷하게 관찰되었다.

4. Cysteine protease family인 caspase는 3, 8, 9 모두 CHE에 농도의존적으로 활성화되었다.

5. CHE의 농도가 증가함에 따라, cytosol에서의 cytochrome-c, mitochondria에서의 Bad가 증가되었다.

6. CHE의 농도가 증가함에 따라, mitochondria에 존재하는 anti -apoptotic protein인 Bcl_2는 감소하였다.

이상의 연구결과는 白屈菜가 위암세포주에서 apoptosis를 유도하므로 stomach adenocarcinoma의 치료에 적극 활용될 수 있음을 시사한다.

參 考 文 獻

1. 안명주. 위암의 항암화학요법. 대한소화기학회지. 2004;43:75-81.
2. 김경종, 민영돈, 정기호, 최철희. 위암세포에서 apoptosis 관련단백의 발현과 항암제에 대한 감수성과의 관계에 대한 연구. 대한외과학회지. 1999;57(6):-967-75.
3. Evan GI, Vousden Khr. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. Nature. 2001;411(6835):342-8.
4. 김철현, 이경희, 이춘택, 김영환, 한성구, 심영수 등. 폐암 세포에서 proteasome inhibitor에 의한 apoptosis의 기전. 결핵 및 호흡기질환. 2003;54(4):403--14.
5. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. Cell. 2002 ;108(2):153-64.
6. Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. Blood. 2001;98(9):2603-14.
7. El-Deiry WS. Role of oncogenes in resistance and killing by cancer therapeutic agents. Curr Opin Oncol. 1997;9(1):79-87.
8. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. Exp Cell Res. 2000;256-(1):42-9.
9. 윤인한, 박창국. 白屈菜에 대한 문헌적 고찰. 동서의학. 1994;19(2) :43-51.
10. 이상인. 본초학. 수서원. 서울. 1981

:532.

11. 소진백, 김호철, 안덕균. 白屈菜의 항암 효과에 관한 연구. 대한본초학회지. 1997;13(2):63-72.
12. 常敏毅 編著, 金洙哲. 抗癌本草. 일중사. 서울. 1992:204-5.
13. 김득용, 권기록, 이준무. 白屈菜水鍼, 煎蕩液 투여 및 鍼刺가 Indomethacin으로 유발된 백서의 위궤양에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1995;12(2):-177-92.
14. Kim SC, Byun SH, Yang CH, Kim CY, Kim JW, Kim SG. Cytoprotective effects of Glycyrrhizae radix extract and its active component liquiritigenin against cadmium-induced toxicity (effects on bad translocation and cytochrome c-mediated PARP cleavage). Toxicology. 2004;197(3):239-51.
15. Cook SA, Sugden PH, Clerk A. Regulation of Bcl-2 family proteins during development and in response to oxidative stress in cardiac myocytes: association with changes in mitochondrial membrane potential. Circ. Res. 1999;85:940-9.
16. Kang KW, Novak RF, Lee CH, Kim SG. Induction of microsomal epoxide hydrolase by sulfur aminoacid deprivation via the pathway of c-Jun N-terminal kinase and its extracellular exposure during cell death. Free Radic, Biol, Med, 2002;32:1017-32.
17. 조준형, 조치흠, 권상훈, 백원기, 권건영, 박준철 등. 자궁경부암 및 난소암에서 세포자멸사 억제인자인 c-IAP과 c-IAP2의 발현 양상. 대부종콜포회지. 2003;4(1):21-9.
18. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972;26(4):239-57.
19. 김대곤. 위장관 질환과 세포사멸. 대한소화기학회지. 2002;39:79-87.
20. French LE, Tschopp J. Defective death receptor signaling as a cause of tumor immune escape. Semin Cancer Biol. 2002;12(1):51-5.
21. Petak I, Houghton JA. Shared pathways: death receptors and cytotoxic drugs in cancer therapy. Pathol Oncol Res. 2001;7(2):95-106.
22. Holzman D. Apoptosis provides new targets for chemotherapy. J Natl Cancer Inst. 1996;88(16):1098-100.
23. Soldani C., Scovassi AI. Poly(ADP--ribose) poltmerase-1 cleavage during apoptosis: an update. Apoptosis. 2002;7:321-8.
24. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. Science. 1998 ;281(5381):1312-6.
25. 정용근. 아폽토시스의 실행자 : caspase를 통하여. 유전 제2권. 1998:106-28.
26. Kim SC, Cho MK, Kim SG. Cadmium-induced non-apoptotic cell death mediated by oxidative stress under the condition of sulfhydryl deficiency. Toxicol Lett. 2003;144(3):-325-36.

27. Phenix BN, Badley AD. Influence of mitochondrial control of apoptosis on the pathogenesis, complications and treatment of HIV infection. Biochimie. 2002;84(2-3):251-64.
28. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. J Cell Sci. 2003;116(Pt 20):4077-85.
29. Hermeking hr. The 14-3-3 cancer connection. Nat Rev Cancer. 2003 ;3(12):931-43.
30. Berg D, Holzmann C, Riess O. 14--3-3 proteins in the nervous system. Nat Rev Neurosci. 2003;4(9):752-62.