

전립선 암세포에서 silymarin의 고사 유도 효과 및 기전 연구

권강범 · 김은경 · 박성주¹ · 송호준¹ · 이영래^{2,3} · 박병현^{2,3} · 박진우^{2,3} · 류도곤*

원광대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 본초학교실, 2: 전북대학교 의과대학 생화학교실, 3: 전북대학교 헬스케어기술개발사업단

Apoptotic Effects and Mechanism Study of Silymarin in DU145 Cells

Kang Beom Kwon, Eun Kyung Kim, Sung Joo Park¹, Ho Joon Song¹,
Young Rae Lee^{2,3}, Byung Hyun Park^{2,3}, Jin Wzoo Park^{2,3}, Do Gon Ryu*

Department of Physiology, 1: Department of herbology, School of Oriental Medicine, Wonkwang University,
2: Department of Biochemistry, 3: Institute for Healthcare Technology Development, Medical School, Chonbuk National University

Silymarin has been known to exert anti-tumoral activity in Korea. However, its molecular mechanism of action is not understood. In this study, we found that silymarin induced apoptosis in androgen-independent prostate cancer DU145 cells as confirmed by DNA fragmentation. Our data demonstrated that silymarin-induced apoptotic cell death was accompanied by activation of caspase-3 and subsequent cleavages of its substrates, poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in a time- and concentration-dependent manner. Also, silymarin-induced apoptotic mechanism of DU145 cells involved the induction of Par-4 protein expression. Taken together, these results suggest that silymarin induces the activation of caspase-3, degradation of PARP, increase of Par-4 expression, and eventually leads to apoptotic cell death.

Key words : silymarin, DU145 cells, apoptosis, caspase-3, PARP, Par-4

서 론

전립선암은 우리나라에서 식생활의 서구화 및 고령화 사회로의 이행에 따라 빈도가 증가하는 추세이다. 전립선암은 초기에 국소적인 부위에 국한되어 나타나는 남성호르몬 의존형(androgen dependent)으로 존재하며 이에 대하여 남성호르몬 중지(androgen ablation)법의 치료를 시행하고 있으나¹⁾ 대부분의 남성호르몬 의존형 전립선암은 3년 이내에 남성호르몬 중지 치료법에 반응하는 세포고사(apoptosis)에 내성을 지니게 되어 남성호르몬 비의존형(androgen independent) 전립선암으로 진행하게 된다^{2,3)}.

세포고사는 다세포 생명체에서 정상적인 기관의 발달과 조직의 항상성 유지에 필수적인 생리현상의 하나인 세포의 계획된 죽음(programmed cell death)을 말하는 것으로 괴사(necrosis)와는 다른 독특한 형태와 생화학적 특징을 동반하는 유전자 활성에 의하여 조절 받는 생리과정으로 암치료제 개발의 한 수단으로서 이용되고 있다^{4,6)}.

Silymarin은 milk thistle (*Silybum marianum*)에서 추출되는 polyphenolic flavonoid antioxidant 복합체로서 주성분은 silibinin이며 그 외에 성분으로서 silybin, dihydrosilybin, silydianin, silychristin 등이 알려져 있다⁷⁾. Silymarin은 in vitro, in vivo 항암효과 실험에서 강력한 암세포 고사효과 있으며⁸⁻¹⁰⁾, 특히 전립선 암세포주인 LNCaP, PC-3, DU145세포의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있다¹¹⁻¹³⁾. 그러나 silymarin의 세포고사 유도 효과와 자세한 기전에 대해서는 알려져 있지 않다.

본 논문에서 남성호르몬 비의존형 암세포인 DU145세포를 이용하여 silymarin의 고사 효과와 기전을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

세포배양에 사용한 세포배양 용기는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로부터 구입하였으며, caspase-3에 대한 형광기질(fluorogenic substrates)과, Par-4, PARP 항체는 BD pharmingen에서 구입하였으며, silymarin,

* 교신저자 : 류도곤, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학

· E-mail : tkryu@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6846

· 접수 : 2005/10/21 · 수정 : 2005/11/15 · 채택 : 2005/12/06

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), Alkaline phosphatase-conjugated mouse IgG secondary antibody는 Santa Cruz사(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고 세포배양액 RPMI, Fetal bovine serum(우태아혈청), 항생제 등은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 세포배양

인간 유래 남성호르몬 비의존형 전립선 암세포인 DU145 세포는 American Type Culture Collection(ATCC; Rockville, MD, U.S.A)에서 구입하였고, 10% FBS가 첨가된 RPMI에서 95% 공기와 5% 이산화탄소(CO₂)가 소통되는 습기가 충분한 대기에서 37°C를 유지하였다. 세포는 지수 성장을 유지하기 위해서 2-3일 마다 분주하여 배양하였다. 세포수는 hemacytometer를 이용한 표준 절차에 의해서 측정하였다.

3. MTT 분석

DU145 세포를 96 well 세포배양 용기에 1×10⁴ cells/ml씩 분주하여 24 시간 세포배양 용기에 부착시키고, 안정화된 DU145 세포에 silymarin을 24 또는 48 시간 처리하여 MTT(0.5mg/ml)와 3시간 반응시켰다. 생존 세포가 MTT로부터 생성한 보라색 불용성 formazan은 DMSO로 용해하여 570nm 파장에서 ELISA reader(Molecular Device, E-max, USA)로 흡광도를 측정하였다. 측정된 formazan 생성 정도는 대조군 세포에 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

4. DNA 분절(fragmentation) 조사

DNA 분절현상을 조사하기 위하여 genomic DNA 추출은 Wizard Genomic DNA purification kit(Promega, USA)를 이용하였다. Silymarin을 DU145 세포에 48시간 동안 처리한 후 세포를 수확하여 nuclear lysis buffer를 첨가하여 세포를 파괴한 후 RNase를 37°C에서 5분 처리하여 RNA를 제거한 후 단백질을 침전용 완충용액으로 단백질을 제거하고 isopropanol 침전에 의하여 응축된 DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 진공건조기로 건조한다. 여기에 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 가하여 DNA pellet을 용해한 후 260 nm와 280 nm의 Spectrophotometer하에서 OD값을 측정하여 DNA를 정량한다. DNA 5μg을 2% agarose gel에서 전기영동(50 V, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV등 아래에서 DNA 분절을 관찰하였다.

5. Caspase-3 활성도 측정

세포를 4°C에서 30분 세포파쇄용액(1% Triton X-100, 0.32M sucrose, 5mM ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA), 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 1μg/ml aprotinin, 1μg/ml leupeptin, 2mM dithiothreitol(DTT), 10mM Tris/HCl, pH 8.0)과 반응 후, 14,000rpm으로 15분 원심분리하여 이 때 얻어진 상층액 30μg을 caspase assay buffer(100mM HEPES, 10%

sucrose, 0.1% CHAPS, 1mM PMSF, 1μg/ml aprotinin, 1μg/ml leupeptin, 2mM DTT, pH 7.5)와 caspase-3의 형광기질인 Ac-DEVD-AFC와 37°C에서 60분 반응시킨 후 fluorometer(F2500, Hitachi, Japan)로 caspase-3의 활성도를 측정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength(400nm)와 emission wavelength(505nm)를 사용하였다.

6. Western blotting

포집된 세포는 세포파쇄용액과 4°C에서 30분 반응시킨 후, 30μg의 단백질을 두 배의 sample buffer(5mM EDTA, 4% sodium dodecyl sulfate(SDS), 20% glycerol, 200mM Tris, pH 6.8, 0.06% bromophenol blue)와 혼합 후, 100°C에서 3분 가열하여 단백질 변성을 유도하고 10% gel에서 전기영동을 시행하였다. 전기영동을 마친 gel의 단백질을 semi-dry electrotransfer system(0.8mA/cm²)을 이용하여 nitrocellulose membrane으로 이동시킨 다음, 5% skim milk와 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적인 항체반응을 억제시켰다.

일차항체(primary antibody)는 TBS-T에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 24시간 반응시키고 TBS-T로 10분 3번 세척한 후, 이차항체(secondary antibody)인 anti-mouse IgG conjugated alkaline phosphatase(TBS-T로 1:3,000으로 희석, Amersham Co., England)와 상온에서 1시간 반응시킨 후, Image Analyzer(Biorad, USA)를 이용하여 발색시켰다.

7. 단백질 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin을 기준으로 이용한 Bradford의 방법¹⁹⁾에 의거하여 정량하였다.

8. 통계 분석

실험 결과는 mean±S.E.M으로 표시하였으며 유의성의 검정은 Microcal Origin(Version 6.0)을 이용하여 ANOVA one-way test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. Silymarin이 세포생존율과 세포고사에 미치는 효과

Silymarin이 DU145 세포의 세포생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 1×10⁶cells/ml의 세포를 RPMI 배지에 접종하고 24시간 후에 silymarin을 0.025-0.5mg/ml의 농도로 24, 48시간 처리한 후 MTT를 이용하여 세포생존율을 조사하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 처리한 농도와 시간에 의존적으로 세포생존율이 감소하였다(Fig. 1).

Silymarin의 DU145 세포에 대한 생존율 감소 효과가 세포고사에 의한 것인지 확인하고자 세포고사의 특징적인 현상인 DNA 분절(fragmentation) 현상을 조사하였다. Silymarin을 0.025-0.5mg/ml의 농도로 48시간 처리한 후 DNA 분절 현상을 조사한 결과 0.1mg/ml의 농도로 처리한 군에서부터 DNA 분절 현상이 나타났으며 그 효과는 0.5mg/ml의 농도로 처리한 군에서도 지속되는 것을 확인하였다(Fig. 2).

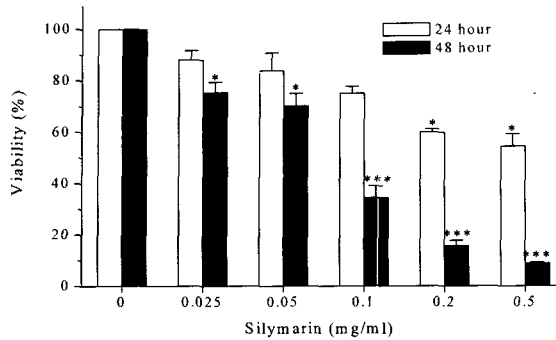


Fig. 1. Effects of silymarin on cell viability in DU145 cells. Cells were treated with various concentrations of silymarin for 24 and 48 hours. Cell viability was measured by MTT assay. The percentage of viable cells was calculated as a ratio of A570 of treated: to control cells (treated with 0.05% DMSO vehicle). Each value is the mean±SEM of four independent experiments. *p<0.05 vs control; ***p<0.001 vs control

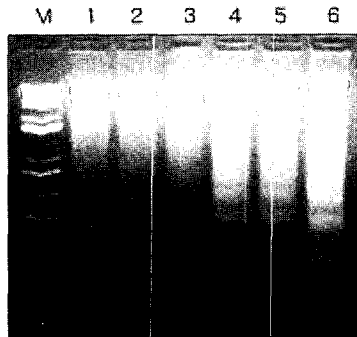


Fig. 2. Apoptosis inducing effects of silymarin in DU145 cells. Cells were treated with 20 mg/ml silymarin for 48 hour. DNA was extracted and analyzed by 2% agarose gel electrophoresis as described in materials and methods. Lane 1: control; Lane 2: 0.025 mg/ml; Lane 3: 0.05 mg/ml; Lane 4: 0.1 mg/ml; Lane 5: 0.2 mg/ml; Lane 6: 0.5 mg/ml silymarin.

2. Silymarin이 caspase-3 활성도에 미치는 영향

Silymarin에 의한 DU145 세포의 고사과정에 caspase-3 활성도의 증가가 관여하는지를 확인하고자 0.2mg/ml 농도의 silymarin을 다양한 시간동안 세포에 노출시킨 후 caspase-3에 특정한 형광 염료인 Ac-DEVD-AFC를 이용하여 활성도를 측정하였다. 그 결과 처리한 시간에 의존적으로 활성도가 증가하였으며 특히 24, 48시간 동안 처리한 군은 대조군에 비하여 각각 3.6배(p<0.001), 3.7배(p<0.001) 증가하여 통계적으로 유의성을 나타냈다(Fig. 3).

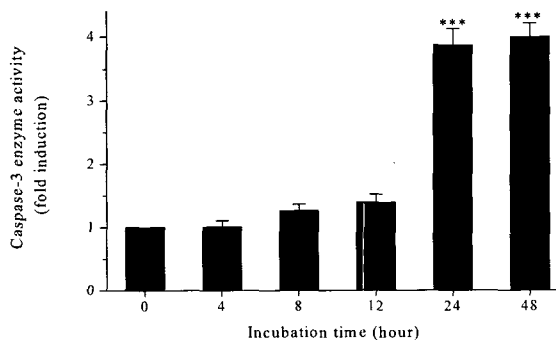


Fig. 3. Dose- response of silymarin on caspase-3 enzyme activity in DU145 cells. Cells were incubated with 20 mg/ml silymarin for indicated hours. Lysate from cells was used to measure the activity of caspase-3 using Ac-DEVD-AFC as fluorogenic substrate as described in material and methods. Data were represented as a relative fluorescence compared with the control value. Values are mean±SEM from four experiments. ***p<0.001 vs control

3. Silymarin이 Par-4 발현과 PARP 절단에 미치는 영향

Silymarin의 DU145세포 고사 유도 효과 기전에 Par-4의 발현과 PARP의 절단이 관여하는지 조사하고자 다양한 농도의 silymarin을 DU145세포에 처리한 후 Western blotting을 이용하여 단백질 발현 정도를 확인하였다. 그 결과 silymarin은 처리한 농도와 시간에 의존적으로 Par-4의 발현을 증가시켰으며 또한 PARP의 절단을 유도하였다(Fig. 4)

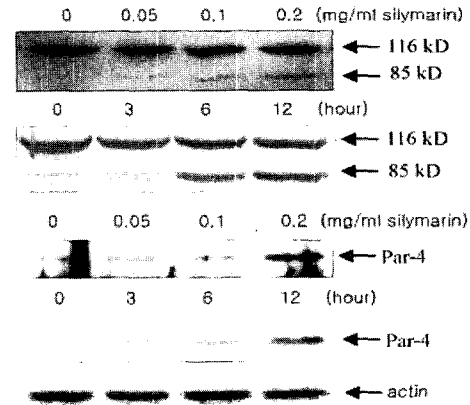


Fig. 4. Effects of silymarin extract on PARP cleavage and Par-4 expression in DU145 cells. DU145 cells were treated with various concentrations of silymarin for indicated times. Lysate from cells was separated on 10.0% SDS-PAGE. PARP and par-4 on the nitrocellulose membrane was probed with anti-PARP and par-4 antibody and the immunoreactive band was visualized by image analyzer. Actin is a loading control.

고찰 및 결론

본 연구에서 silymarin은 남성호르몬 비의존형 전립선 암세포인 DU145세포의 고사를 유도하였으면 그 기전에 caspase-3 활성화에 의한 PARP의 절단, Par-4 발현의 증가가 관여하는 것으로 나타났다.

Silymarin은 chemical에 의해 유도된 피부암, 혀암, 방광암, 직장암 등에 대하여 항암효과가 있는 것으로 나타났다^{10,15-17}. 특히 전립선 암세포의 고사 유도 효과, 증식 억제 효과 등이 보고되어¹¹⁻¹³ 전립선 암치료제 후보 물질중의 하나로 알려져 있다.

본 실험에서 silymarin을 다양한 농도로 DU145세포에 처리한 후 MTT 분석법을 이용하여 세포 생존율을 조사한 결과 처리한 농도에 비례하여 세포 독성이 증가하였으며(Fig. 1) 이러한 세포 독성의 증가는 세포고사에 의한 것으로 나타나(Fig. 2) 전 실험자들의 연구 결과¹¹⁻¹³와 일치하였다.

세포고사 유도 기전으로 중요시되고 있는 caspase protease family는 염증반응 및 세포고사 유도에 핵심적인 역할을 수행하는 효소로서 정상적으로 세포 내에서 불활성화 형태로 존재하다가 외부 자극에 의하여 활성화되며 현재까지 14종류가 알려져 있다¹⁸⁻²⁰. 그 중 caspase-3 protease는 mammalian ced-3 homologue로서 세포질에서는 proenzyme 형태로 존재하다가 proenzyme 형태의 caspase-3 protease는 caspase-8 및 9 같은 initiator caspase에 의하여 pro-form이 절단되어 활성화된 형태로 변환되어 세포의 기능 유지에 필요한 단백질인 poly-(ADP-ribose)-polymerase(PARP), inhibitor of

caspase-activated deoxyribonuclease(ICAD), 그리고 actin, fodrin, lamin 등과 같은 구조 단백질을 절단하여 세포고사를 유도하는 것으로 알려져 있다^{21,22)}. Fig. 3에서 나타났듯이 silymarin을 0.2, 0.5mg/ml의 농도를 처리한 군의 caspase-3 활성도는 대조군에 비하여 유의하게 증가하였으며 또한 caspase-3의 기질로 알려진 PARP의 절단을 유도하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 silymarin에 의한 세포고사 유도 기전에 단백분해 효소로 알려진 caspase-3 활성도의 증가와 이로 인한 PARP의 절단이 관여함을 추측할 수 있다. 그러나 caspase-3외에 다른 effector caspase인 caspase-6, -7의 관여를 배제할 수 없다.

Par-4(prostate apoptosis response-4)는 전립선 암세포에서 세포고사를 유도하는 유전자로서²³⁾ tumor necrosis factor(TNF)- α 수용체 군중의 하나인 FasL/Fas의 활성화를 통하여 세포고사를 유도하거나 또는 세포 생존을 촉진하는 기전에 관여하는 nuclear factor(NF)- κ B의 활성화를 억제하여 세포고사를 유도하는 것으로 알려져 있다²⁴⁾. Par-4 단백질 발현에 대한 silymarin의 효과를 DU145 세포에서 조사한 결과 처리한 시간과 농도에 의존적으로 Par-4의 발현을 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 4). Silymarin이 Par-4의 발현을 증가시켜 세포고사를 유도하는 것으로 나타났으나 FasL/Fas 신호전달기전을 활성화시키는지 또는 NF- κ B의 활성화를 억제시켜 고사를 유도하는지 지속적인 연구가 필요할 것이다.

이상의 결과를 요약하면, 인간 전립선 암세포인 DU145 세포에서 silymarin은 세포고사에 의한 생존율의 감소를 유도하였으며 세포고사 기전에 caspase-3 활성화에 의한 PARP의 절단과 Par-4 발현의 증가가 관여하는 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 교육인적자원부 지방연구중심대학육성 사업 헬스케어기술개발사업단의 지원에 의하여 연구되었음

참고문헌

- Lu-Yao, G.L., et al., An assessment of radical prostatectomy. Time trends, geographic variation, and outcomes. The Prostate Patient Outcomes Research Team. *Jama* 269(20): 2633-2636. 1993.
- Walsh, P.C., A.W. Partin, J.I. Epstein. Cancer control and quality of life following anatomical radical retropubic prostatectomy: results at 10 years. *J Urol* 152(5 Pt 2): 1831-1836. 1994.
- Isaacs, J.T., et al. Androgen regulation of programmed death of normal and malignant prostatic cells. *J Androl* 13(6):457-464. 1992.
- Janus, T.J., Kyritsis, A.P., Forman, A.D., Levin, V.A. Biology and treatment of gliomas. *Ann Oncol* 3(6):423-433. Review, 1992.
- Yoshida, T., Kawano, N. Clinical cure of glioblastoma-two case reports. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 40(4):224-229, 2000.
- Madajewicz, S., Chowhan, N. Therapy for patients with high grade astrocytoma using intraarterial chemotherapy and radiation therapy. *Cancer* 88(10):2350-2356, 2000.
- Luper, S. A review of plants used in the treatment of liver disease L Part 1. *Altern Med Rev* 3, 410-421, 1998.
- Gershbein, L.L. Action of dietary trypsin, pressed coffee oil, silymarin and iron salt on 1,2-dimethylhydrazine tumorigenesis by gavage. *Anticancer Res* 14, 1113-1116, 1994.
- Katiyar, S.K., Korman, N.J., Mukhtar, H., Agarwal, R. Protective effects of silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model. *J Natl Cancer Inst* 89, 556-566, 1997.
- Nehta, R.G., Moon, R.C. Characterization of effective chemopreventive agents in mammary gland in vitro using an initiation-promotion protocol. *Anticancer Res* 11, 593-596, 1991.
- Zi, X., Agarwal, R. Silibinin decreases prostate-specific antigen with cell growth inhibition via G1 arrest, leading to differentiation of prostate carcinoma cells: implications for prostate cancer intervention. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 7490-7495, 1999.
- Zi, X., Zhang, J., Agarwal, R., Pollak, M. Silibinin upregulates insulin-like growth factor-binding protein 3 expression and inhibits proliferation of androgen-independent prostate cancer cells. *Cancer Res* 60, 5617-5620, 2000.
- Zi, X., Grasso, A.W., Kung, H.J., Agarwal, R. A flavonoid antioxidant, silymarin, inhibits activation of erb B1 signaling and induces cyclin-dependent kinase inhibitors, G1 arrest, and anticarcinogenic effects in human prostate carcinoma DU145 cells. *Cancer Res* 58, 1920-1929, 1998.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254, 1976.
- Yanaiida, Y., Kohno, H., Yoshida, K. et al. Dietary silymarin suppresses 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in male F344 rats. *Carcinogenesis* 23, 787-794, 2002.
- Vinh, P.Q., Sugie, S., Tanaka, T. et al. Chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Jpn J Cancer Res* 93, 42-49, 2002.
- Kohno, H., Tanaka, T., Kawabata, K. et al. Silymarin, a naturally occurring polyphenolic antioxidant flavonoid, inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in

- male F344 rats. *Int J Cancer* 101, 461-468, 2001.
18. Goldberg, Y.P. Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract, *Nature Genetics* 13, 442-449, 1996.
 19. Kim, T.W., Warren, H., Jung, Y.K., Kovacs, D., Tanzi, R. Alternative cleavage of Alzheimer-associated presenilins during apoptosis by a caspase-3 family protease, *Science* 277, 373-376, 1997.
 20. Takahashi, A. Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis, *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 8395-8400, 1996.
 21. Lazebnik, Y.A. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE, *Nature* 371,346-347, 1994.
 22. Wang, Z.Q. Mice lacking ADPRT and poly (ADP-ribosyl) ation develop normally but are susceptible to skin disease, *Genes Dev* 9, 509-520, 1995.
 23. Chakraborty, M. et al. Par-4 drives trafficking and activation of Fas and FasL to induce prostate cancer cell apoptosis and tumor regression. *Cancer Res* 61(19):7255-7263, 2001.
 24. Gurumurthy, S., K.M. Vasudevan, V.M. Rangnekar. Regulation of apoptosis in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 20(3-4):225-243, 2001.