

三稜이 子宮頸部癌細胞(HeLa cell)의 Apoptosis에 미치는 影響

원광대학교 한의과대학 부인과학교실
홍기철, 김주연, 공복철, 최창민, 유심근

ABSTRACT

Rhizoma Scirpi induced Apoptosis in Human Cervical Carcinoma HeLa Cells

Ki -Cheul Hong, Joo-Yeon Kim, Bok-Cheul Kong,
Chang-Min Choi, Sim-Keun Yoo
Department of Oriental Obstetric and Gynecology,
college of Oriental Medicine, Wonkwang University

Purpose : This study is to examine the ability of *Rhizoma Scirpi* (RS) to induce HeLa cell viability.

Methods : We culture HeLa cell which is human metrocarcinoma cell in D-MEM included 10% fetal bovine serum(Hyclone Laboratories) below 37°C, 5% CO₂. Then we observed apoptosis of log phase cell which is changed cultivation liquid 24 Hours periodically.

Results :

1. RS induces mitochondria membrane potential collapse.
2. P38 MAPK is involved in RS-induced death in HeLa cells.
3. P38 MAPK is involved in RS-induced apoptosis in HeLa cells.
4. P38 MAPK regulates RS-induced caspase-3, -8 and -9 activation in HeLa cells.
5. The inhibition of caspase regulates RS-induced cell death in HeLa cells.
6. RS induces mitochondria membrane potential collapse in HeLa cells.
7. P38 MAPK is involved in the regulation of Bcl-2 and Bax in HeLa cells.
8. RS regulates the expression of Bcl-2 and Bax in HeLa cells.
9. SR induces p38 MAPK activation in HeLa cells.

Conclusion : RS induces apoptosis in HeLa cells via p38 MAPK activation.

Key Words : *Rhizoma Scirpi* (RS), Bax, mitochondria membrane potential, Bax, mitochondria, apoptosis, HeLa cells

I. 緒 論

자궁경부암은 全世界의으로 女性癌 中에서 乳房癌 다음으로 가장 높은 발생頻度を 보이는 腫瘍이다. 자궁경부암은 대개 10여년의 전구단계인 上皮內癌의 상태를 거쳐 浸潤性癌으로 진행하기 때문에 早期 診斷과 治療가 가능하지만 최근 20代에 자궁경부암이 발생하는 경우도 적지 않고 또한 뚜렷치 않는 이유로 35세 이전에 자궁경부암이 발생하는 경우는 5년 生存率이 현저히 떨어짐을 볼 수 있다¹⁻³⁾.

최근 三稜, 蓬朮, 小茴香, 蘿蔔子, 大黃, 桃仁, 甘遂, 巴豆, 紅花, 牡丹皮 등 여러 한약재들의 抗癌效果에 대한 研究가 進行되고 있으나⁶⁻¹¹⁾ 癥瘕積聚의 치료에 사용되어온 三稜이 HeLa cell에 대한 세포고사 효과에 대한 많은 의의를 가질 것으로 思料되었지만 아직까지 이에 대한 實驗研究 접해보지 못하였다.

이에 저자는 韓醫學的으로 女性 生殖器 腫瘍과 유사한 병증인 癥瘕의 치료에 임상적으로 널리 활용되어 왔던 三稜을 자궁경부암세포인 HeLa cell에 처리하여 세포의 生存度, p38MAPK 의존적 細胞毒性, 三稜으로 인한 apoptosis 유발 및 caspase 활성화와 p38MAPK의 역할, 三稜의 caspase 依存的 細胞枯死, 子宮癌細胞 죽음시 mitochondria membrane potential collapse, Bcl-2와 Bax의 發現 등을 觀察한 결과 三稜이 HeLa cell에 미치는 抗癌效果에 對한 有意性있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材 料

1) 藥材

實驗에 사용된 三稜은 圓光大學校 附屬 韓方病院에서 구입한 것을 精選하여 사용하였다.

2) 試藥

Anti-Bcl-2, Bax or Bak antibody는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 공급받았다. SB 203580와 PD 098059는 Calbiochem에서 구입하였으며 Hoechst 33258 dye는 Sigma에서 구입하였다. 세포배양시 필요한 배양액 및 시약들은 Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다.

3) 檢液의 製造

三稜 추출액을 凍結乾燥하여 10%의 수율로 건조물을 얻었다. 이 건조물에 멸균된 蒸溜水를 첨가하여 溶解物을 만들어 실험에 사용하였다.

2. 方法

1) 細胞柱 培養

사람 자궁암 細胞柱인 HeLa 세포를 37°C, 5% CO₂하에서 10% fetal bovine serum(Hyclone Laboratories)이 포함된 D-MEM에서 培養하고 약 24시간 주기로 培養液을 교체하여 주며 log phase에 있는 세포에 三稜을 처리하여 細胞枯死 현상을 관찰하였다.

2) 細胞 活性度 測定

細胞 生存度는 crystal violet dye의 uptake 정도를 colorimetric assay로 測定하였다. 細胞枯死가 일어난 세포에 crystal violet solution을 넣고 2분 동안 常溫에서 放置하여 staining한다. 바로 tap water

로 水洗한 후, staining된 세포를 10% acetic acid상에 5분 동안 常溫에서 반응하여 ELISA reader로 405nm에서 OD값을 계산한다. 세포 生存度 실험에서 culture media상의 세포를 100%의 세포 活性度를 나타낸다는 기준으로 시약처리군의 세포 生存度を %로 계산하였다.

3) 미토콘드리아 막전위 측정

미토콘드리아 막전위를 측정하기 위하여 potential-sensitive dye인 DiO₆ (Molecular probes, Eugene, OR)를 사용하였다. 5mg/ml의 三稜을 처리한 후 DiO₆ (100nM)을 20분간 처리하였다. 遠心分離하여 세포를 정상 media로 washing하였다. flow cytometry로 막전위를 측정하였다.

4) 細胞 形態觀察

HeLa cell (1×10^5 cells)을 slide chamber dish에 배양하였다. 핵의 染色을 위하여 三稜을 24시간 처치한 Hela cell 군과 시약처치를 하지않은 Hela cell을 3.7% para-formaldehyde로 고정하였다. PBS로 3번 washing한 후, Hoechst 33258 dye로 염색하였다. 형광현미경(Nikon, Tokyo)으로 관찰 현상하였다.

5) Caspase 活性度 測定

HeLa cell(2×10^6 cells)을 4°C에서 15분 동안 lysing buffer (1% TritonX-100, 0.32 M sucrose, 5mM EDTA, 1mM PM SF, 1µg/ml aprotinin, 1µg/ml leupeptin, 2mM dithiothreitol (DTT), 10mM Tris/HCl, pH 8.0)에서 溶解하고 20,000g로 15분 동안 遠心分離시켰다. 遠心分離하여 얻은 上層液은 BCA(Bicichonic acid, Sigma, St. Louis)방법으로 定量하여 assay buffer(100mM Hepes, 10% sucrose, 0.1% chaps, pH 7.5, 1mM PMSF, 1µg/ml aprotinin, 1µg/ml leupeptin, 2mM DTT)에 희석된 형광표지된 기질과 37°C에서 30

분간 反應시킨후, fluorometer로 측정하였다. 이 때의 파장은 excitation wavelength (380nm)와 emission wavelength (460nm)를 사용하였다. 기질은 CPP32-like caspase의 경우, fluorogenic substrate인 7-amino-4-coumarin (AMC)-DEVD를 사용하였으며 proteolytic cleavage를 측정함으로써 인지하였다.

6) Western blotting

HeLa cell (5×10^6 cells)을 0.5ml lysis buffer 용액에 넣은 다음 단백질 양은 BCA protein assay 법으로 定量하였다. 定量한 단백질은 sample buffer에서 denaturation 시킨 다음 SDS-PAGE를 이용하여 전기영동을 하였다. 전기영동 후 gel을 nitrocellulose membrane으로 transfer 시킨 다음 항체를 결합시킨 후 peroxidase가 conjugation된 2차 항체와 결합시킨 후 luminescence를 이용하여 현상하였다.

7) 結果算出

표시된 結果는 3번 以上の 獨立的인 結果이며 이들의 平均(mean)과 標準偏差(standard deviation, SD)를 算出하여 結果를 표시하였다. 細胞毒性을 보이는 값의 比較에 있어서는 Students's t-test를 使用하였으며 $P < 0.01$, 혹은 $P < 0.05$ 수준으로 有意성을 검증하였다.

III. 實驗結果

1. 三稜으로 인한 子宮癌 細胞 죽음

三稜으로 인한 抗癌效果를 검색하기 위해 子宮癌 細胞柱인 HeLa cell에 三稜을 처리하여 세포죽음을 일으키는지 여부를 관찰하였다. 三稜 (0, 1, 2, 5 or 10 mg/ml) 처리시 용량 의존적으로 세포죽음이 일어났다 (Fig. 1B). 특히 三稜 5 m

g/ml 처리 후 24 시간에 세포 생존도가 현저하게 감소하였다 (Fig. 1A).

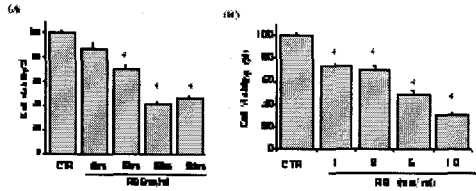


Fig.1. *RS* induces death in HeLa cells.

(A) Cell death was assessed by crystal violet staining. HeLa cells were incubated with 5mg/ml *RS* for various incubation time (0, 6, 12, 18 or 24hrs) (B) Cell death was assessed by crystal violet staining. HeLa cells were incubated with 0, 1, 2, 5 or 10mg/ml *RS* for 24hrs followed by measurement of crystal violet staining. Data were the mean \pm S.E. of three experiments. *Significantly different from control, $P < 0.05$. *RS*: *Rhizoma Scirpi*.

2. 三稜으로 인한 子宮癌 細胞에 대한 毒性에서 p38 MAPK 抑制의 影響
5mg/ml의 三稜 處置하여 HeLa cell의 유의성있는 細胞毒性을 유발한 조건하에 p38 MAPK inhibitor인 SB 203580

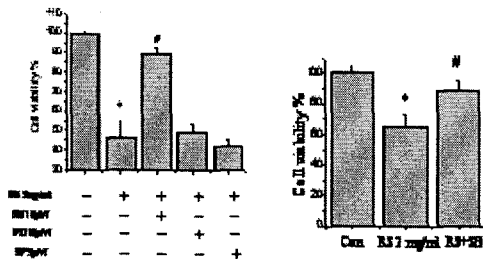
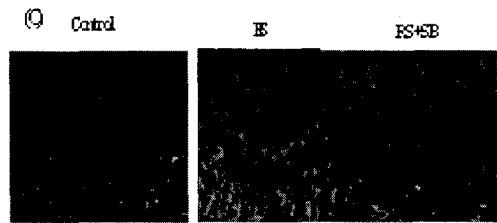


Fig. 2. P38 MAPK is involved in *RS*-induced death in HeLa cells.

(A) *RS* (5mg/ml) was treated in HeLa cells with 10 μ M SB 203580, 20 μ M PD 098059 or 10 μ M SP for 24hrs. (B) *RS* (2mg/ml) was treated in HeLa cells with 10 μ M SB 203580 for 24hrs. And then the cell viability was measured by crystal violet assay. (C) The crystal violet-stained cells were showed. Data were the mean \pm S.E. of three experiments. *Significantly different from control, $P < 0.05$. *RS*: *Rhizoma Scirpi*. #Significantly different from *RS*-treated, $P < 0.05$. *RS*: *Rhizoma Scirpi*, SB: SB 203580

10 μ M을 처치시 유의한 보호 효과를 관찰할 수 있었다(Fig. 2A). 2mg/ml의 三稜 처치시 동일한 보호 효과를 나타내었다(Fig. 2B). 이에 비해 ERK의 upstream인 MEK 1의 inhibitor인 PD 098059 20 μ M 처치시에는 별다른 영향을 미치지 않았다.

위에 언급한 p38 MAPK는 JNK/SAPK, ERK와 더불어 Mitogen activated protein kinase (MAPK)를 구성하며 주로 細胞의 죽음과 炎症의 신호전달기전에 연결되어 있다^{12,13}). 본 연구 결과는 다른 기존의 연구 결과와 유사한 p38 MAPK의 細胞 毒性 유발 효과를 보여주고 있으며 三稜과 같은 破積之劑 역시 p38 MAPK 의존적인 毒性을 증명하고 있다.



3. 三稜으로 인한 細胞枯死(apoptosis)에 있어서의 p38 MAPK의 役割

세포죽음에는 자연적인 細胞枯死(apoptosis)와 물리적인 자극이나 삼투압 등으로 인한 壞死(necrosis)가 있다. Apoptosis시 세포막의 blebbing이나 핵의 condensatio

n, fragmentation등이 일어나므로 이의 形態를 관찰하여 apoptosis와 necrosis를 구별하고자 하였다. 핵을 染色하기 위하여 Hoechst 33258 dye를 이용하였으며 형광 현미경으로 관찰하였다. 三稜 5mg/ml를 24시간 처치하였을 때 전형적인 細胞枯死

의 현상을 관찰하였으며 p38 MAPK 억제 시에는 細胞枯死를 보호하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 위에서 언급한 三稜으로 인한 毒性이 細胞枯死를 포함하고 있음을 보여주고 있으며 이 역시 p38 MAPK 억제제로 조절 가능함을 보여주고 있다.



Fig. 3. P38 MAPK is involved in RS-induced apoptosis in HeLa cells.

RS (5mg/ml) was treated in HeLa cells with or without 10µM SB 203580 for 24hrs. The cells were fixed with 3.7% para-formaldehyde and then were washed with PBS. The cells were stained with 1µg/ml Hoechst 33258 dye for 10mins. The cells were taken a picture using a fluorescence microscope. RS: *Rhizoma Scirpi*, SB: SB 203580

4. 三稜으로 인한 caspase活性和 p38 MAPK 抑制의 役割

Caspase가운데 initiator caspase로 caspase-8 과 caspase-9가 속하며, 이는 비교적 upstream의 caspase로 분류되고 있다. caspase-9은 mitochondria 經由하는 apoptosis pathway에 속하며 caspase-8은 receptor 경유하는 pathway에 속하고 TNF-alpha, Fas로 인한 apoptosis에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{14,15}.

HeLa 자궁암세포에 三稜 처치시 p38 MAPK의 caspase-3의 활성 조절을 보여주고 있으며 SB 203580 (10µM) 처치시 三稜으로 인한 caspase-3의 활성 증가를 억제한 반면 MEK1 억제제인 PD 98059와 JNK/SAPK 억제제인 SP compound 처치시에는 caspase-3의 활성증가에 아무런 영향을 미치지 않았다(Fig. 4

A). 이는 cell viability 결과와 동일한 결과로 三稜으로 인한 caspase cysteine protease의 활성증가가 p38 MAPK 의존적으로 惹起함을 제시하여주고 있다. 이와 동시에 initiator caspase family인 caspase-8과 -9역시 p38 MAPK 의존적인 활성을 보여주고 있다(Fig. 4B, C).

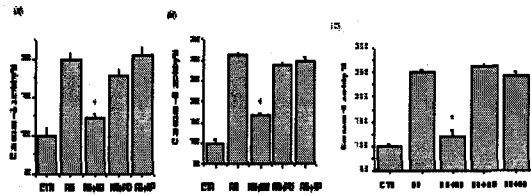


Fig. 4. P38 MAPK regulates RS-induced caspase-3, -8 and -9 activation in HeLa cells.

RS (5mg/ml) was treated in HeLa cells with 10µM SB 203580, 20µM PD98059 or 10µM SP for 24 hrs. (A) Caspase-3, (B) caspase-9 and (C) caspase-8 activity were measured as described in Materials and Methods. *Significantly different from RS-treated P<0.05. RS: *Rhizoma Scirpi*.

5. 三稜으로 인한 세포죽음에서 caspase의 役割

細胞枯死시 주된 경로는 caspase-依存的인 경로이며 최근 caspase-非依存的인 細胞枯死 경로 역시 주목받아 왔다. 三稜으로 인한 caspase의 역할을 보다 분명하게 나타내기 위하여 pan-caspase 억제제인 Z-VAD 100µM을 처치하여 三稜에 의한 細胞枯死 활성을 억제함을 보여주었다(Fig. 5).

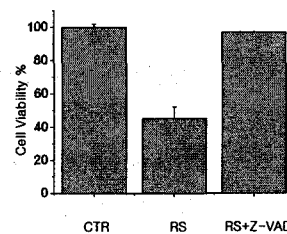


Fig. 5. The inhibition of caspase regulates RS-induced cell death in HeLa cells.

RS (5mg/ml) was treated in HeLa cells with 100µM Z-VAD peptide for 24hrs, followed by measurement of crystal violet staining. Data were the mean ± S.E. of three experiments. *Significantly different from RS-treated, P<0.05. RS: *Rhizoma Scirpi*.

6. 三稜으로 인한 세포죽음시 mitochondria membrane potential collapse 分析

세포죽음에는 mitochondria-依存的/非依存的인 죽음이 있다. 일반적으로 caspase-9 의존적인 경로는 mitochondria의 Bcl-2 family protein과 연관되어 보고된 바 있으므로 본 연구에서 HeLa 자궁암세포에서 三稜 처리시 유의성있는 mitochondria membrane potential collapse를 보여주고자 하였다. 5mg/ml 三稜 처리시 mitochondria membrane potential collapse를 일으켰으며 p38 MAPK 억제제인 SB 203580 10µM 처리시 membrane potential의 collapse를 억제함을 확인하였다(Fig. 6).

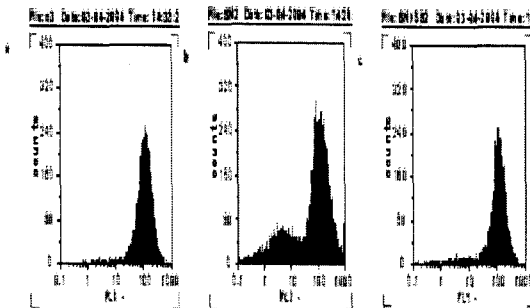


Fig. 6. RS induces mitochondria membrane potential collapse in HeLa cells.

HeLa cells were subjected to 5mg/ml RS in the presence or absence of 100µM Z-VAD for 24hrs. The cells were incubated with 100nM DiO6 dye for 20mins. And then the cells were washed with PBS for 2 times. The cells were harvested and mitochondria membrane potential was measured using FACS Caliber. a; control, b; RS (*Rhizoma Scirpi*), c; RS+SB.

7. 三稜으로 인한 HeLa cell에서의 Bcl-2의 발현 변화

Bcl-2 family proteins은 다양한 경로의 枯死에 관련됨을 증명하는 연구 결과가 최근 많이 발표된 바 있다. Bcl-2는 암세포에서 expression이 증가되어 있으며 이의 발현을 암의 positive marker로 간주하는 발표도 있어왔으며 pro-apoptotic protein의 대표적 단백질인 Bax와 더불어 homo-dimeric/hetero-dimeric associated protein으로 알려져 있다^{16,17}. Fig. 7에서 三稜 5mg/ml 처리시 Bcl-2 protein 발현은 6시간 이후부터 減少를 보여주고 있으며, 24시간대에서는 현저한 抑制를 나타내었다. 이에 비하여 pro-apoptotic protein인 Bax의 발현은 동일 시간대에서 增加현상을 보여주었다. Bcl-2의 발현 抑制와 Bax의 增加는 三稜으로 인한 세포죽음시 주요한 현상으로 간주되어질 수 있다.

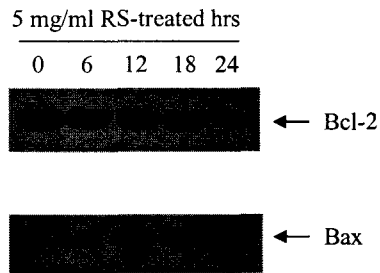


Fig. 7. RS regulates the expression of Bcl-2 and Bax in HeLa cells.

HeLa cells were subjected to 5mg/ml RS for 0, 6, 12, 18 and 24hrs. The cell lysates were prepared and separated on SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. Bcl-2 and Bax were visualized by western blot analysis. RS: *Rhizoma Scirpi*.

8. 三稜으로 인한 HeLa cell의 Bcl-2/Bax 단백질 조절에서 p38 MAPK inhibitor의 역할

앞의 결과에서 5mg/ml의 三稜 처치시 HeLa cell의 죽음을 유도하는 조건에서 p38 MAPK inhibitor인 10 μ M의 SB 203580을 처치시 有意性있게 보호하는 효과를 보여준바 있으며, caspase-3의 활성 조절을 보여주었다. SB 203580 10 μ M 처치시 三稜을 24시간동안 처치하여 감소된 Bcl-2가 대조군 수준으로 回復됨을 관찰하였으며 이와 반대로 pro-apoptotic protein인 Bax의 양은 증가하는 시간대에서 減少됨을 관찰하였다(Fig. 8).

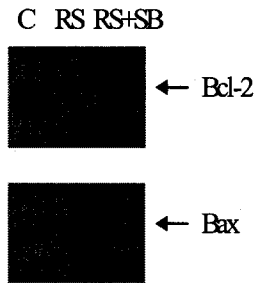


Fig. 8. P38 MAPK is involved in the regulation of Bcl-2 and Bax in HeLa cells.

RS (5mg/ml) was treated in HeLa cells with 10 μ M SB 203580 for 24hrs. The cell lysates were prepared and separated on SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. Bcl-2 and Bax were visualized by western blot analysis. RS: *Rhizoma Scirpi*, SB: SB 203580.

9. 三稜으로 인한 p38 MAPK 活性化 惹起

三稜으로 인한 죽음에 p38 MAPK가 關여하는 기존의 결과를 바탕으로 phospho-p38 MAPK 항체를 사용하여 immunoblotting을 시행하였다. 30분대에서부터 인산화된 p38을 관찰할수 있었으며 p38 MAPK의 총량은 변화가 없었다(Fig. 9). 본 결과와 유사하게 임상에서 쓰

여지고 있는 anti-cancer agent도 biological response를 다양하게 보이는 p38 MAPK cascade를 활성화시킨다고 한다¹⁸⁾.

이러한 p38 MAPK와 같은 효소들은 세포의 죽음, 염증 등의 신호전달체계에서 활발히 연구되어진바 있으며 癌細胞의 枯死를 惹起하는데 결정적 인자로 제시한 보고들이 있다. 이에 본 연구에서도 역시 三稜이 p38 MAPK를 活性化하여 HeLa cell에 枯死를 惹起함을 보고하게 되었다.

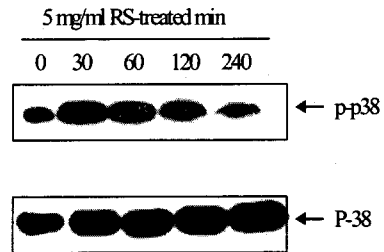


Fig. 9. RS induces p38 MAPK activation in HeLa cells.

HeLa cells were treated with 5mg/ml RS for 0, 30, 60, 120 or 240 mins. The cell lysates were prepared and separated on SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. Phospho-p38 MAPK and p38 MAPK were visualized by western blot analysis. RS: *Rhizoma Scirpi*.

IV. 考 察

자궁경부암은 韓國에서 가장 발생 頻度가 높은 女性 生殖器系 腫瘍이다. 자궁경부암이 上皮內腫瘍(CIN)에서 10여년의 기간을 거쳐 微細浸潤癌으로 발전한다는 사실은 이미 역학적으로 밝혀졌으나 아직까지 각각의 단계에서의 發癌 機轉에 대한 연구는 未洽한 상태이다¹⁹⁾.

자궁경부암에 대한 韓醫學的 概念은 그 臨床 樣相에 있어서 陰道出血이나 分泌物이 增加하는 경우에는 '崩漏', '五

色帶下'에, 病期가 어느 정도 進行되어 腫塊의 형태를 이룬 단계에 이르면 주로 '積聚', '癥瘕', '血蟲'에 해당한다고 볼 수 있다. 이 중에서 특히 癥瘕는 女性의 生殖器에 好發하는 腫塊로서 腹中 腫塊가 上下로 攻築하고 積塊가 日益增大하여 때로 經閉·切産하며 形瘦不食하고 胸腹飽悶하며 疼痛劇盛하는 症狀을 나타내는 婦人科 疾患으로²⁰⁾ 자궁경부암의 腫瘍이라는 表現과 其他 症狀을 考慮할 때 癥瘕가 가장 恰似하다고 할 수 있다.

三稜은 莎草科의 매자기, 또는 黑三稜科의 黑三稜의 塊莖으로 性은 平無毒하고, 味는 苦하다. 肝脾經에 入하고 破血祛瘀, 行氣消積, 止痛和胃, 抗癌의 效능으로 癥瘕積聚, 心腹疼痛, 瘡腫堅硬, 撲損瘀血, 經閉, 産後腹痛, 積滯腹痛, 氣血凝滯 등의 증상에 활용하여 왔으나 氣血虛弱者나 妊婦에게는 禁忌로 되어 있다^{4,5,21)}. 최근의 문헌에는 甲狀腺 腫瘍, 子宮癌, 卵巢癌, 原發性肝癌 등의 각종 癌에 效果가 있음을 밝히고 있고^{4,5)}, 實驗的 研究에서도 抗癌 效果가 立證되고 있다⁷⁻¹¹⁾.

抗癌 治療에 흔히 사용되는 抗癌劑들은 그 機轉에 관계없이 다양한 癌組織이나 細胞柱에서 細胞枯死를 유도함이 밝혀져 있다. 이러한 이유로 抗癌 治療의 효율성은 細胞枯死 기전의 活性化와 밀접한 관련이 있으며 腫瘍 治愈의 觀點에서 중앙세포의 細胞枯死와 관련된 細胞枯死 誘導因子, 信號傳達經路 그리고 關聯 유전자들과 단백질들에 대한 抗癌 機轉의 많은 연구가 이뤄지고 있다.

따라서 본 실험은 사람의 자궁경부암

세포주인 HeLa cell을 사용하여 三稜에 의한 細胞枯死 與否와 作用機轉 및 단백질의 발현 與否를 알아보려고 하였다.

먼저 三稜 (0, 1, 2, 5 or 10mg/ml)을 처리시 용량 의존적으로 세포죽음이 일어남을 확인하였다(Fig. 1B). Apoptosis시 세포막의 blebbing이나 핵의 condensation, fragmentation등이 일어나므로 apoptosis와 necrosis를 구별하고자 이의 형태를 관찰한 결과 三稜 5mg/ml을 24시간 처리하였을 때 전형적인 細胞枯死의 현상을 관찰하였다.

최근 apoptosis시의 신호전달기작이 활발히 연구되고 있으며 그 중 MAPK(Mitogen-activated protein kinase) 등은 세포죽음 및 세포분화와 성장에 관련되어 있다고 발표된 바 있다. Extracellular signal-regulated protein kinase(ERK), c-Jun NH₂-terminal kinase(JNK) 및 p38 MAPK 등이 MAPK의 주류를 이루고 있으며 그 중, JNK 및 p38 MAPK는 세포죽음에 직접 연관된다고 보고되고 있다²²⁻²⁶⁾. 본 연구 결과 三稜이 p38 MAPK 의존적인 독성을 보이고 있으며 p38 MAPK inhibitor인 SB 203580로 p38 MAPK 억제시 세포고사를 보호하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

Caspase계 cysteine protease는 Fas를 經由하는 신호전달과정과 미토콘드리아를 經由하는 신호전달의 하방에 위치하여 細胞枯死에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. caspase는 정상적으로 세포내에 불활성화효소 형태로 존재하다가 세포고사 자극에 의해 활성화되고, 다른 caspase 등 여러 표적 단백질의 기능을 활성화 또는 불활성화시켜

서 세포내 신호전달 활성화를 조절한다²⁷⁾.

Caspase가운데 initiator caspase로 caspase-8 과 caspase-9가 속하며, 이는 비교적 upstream의 caspase로 분류되어 지고 caspase-9은 mitochondria를 경유하는 apoptosis pathway에 속하며 caspase-8은 receptor를 경유하는 pathway에 속하고 TNF-alpha, Fas로 인한 apoptosis에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{14,15)}.

p38 MAPK inhibitor인 SB 203580 10 μ M 처치시 三稜으로 인한 caspase-3의 활성증가를 억제한 반면 MEK1 억제제인 PD 98059와 JNK/SAPK 억제제인 SP compound 처치시, caspase-3의 활성증가에 아무런 영향을 미치지 않았다 (Fig. 4A). 이는 三稜으로 인한 caspase cysteine protease의 활성증가가 p38 MAPK 의존적으로 야기함을 제시하여 주고 있다. 이와 동시에 initiator caspase family인 caspase-8과 -9도 p38 MAPK 의존적인 활성을 보여주었다 (Fig. 4B, C). 三稜으로 인한 세포죽음에 caspase의 역할을 보다 분명하게 나타내기 위하여 pan-caspase 억제제인 Z-VAD 100 μ M을 처치하여 三稜에 의한 細胞枯死 활성을 억제함을 보여주었다 (Fig. 5).

세포죽음에는 mitochondria-의존적인 /비의존적인 죽음이 있다. 細胞枯死시 mitochondria membrane permeability transition에 영향을 미쳐 mitochondria에서 pore를 形成하고 cytochrome c release를 惹起하게 된다^{28,29)}. 이러한 cytochrome c release로 caspase 활성이 惹起되고 세포죽음이 초래되는 과정에

서 membrane potential도 collapse된다³⁰⁻³²⁾. 일반적으로 caspase-9 의존적인 경로는 mitochondria의 Bcl-2 family protein과 연관되어 보고된 바 있으므로 본 연구에서 HeLa 자궁암세포에서 5mg/ml 三稜 처치시 유의성있는 mitochondria membrane potential collapse를 야기시켰으며 p38 MAPK 억제제인 SB 203580 10 μ M 처치시 membrane potential의 collapse를 억제함을 확인하였다.

세포의 能動的 死亡을 의미하는 細胞枯死의 개념이 導入되면서 이것이 發癌過程과 암의 진행 및 암 치료에 미치는 영향에 대한 연구가 관심을 끌면서 최근에 인간의 여러 癌種에서 細胞枯死를 調節하는 유전자가 발견되었다. 細胞枯死의 誘導 및 調節에는 많은 유전자들이 관여하는데, 대표적이 것들이 Bcl-2 유전자 가계에 속하는 Bcl-2, Bax, Mcl-1 유전자가 있으며, 그 외에 p53, c-myc 및 APO/Fas 등이 細胞枯死 過程에 관여하는 것으로 알려져 있다³³⁾.

Bcl-2 유전자는 전종양유전자(proto-oncogene)로서 細胞死亡의 조절에 관여하는 인자로서 다양한 자극에 의해 細胞枯死를 억제하여 세포의 증식을 유발한다³⁴⁾. Bcl-2 단백질은 Bax 단백질과 heterodimer를 형성하고 있어 상호간에 서로의 기능을 억제하고 있는데, Bax 단백질이 Bcl-2 단백질로부터 분리되면 직접적으로 혹은 Bcl-2의 다른 작용기전을 抑制하는 간접적인 경로로 細胞死亡의 기전에 관여한다³⁵⁾. 乳房癌의 80%이상에서 Bcl-2 유전자의 발현이 보고되었고, 자궁경부암에서 Bcl-2 유전자의 발현이 증가할수록 예후가 좋지 않다는 보고가

있었으며³⁶⁾, 子宮頸部 上皮內腫瘍에서도 그 정도가 심할수록 Bcl-2 유전자의 발현이 증가함이 보고되었다³⁷⁾.

Bcl-2 유전자의 과발현에 의한 Bcl-2 단백질의 과생성은 종양 발생을 유도하며, 이는 Bcl-2 유전자가 과발현 될 경우 세포의 증식을 유도한다기보다는 apoptosis를 억제하여 세포 사멸을 감소시키기 때문으로 생각되고 있으며³³⁾. Bcl-2 유전자는 세포사멸을 촉진하는 Bax 유전자와의 상호 비율에 의해 세포 고사에 관여하는 것으로 보고되었다.³⁵⁾

본 실험에서 三稜으로 인한 Bcl-2/Bax의 발현 변화를 알아보고자 三稜(5mg/ml) 처리시, Bcl-2 protein 발현은 6시간이후부터 감소를 보여주고 있으며, 24시간대에서는 현저한 억제를 나타내었다. 이에 비하여 pro-apoptotic protein인 Bax의 발현은 동일 시간대에서 증가현상을 보여주었다(Fig. 7). 그러므로 Bcl-2의 발현 억제와 Bax의 증가는 三稜으로 인한 세포죽음시 주요한 현상으로 간주되어질 수 있다. Bcl-2/Bax 단백질 조절에서 p38 MAPK억제제의 역할을 알아보고자 p38 MAPK inhibitor인 SB 203580 (10 μ M) 처리시 三稜을 24시간 동안 처리하여 감소된 Bcl-2가 대조군 수준으로 회복됨을 관찰하였으며 이와 반대의 pro-apoptotic protein인 Bax의 양은 증가하는 시간대에서 減少시킴을 관찰하였다(Fig. 8).

MAPK는 각각의 단백질에 磷酸이 결합되어 세포의 분화, 성장 그리고 죽음을 유발하는 信號傳達를 한다고 알려져 있다³⁸⁻⁴¹⁾. HeLa cell에서 三稜이 p38 MAPK의 활성을 야기하는지 알아보기 위하여 Immunoblotting한 결과 總량의 변화는 없이 p38 MAPK의 磷酸化를 확인하

였다(Fig. 9).

以上の 實驗 結果를 綜合하면, 三稜은 자궁경부암 세포주 HeLa cell의 細胞枯死를 유도하며, 三稜에 의한 細胞枯死는 caspase 활성화 시키고 미토콘드리아의 經由하는 信號 전달 기전을 媒介하며, Bcl-2/Bax 단백질 조절과 p38 MAPK 활성화를 惹起하고 있음이 확인되었다.

V. 結 論

三稜의 抗癌效果를 연구하고, 細胞枯死 信號 전달체계의 活性化를 통하여 그 효능을 알아보고자 caspase 활성화와 미토콘드리아의 막전위 분석, Bcl-2/Bax 단백질군의 발현 변화 및 p38 MAPK 활성화를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 三稜은 자궁암세포주인 HeLa cell의 細胞 生存度를 減少시켰다.
2. 三稜으로 인한 細胞毒性 유발 조건에서 p38 MAPK inhibitor인 SB 203580 처리시 有意性있게 保護하는 효과를 나타낸 결과 三稜이 p38 MAPK 依存的인 毒性을 나타내는 것을 확인하였다.
3. 三稜으로 인한 세포죽음에 전형적인 細胞枯死의 현상을 관찰하였고, p38 MAPK 抑制시 細胞枯死를 保護하는 것을 확인하였다.
4. 자궁암세포주인 HeLa cell에 三稜 처리시 caspase cysteine protease의 활성증가를 관찰하였고, p38 MAPK 抑制시 caspase family의 활성이 抑制됨을 확인하였다.
5. 三稜으로 인한 細胞枯死에서 caspase의 역할을 보다 분명하게 나타내기 위하여 pan-caspase 억제제인

Z-VAD 100 μ M을 처치한 결과, 三稜에 의한 細胞枯死 활성이 억제됨을 확인하였다.

6. HeLa 자궁암세포에서 三稜 처치시 有意性있는 mitochondria membrane potential collapse가 惹起되었으며, p38 MAPK inhibitor인 SB 203580 처치시 membrane potential의 collapse가 抑制됨을 확인하였다.
7. HeLa 자궁암세포에 三稜 처리시, Bcl-2 protein 발현은 減少되었고, 이에 비하여 pro-apoptotic protein인 Bax의 발현은 增加됨을 보여주었다.
8. 三稜을 24시간 동안 처치하여 감소된 Bcl-2가 p38 MAPK inhibitor인 SB 203580 처치시 대조군 수준으로 回復됨을 관찰하였으며 이와 반대의 pro-apoptotic protein인 Bax의 양은 減少시킴을 확인하였다.
9. HeLa cell에서 三稜이 p38 MAPK의 활성을 惹起하는지 알아보기 위하여 immunoblotting한 결과 p38 MAPK의 總量은 변화가 없이 p38 MAPK의 磷酸化를 확인하였다.

以上の 實驗 結果로 볼 때, 三稜은 자궁경부암 세포주 HeLa cell의 細胞枯死를 誘導하였으며, 여기에는 caspase를 활성화시키고 mitochondria membrane potential collapse를 惹起시키고 Bcl-2의 減少와 Bax 단백질 增加시키며 p38 MAPK 활성화를 經由한 細胞枯死 機轉이 있음이 확인되었다.

- 투 고 일 : 2005년 04월 29일
- 심 사 일 : 2005년 05월 02일
- 심사완료일 : 2005년 05월 10일

參考文獻

1. 한국중앙암등록본부·보건복지부. 한국중앙암등록사업 연례보고서(2000. 1. - 2000. 12.). 보건복지부. 2002.
2. 서울대학교 의과대학 산부인과학교실. 산부인과학. 서울: 군자출판사. 1999; 404-411.
3. 대한산부인과학회 교과서편찬위원회. 부인과학. 서울: 칼빈출판사. 1997; 98 0-1027.
4. 楊維傑 編. 黃帝內經譯解(靈樞). 서울: 成輔社. 1980; 473.
5. 孫思邈. 華陀神醫秘傳. 서울: 東醫輔. 1976; 20.
6. 차승만. 항암 및 항세균 생약의 통계학적 연구. 생약학회지. 1977; 8(1): 1-15.
7. 朴世光. 三稜煎元煎湯液이 人體白血病細胞柱에 미치는 影響. 大田大學校大學院. 1996.
8. 韓德珉. Leukaemic Cell增殖 抑制에 미치는 萊菔子 및 三稜抽出物の 影響. 高麗大學校 大學院. 1982.
9. 이학승. 삼능(Scirpus Maritimus)의 항암성연구. 高麗大學校 大學院. 1994.
10. 황우익. 한국산 생약제로부터 항암성분의 추출 및 그의 항암성 활성 측정 에 관한 연구. 한국생화학학회지. 1980; 13(1): 25-29.
11. 최광수. 홍화, 목단피, 삼릉이 치은섬유모세포와 치주인대세포에 미치는

- 영향. 圓光大學校 大學院. 1997.
12. Chae HJ. et al. The p38 mitogen activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis in response to tumor necrosis factor in osteoblasts. *Bone*. 2001; 28(1): 45-53.
 13. Chae HJ. et al. Blockade of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibits inducible nitric oxide synthase and interleukin-6 expression in MC3T3E-1 osteoblasts. *Pharmacol Res*. 2001; 43(3): 275-283.
 14. van Loo G. et al. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell death Differ*. 2002; 9: 1031-1042.
 15. Petak I, Houghton JA. Shared pathways: death receptors and cytotoxic drugs in cancer therapy. *Pathol Oncol Res*. 2001; 7(2): 95-106.
 16. Dekker NP. et al. Apoptosis-associated markers in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*. 1997; 26(4): 170-175.
 17. Kang M. et al. Ki-67, p53 and Bcl-2 expression of serrated adenomas of the colon. *Am J Surg Pathol*. 1997; 21(4): 417-423.
 18. Bacus SS. et al. Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways(ERK and p38) and is independent of p53. *Oncogene*. 2001; 20(2): 147-55.
 19. 최규연 등. 자궁경부암의 발암과정에서 아포토시스의 역할. *대한부인종양콜포스키회학회지*. 1997; 8(3): 250-257.
 20. 李熙祥, 鄭鎮鴻, 柳同烈. 癥瘕의 治方에 對한 文獻的 考察. *大田大學校 韓醫學研究所 論文集*. 1998; 6(2): 417-435.
 21. 구덕모. 삼릉, 봉출이 임신에 미치는 영향. *대한한방부인과학회지*. 1993; 6(1): 15-25.
 22. Wilson DJ. et al. JNK, but not MAPK, activation is associated with Fas-mediated apoptosis in human T cells. *Eur J Immunol*. 1996; 26(5): 989-994.
 23. Saldeen J, Lee JC, Welsh N. Role of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) in cytokine-induced rat islet cell apoptosis. *Biochem Pharmacol*. 2001; 61(12): 1561-9.
 24. Zhu W. et al. MAPK superfamily plays an important role in daunomycin-induced apoptosis of cardiac myocytes. *Circulation*. 1999; 100(20): 2100-2107.
 25. Liao JH. et al. The involvement of p38 MAPK in transforming growth factor beta1-induced apoptosis in murine hepatocytes. *Cell Res*. 2001; 11(2): 89-94.
 26. Nagata Y, Todokoro K. Requirement of activation of JNK and p38 for en

- vironmental stress-induced erythroid differentiation and apoptosis and of inhibition of ERK for apoptosis. *Blood*. 1999; 94(3): 853-863.
27. Talanian RV. et al. Substrate specificities of caspase family protease. *J Biol Chem*. 1997; 272: 9677-82.
28. archetti P. et al. Mitochondria permeability transition is a central cocodinating event of apoptosis. *J Exp Med*. 1996; 184: 1155-1160.
29. Marzo I. et al. The permeability transition pore complex: A target for apoptosis regulation by caspases and Bcl-2-related proteins. *J Exp Med*. 1998; 187: 1261-1271.
30. itanaka C. et al. Caspase-dependent apoptosis of COS-7 cells induced by Bax overexpression: differential effects of Bcl-2 and Bcl-XL on Bax-induced caspase activation and apoptosis. *Oncogene*. 1997; 15: 1763-1772.
31. Jurgensmeier JM. et al. Bax indirectly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 4997-5002.
32. astorino JG. et al. The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem*. 1998; 273: 7770-7775.
33. 이규완 등. 자궁경부 상피내 종양 및 자궁경부암 조직에서 p53, MIB-1, 및 세포고사(apoptosis)에 관한 연구. 대한 산부인과학회지. 2001; 44(6): 1115-1122.
34. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol*. 1994; 124, 1-6.
35. Oltvai Z, Milliman C, Korsmeyer SJ. bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993; 74: 609-619.
36. Uehara T. et al. Expression of the proto-oncogene Bcl-2 in uterine cervical squamous cell carcinoma: Its relationship to clinical outcome. *Eur J Gynecol Oncol*. 1995; 6: 453-460.
37. Ter Harnsel B, Smedts F. Bcl-2 immunoreactivity increases with severity of CIN: a study of normal cervical epithelia, CIN, and cervical carcinoma. *J Pathol*. 1996; 179(1): 26-30.
38. Chen W, Bowden GT. Activation of p38 MAP kinase and ERK are required for ultraviolet-B induced c-fos gene expression in human keratinocytes. *Oncogene*. 1999; 18(52): 7469-7476.
39. Feng GJ. et al. Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric

- c oxide synthase and IL-12 in macrophages, *Leishmania phosphoglycans* subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. *J Immunol.* 1999; 163(12): 6403-6412.
40. Xia Z. et al. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science.* 1995; 270(5240): 1326-1331.
41. Schumann RR. et al. Lipopolysaccharide induces the rapid tyrosine phosphorylation of the mitogen-activated protein kinases erk-1 and p38 in cultured human vascular endothelial cells requiring the presence of soluble CD14. *Blood.* 1996; 87(7): 2805-2814.