

## 보두산에 의한 사람 위암 세포주 SNU-1의 세포사멸 경로

이재은, 윤현정, 이영태, 배창욱, 전현숙, 박선동<sup>#\*</sup>

동국대학교 한의과대학 방제학교실

Apoptotic pathway of SNU-1, human gastric cancer cell line, by Bodusan.

Jae-Eun Lee, Hyun-Joung Yun, Young-Tae Lee, Chang-Wook Bae,  
Hyun-Sook Jeun, Sun-Dong Park<sup>#\*</sup>

Department of Herbal pharmacology, Collage of Oriental Medicine, Dongguk University

### ABSTRACT

**Objectives :** The purpose of this study was to investigate the anticancer effects of Bodusan (BDS) on SNU-1 cells, a human gastric cancer cell line.

**Methods :** To study the cytotoxic effect of BDS on SNU-1 cells, the cells were treated with various concentrations of BDS and then cell viability was determined by XTT reduction method and trypan blue exclusion assay. The typical signs of apoptosis, was examined by western blot analysis. BDS-induced MAPK activation was also examined by Western blot for phosphorylated ERK and p38.

**Results :** BDS reduced proliferation of SNU-1 cells in a dose-dependent manner and decreased procaspase 3 level in a dose-dependent manner and induced the cleavage of PARP at concentration > 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . BDS also triggered the mitochondrial apoptotic signaling by increasing the release of cytochrome C from mitochondria to cytosol and reducing the level of anti-apoptotic Bcl-2. BDS significantly decreased ERK phosphorylation and increased p38 phosphorylation in a dose-dependent manner. Furthermore, BDS treatment up-regulated p53 and p21waf expression in a dose-dependent manner.

**Conclusion :** BDS-induced apoptosis is MAP kinase-dependent apoptotic pathway and arrested SNU-1 cells at the G0/G1 of cell cycle. These results suggest that BDS is potentially useful as a chemotherapeutic agent in human gastric cancer.

**Key words :** Bodusan, apoptosis, mitochondrial pathway, MAP kinase, cell cycle

---

#제1저자, \*교신저자 : 박선동, 동국대학교 한의과대학 방제학교실

· Tel : 054-770-2654 e-mail : sundong@dongguk.ac.kr

· 접수 : 2006년 1월 23일 · 수정 : 2006년 3월 17일 · 채택 : 2006년 3월 22일

## 서 론

위암에 대한 발생빈도는 서양 선진국에서는 이미 감소 추세에 있으나, 우리나라에서는 아직도 높은 비중을 차지하고 있다. 위암의 전구 병변으로는 위축성 위염, 무산증 악성빈혈 그리고 위궤양을 들 수 있으며, 치료는 주로 외과수술, 화학요법 및 면역요법 등이 주요 치료방법이나 최근에는 개복한 상태에서 수술 중 방사선조사요법이 시도되고 있다<sup>1)</sup>.

한의학적으로 위암에 대한 다양한 치료방법이 모색되어 왔으며, 그 중 약물요법으로 알려진 처방으로는 十全大補湯, 柴芩湯, 血府逐瘀湯 등을 들 수 있다<sup>2)</sup>. 그러나 직접적인 위암 세포 제거보다는 암세포발생의 예방이나 방사선치료의 부작용에 대한 보조적 역할의 한계에서 벗어나지 못한 실정이다.

저자는 이와 같이 위암에 대한 관심을 좀 더 심도 있게 공부하면서 분자생물학적인 기전에 집중하였으며, 아울러 새로운 치료 가능성성을 가진 약물을 탐색해오던 중 대중적으로 알려지진 않았지만 보두감초의 복합처방을 찾을 수 있었다. 보두 (*Strychni ignatii semen*)는 馬錢科 (*Loganiaceae*)에 속하는 상록관목인 보두나무의 종자를 말한다<sup>3)</sup>. 보두는 溫한 성질을 가지며 苦味로서 독성이 있는데 진통·진경작용을 가지고 후두마비, 회복통, 학질, 이질, 그리고 급만성위염을 치료한다고 한다. 근래 임상에서는 보두를 수치법에 따라 분말로 감초와 배합하여 항암치료나 진통제 등으로 사용하고 있다<sup>4)</sup>.

보두를 이용한 실험논문으로는 정<sup>5)</sup>이 수점산과 보두를 병용 투여하여 위액분비가 억제되었다는 것과, 장관 수송능, 지사작용, 그리고 진통실험에서도 유의한 효과가 있음을 보고하였다. 또한 정<sup>6)</sup>은 ammonia투여 궤양유발실험에서 투여용량 및 기간의 존적으로 궤양면적의 감소를 관찰하였으며, 위 점막의 출혈정도도 감소하는 것을 확인하였음을 보고하였다. 한편 조<sup>7)</sup>는 보두의 수치법에 따라 독성이 감소함을 보고하였고, 아울러 유문결찰궤양과 indomethacin 궤양억제효과와 위액분비 억제효과를 보고하였다. 그러나 *in vitro*상에서 위암세포를 이용한 보두의 작용기전의 보고는 보이지 않았다.

이에 본 실험에서는 보두감초(보두산)의 효능을 실험적으로 규명하기 위하여 사람 위암 세포주인 SNU-1을 선정하였다. 먼저, 세포독성여부를 확인하기 위하여 농도별로 보두산을 처리하여 XTT assay

와 trypan blue exclusion assay를 수행하였으며, 세포의 형태학적 변화는 현미경을 통해 관찰하였다. 농도에 따른 세포사가 apoptosis (programmed cell death)에 의한 것인지를 확인하기 위하여 western blot을 수행하였다. 또한 apoptosis에 관여하는 세포내 signal을 확인하기 위해 경로 중 하나인 mitochondria pathway에 관해 조사하였고, 세포의 증식, 분화, 그리고 세포의 생존과 세포사멸을 포함하는 다양한 생물학적 기능을 조절한다고 알려져 있는 mitogen-activated protein kinase (MAPK)가 관여하는지 알아 보았다.

MAPKs는 serine/threonine kinase로서 extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 MAPK, c-jun N-terminal kinase (JNK)로 구분된다. MAPKs의 활성은 세포 내 인산화에 의해 기인하고, 그 신호전달 과정은 세 가지의 세포 내 protein kinase의 활성과정에 의해 구성되며 MAPK kinase kinase (MAPKKK)의 활성화에 의해 시작된다. 활성화된 MAPKs는 다른 protein kinase들과 혼단백질, 또는 전사인자를 활성화시켜 신호를 전달하게 된다 (Figure 1).

마지막으로 보두산가 SNU-1 세포의 cell cycle 조절에 관여여부를 검증한 바 다음과 같은 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

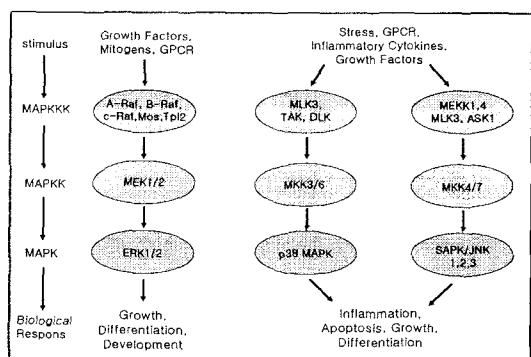


Figure 1. Mitogen-activated protein kinase cascades. The mitogen-activated protein kinase (MAPK) family is an evolutionarily conserved class of proline-directed serine/threonine kinases, which include Erk1/2, p38 Hog, JNK/SAPK, Erk3 and Erk5. This family has been implicated in a myriad of biological events including cell proliferation, differentiation and metabolism. Furthermore, (epi)-genetic aberrations of these enzymes or of the signaling cascades that regulate them have been implicated in a variety of human diseases including cancer, inflammation and cardiovascular disease.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 동국대학교 부속 한방병원에서 정선하여 구입하였으며, 보두는 껍질을 벗긴 후 2ℓ의 식초에서 48시간동안 수치한 것을 말린 후 사용하였다. 보두산의 내용 및 총량은 다음과 같다.

Table 1. Composition and contents of Bodusan

약명	학명	각량(g)
보두	<i>Strychnos ignatti</i> Bergius	100
감초	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	400
Total		500

#### 2) 시약

RPMI-1640, fetal bovine serum, streptomycin-penicillin 등의 세포배양용 시약들은 Gibco BRL (Grand Island, USA)사에서, 배양조는 Corning (Rochester, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 HEPES, sodium dodesyl sulfate (SDS), NP-40, CAPS, protease inhibitors 등은 SIGMA (St. Louis, USA)사에서 구입하였으며, 실험에 사용된 항체인 anti-caspase 3, anti-p53, anti-p21Waf은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)사에서, anti-PARP, anti-P-ERK1/2, anti-P-p38은 Cell signaling사에서, Bcl-2와 cytochrome C는 BD Bioscience사에서 구입하였다. 또한 실험에 사용된 시약 중 p38 MAPK의 저해제인 SB203580과 RNase A, proteinase K는 Sigma (St. Louis, USA)에서 구입하였다. Enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit는 Oxford, UK에서, protein assay reagent는 Bio-Rad (Hercules, USA)사에서 구입하였으며, 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 검액 조제

보두산에 3배량의 80% methanol을 가한 다음 48시간 동안 추출하고, 이 과정을 2회 반복하여 여과한

후 농축하고 동결 건조하여 159.35 g (수율:21.25%)의 보두산을 얻었다.

#### 2) 세포배양

사람 위암 세포주인 SNU-1 (human gastric cancer cell, KCLB)을, 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 RPMI-1640 배지에서 CO<sub>2</sub>, 37℃ 배양조에서 배양하였다.

#### 3) XTT assay

보두산에 의한 세포 세포독성을 알아보기 위해 XTT assay 방법을 이용하였다. Well당 1×10<sup>5</sup>개의 cell을 96 well plate에 분주하고 serum free media로 16시간 동안 starvation 시킨 후, 보두산을 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. Well당 100 μl의 XTT (Roche, USA) labeling mixture (5 μl XTT labeling reagent + 0.1 μl electron coupling reagent)를 처리하여 4시간 반응시킨 후, micro plate reader (DYNEX, Opsys MR)를 이용하여 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다. 약제가 갖는 흡광도를 보정하기 위하여 세포를 뺀 배지를 같이 배양하여 대조군과 실험군의 흡광도를 비교 보정하여 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

#### 4) Trypan blue exclusion assay

60 mm 배양조에 1×10<sup>6</sup> cells/㎜<sup>2</sup>로 세포를 심고 serum free media로 16시간동안 starvation 시킨 후, 보두산을 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. Trypsin-EDTA를 처리하고 원심분리하여 세포들은 모아서 trypan blue (0.4%)로 염색하여 hematocytometer를 이용하여 생존한 세포의 수를 측정하였다.

#### 5) Western blot analysis

전기영동을 위한 단백질 시료의 추출은 처리 시간별로 세포를 ice-cold tris buffered saline (TBS ; 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl)으로 3회 수세한 후 lysis buffer (TBS, 1% NP-40, 1 mM sodium orthovanadate, 10 μg/ml aprotinin, 10 μg/ml leupeptin 및 1 mM PMSF)를 넣어 4℃에서 20분간 반응시키고 12,000×g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 모았다. 동일한 양의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리시킨 후, 단백질을 nitrocellulose membrane에

transfer하였다. 이 membrane을 항체의 비특이적 결합을 차단하기 위하여 blocking buffer (5% non-fat milk와 0.1% Tween 20을 함유한 TBS 용액)에서 1시간 동안 반응시킨 후 각 검증 단백질에 대한 항체를 가하여 1~2시간 동안 반응시켰다. 이어서 0.1% Tween 20을 함유한 TBST 용액으로 10분씩 3차례 수세한 다음, peroxidase-conjugated anti-mouse IgG 혹은 anti-rabbit IgG를 secondary antibody로 반응시켰다. 이어서 ECL system으로 반응 시킨 후 X-ray film상에서 단백질을 검증하였다. 각 시료의 단백질 정량은 bradford protein assay kit를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 실시하였다.

### 3. 통계처리

실험 결과에 대한 통계학적 분석은 실험 결과는 Sigma Plot 2001 (Window용 version 7.0)을 이용하여 평균과 표준 편차 (mean±S.D.)로 타나냈었다. 유의성은 student's t-test로 검정하였다.

## 결과

### 1. 보두산의 SNU-1 세포에 대한 독성

보두산의 세포독성을 관해 알아보기 위하여 위암 세포주인 SNU-1 세포에 다양한 농도 (100~1000 µg/ml)의 보두산을 24시간 동안 처리하여 XTT assay 와 trypan blue exclusion assay를 수행하였다. XTT assay 결과, 500 µg/ml의 농도에서부터 세포에 대한 독성을 나타내었으며 (Figure 1), trypan blue 염색을 통해 관찰한 결과 500 µg/ml의 농도에서 control의 61.8% 생존율을 보였고 800 µg/ml의 농도에서는 45.5%까지 생존율이 감소하는 것으로 나타났다 (Figure 2).

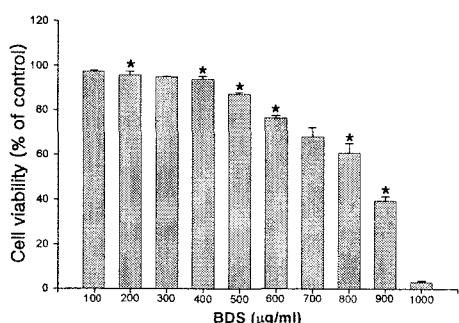


Figure 1. Effect of BDS on cell viability of the SNU-1 cells. SNU-1 cells were incubated in the absence or presence of the various concentrations of BDS for 24 hrs. Cell viability was measured by XTT assay as described in materials and method. Data were chosen from six independent triplicate experiments. Values are mean±S.D., \*, p<0.05 compared with control.

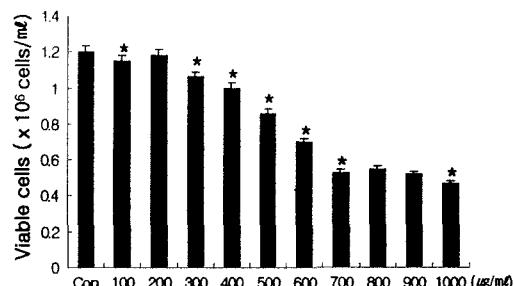


Figure 2. Effect of BDS on cell viability of the SNU-1 cells. Cell viability was determined by trypan blue exclusion assay as described in Materials and Method. Data were chosen from six independent triplicate experiments. Values are mean±S.D. \*, p<0.05 compared with control.

### 2. 보두산에 의한 SNU-1 세포사멸

SNU-1 세포에 보두산을 농도별로 처리하여 세포사멸 (apoptosis ; programmed cell death)의 진행 정도를 알아보았다. 세포는 세포사멸 과정동안 회복 기능을 상실하게 되는데, 여기에 중요한 polymerase가 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)이다. 이 PARP의 절단이 곧 세포사멸을 확인할 수 있는 하나의 지표가 된다. 또한 PARP의 upstream regulator인 caspase 3의 이에 western blot을 통해 PARP의 절단을 관찰하였다. 그 결과, 500 µg/ml 이상의 농도에서 세포사멸이 유도되는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 3). 또한 PARP의 upstream regulator인 caspase 3의 발현양상을 알아 본 결과, procaspase 3가 보두산의 농도에 의존적으로 감소함을 볼 수 있었다 (Figure 4).

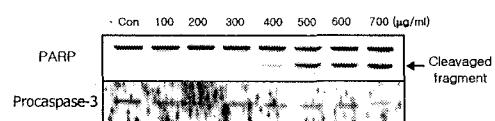


Figure 3. BDS-induced apoptosis. SNU-1 cells were incubated in the absence or presence of various concentrations of BDS for 24 hrs. The cleavages of PARP and the reduction of procaspase 3 were detected by Western blot.

### 3. Mitochondrial pathway를 통한 세포사멸

보두산에 의해 유도되는 세포사멸이 세포 내 어떠한 신호전달을 통해 일어나는지 알아보았다. 본 실험에서는, 잘 알려진 세포사멸의 경로 중 하나인 mitochondrial apoptosis에 관여하는 Bcl-2의 발현양상과 cytochrome C release 정도를 알아보았다. 그 결과, 처리한 보두산의 농도에 의존적으로 Bcl-2의 발현이 점차적으로 감소하였고, 세포질 내의 cytochrome C가 증가하는 것을 확인하였다 (Figure 4). 이로써 보두산에 의한 세포사멸이 mitochondrial pathway를 경유하는 것으로 볼 수 있다.

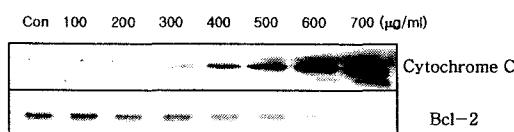


Figure 4. Effects of BDS on cytochrome C release and expression of Bcl-2. SNU-1 cells were incubated in the absence or presence of various concentrations of BDS for 24 hrs. Release of cytochrome C from mitochondria and Bcl-2 were detected by Western blot.

### 4. 보두산에 의한 Mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 활성 변화

Mitogen-activated protein kinase (MAPK)는 세포의增식, 분화, 그리고 세포의 생존과 세포사멸을 포함하는 다양한 생물학적 기능을 조절한다고 알려져 있다. 보두산 처리 시, MAP kinase의 활성에 어떠한 변화가 있는지 알아보기 위하여 anti-P-ERK1/2와 anti-P-p38을 이용한 western blot을 수행하였다. 그 결과, P-JNK는 detection되지 않았고, 처리한 보두산의 농도에 의존적으로 P-ERK1/2가 감소하는 것을 볼 수 있었다. 반면, P-p38 MAP kinase는 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다 (Figure 5).

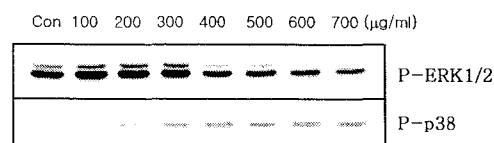


Figure 5. Changes of the activities of ERK1/2 and p38 MAP kinase during BDS-induced apoptosis. SNU-1 cells were incubated in the absence or presence of various concentrations of BDS for 24 hrs. MAPKs activation was analyzed by Western blot.

### 5. p38 MAP kinase의 활성에 따른 세포사멸의 변화

보두산 처리 시 p38 MAP kinase의 인산화가 증가하는 것으로 보아, 이때 증가한 P-p38이 보두산에 의한 apoptosis와 관련이 있을 것으로 생각되어 p38 MAP kinase의 특이적 저해제인 SB203580을 보두산과 cotreat한 후, apoptosis가 유도에 어떠한 변화가 나타나는지 알아보았다. 그 결과, SB203580에 의해 p38의 인산화가 억제되었을 경우 PARP의 cleavage가 관찰되지 않았고 procaspase 3의 감소도 나타나지 않았다 (Figure 6). 이로써, 보두산에 의해 증가된 p38 MAP kinase의 활성에 의해 SNU-1 세포의 apoptosis가 유도되는 것으로 볼 수 있다.

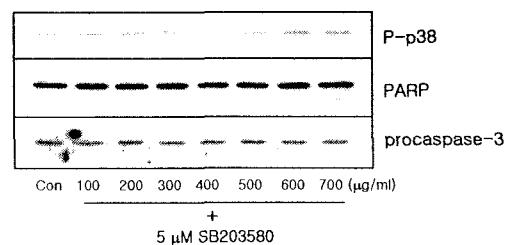


Figure 6. Inhibition of P-p38 by a specific inhibitor, SB203580, lead to inhibit the fragmentations of PARP and procaspase 3. SNU-1 cells were cotreated with BDS and 5 μM SB203580 for 24 hrs. The cleavages of PARP and the expression of procaspase 3 were analyzed by Western blot.

### 6. 보두산이 SNU-1 세포의 cell cycle에 미치는 영향

p53은 tumor suppressor gene으로서 외부 자극에 의해 DNA damage가 생긴 경우, p53의 발현이 증가하게 된다. 증가된 p53은 cell cycle arrest와 apoptosis의 두 가지 pathway에 관여하게 된다 (Figure. 8). 보두산 처리 시 SNU-1의 cell cycle에 어떠한 영향이 있는지 확인하기 위하여 cell cycle 조절에 관여하는 단백질인 p53과 p21<sup>Waf</sup>의 발현양상에 관하여 알아보았다. 그 결과, 처리한 보두산의 농도에 의존적으로 p53과 p21<sup>Waf</sup>의 발현이 증가하는 것으로 보아 보두산이 SNU-1 세포의 cell cycle 조절에 관여하여 세포의增식에 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다 (Figure 7).

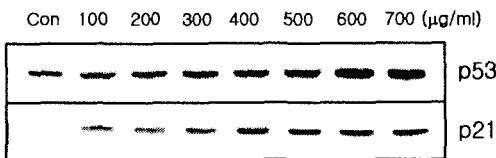


Figure 7. Effects of BDS on p53 and p21 expression. SNU-1 cells were incubated in the absence or presence of various concentrations of BDS for 24 hrs. p53 and p21 were detected by Western blot.

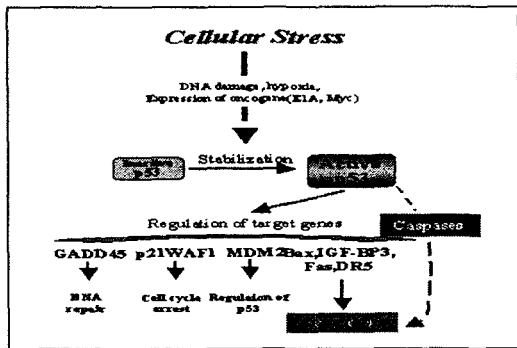


Figure 8. The roles of p53. Cellular stresses such as genotoxic injury and oxidative stress, viral proteins such as SV40 T antigen and adenovirus Ela, and conditional expression of cellular factors such as myc and ras all induce p53 expression. p53 accumulation is likely to be mediated via multiple pathways. p53 acting as a sequence-specific and DNA binding protein is known to activate p21WAF/CIP, Bax, and MDM2, which are linked to cell cycle arrest and apoptosis.

## 고 찰

매년 국내에 10만 명 이상의 암 환자가 발생하고 있으며 평생 남자는 3명 중 1명꼴, 여자는 5명 중 1명꼴로 발생하고 있는 실정이다. 보건복지부 최근 1999년에서 2001년 까지 전국 암 환자 발생사태를 조사한 결과 위암환자가 가장 많은 것으로 조사되었다. 선진 국에서는 감소추세 있는 위암이 유전적 요인 및 식생활을 포함한 환경적 요인으로 인해 그 발생률과 사망률이 국내에 있어서 전체 종양 중 가장 높은 것으로서 보고되고 있다. 한의학적인 치료에 있어서 위암에 대한 다양한 치료방법과 더불어 항암 효과를 밝힌 연구가 현재까지 많이 진행되어 오고 있으나 아직까지 특이한 치료연구는 미흡한 상태이다.

보두는 마전과에 속하는 상록관목인 보두나무의 종자로 성이 온하고 고미로서 독성이 있는데 진통·

진정작용을 가지고 있으며, 근래 임상에서는 수치법에 따라 분말로 감초와 배합하여 항암치료나 진통제 등으로 사용하고 있다. 이에 본 연구에서는 보두가 위암 세포주에 어떠한 영향을 주는지 알아보았다.

위암에 관한 실험은 일반적으로 *in vivo*와 *in vitro*로 나누어지며, *in vitro*로 실험에서 상용되어온 위암세포로는 AGS, MKN45, SNU-1, SNU-5, SNU-16, M1, M28, M45등이 있다. 본 실험에서는 SNU-1 세포주를 선정하여 실험을 수행하였다.

먼저, 보두산이 SNU-1 세포에 대해 독성을 갖는지 알아보기 위하여 XTT assay와 trypan blue exclusion assay를 수행하였다. 또한 현미경 관찰을 통해 형태학적 변화를 관찰한 결과, 500 μg/ml 이상의 농도에서 SNU-1의 세포사가 일어나는 것을 볼 수 있었다.

정상적인 조직에서는 apoptosis (programmed cell death)를 통해 세포의 증식과 사멸이 균형을 이루게 되는데, 이런 apoptosis의 조절에 이상이 생김으로 인해 세포의 증식과 사멸의 균형이 깨어지게 되면 악성 종양으로의 변형이 일어날 수 있게 된다<sup>8-10)</sup>. 따라서 암세포의 apoptosis를 인위적으로 유도함으로써 세포의 증식을 조절하여 암을 치료할 수 있을 것이다. 이에 보두산에 의한 세포사가 apoptosis에 의한 것인지를 알아보기 위하여 anti-procaspase 3와 anti-PARP를 사용하여 western blot을 수행하였다. Caspase는 세포질에서 pro-form으로 존재하고 특정 위치의 proteolytic 과정에 의해 활성화된다. Caspase 3는 특이적인 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD) sequence에서 PARP의 절단을 조절한다고 알려져 있다<sup>11-13)</sup>. 본 연구에서도 보두산에 의해 procaspase 3의 발현 감소와 PARP의 cleavages를 관찰함으로써 apoptosis가 유도됨을 확인하였다. 보두산에 의해 유도되는 apoptosis가 세포 내 어떠한 경로를 통하여 일어나는지 알아보았다. Apoptosis가 유도되는 경로 중 잘 알려진 mitochondrial pathway에 관여하는 cytochrome C와 Bcl-2 family의 발현양상을 조사하였다<sup>14-17)</sup>. 그 결과, 처리한 보두산의 농도에 의존적으로 cytochrome C의 세포질로의 방출이 증가하였고, mitochondria로부터 cytochrome C의 방출을 저해하는 Bcl-2의 발현이 감소하는 것을 확인하였다. 또한 proapoptotic Bax의 발현이 증가하였다. 이로써, 보두산에 의한 apoptosis는 mitochondrial pathway를 경유한다는 것을 알 수 있었다.

MAP kinase family (MAPK)는 serine/threonine kinase이며 extracellular signal-regulated kinase

(ERK), p38 MAPK, c-jun N-terminal kinase (JNK)로 크게 구분된다. MAPK 구성요소들은 세포의 증식, 분화, 그리고 세포의 생존과 세포사멸을 포함하는 다양한 생물학적 기능을 조절한다고 알려지고 있다<sup>18~21)</sup>. 세포는 세포 내 전달명령에 의해 세포 밖의 신호를 세포 내로 보내게 된다. 그러한 신호의 전달 변화에 종종 이용되어지는 대표적인 경로에 MAPK 가 위치하고 있다. MAPK의 활성은 세포내 인산화에 의해 기인한다. MAPK 신호전달과정은 세 가지의 세포 내 protein kinase의 활성 과정에 의해 구성되며 MAPK kinase kinase (MAPKKK)의 활성화에 의해 시작된다. MAPKKK는 serine/threonine kinase이며 MAPK kinase (MAPKK)를 활성화한다. MAPKK는 양쪽 threonine과 tyrosine 잔기의 인산화에 의해 MAPK를 활성화한다. 활성화된 MAPKs는 다른 protein kinase들과 핵 단백질, 또는 전사인자를 활성화하여 신호를 전달하게 된다. MAPK의 활성과정은 빠르며 세포가 환경적 변화에 반응할 수 있도록 해 준다.

MAPK/ERK kinase (MEK)는 MEK kinase (MEKK)에 의해서 활성화된다. ERK는 성장 요인들의 반응에 의해 활성화되어 지는데 이들의 활성화는 tyrosine 인산화와 상호 작용한다. ERK의 인산화는 여러 세포주와 *in vivo*에서 명확하게 조절되는 것을 볼 수 있다. ERK1/2는 세포 내에서 광범위하게 발현되고, 유사분열과 감수분열의 조절, postmitotic 기능에 관여하며, 성장인자와 cytokine, 바이러스 감염, 형질전환 물질, carcinogen 등과 같은 많은 자극에 의해 활성화된다<sup>22~23)</sup>. ERK1/2는 c-Raf, B-Raf, A-Raf 등 의 인산화에 의해 활성화되는데 이들은 protooncogene인 Ras에 의해 활성화된다. 활성화된 oncogene에 의한 Ras의 돌연변이는 많은 암세포에서의 공통된 특징으로 알려져 있다<sup>24~26)</sup>. 암세포에서의 Ras는 ERK1/2 경로를 활성화시키고 암세포의 증식률을 높이는 데 기여한다. 따라서 ERK 경로의 저해는 잠재적으로 항암 치료의 target이 될 수 있을 것이다. p38 MAP kinase 는 네 가지의 동위효소를 가지고 있으며 stress, heat shock, radiation 등과 같은 일련의 자극에 의해 활성화되어 염증반응, apoptosis, 세포 분화등 다양한 생물학적 반응을 유도한다고 알려져 있다<sup>27)</sup>.

이에 본 연구에서는 보두산에 의해 SNU-1 세포 내 MAPKs에 어떠한 활성변화가 있는지 알아보았다. 보두산을 24시간 처리 시 인산화된 ERK1/2의 발현이 농도 의존적으로 감소하였고, 반면 인산화된 p38의 발현은 농도 의존적으로 증가하였다. MAP kinase의 이러한 활성 변화로 보아 증가된 P-p38이 보두산에

의한 apoptosis에 작용할 것으로 생각되어 p38의 specific inhibitor인 SB203580을 보두산과 cotreat한 후 PARP와 procaspase 3의 발현양상을 조사하였다. 그 결과, p38의 저해 시 보두산에 의한 apoptosis가 감소하는 것으로 나타났다. 이로써 보두산에 의해 증가된 p38의 활성이 SNU-1 세포의 apoptosis를 유도하는 데 작용하는 것으로 생각할 수 있었다.

p53은 53 kD의 종양억제 단백질로서 비정상적인 세포의 성장을 억제하고 세포 내에서 여러 경로를 통해 조절자로서의 역할을 하고 있다<sup>28)</sup>. 어떤 자극에 의해 세포의 DNA 손상이 생긴 경우 p53이 활성화된다. DNA손상이 적은 경우 활성화된 p53은 p21<sup>waf</sup>를 활성화시켜 cell cycle arrest를 유도하여 DNA repair가 일어날 수 있도록 해 주며, 심각한 DNA 손상이 생긴 경우에는 Bax의 발현을 upregulation시키고 Bcl-2의 발현을 downregulation시킴으로써 apoptosis를 유도한다<sup>29)</sup>. 이에 보두산을 처리한 후 p53과 p21<sup>waf</sup>의 발현양상을 조사해 본 결과, 처리한 보두산의 농도가 증가함에 따라 p53과 p21<sup>waf</sup>의 발현이 점차 증가하는 것을 볼 수 있었다.

이러한 실험 결과들로 보아, 보두산은 위암 세포 주인 SNU-1의 apoptosis를 유도하고, 이는 mitochondrial pathway를 경유하는 것으로 볼 수 있었다. P-ERK1/2의 감소와 P-p38의 증가를 유도하는 것으로 보아 보두산에 의한 apoptosis에 MAP kinases가 관여한다는 것을 알 수 있었다. 또한 보두산에 의해 p53과 p21<sup>waf</sup>의 발현이 증가하는 것으로 보아 SNU-1 세포의 cell cycle 중 G1 phase에서 arrest가 유도됨을 알 수 있었다. 즉, 보두산이 위암 치료에 효과적으로 작용할 수 있을 것으로 보인다. 앞으로 보두산의 세포 내 분자적 기작에 관한 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이며 *in vivo* 실험들도 함께 이루어져야 할 것이다.

## 결 론

사람 위암 세포주인 SNU-1에 대한 보두산의 세포사멸 유도와 그 mechanism에 관한 연구를 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 보두산의 세포독성을 확인하기 위해 XTT assay 와 trypan blue exclusion assay를 수행한 결과, 500 µg/ml 이상의 농도에서 세포사가 관찰되었다. 또한 현미경을 이용한 세포 형태학적 관찰을 통해 서도 이와 같은 결과를 얻었다.

2. 보두산의 세포독성으로 인해 SNU-1 세포의 apoptosis가 유도되는지 확인하기 위하여 western blot을 수행한 결과, 처리한 보두산의 농도 의존적으로 세포사멸의 지표가 되는 PARP cleavages가 detection되었고 PARP의 upstream regulator인 caspase 3를 관찰한 결과, procaspase 3가 감소하는 것을 볼 수 있었다. 이로써 보두산에 의한 세포사가 apoptosis에 의한 것임을 알 수 있었다.

3. 보두산에 의한 apoptosis가 어떠한 mechanism에 의해 유도되는지 알아보기 위해 Bcl-2와 cytochrome C의 발현을 조사한 결과, 처리한 보두산의 농도가 증가함에 따라 세포질내의 cytochrome C가 증가하였고 anti-apoptotic Bcl-2가 감소하였다.

4. 보두산 처리 시, MAP kinase의 활성에 어떠한 변화가 있는지 알아보기 위하여 anti-P-ERK1/2와 anti-P-p38을 이용한 western blot을 수행하였다. 그 결과, 처리한 보두산의 농도 의존적으로 P-ERK1/2가 감소하는 것을 볼 수 있었다. 반면, P-p38 MAP kinase는 농도 의존적으로 증가하였다.

5. p38 MAP kinase의 저해제인 SB203580을 보두산과 cotreat한 후, apoptosis 유도에 어떠한 변화가 나타나는지 알아 본 결과, SB203580에 의해 p38의 인산화가 억제되었을 경우 PARP의 cleavages가 관찰되지 않았고 procaspase 3의 감소도 나타나지 않았다.

6. 보두산이 cell cycle 조절에 미치는 영향을 알아보기 위하여 p53과 p21<sup>Waf</sup>의 발현양상을 조사한 결과, 처리한 보두산의 농도가 증가할수록 p53과 p21<sup>Waf</sup>의 발현이 증가하였다.

이 같은 결과로 보아, 보두산은 위암 세포주인 SNU-1의 apoptosis를 유도할 수 있으며, 이는 apoptosis의 주요 경로 중 하나인 mitochondrial pathway를 통한 것임을 알 수 있다. 그리고 보두산에 의해 MAP kinase의 활성에 변화가 생기는 것을 확인하였다. 처리한 보두산의 농도에 의존적으로 P-ERK1/2 활성이 감소하였고, P-p38의 활성은 증가하는 것으로 나타났다. 이에 보두산에 의해 유도되는 apoptosis가 P-p38의 증가된 활성과 어떠한 연관이

있을 것으로 생각되어, p38 저해제인 SB203580을 cotreat 하였다. 그 결과, 보두산에 의해 유도되는 apoptosis가 저해되는 것을 확인하였다. 마지막으로 보두산은 p53과 p21의 발현을 증가시켜 cell cycle 중 G1 phase에서 arrest시켜 세포의增식을 억제할 것으로 볼 수 있다 (Figure 9).

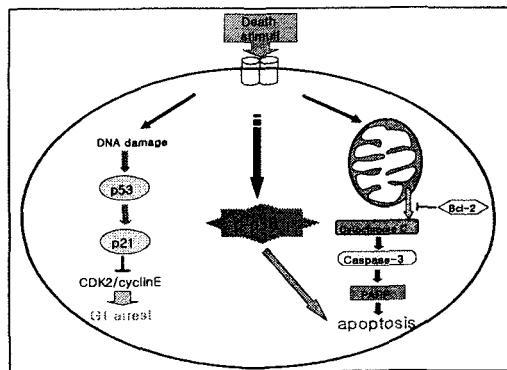


Figure 9. The effects of BDS in SNU-1 cells.

## 감사의 글

- 본 연구는 동국대학교 학술지원 사업비로 이루어진 논문임.

- 본 연구는 과학기술부/한국과학재단 기초의과학 연구센터육성사업의 지원으로 수행되었음 (과제번호 : R13-2005-013-01000-0).

## 참고문헌

- 서울대학교 의과대학 소화기학. 서울대학교 출판부. 1985:88-95.
- 백강, 소홍삼. 중약방제 연구여응용대전. 중국과학기술출판사. 1995:1089.
- 김재길. 원색천연약물대사전. 행림출판. 1984:215.
- 신길구. 신씨본초학. 수문사. 1982:705.
- 정인채. 수점산과 보두의 병용투여가 흰쥐의 위장관에 미치는 영향. 동국대대학원. 1988.
- 정주화. 보두감초말 추출물이 흰쥐의 소화성궤양에 미치는 영향. 동국대대학원. 1998.
- 조유경. 보두의 수치법에 따른 독성 및 소화기계에 미치는 영향. 경희대 대학원. 1998.
- Guseva NV, Taghiyev AF, Rokhilin OW, Cohen

- MB. Death receptor-induced cell death in prostate cancer. *J Cell Biochem.* 2004;91:70-99.
9. Viktorsson K, Lewensohn R, Zhivotovsky B. Apoptotic pathways and therapy resistance in human malignancies. *Adv Cancer Res.* 2005;94: 143-196.
  10. Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds.* 2005;4:138-144.
  11. Vitale I, Antoccia A, Crateri P, Leone S, Arancia C. Caspase-independent apoptosis is activated by diazepam-induced mitotic failure in HeLa cells, but not in human primary fibroblasts. *Apoptosis.* 2005;10:909-920.
  12. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest.* 2005;11:2665-2672.
  13. Tong X, Lin S, Fujii M, Hou DX. Molecular mechanisms of echinocystic acid-induced apoptosis in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;321:539-546.
  14. Oh SH, Lee BH, Lim SC. Cadmium induces apoptotic cell death in WI 38 cells via caspase-dependent Bid cleavage and calpain-mediated mitochondrial Bax cleavage by Bcl-2-independent pathway. *Biochem Pharmacol.* 2004;68:1845-1855.
  15. Ahmed MD, Alcock RA, Chendil D, Dey S, Das A, Venkatasubbarao K, Mohiuddin M, Sun L, Strodel WE, Freeman JW. Restoration of transforming growth factor-beta signaling enhances radiosensitivity by altering the Bcl-2/Bax ratio in the p53 mutant pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2. *J Biol Chem.* 2002;277:2234-2246.
  16. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell.* 2001;8: 705-7511.
  17. Sundararajan R, Cuconati A, Nelson D, White E. Tumor necrosis factor-alpha induces Bax-Bak interaction and apoptosis, which is inhibited by adenovirus E1B 19K. *J Biol Chem.* 2001;276:45120-45127.
  18. Dong C, Dayis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:55-72.
  19. Tamura S, Hanada M, Ohnishi M, Katsura K, Sasaki M, Kobayashi T. Regulation of stress-activated protein kinase signaling pathways by protein phosphatases. *Eur J Biochem.* 2002;269: 1060-1066.
  20. Hofmann TG, Stollberg N, Schmitz ML, Will H. HIPK2 regulates transforming growth factor-beta-induced c-Jun NH(2)-terminal kinase activation and apoptosis in human hepatoma cells. *Cancer Res.* 2003;63:8271-8277.
  21. Hideshima T, Hayashi T, Chauhan D, Akiyama M, Richardson D, Anderson K. Biologic sequelae of c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) activation in multiple myeloma cell lines. *Oncogene.* 2003; 22:8797-8801.
  22. Nguyen TT, Tran E, Nguyen TH, Do PT, Huynh TH, Huynh H. The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. *Carcinogenesis.* 2004;25:647-659.
  23. Tanaka-Kagawa T, Hanioka N, Yoshida H, Jinno H, Ando M. Arsenite and arsenate activate extracellular signal-regulated kinases 1/2 by an epidermal growth factor receptor-mediated pathway in normal human keratinocytes. *Br J Dermatol.* 2003;149:1116-1127.
  24. Jung JW, Cho SD, Ahn NS, Yang SR, Park JS, Jo EH, Hwang JW, Jung JY, Kim SH, Kang KS, Lee YS. Ras/MAP kinase pathways are involved in Ras specific apoptosis induced by sodium butyrate. *Cancer Lett.* 2005;225:199-206.
  25. Pruitt K, Ullku AS, Frantz K, Rojas RJ, Muniz-Medina VM, Rangnekar VM, Der CJ, Shields JM. Ras-mediated loss of the pro-apoptotic response protein Par-4 is mediated by DNA hypermethylation through Raf-independent and Raf-dependent signaling cascades in epithelial cells. *J Biol Chem.* 2005;280:23363-23370.
  26. Drosopoulos KG, Roberts ML, Cermak L, Sasazuki T, Shirasawa S, Andera L, Pintzas A.

- Transformation by oncogenic RAS sensitizes human colon cells to TRAIL-induced apoptosis by up-regulating death receptor 4 and death receptor 5 through a MEK-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2005;280:22856-22867.
27. Huang Q, Wu LJ, Tashiro S, Onodera S, Li H, Ikejima T. Silymarin augments human cervical cancer HeLa cell apoptosis via P38/JNK MAPK pathways in serum-free medium. *J Asian Nat Prod Res.* 2005;7:701-709.
28. Hattangadi DK, DeMasters GA, Walker TD, Johnes KR, Di X, Newsham IF, Gewirtz DA. Influence of p53 and caspase 3 activity on cell death and senescence in response to methotrexate in the breast tumor cell. *Biochem Pharmacol.* 2004; 68:1699-1708.
29. Tan J, Zhuang L, Leong HS, Iyer NG, Liu ET, Yu Q. Pharmacologic modulation of glycogen synthase kinase-3 beta promotes p53-dependent apoptosis through a direct Bax-mediated mitochondrial pathway in colorectal cancer cells. *Cancer Res.* 2005;65:9012-9020.