

榆白皮가 HT-29 대장암세포의 활성화 및 세포사멸에 미치는 영향

박용기^{**}, 정선주, 장태정¹, 이제현,

동국대학교 한의과대학 본초학교실, 1: 동국대학교 의과대학 병리학교실

Effects of Ulmi cortex extract on cell apoptosis in HT-29 human colon cancer cells

Yong-Ki Park^{**}, Sun Ju Jung, Tae Jung Jang¹, Jae-hyun Lee

Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Gyeongju, 780-714 Korea,

1: Department of Pathology, College of Medicine, Dongguk University, Gyeongju, 780-714 Korea.

ABSTRACT

Objectives : In this study, we investigate that Ulmi cortex extract contributes to growth inhibitory effect and anti-cancer activity on the HT-29 human colon cancer cells.

Methods : Ulmi cortex was extracted from the leaves of the plant using water. The Ulmi cortex extract was treated to different concentrations for 24 hr. Growth inhibitory effect was analyzed by measuring FACS study and MTT assay. Cell cycle inhibition was confirmed by kinases assay. Cell apoptosis was confirmed by surveying caspases cascades activation using Western blot.

Results : Exposure to Ulmi cortex extract (0.4mg/ml) results in an inhibitory effect on cell growth in HT-29 cells. Growth inhibition by Ulmi cortex extract in HT-29 cells was related with the inhibition of proliferation and induction of apoptosis. The Ulmi cortex extract induces G1-cell cycle arrest and DNA fragmentation in HT-29 cells. Furthermore, Ulmi cortex extract induces cell apoptosis through the activation of caspases-3 and PARP cleavage.

Conclusion : Ulmi cortex extract induces apoptosis in human colon cancer cells, therefore, we suggest that Ulmi cortex extract can be used as a novel class of anti-cancer drugs.

Key words : apoptosis, anti-cancer drug, cell cycle arrest, HT-29 human colon cancer cell, Ulmi cortex.

서 론

암은 인체의 면역기전손상으로 정상적인 세포가 무한정 이상증식하면서 발생하게 되는데 최근 서구적인 생활양식으로의 변화와 심한 정신적 스트레스, 불규칙적인 생활습관 등으로 인하여 고혈압, 당뇨 및 암과 같은 난치성질환의 가능성이 매우 증가하고 있다¹⁾. 대장은 소화 및 흡수되고 남은 음식물이 머무르는 곳으로 많은 종류의 세균이 번식하고 있고 대장점막이 있는 곳이면 어디서나 암이 생기지만, S상 결장과 직장이 가장 암이 생기기 쉬운 부위이다. 우리나라에서 대장암 발생율은 최근 현저히 증가하고 있으며, 대장암에 의한 사망율이 위암, 폐암, 간암에 이어 4위를 차지하고 있을 정도로 매우 중요한 암질환이다^{2,3)}. 현재까지의 암의 치료는 주로 외과적 수술과 항암제에 의존하고 있는데, 항암제는 암세포만 선택적으로 죽이기보다는 암조직 주위에 있는 정상세포도 공격함으로써 항암제 치료에 따른 심각한 부작용이 문제가 되고 있다²⁾. 또한 대장암과 같은 진행성, 재발성 암은 흔히 사용되는 항암제에 대하여 저항성을 나타내기 때문에 몇 가지 항암제를 조합하여 사용하는 방법도 시도되고 있다⁴⁾. 따라서 독성과 부작용이 적으면서 효과적으로 암세포를 죽일 수 있는 새로운 치료약제의 개발이 무엇보다도 시급한 현실이며 최근 녹색식물이나 과일, 한약추출물 등에 독성이 적으면서 강력한 항암효과를 나타내는 성분이 포함되어 있다고 보고되면서 국내를 비롯하여 전 세계적으로 천연물을 이용한 신약개발에 막대한 투자를 하고 있다^{5,6)}. 암환자에 있어 한방에서의 치료는 항암작용을 목적으로 사용하기 보다는 환자의 중후를 개선시키고 면역기능을 강화시키며 암의 전이를 차단하는 방향으로 접근하고 있다⁷⁾.

세포사멸(apoptosis; Programed cell death)는 특히 외부 자극에 대해서 세포 내부에 이미 존재하는 일련의 프로그램에 의해 세포가 사멸하는 과정을 의미하는데, 최근 다양한 종양세포에서 세포사멸을 유도하는 항암제에 관한 연구들이 많이 보고되고 있다^{8,11)}.

유백피(橘白皮, Ulmi cortex)는 느릅나무의 수피 또는 근피로써 예로부터 수욕, 거담, 항암, 항균 및 염증이나 상처치료에 탁월한 효능이 있는 것으로 알려져 있으며^{12,13)}, 유백피의 β -sitosterol, phytosterol, stigmasterol, tannin 및 다당류 등이 존재하고 friedelin과 spifriedelanol, taraxerol 등이 진통작용을 하는 것으로 알려져 있다^{14,15)}. 또한 유백피는 東醫寶

鑑에¹⁶⁾ 大小便不通, 不眠症 등에 쓰인다고 하였으며, 방약합편에는¹⁷⁾ 水道通利, 水腫, 丹毒 등에 쓰인다고 하였고 일반적으로는 소염작용이 있는 것으로 소개되고 있으며 민간에서는 위장병이나 위궤양 등에 쓰이고 있다¹⁸⁾. 유백피에 대한 연구로는 유백피 물추출물의 항산화 활성¹⁵⁾, 위궤양의 보호효과¹⁹⁾, 항균효과²⁰⁾ 등이 알려져 있다. 그러나 아직까지 유백피의 대장암 세포에 대한 기전연구가 없으므로 본 연구에서는 유백피의 메탄을 추출물이 사람의 대장암 세포주인 HT-29 세포에서 세포성장 억제와 세포사멸을 유발하는지 살펴보고 그 기전을 밝혀보고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 유백피 추출물의 제조

본 실험에 사용한 유백피는 분쇄하여 80% MeOH과 함께 60°C에서 3시간 동안 3회 추출하였으며 그 추출액을 2겹 여과지로 여과하고 rotary evaporator로 감압농축한 후 -20°C에서 동결건조 하였다. 추출된 유백피는 -80°C에서 냉동보관하며, 세포실험 직전에 DMSO로 녹여서 사용하였다.

2. 세포배양

사람의 대장암 세포주인 HT29 세포(ATCC)를 10% fetal bovine serum(FBS, Hyclone)과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM(GibcoBRL)을 배양액으로 하여 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양하였다.

3. 세포생존율 측정

HT-29 세포(5×10^4 cells/well)를 96-well culture plate에 DMEM 100 μ l와 함께 하룻밤 배양한(37°C, 5% CO₂) 후, 다양한 농도(0.1-0.6mg/ml)의 유백피 추출물을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. MTT 용액(Sigma) 10 μ l를 각 well에 첨가하여 4시간 동안 배양하면서 환원반응을 유도한 후 formazan 결정을 용해하기 위해 배양액을 제거하여 100 μ l의 DMSO 용액 첨가하였다. 이를 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 550nm에서 흡광도를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율 100%를 기준으로 세포 생존율(cell viability)을 계산하였다.

4. DNA fragmentation 분석

HT-29 세포(1×10^5 cells/well)를 6-well culture plate의 각 well에 2ml 배지와 함께 하룻밤 배양한 다음, 유백피 추출물을 처리하여 세포사멸을 유도하였다. 이를 24시간 배양한 후 세포를 수거하고 lysis buffer(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA, 0.2% Triton X-100) 200 μ l를 첨가하여 세포를 lysis시킨 다음, 30분간 얼음에 유지하고 proteinase K(200 μ g/ml)를 첨가하여 50°C에서 3시간 동안 정치하였다. 여기에 phenol:chloroform(1:1) 용액의 동량을 넣고 잘 혼합하여 14,000rpm에서 20분간 원심분리한 다음 상층액을 수거하여 100% ethanol로 침전시켰다. 얻어진 DNA pellet을 건조시키고 RNase(10 μ g/ml)가 첨가된 TE buffer 30 μ l로 녹인 후 2% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 DNA fragmentation 유무를 확인하였다.

5. Flow cytometric cell cycle 분석

HT-29 세포(1×10^5 cells/well)를 6-well culture plate의 각 well에 2ml 배지와 함께 하룻밤 배양한 다음, 유백피 추출물을 여러 농도로 처리하여 24시간 배양한 후 세포를 수거하여 0.5% BSA가 첨가된 95% ethanol로 고정시켰다. 이를 $1 \times$ ice-cold PBS로 두 번 세척한 후 10 μ g/ml RNase A(Sigma)를 처리하여 15분간 37°C 배양기에서 반응시키고 10mg/ml propidium iodide(PI)로 염색하였다. 세포주기(cell cycle)는 유세포분석기(FACStar flow cytometer, Becton Dickinson)과 ModFit LT V2.0 software를 이용하여 분석하였다.

6. SDS-PAGE와 Western blot analysis

HT-29 세포(5×10^5 cells/ml)를 6-well plate에 하룻밤 배양한 후 유백피 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. HT-29 세포를 수거하여 $1 \times$ ice-cold PBS로 두 번 세척한 다음 lysis buffer(1M Tris-HCl, 5M NaCl, 0.5% Triton X-100, protease inhibitor cocktail) 100 μ l를 넣어 세포를 lysis시켰다. 이를 14,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 회수한 후 Bradford 용액과 BSA 표준용액을 이용하여 단백질 양을 정량하고 20 μ g의 단백질을 10% polyacrylamide gel을 이용하여 SDS-PAGE를 실시하였다. 전기영동 후 gel을 분리하여 nitrocellulose(NC) membrane에 옮기고 5% skim milk로 실온에서 1시

간 동안 blocking 시켰다. 각 단백질에 대한 일차항체를 150mM NaCl과 0.5% Tween-20이 첨가된 10mM Tris-HCl(TBS-T) 용액으로 희석하여(1:3000) blocking이 된 membrane에 넣은 후 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. 다음날 membrane을 TBS-T 용액으로 3회 세척하고 TBS-T로 희석된(1:5000) horseradish peroxidase-conjugated 이차항체(secondary antibody; Santa Cruz)를 넣어 실온에서 1시간 반응시켰다. 이를 다시 TBS-T로 3회 세척한 다음 enhanced chemiluminescence detection system (Amersham, Piscataway, NJ)을 이용하여 X-ray film(Kodak)에 감광시켰다. 각 단백질의 발현에 대한 대조군으로 actin에 대한 일차항체(Sigma)를 이용하여 위와 동일한 방법으로 Western blot을 수행하였다.

7. 통계학적 검정

실험결과는 3회 반복실험에 대한 평균 \pm 표준편차(standard deviation; SD)로 나타내었으며, 통계학적 분석은 ABI prism의 Student *t*-test로 검정하여 *p*값이 0.05 이하인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. HT-29의 세포증식에 미치는 영향

유백피 추출물이 HT-29세포 증식에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 다양한 농도(0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6mg/ml)의 유백피 추출물을 24시간 처리한 다음 MTT assay를 수행하였다.

HT-29 세포에 유백피 추출물 농도 0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.4mg/ml 및 0.6mg/ml를 처리하였을 때 각각 83.63 \pm 10.72%(mean \pm SD), 69.36 \pm 12.60%, 47.45 \pm 8.83% 및 44.02 \pm 3.74%로 측정되었다(Fig. 1). 즉, HT-29 세포의 증식이 유백피 추출물 처리 농도에 의존적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

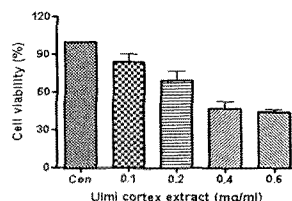


Fig. 1. Effect of Ulmi cortex extract on the cell proliferation of the IIT-29 cells. IIT-29 cells were treated with various concentrations (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6mg/ml) of Ulmi cortex extract for 24hr. Cell viability was measured by MTT assay as described in Materials and methods. Data present mean±SD(%) from six independent triplicate experiments. Con, cells alone.

2. 세포사멸에 미치는 영향

유백피 추출물에 의한 HT-29 세포에서의 세포사멸 유도 및 DNA contents를 유세포분석으로 조사한 결과, sub-G1 fraction이 세포만 배양한 무처리 대조군에서 0.62%인 반면, 유백피 추출물의 처리농도 0.2mg/ml 및 0.4mg/ml에서 각각 9.19%와 21.75%로 나타났다(Fig. 2). 따라서 HT-29 세포는 유백피 추출물 처리에 의해 sub-G1 fraction이 증가함으로써 세포사멸이 유도되는 것을 알 수 있었다.

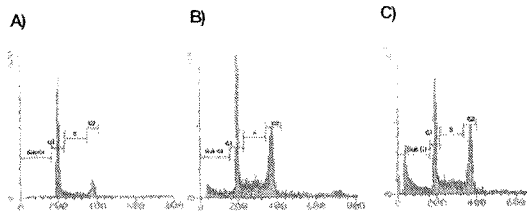


Fig. 2. Cell cycle analysis and apoptosis detection by flow cytometry.

IIT-29 cells were treated with various concentrations (0(A), 0.2(B), 0.4(C) mg/ml) of Ulmi cortex extract for 24hr. Cells were partially arrested at S and G2/M phase with decreased cell population at G0/G1 phase. Sub-G1 peak represents the population of apoptotic cells after the treatment with *Ulmi cortex* extract.

3. Caspase 3를 통한 세포사멸에 미치는 영향

세포는 세포사멸과정 동안 회복기능을 상실하게 되는데, 여기에 중요한 polymerase가 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)이며 PARP의 cleavage는 세포사멸을 확인할 수 있는 하나의 지표가 된다. 또한 caspases는 cystinyl aspartate-specific protease로 세포질에서 pro-form으로 존재하는데 특정 위치의 proteolytic 과정에 의해 활성화되며 세포의 DNA 복제 및 유전자 발현과 관련된 단백질 및 핵의 구조 유지, 세포의 항상성 유지 등과 관련된 단백질을 활성화시켜 세포사멸을 유도하게 된다. 따라서 본 실험에서는 유백피 추출물 처리에 의한 세포사

멸이 유백피 추출물 처리에 의한 것인지 확인하기 위하여 HT-29 세포에 유백피 추출물을 농도 별로 처리한 다음 세포사멸 진행정도를 procaspase-3와 -9의 발현양상과 PARP의 cleavage 유무를 통해 관찰하였다.

그 결과, Fig. 3에서 보는 것과 같이 유백피 추출물을 0.2mg/ml 및 0.4mg/ml 농도로 처리하였을 때, procaspase-3와 procaspase-9의 발현이 처리농도에 의존적으로 감소하였음을 확인 할 수 있었으며, 나아가 PARP의 cleavage가 관찰되는 것을 알 수 있었다. 따라서 유백피 추출물에 의해 caspases의 발현 증가와 PARP cleavage를 통한 HT-29 세포사멸이 유도됨을 알 수 있었다.

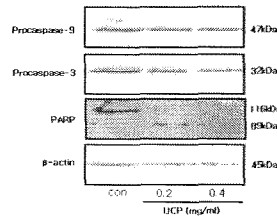


Fig. 3. Ulmi cortex induces apoptosis in IIT-29 cells.

IIT-29 cells were treated with various concentrations (0, 0.2, 0.4mg/ml) of Ulmi cortex extract(UCP) for 24hrs. Equal protein of the total cell lysates were analyzed by gradient % SDS-PAGE. The cleavages of PARP and the reduction of procaspase-3,-9 were detected by Western blot, β -actin levels were used as internal markers for loading variation.

4. DNA fragmentation을 통한 세포사멸에 미치는 영향

세포사멸이 일어나면 자가효소에 의해 세포내의 염색체가 잘라지게 되어 불연속적인 절편(fragmentation)이 만들어지게 된다. 따라서 이런 세포사멸의 일차과정인 세포핵의 변화를 관찰하기 위해서 유백피 추출물을 0.2mg/ml 및 0.4mg/ml 농도로 처리한 다음 HT-29 세포사멸에 의한 DNA fragmentation 정도를 확인하였다.

그 결과 Fig. 4에서처럼 세포만 배양한 정상군에서는 DNA laddering이 관찰되지 않은 반면 유백피 추출물을 처리한 경우는 뚜렷한 불연속적인 ladder는 아니지만 gel 전체로 DNA fragmentation이 확산되는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 유백피 추출물의 처리가 HT-29 세포의 사멸을 유도하는 것을 알 수 있었다.

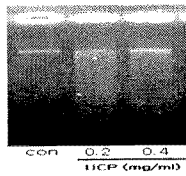


Fig. 4. DNA fragmentation by Ulmi cortex extract. IIT-29 cells were treated with various concentrations (0, 0.2, 0.4mg/ml) of Ulmi cortex extract(UCP) for 24hr. Internucleosomal DNA fragmentation was analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis in the presence of EtBr.

5. Mitochondrial pathway를 통한 세포사멸

유백피 추출물에 의해 유도되는 HT-29 대장암 세포의 세포사멸이 세포 내 어떠한 신호전달을 통해 일어나는지 알아보기 위하여 세포사멸의 경로중 하나인 미토콘드리아 세포사멸(mitochondrial apoptosis)에 관여하는 Bcl-2의 발현양상을 조사하였다. 그 결과, 유백피 추출물 처리 후 0.4mg/ml 농도에서 Bcl-2의 발현이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 5). 따라서 유백피 추출물이 미토콘드리아 세포사멸 경로 조절함으로써 HT-29 세포사멸을 유도하는 것을 알 수 있었다.

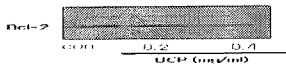


Fig. 5. Effect of Ulmi cortex extract on Bcl-2 expression from mitochondria fraction of IIT-29 cells. Cells were treated with various concentrations (0, 0.2, 0.4mg/ml) of Ulmi cortex extract(UCP) for 24hr. Equal protein of the total cell lysates were analyzed by 12% SDS-PAGE. Western blotting analysis was used to assess the protein expressions.

6. ERK/p38 pathway에 미치는 영향

ERK/p38 pathway는 대부분 세포성장인자 수용체들의 downstream으로 알려져 있으며, 세포의 생존, 성장, 분화, 형질전환 등을 조절하는 데 필수적인 신호전달 체계이다. 따라서 유백피 추출물이 MEK/ERK pathway에 어떠한 영향을 주는 지 알아보려 Western blot을 수행하였다.

유백피 추출물을 0.2mg/ml 및 0.4mg/ml 농도로 HT-29 세포에 처리하였을 때, pMEK, pERK의 발현이 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났으며 특히 ERK/p38 활성이 현저히 증가하는 것을 알 수 있

었다(Fig. 6). 따라서 유백피 추출물은 ERK/p38 경로를 통해 HT-29 세포에 작용하는 것을 알 수 있었다.

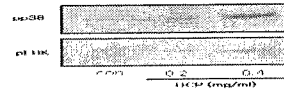


Fig. 6. Effect of Ulmi cortex extract on ERK/p38 pathway in IIT-29 cells. cells were treated with various concentrations (0, 0.2, 0.4mg/ml) of Ulmi cortex extract (UCP) for 24hr. Equal protein of the total cell lysates were analyzed by 10% SDS-PAGE. Western blotting analysis was used to assess the protein expressions. β -actin levels were used as internal markers for loading variations.

고 찰

대장암은 대장의 가장 안쪽 표면인 점막에서 발생하는 아주 흔한 암으로써 최근 식생활 등의 환경요인이 서구화되어감에 따라 그 발생빈도는 계속 증가하고 있어 우리나라의 경우 소화기암 중에서는 위암 다음으로 두 번째로 흔히 발생하는 병이다¹⁵⁾. 대장암의 치료는 수술적 요법에 방사선 치료 및 화학요법을 병행하여 사용하고 있으며 대부분 효율적이지만 잘 알려진 바와 같이 심각한 부작용을 가지는 cytotoxic 화학 치료 요법에 기반을 두고 있기 때문에 문제가 되고 있다. 따라서 최근에는 한방생약추출물로부터 항암활성을 갖는 물질을 분리하고 이를 암치료에 적용하려는 시도가 많이 이루어지고 있는 추세이다.

유백피(楡白皮)는 느릅나무(*Ulmis pamila* L.)의 수피(cortex)로서 소염작용이 뛰어나고 위장병과 궤양 병 등에 사용하는 것으로 알려져 있다^{12,13)}. 유백피에 대한 연구는 국내에서 주로 이루어지고 있는데, 최근 유백피 물추출물의 항산화활성¹⁵⁾, 쥐 위궤양에서의 치료효과(antiulcer activity)¹⁹⁾ 및 항균활성(antimicrobial activity)²⁰⁾ 등에 대한 보고가 있으며, anti-DNP IgE에 의해 유도되는 히스타민 분비와 tumor necrosis factor-alpha(TNF- α) 생성을 억제함으로써 초과민성 쇼크증상을 완화(anti-anaphylaction)시킨다는 보고가 있고²⁸⁾ 쥐대식세포주인 RAW264.7 세포를 이용한 연구에서 interferon-gamma에 의해 유도되는 NO와 TNF- α 의 생성이 유백피 물추출물에 의해 억제된다고 하였다²⁹⁾. 또한 치주염(periodontitis) 환자의 잇몸 열구액(gingival crevicular fluid)과 periodontal ligament cells로부터 분비되는 MMP-8와 MMP-9을 억제함으로써 염증을 개선시키고 periodontal diseases의 치료제 개발 가능성을 제시하였다³⁰⁾. 이처럼 유백피 추출물의 다양한 생물학적 활성이 밝혀지

고 있으나 사람세포에서의 세포성장 및 세포사멸 유도 또는 구체적인 작용기전에 대한 연구는 밝혀진 바 없다. 따라서 본 연구에서는 HT-29 대장암 세포주를 이용하여 유백피 추출물의 항암활성을 세포사멸 효과 및 작용기전을 통해 검증하였다. 먼저, HT-29 대장암 세포주에 대하여 유백피 추출물이 항암활성을 갖는지에 초점을 맞추어 실험한 결과 유백피 추출물을 농도별로 처리하고 MTT assay를 통해 세포생존율을 측정된 결과(Fig. 1), 농도에 의존적으로 HT-29 대장암 세포의 생존율이 떨어지는 것을 확인하였으며 이러한 결과는 유백피 추출물이 대장암 세포의 증식을 억제할 수 있음을 의미한다.

세포사멸(apoptosis, programmed cell death)은 조직의 항상성이나 발생과정에서 정상적이지 않은 자극을 받거나 상처가 가해질 때 개체를 보호하기 위해 생겨난 과정이다²⁴⁾. 암세포의 경우 세포주기 이상으로 증식과 분열을 반복하게 되어 무한정 생존하게 되는데, 세포주기의 조절이 암세포 치료의 새로운 표적이 되고 있다. 따라서 유백피 추출물이 세포주기에 미치는 영향을 조사하기 위하여 유세포 분석 및 DNA contents 실험을 수행한 결과, 유백피 추출물을 처리한 HT-29 대장암 세포에서는 처리하지 않은 세포에 비해 G1 cycle arrest가 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 2). 이는 유백피 추출물이 HT-29 대장암세포의 G1 cell cycle arrest를 통해 세포사멸을 유도한다는 것을 의미한다.

세포사멸기전의 주요 요소는 caspases라는 proteolytic system이며 caspase-8, caspase-9과 같은 upstream initiator caspases와 caspase-3, caspase-6, caspase-7과 같은 downstream caspases로 알려져 있다²²⁾. 그 중 caspase-3의 활성화는 세포사멸과정에서 핵심적인 역할을 하며 세포 내 많은 단백질-poly(ADP-ribose) polymerase(PARP), gelsolin, Rb catenin 등을 분해시킨다²³⁾. 또한 caspases와 더불어 세포사멸에 중요한 역할을 하는 것이 Bcl-2 family protein이며 Bcl-2와 Bcl-XL과 같은 anti-apoptotic members와 Bax와 Bak 같은 pro-apoptotic members가 속하는데 이 단백질들이 세포의 생사를 결정하는 중요한 인자들이다^{24,25)}. 따라서 본 연구에서는 유백피 추출물을 HT-29 세포에 처리한 후 caspases 활성화 및 PARP, Bcl-2 등의 발현 양상을 조사하였다. 즉, Fig. 3에서 보듯이 유백피 추출물 처리에 의해 HT-29 세포의 mitochondria에서의 PARP 및 caspase 3의 발현이 감소하는 것으로 나타났으며, Fig. 5에서 보는 것과 같이, Bcl-2의 발현이 감소하는

것을 볼 수 있었다. 이런 결과들로 보아, 유백피 추출물에 의한 HT-29 세포의 사멸은 mitochondrial pathway를 통해 유도된다는 것을 알 수 있다.

한편, 세포내 신호전달 경로 중 MAP kinase family(MAPK)는 serine/threonine kinase가 세포의 증식과 분화, 사멸 등 세포의 다양한 생물학적 기능 조절에 관여하는 것으로 알려져 있는데 extracellular signal-regulated(ERK), p38 MAPK, c-jun-N-terminal kinase (JNK) 등으로 나누어진다^{26,27)}. 그 중 ERK는 기타 세포성장요소들의 반응에 의해 활성화되는데, 이들의 활성화는 tyrosine 인산화와 상호 작용한다. 또한 ERK1/2(p42/44)는 세포 내 광범위하게 발현되며, 유사분열과 감수분열의 조절, postmitotic기능에 관여하며, 성장인자와 사이토카인, 감염, carcinogen등과 같은 많은 자극에 의해 활성화된다. 암세포에서는 Ras에 의해 ERK1/2가 활성화되며 Ras/Raf 및 MEK/ERK pathway가 암세포의 생존과 분화를 조절하는 주요 인자로 알려져 있다²⁷⁾. 본 연구에서 유백피 추출물의 반응신호전달 경로를 알아 본 결과, ERK/p38 경로를 통해 세포사멸에 관여하는 것으로 나타났다(Fig. 6). 그러나 신호전달경로에 대한 연구를 추후 좀 더 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결과적으로 유백피 추출물은 HT-29 대장암 세포의 생존율을 억제시키며 caspase-3의 활성화 및 PARP의 cleavage를 통해 세포사멸을 유도하고 Bcl-2 mitochondrial pathway와 ERK/p38 pathway를 통해 항암활성을 나타내는 것으로 조사되었다. 따라서 유백피 추출물은 대장암 치료를 위한 약물로 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

유백피 추출물의 HT-29 대장암 세포에 대한 활성작용에 관한 연구를 수행하였다. HT-29 대장암 세포에 80% 메탄올로 추출한 유백피 추출물을 처리하였을 때, 세포사멸과 세포주기억제현상을 관찰하였다. 즉, HT-29 대장암 세포에 유백피 추출물을 처리하였을 때, 처리농도에 의존적으로 세포생존율이 억제되는 것을 확인하였다. 또한 HT-29 대장암 세포의 세포사멸은 유백피 추출물 0.4mg/ml 농도에서 sub-G1 cell cycle arrest와 DNA fragmentation을 통해 유도되는 것으로 나타났으며, mitochondrial pathway인 Bcl-2의 발현을 억제시켰고, ERK/p38 pathway를 경유하는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구를 통해 유백피 추출물이 암세포를 세포사멸로 유도할 수 있음

을 알 수 있었으며 향후 대장암 한방치료제로서의 개발 가능성이 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 동국대학교 교내연구비 지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Novotny L, Szekeres T. Cancer therapy: new targets for chemotherapy. *Hematology*. 2003;8:129-37. Review.
2. White K, Grether ME, Abrams JM, Young L, Farrell L, Steller H. Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* 1994; 264: 677-683.
3. Gustin DM, Brenner DE. Chemoprevention of colon cancer: current status and future prospects. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2002;21:323-348.
4. Labianca R, Beretta G, Gatta G. Colon cancer. *Critical Reviews in Oncology/ Hematology*, 2004;51:145-170.
5. 통계청. 2004년도 사망원인통계결과. 서울. 통계청. 2005. pp13-15.
6. 김병, 문구. 위암의 동서의학적 진척개황. 대한한의학회지. 1996;17:100-116.
7. 김성훈. 한의학계의 암연구동향과 연구성과에 대한 고찰. 대한한의학회지 1998;19:470 -499.
8. Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Research* 2000; 60: 3823 - 3831.
9. Chen GG, Liang NC, Lee JF, Chan UP, Wang SH, Leung BC, Leung KL. Over-expression of Bcl-2 against Pteris semipinnata L-induced apoptosis of human colon cancer cells via a NF-kappa B-related pathway. *Apoptosis*. 2004;9:619-27
10. Song G, Mao YB, Cai QF, Yao LM, Ouyang GL, Bao SD. Curcumin induces human HT-29 colon adenocarcinoma cell apoptosis by activating p53 and regulating apoptosis-related protein expression. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38:1791-8.
11. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC.

Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Reseach*. 2003;23:363-398.

12. 한국유용식물자원 연구총람. 한국화학연구소. 1988. p949.
13. Duke JA. Handbook of medicinal herbs. CRC press. Boca Raton. p495.
14. Matsuzaki T, Nara Y. Antioxidative of tea leaf catechins. *Nippon Nogeikaga Kogyo Kaishi*. 1985;59:129-134.
15. Lee KH, Jeon EK, Yoo SY, Oh MJ. Antioxidative activity of Ulmi cortex extract. *Korean J. Postharvest Sci. Technol*. 2000;7:373-379.
16. 허준. 동의보감. 여강출판사. 1994. pp476, 555, 2350, 2217.
17. 황도연. 방약합편. 남산당. 1984. p235.
18. 생약학교재편찬위원회. 생약학. 동명사. 2002. p389.
19. Lim JP, Cui X. Effect of water extract of Ulmi pumilar cortex on gastric ulcer in rats. *Korean J. Medicinal Crop Sci*. 2002;10:177-180.
20. Park JS, Shim CJ, Jung JH, Lee GH, Sung CK, Oh MJ. Antimicrobial activity of Ulmi cortex extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. 1999;1022-1028.
21. Hengartner, MO, Ellis RE, Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 1992;356:494-499.
22. Castaño E, Dalmau M, Barragán M, Pueyo G, Bartrons R, Gil J. Aspirin induces cell death and caspase-dependent phosphatidylserine externalization in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *British Journal of Cancer*. 1999;81:294-299.
23. Song G, Mao YB, Cai QF, Yao LM, Quyang GL, Bao SD. Curcumin induces human HT-29 colon adenocarcinoma cell apoptosis by activating p53 and regulating apoptosis-related protein expression. *Brazilian J. Medical and Biological Res*. 2005;38:1791-1798.
24. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322-1326.
25. Atan G, James MM, Stanley JK. Bcl-2

family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes. Dev.* 1999;13:1899-1999.

26. Yang SA, Paek SH, Kozukue N, Lee KR, Kim JA. Alpha-chaconine, a potato glycoalkaloid, induces apoptosis of HT-29 human colon cancer cells through caspase-3 activation and inhibition of ERK 1/2 phosphorylation. *Food Chem Toxicol.* 2006 Jun;44(6):839-46.

27. Kim TI, Jin SH, Kang EH, Shin SK, Choi Y, Kim WH. The Role of Mitogen-Activated Protein Kinases and Their Relationship with NF- κ B and PPAR in Indomethacin-Induced Apoptosis of Colon Cancer Cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2002;973:241-245.

28. Kim HM, Shin HY, Choi IY, Lee EH, Lee EJ. Action of Ulmi radicis cortex extract on systemic and local anaphylaxis in rats. *Gen Pharmacol.* 1998 ;31:483-488.

29. Kim HM, Lee SO, Lee EH. The nitric oxide-producing properties of Ulmi radicis cortex extract. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1999;21:295-306.

30. Song SE, Choi BK, Kim SN, Yoo YJ, Kim MM, Park SK, Roh SS, Kim CK. Inhibitory effect of procyanidin oligomer from elm cortex on the matrix metalloproteinases and proteases of periodontopathogens. *J. Periodontal Res.* 2003 ;38:282-289.