

목향 헥산추출물의 LNCaP 전립선암세포 증식 억제 효과

박소영^{1,2} · 김은지³ · 임도영^{1,2} · 김정상⁴ · 임순성³ · 신현경^{1,3} · 윤정환^{1,2,3*}

¹한림대학교 식품영양학과, ²한림대학교 한국영양연구소
³한림대학교 식의약품의 효능평가 및 기능성소재개발센터, ⁴경북대학교 동물공학과

Inhibitory Effect of the Hexane Extract of *Saussurea lappa* on the Growth of LNCaP Human Prostate Cancer Cells

So Young Park^{1,2}, Eun Ji Kim³, Do Young Lim^{1,2}, Jong-Sang Kim⁴, Soon Sung Lim³, Hyun-Kyung Shin^{1,3}, and Jung Han Yoon Park^{1,2,3*}

¹Dept. of Food Sciences and Nutrition, ²The Korean Institute of Nutrition and ³Center for Efficacy Assessment and Development of Functional Foods and Drugs, Hallym University, Chuncheon 200-702, Korea

⁴Dept. of Animal Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Abstract

Saussurea lappa (SL) has been used to reduce abdominal pain and tenesmus in traditional oriental medicine. SL and major compounds of SL, sesquiterpene lactones, have been suggested to possess various biological effects, including anti-tumor, anti-ulcer, anti-inflammatory, anti-viral and cardiotoxic activities. Recently, it has been reported that ethanol extracts from roots of SL have antiproliferative effects on gastric cancer cells. To explore the possibility that SL has chemopreventive effects on prostate cancer, we examined whether the hexane extract of SL (HESL) inhibits the growth of LNCaP human prostate cancer cells. Cells were incubated with various concentrations (0~4 mg/L) of HESL in DMEM/F12 containing 5% charcoal stripped fetal bovine serum. HESL substantially decreased viable cell numbers and induced apoptosis of LNCaP cells in dose-dependent manners. HESL increased the levels of cleaved caspase-8, -9, -7 and -3, and poly (ADP-ribose) polymerase. HESL increased the levels of the pro-apoptotic Bak and truncated-Bid proteins whereas it had no effect on the anti-apoptotic Bcl-2, Bcl-xL, or Mcl-1. The present results indicate that HESL inhibits the growth of human prostate cancer cells by inducing apoptosis, which involves the activation of the caspase cascades.

Key words: *Saussurea lappa*, prostate cancer, apoptosis, Bcl-2 family proteins, caspase

서 론

목향은 국화과에 속한 다년생 식물인 *Saussurea lappa*(SL)의 뿌리로서 한의학에서는 구토, 설사 및 염증치료 등에 사용되고 있다(1). 목향은 많은 종류의 sesquiterpene 및 sesquiterpene lactone계 화합물을 함유하고 있으며(2) 이들 성분 중 주성분은 sesquiterpene lactone계 화합물들인 costunolide와 dehydrocostus lactone으로 알려져 있다(3). 이들 주성분은 항균 작용(4), 항염증 작용(5) 및 혈관생성 억제 효능(6) 등 많은 약리 작용을 지니고 있다. 최근에 목향에탄올추출물은 apoptosis(7)와 G2-growth arrest(8)를 통해 위암 세포의 증식을 억제하는 것으로 보고되었다. 또한 목향 성분 중 하나인 costunolide는 human leukemia cell(9)과 azoxymethane으로 유도된 쥐의 대장암(10)에서 apoptosis를 통해 암을 억제하였고 isocostunolide는 human mela-

noma cell에서 세포 내·외적인 경로를 통해 apoptosis를 유도하였다(11). 그러나 현재 급격한 증가추세에 있으며 남자에게 흔하게 발생하는 고형암인 전립선암에 대한 목향의 효과는 알려진 바 없다.

Programmed cell death라고도 알려져 있는 apoptosis(세포사멸)는 정상적인 세포의 수를 조절하는데 있어 필요한 과정으로 DNA damage를 비롯한 다양한 원인의 손상에 의해 유도되며 정상세포의 기능 유지에 필수적인 과정이다(12,13). 최근 연구에 따르면 많은 종류의 항암제와 항암화학요법에 사용되는 물질들은 많은 암에서 암세포 세포사멸을 유도함으로써 암의 발생과 진행을 억제하는 것으로 알려져 있다(11). Apoptosis는 Bcl-2 family protein의 변화를 통해 미토콘드리아에서 cytochrome c의 분비를 조절함으로써 apoptosis를 조절하는 내적인 경로와 Fas 매개 신호체계를 통해 apoptosis를 조절하는 외적인 경로로 크게 나눌 수 있

*Corresponding author. E-mail: jyoona@hallym.ac.kr
Phone: 82-33-248-2134, Fax: 82-33-256-0199

다(14). 식품에 들어있는 여러 가지 성분들은 단백질의 발현 및 기능 조절, mRNA의 발현 조절 등을 통해 직·간접적으로 유전자 발현을 변화시켜 apoptosis를 조절할 수 있다(12). 따라서 apoptosis를 유도하는 식품 성분들은 향후 항암제, 암예방제 및 항암보조제로 개발할 수 있는 가능성이 크다.

본 연구에서는 목향이 전립선암에 미치는 영향을 조사하기 위해 목향이 인간의 전립선에서 유래한 암세포인 LNCaP 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하고 그 기전을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

재료

인간의 전립선에서 유래한 암세포인 LNCaP 세포는 American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 세포배양에 사용한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture Ham's F12(DMEM/F12)는 Gibco/BRL(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. Fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA는 Cambrex Bio Technology(Walkersville, MD, USA)에서 구입하였다. Bovine serum albumin(BSA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), β -actin antibody와 본 연구에 사용한 일반적인 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Horse radish peroxidase-linked anti-rabbit IgG와 horse radish peroxidase-linked anti-mouse IgG는 Amersham(Buckinghamshire, England)에서 구입하여 사용하였다. Bcl-2, Bax antibody는 Santa Cruz Biotechnology Inc.(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, Bcl-xL, Mcl-1, Bak, Bok, Bad, Bid, Bik, cleaved caspase-3, cleaved caspase-8, cleaved caspase-7, cleaved caspase-9, cleaved poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)에 대한 antibody는 Cell Signaling(Beverly, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Phycoerythrin(PE)-conjugated Annexin V(Annexin V-PE)와 7-amino-actinomycin D(7-AAD)는 BD Pharmingen(Franklin Lake, NJ, USA)으로부터 구입하였다.

시료추출

본 연구팀의 공동연구자인 Im 등은 목향 메탄올추출물의 핵산분획이 detoxifying 효소의 활성을 증가시키며 여러 종류의 암세포 증식억제 효능을 지닌다고 보고하였다(15). 따라서 춘천지역 한약방에서 구입한 목향은 분쇄하여 가루로 만든 후 목향 분말 100 g에 2 L의 핵산을 가하고 환류 조건하에서 70°C의 온도로 3시간 추출하였다. 추출을 2회 반복 실시한 후 추출물을 여과지로 여과하고 감압 농축하여 3 g의 추출물을 얻었다. HPLC 성분 검사 결과 목향 핵산추출물은 목향 메탄올추출물의 핵산분획과 유사한 성분 조성을 지닌

을 확인하여(data not shown) 목향 핵산추출물을 본 실험에 사용하였다.

세포배양

LNCaP 세포는 DMEM/F12 배지에 10% FBS, 100 units/mL penicillin과 100 μ g/mL streptomycin을 첨가한 세포 배양액을 사용하여 37°C 습윤한 CO₂ incubator(5% CO₂/95% air)에서 배양하였다. 세포가 80% 정도 배양접시를 덮으면 PBS(pH 7.4)로 세포의 단층을 씻어낸 후 0.25% trypsin-2.65 mM EDTA로 처리하여 계대배양하였고 배지는 2~3일마다 교환하였다.

세포 증식 변화 측정

목향 핵산추출물이 LNCaP 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위해 세포를 10% FBS가 포함된 배지로 희석하여 25,000 cells/well의 밀도로 24 well-plate에 분주하였다. 24 시간이 지난 후 10% FBS 대신 5% charcoal-stripped FBS를 포함하는 배지로 교환하여 혈청에 함유된 여러 성분들의 효과를 최소화하였다. 5% charcoal-stripped FBS를 포함하는 배지로 세포를 24시간 동안 배양한 후 5% charcoal-stripped FBS를 포함하는 배지에 목향 핵산추출물을 여러 농도(0, 1, 2, 3, 4 mg/L)로 첨가하여 교환한 후 세포를 배양하였다. 목향 핵산추출물을 첨가한 후 24시간, 48시간, 72시간이 경과한 뒤 MTT assay로 살아있는 세포수를 측정하였다(16).

Fluorescence-activated cell sorting analysis

세포를 24 well-plate에 분주한 후 위와 동일한 방법으로 목향 핵산추출물을 처리하였다. 목향 핵산추출물을 첨가하여 48시간이 경과한 후 trypsin-EDTA로 처리하여 세포를 수집하였다. 세포를 Annexin V-PE와 7-AAD로 염색한 후 FACScan™(Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ, USA)를 사용하여 flow cytometry 방법에 의해 Annexin V 또는 7-AAD에 의해 염색된 세포의 수를 측정하였다(17,18).

Hoechst 33258 staining

세포를 50,000 cells/well의 밀도로 4-well chamber slide에 분주하였다. 24시간 후 5% charcoal stripped FBS medium으로 배지를 교환하고 24시간 뒤 여러 농도의 목향 핵산추출물이 포함된 5% charcoal stripped FBS medium을 처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 4% formaldehyde로 20분간 고정시키고, DNA-specific fluorochrome Hoechst 33258로 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다(19).

세포사멸 관련 단백질 수준 측정

세포를 100 mm dish에서 위와 동일한 방법으로 목향 핵산추출물을 처리하고 세포 파쇄액을 준비하여 Western blot을 실시하였다. 세포 파쇄액은 세포를 차가운 PBS로 헹구고, 세포를 수집하여 lysis buffer(20 mM Hepes, pH 7.5, 150

mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 100 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM Na_3VO_4)를 첨가하여 4°C에서 40분간 교반하였다. 이때 단백질의 분해를 방지하기 위해서 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antipain, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ benzamidin HCl, 0.2 nM phenylsufonyl fluoride를 첨가하였다. 13,000 $\times g$ 에서 10분간 원심분리하여 침전물을 제거하고 상층액을 취해 세포 파쇄액(cell lysate)으로 사용하였다.

세포 파쇄액을 4~20%까지 농도를 다르게 한 SDS-PAGE로 분리하여 polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, USA)에 이동시켰다. Membrane은 5% skim milk-TBST(20 mM Tris HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에서 1시간 동안 blocking하고, cleaved caspase-3(1:1000 희석), cleaved caspase-7(1:1000 희석), cleaved caspase-9(1:1000 희석), cleaved caspase-8(1:1000 희석), cleaved PARP(1:1000 희석), Bcl-2(1:1000 희석), Bax(1:1000 희석), Bak(1:1000 희석), Bid(1:1000 희석), β -actin(1:1000 희석) antibody 등 측정하고자 하는 antibody를 각각 첨가하여 4°C에서 16시간 동안 교반하여 antibody를 붙였다. 그 후 horse radish peroxidase-linked anti-rabbit IgG 또는 horse radish peroxidase-linked anti-mouse IgG를 첨가하여 1시간 교반하였다. 각 protein band는 SuperSignal[®] West Dura Extended Duration Substrate (Pierce, USA)를 사용하여 enhanced chemiluminescence 방법으로 가시화하였다.

통계처리

모든 분석 수치는 mean \pm SEM으로 나타내었다. 수집된 결과는 SAS(Statistical Analysis System, ver. 8.01) PC 프로그램을 이용하여 통계 분석하였으며, 각 실험군들의 평균치간의 유의성은 $\alpha=0.05$ 수준에서 analysis of variance와 Duncan's multiple range test를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

목향 헥산추출물이 LNCaP 세포의 증식에 미치는 영향

목향 헥산추출물이 인간의 전립선에서 유래한 LNCaP 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위해 배양액에 0, 1, 2, 3, 4 mg/L의 목향 헥산추출물을 첨가하고 0, 1, 2, 3일이 경과한 후 MTT assay 방법(16)으로 살아있는 세포수를 측정하였다. 목향 헥산추출물의 농도가 증가할수록 세포 증식이 감소하였다(Fig. 1). 1일 경과 후 2 mg/L 농도의 목향 헥산추출물에서 세포의 증식이 감소하였으며 2일 후에는 낮은 농도(1 mg/L)에서도 세포증식 억제효과를 나타내었고 시간이 경과함에 따라 세포증식의 감소는 더욱 현저하게 나타났다. Jeon 등은 목향에서 분리한 dehydrocostuslactone 성분이 인간의 대장암세포인 HCT-116 세포의 세포증식을

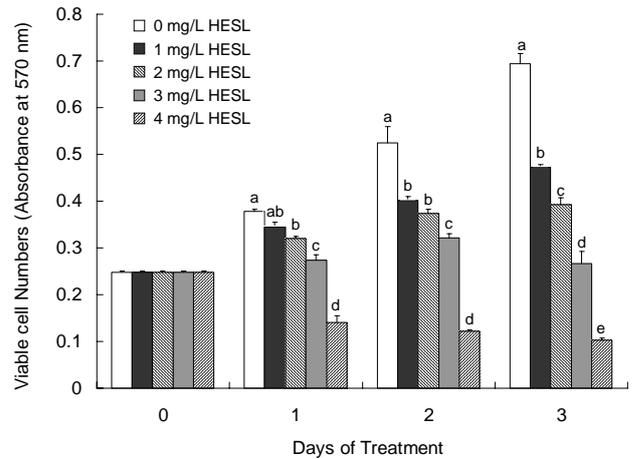


Fig. 1. The hexane extract of *Saussurea lappa* (HESL) inhibits LNCaP cell growth. Cells were plated in 24-well plates at 50,000 cells/well in DMEM/F12 supplemented with 10% FBS. One day later, the cell monolayers were serum-deprived with serum-free DMEM/F12 supplemented with 5% charcoal stripped FBS for 24 hr. After serum deprivation, cells were incubated in serum-deprivation medium in the absence or presence of various concentrations of HESL for the indicated periods. Viable cell numbers were estimated by the MTT assay. Each bar represents the mean \pm SEM (n=6). Bars with different letters are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range tests at each time point.

억제한다고 보고하였고(20), Bocca 등은 목향에서 분리한 costunolide 성분이 인간의 유방암세포인 MCF-7의 세포증식을 억제한다고 보고하였다(21). 또한 Ko 등은 목향 에탄올 추출물이 AGS gastric cancer cell의 세포증식을 현저히 억제하나 rat의 정상상피세포의 세포증식 억제효과는 미약하다고 보고하였다(8). 이러한 결과를 통해 목향은 대장암세포, 위암세포, 유방암세포 뿐만 아니라 전립선암세포의 증식도 억제하며 독성과 부작용이 비교적 적은 항암제로 개발할 수 있는 좋은 소재가 될 수 있음을 제시한다.

목향 헥산추출물이 LNCaP 세포의 apoptosis에 미치는 영향

Apoptosis는 암세포의 증식을 억제하는 기전 중의 하나이다. 목향 헥산추출물에 의한 세포증식 억제 효과가 apoptosis에 의한 것인지 확인하기 위하여 목향 헥산추출물이 LNCaP 세포의 apoptosis에 미치는 영향을 살펴보았다. Apoptosis의 형태학적 특성을 평가하기 위하여 Hoechst 33258 시약으로 염색한 결과 세포질의 위축, 염색사의 응축 및 핵의 분절 등을 포함하는 전형적인 apoptosis 특이적 형태가 관찰되었다(Fig. 2A). 사멸되는 세포수를 정량화하기 위하여 세포배양액에 목향 헥산추출물을 처리하고 48시간 배양한 후 Annexin V로 세포를 염색하여 flow cytometry 방법으로 early apoptotic cell 수를 측정하였다. 목향 헥산추출물의 처리 농도가 증가함에 따라 살아있는 세포수는 감소하였고 early apoptotic cell 수는 현저하게 증가하여 4 mg/L

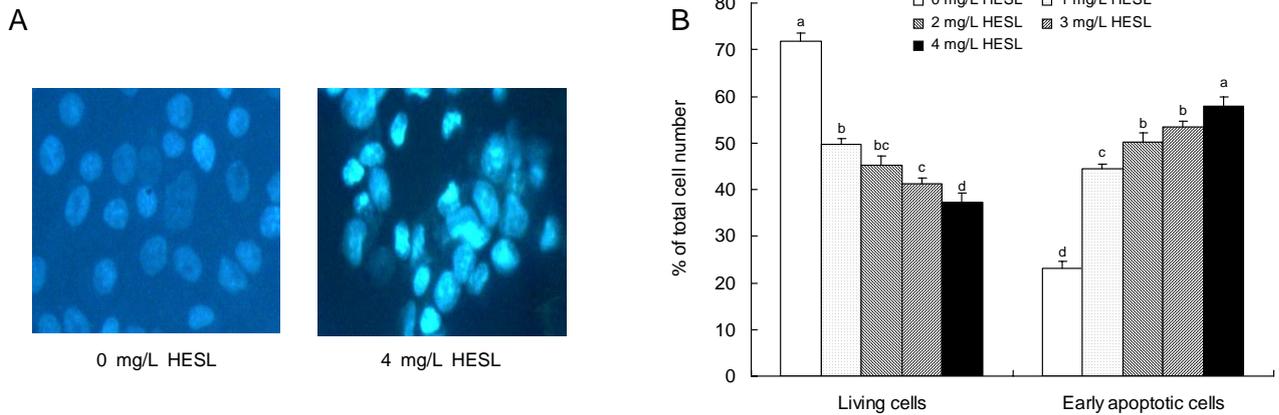


Fig. 2. HESL induces apoptosis of LNCaP cells. Cells were treated with HESL for 2 days as described in Fig. 1. A. Hoechst 33258 staining. Cells were stained with Hoechst 33258. Images were obtained using a fluorescence microscope. Microphotographs are representative of three independent experiments. Magnification, $\times 200$. B. Fluorescence-activated cell sorting. Cells were trypsinized, stained with 7-amino-actinomycin D and Annexin V, and then analyzed by flow cytometry. The number of living cells and early apoptotic cells is expressed as a percentage of total cell number. Each bar represents the mean \pm SEM (n=6). Comparisons between groups that yielded significant differences ($p < 0.05$) are indicated by different letters above each bar.

의 농도에서는 apoptotic cell이 약 58%에 달하였다(Fig. 2B). 이는 목향의 주요한 성분인 costunolide와 dehydrocostuslactone이 apoptosis를 유도한다는 다른 연구결과들(9,22)과 일치하는 내용으로 목향 헥산추출물의 전립선암세포 증식 억제 효과는 암세포의 apoptosis를 통해 이루어짐을 알 수 있다.

목향 헥산추출물에 의한 apoptosis 관련 유전자의 발현 변화

Apoptosis는 많은 유전자와 단백질들의 유기적인 작용으로 일어나는 과정으로 세포 내·외적인 경로를 통해 조절된다. Apoptosis 유발인자에 세포가 노출되면 여러 가지 경로와 핵심 인자들 간의 유기적인 작용으로 최종적으로 단백질 분해 효소인 caspase에 의해서 DNA가 분해되면서 주변세포나 식세포에 의한 phagocytosis를 통해 사멸하게 된다(23). 본 연구에서는 LNCaP 세포에서 목향 헥산추출물의 apoptosis 유도 경로를 조사하기 위하여 목향 헥산추출물을 세포배양액에 첨가하고 48시간 배양한 후 세포를 모아 cell lysate를 만들어 Western blot을 통해 apoptosis를 조절하는 단백질의 발현 양상을 조사하였다.

목향 헥산추출물이 p53 tumor suppressor 단백질의 수준에 미치는 영향: p53은 정상적인 세포의 세포질에 소량 존재하는 암억제 단백질로 DNA가 손상을 받는 경우에 그 양과 기능이 증가되고 세포질에서 핵으로 이동된다. p53 단백질은 apoptosis를 유발하는 Bax, Bid, p21^{WAF1/Cip1}, GADD45, mdm2 등의 유전자를 transactivation시킴으로써 apoptosis를 유도한다(24). 인체 암의 50% 이상에서 p53 유전자는 돌연변이되어 있거나 단백질이 기능적으로 소실되어 있다(25). LNCaP 전립선암세포는 p53 유전자가 변이된 많은 인간의 암세포와는 달리 p53 유전자가 wild type으로 존재하

는 세포이다(26). 따라서 목향 헥산추출물이 p53 단백질의 발현에 미치는 영향을 먼저 살펴보았다. 그 결과 목향 헥산추출물은 p53 단백질의 발현에 어떠한 영향도 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이는 위암세포에서 목향 에탄올추출물에 의해 p53이 증가된다고 보고한 Ko 등의 보고(7,8)와는 다른 결과이다. 이는 추출에 사용한 용매가 각각 헥산과 에탄올로 차이가 있었고 사용한 추출물의 농도도 본 연구에서는 비교적 낮은 농도(4 mg/L)를 사용했으나 Ko 등(7,8)은 이보다 높은 농도(100 mg/L)를 사용하였기 때문인 것으로 보인다. 즉, 낮은 농도(4 mg/L 이하)의 목향 헥산추출물은 LNCaP 세포의 p53 단백질 수준에는 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

목향 헥산추출물이 Bcl-2 family 단백질들의 수준에 미치는 영향: Bcl-2 family 단백질들은 미토콘드리아 막 투과성을 조절하는 단백질로 미토콘드리아를 통한 apoptosis의 경로를 조절하는데 중요한 역할을 담당한다(27). Bcl-2 family 단백질들은 미토콘드리아 막에 존재하거나 또는 apoptotic 자극에 의하여 미토콘드리아 막으로 이동한다. 이

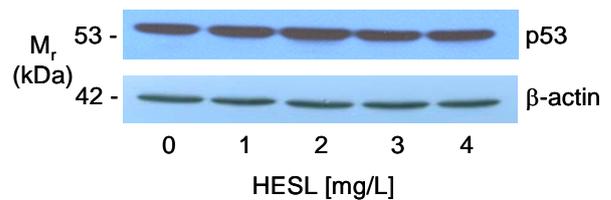


Fig. 3. HESL does not change the levels of p53 protein in LNCaP cells. Cells were treated with HESL for 2 days as described in Fig. 1. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with an antibody against p53 or β -actin antibody. Photographs of chemiluminescent detection of the blots, which are representative of three independent experiments, are shown.

들 단백질은 기능과 아미노산 서열의 유사성에 따라 anti-apoptotic 단백질(e.g. Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1), pro-apoptotic 단백질(e.g. Bax, Bak) 그리고 Bcl-2 homology(BH)3 only pro-apoptotic 단백질(e.g. Bid, Bak, Bad, Bik, Bmf)로 나눌 수 있다(28). Anti-apoptotic 단백질은 미토콘드리아 막의 탈분극화를 억제하고 막의 산화적 인산화를 증가시켜 미토콘드리아의 permeability transition을 억제한다. 이는 미토콘드리아의 permeability transition pore를 닫히게 하고 미토콘드리아 내에 존재하는 cytochrome c의 유출을 억제함으로써 apoptosis를 억제한다(24,29). 이와는 반대로 pro-apoptotic 단백질들은 세포가 apoptotic 자극에 노출되면 발현이 증가하거나 또는 미토콘드리아 막으로 이동이 증가하여 anti-apoptotic 단백질들의 작용을 억제하고 미토콘드리아 막을 탈분극화시켜 permeability transition pore를 열게 하여 cytochrome c를 방출시킨다. 미토콘드리아에서 분리된 cytochrome c는 caspase의 활성화를 촉진시키는 apoptotic protease activating factor(Apaf)-1에 촉매작용을 하여 caspase-9을 활성화함으로써 apoptosis를 촉진시키게 된다. BH3 only pro-apoptotic 단백질들은 anti-apoptotic 단백질과 결합하여 anti-apoptotic 단백질들에 길항작용을 함으로써 apoptosis를 조절한다(29). BH3 only 단백질 중 하나인 Bid는 cytosol에 존재하며 caspase-8에 의해 truncated Bid(t-Bid)로 분절되어 미토콘드리아 막으로 이동하고 미토콘드리아를 통한 내적 경로를 활성화시킨다. 이를 통해 미토콘드리아를 통한 내적 경로와 death receptor를 통한 외적 경로가 서로 연결되게 된다(28). LNCaP 세포에서 목향 핵산추출물에 의해 증가된 apoptosis가 미토콘드리아 막 투과성의 변화에 의한 것인지 확인하기 위하여 Western blot을 통해 Bcl-2 family 단백질들의 변화를 조사하였다. Anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1은 목향 핵산추출물의 처리에 의해 변화하지 않았고(Fig. 4A) pro-apoptotic 단백질 중 Bax 단백질 수준은 변화하지 않았으나 Bak 단백질은 목향 핵산추출물의 처리에 의해 발현이 유의적으로 증가하였다(Fig. 4B). BH3 only Bcl-2 family 단백질 중 Bad, Bik, Bmf 단백질 또한 목향 핵산추출물의 처리에 의한 변화가 없었으나 세포 내·외적인 경로를 연결시켜주는 단백질인 Bid는 목향 핵산추출물의 농도가 증가할수록 현저하게 감소하였으며 Bid의 분절형태인 t-Bid는 낮은 농도의 목향 핵산추출물을 처리한 경우에는 변화가 없었으나 4 mg/L 농도의 목향 핵산추출물을 처리한 경우 약 1.3배 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 4C). Ko 등은 위암세포에서 목향 에탄올추출물에 의해 Bax 단백질이 증가하고 Bcl-2 단백질은 감소한다고 보고하였다(7,8). 또한, Chen 등은 목향의 성분 중 하나인 isocostunolide는 melanoma 세포에서 Bcl-2와 Bid 단백질을 감소시킨다고 보고하였다(11). 이는 본 연구의 결과와 부분적으로만 일치하는 결과로 앞에 언급한 바와 마찬가지로 추출물의 농도, 성분 그리고 암세포의 차이에 따른 결과로

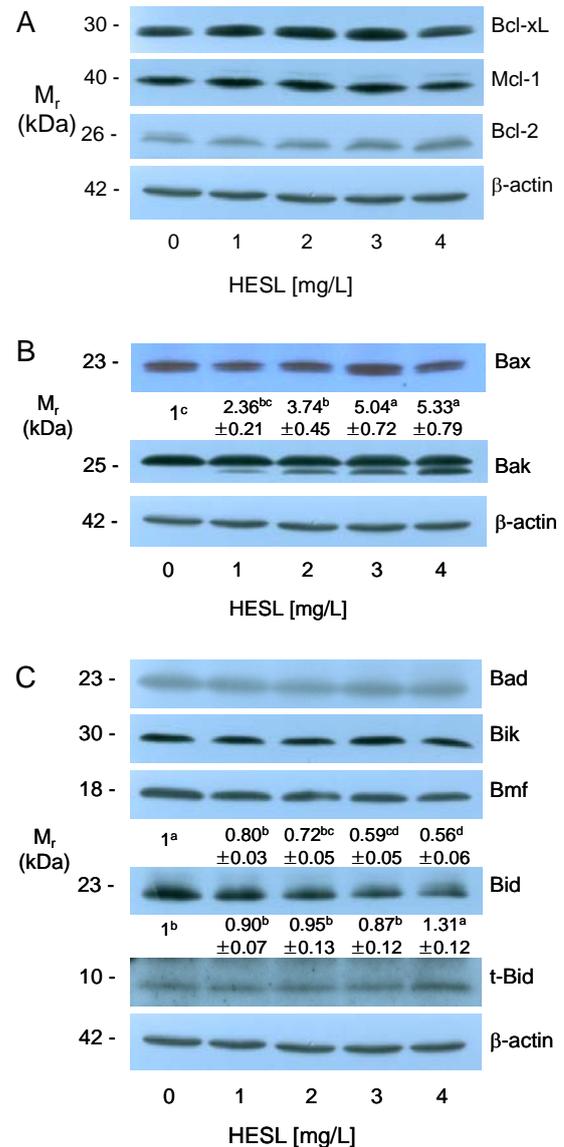


Fig. 4. HESL alters the levels of Bcl-2 family proteins in LNCaP cells. A. Anti-apoptotic Bcl-2 family proteins, B. Pro-apoptotic Bcl-2 family proteins, C. BH3 only Bcl-2 family proteins. Cells were treated with HESL for 2 days as described in Fig. 1. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with an antibody against Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bax, Bak, Bad, Bik, Bmf, Bid, t-Bid or β -actin. Photographs of chemiluminescent detection of the blots, which are representative of three independent experiments, are shown. The relative abundance of each band to their own β -actin was quantified, and the adjusted mean \pm SEM (n=3) of each band is shown above each blot. Means without a common letter differ, $p < 0.05$.

판단된다. 그리고 여러 가지 Bcl-2 family 단백질들의 transcription은 p53 tumor suppressor protein에 의하여 조절된다(30). 앞에서 언급한 것처럼 Ko 등(7,8)과 Chen 등(11)이 사용한 세포에서는 p53이 증가하였으나 본 연구에서는 p53은 변하지 않았다. 따라서 p53의 변화 여부도 Bcl-2 family 단백질들의 발현 특성에 차이를 나타내는 이유 중 하나가

될 수 있다고 판단된다. 이상의 결과를 통해 목향 핵산추출물은 Bcl-2 family 단백질들의 수준을 변화시켜 apoptosis를 유도한다는 결론을 내릴 수 있다.

목향 핵산추출물이 caspase 활성 및 PARP의 분절에 미치는 영향: Cysteine-dependent aspartate-directed protease인 caspase는 세포 내 단백질의 분절에 주요한 역할을 하며 이를 통해 death signal을 전달한다. Caspases는 세포 내에서 불활성 형태인 proenzyme으로 합성된 후 스스로 또는 다른 caspase에 의해 분절되어 활성화된다(31). 현재 14 종류의 caspase가 알려져 있고 그 중 7종의 caspase가 apoptosis에 깊게 관여하며 크게 initiator caspase(caspase-8, -9, -2, -10)와 effector caspase(caspase-3, -7, -6)로 분류할 수 있다(28). Initiator caspase인 caspase-8과 -9은 각각 death effector domain(DED)과 caspase recruitment domain(CARD)을 지니고 있으며 서로 다른 경로를 통해 활성화된다(32). Death receptor에 ligand가 결합하면 caspase-8을 끌어당겨 활성화시킨다. 활성화된 caspase-8은 직접 caspase-3를 활성화시키거나 또는 Bid의 분절, t-Bid의 미토콘드리아로의 이동을 유발시켜 미토콘드리아 막투과성을 증가시키고 이를 통해 apoptosis를 유도한다. 반면 caspase-9은 미토콘드리아에서 방출된 cytochrome c에 의해 활성화되어 caspase-3를 활성화시킨다. 이렇게 활성화된 caspase-3는 caspase-7을 활성화시키고 활성화된 effector caspase들은 lamin A, PARP, DNA fragmentation factor 등의 단백질을 분해하여 apoptosis를 유도한다(33,34). 이처럼 apoptosis에 있어 중요한 역할을 하는 caspase의 활성에 미치는 목향 핵산추출물의 효과를 조사하기 위하여 caspase의 활성형태인 cleaved caspase 단백질들의 발현을 조사하였다. 그 결과 initiator caspase인 cleaved caspase-8, -9은 각각 4 mg/L, 3 mg/L 농도에서 약 3배 정도 증가하였다(Fig. 5). 또한 effector caspase인 caspase-7, -3의 cleaved form도 목향 핵산추출물의 농도가 증가함에 따라 현저하게 증가하였다(Fig. 5). 이는 목향 에탄올추출물이 위암세포주에서 활성화된 caspase-3 단백질의 발현을 증가시킨다는 보고(7,8) 및 melanoma cell에서 isocostunolid가 procaspase-8, -3를 감소시킨다는 보고(11)와 일치하는 결과이다. 이들 결과로부터 목향 핵산추출물의 apoptosis 유도 효과는 Bcl-2 family 단백질의 변화와 더불어 활성화된 caspase 단백질의 발현 증가에 의한 것임을 확인할 수 있다.

Caspase-3에 의해 분해되어 불활성화 되는 것으로 알려진 PARP는 DNA 복구와 유전자 보전에 관련된 세포 핵 내 단백질로 DNA 손상을 신호로 base-excision repair에 관여한다. 활성화된 PARP는 NAD를 기질로 poly(ADP-ribose)를 형성하여 핵 내에 존재하는 다양한 단백질 및 효소를 변형시켜 DNA를 회복시킴으로써 세포의 생존 유지에 중요한 역할을 담당한다. PARP의 분절로 인한 불활성화는 세포 분해를 촉진함으로써 cleaved PARP의 증가는 세포가 apoptosis

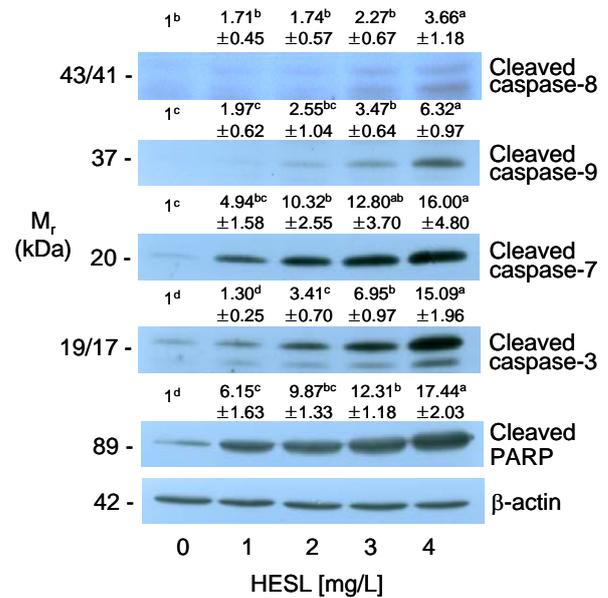


Fig. 5. HESL induces caspase activation in LNCaP cells. Cells were treated with HESL for 2 days as described in Fig. 1. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with an antibody against cleaved caspase-3, -7, -8, -9, cleaved PARP or β-actin. Photographs of chemiluminescent detection of the blots, which are representative of three independent experiments, are shown. The relative abundance of each band to their own β-actin was quantified, and the adjusted mean ± SEM (n=3) of each band is shown above each blot. Means without a common letter differ, p<0.05.

되고 있음을 나타낸다(35,36). Bcl-2 family 단백질들의 변화와 caspase 단백질들의 활성화를 일으킨 목향 핵산추출물이 PARP 단백질의 분절에 미치는 영향을 Western blot을 통해 살펴보았다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 목향 핵산추출물의 농도가 증가할수록 cleaved PARP 단백질이 현저하게 증가하여 4 mg/L의 농도에서는 17.5배로 증가되었다. 이는 목향 에탄올추출물이 위암세포주에서 PARP를 감소시켰다는 보고(8) 및 목향의 주요 성분인 isocostunolid가 melanoma 세포에서 PARP를 감소시켰다는(11) 보고와 일치하는 결과로 목향 핵산추출물에 의한 PARP의 불활성화가 apoptosis에 기여함을 알 수 있다.

이상의 결과들을 통해 목향 핵산추출물은 전립선암세포인 LNCaP 세포에서 Bcl-2 family 단백질들의 변화와 caspase-8, -9, -3, -7의 활성 증가에 의해 PARP를 불활성화시킴으로써 apoptosis를 유도함을 확인할 수 있었다. 최근에는 강력한 PARP-1 억제제를 암환자의 임상시험으로도 사용하고 있어(37) PARP를 억제함으로써 apoptosis를 유도한 목향 핵산추출물은 향후 화학적 암예방 물질이나 치료제로 개발될 가능성을 지님을 제시한다. 특히, 목향 핵산추출물은 아주 낮은 농도(1~4 mg/L)에서 그 효능을 나타냄으로 효능이 높은 항암제로 개발되기 위해서 transgenic mouse prostate adenocarcinoma(TRAMP) mouse 동물모델을 이용하여 동물실험을 수행할 가치가 있다고 사료된다. 또한 이러한

용도로 목향 핵산추출물을 사용하기 위해서는 항암효과를 나타내는 성분의 동정 및 좀 더 세밀한 기전연구 등 추후에도 계속적으로 다양한 연구가 수행되어야 할 것이다.

요 약

목향은 국화과에 속한 다년생 식물인 *Saussurea lappa*의 뿌리로서 한의학에서는 구토, 설사 및 염증치료 등에 사용되고 있다. 목향 추출물 및 그 성분들은 항균 작용, 항염증 작용, 혈관생성 억제 효능 등을 지니고 있으며 위암과 대장암의 세포증식을 억제하는 것으로 알려져 있다. 그러나 현재까지 전립선암에 대한 목향의 효과는 연구된 바 없다. 본 연구에서는 목향이 전립선 암세포에 미치는 영향을 조사하기 위해 인간의 전립선에서 유래한 암세포인 LNCaP 세포의 증식과 apoptosis에 미치는 영향을 조사하였다. 목향 핵산추출물을 LNCaP 세포 배양액에 여러 농도(0~4 mg/L)로 첨가하여 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하였다. 목향 핵산추출물의 농도가 증가할수록 LNCaP 세포의 증식은 현저하게 감소하였고 apoptosis는 증가함을 관찰하였다. 목향 핵산추출물이 LNCaP 세포의 apoptosis 일으키는 기전을 연구하기 위하여 목향 핵산추출물을 첨가하고 세포를 48시간 배양한 후 cell lysate를 얻어 Western blot을 실시하였다. Apoptosis 과정에 작용하는 중요한 단백질 중 하나인 Bcl-2 family 단백질 중 pro-apoptotic Bcl-2 단백질인 Bak와 BH3 only Bcl-2 단백질인 truncated-Bid의 단백질 수준은 목향 핵산추출물에 의해 유의적으로 증가한 반면 anti-apoptotic Bcl-2 단백질인 Bcl-2, Bcl-xL 및 Mcl-1 단백질 수준은 변하지 않았다. 또한 apoptosis를 집행하는 caspase의 활성 형태인 cleaved caspase-8, -9, -7, -3의 단백질 수준이 목향 핵산추출물의 처리에 의해 증가하였고 caspase-3의 표적 단백질 중 하나인 PARP의 불활성 형태인 cleaved PARP의 단백질 수준도 현저하게 증가하였다. 이 결과들은 목향 핵산추출물이 LNCaP 세포의 apoptosis를 유도함으로써 전립선 암세포의 증식을 억제함을 보여주는 것이며 목향 핵산추출물에 의한 apoptosis 유도는 caspase 활성 증가와 Bak 및 t-Bid 단백질의 증가에 의한 것임을 제시한다. 따라서 앞으로 항암효과를 나타내는 성분의 동정 및 동물실험을 통하여 좀 더 면밀한 기전 연구가 수행된다면 목향 핵산추출물은 화학적 암예방 물질이나 치료제로 개발될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단의 연구지원(KRF-2005-F00055) 사업과 농촌진흥청 바이오그린21(과제번호: 20070301034039) 사업의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Jeon YJ, Lee HS, Yeon SY, Ko JH, An KM, Yu SW, Kang JH, Hwang BY, Kin TY. 2005. Inhibitory effect of dehydrocostuslactone isolated from *Saussurea Radix* on CDK2 activity. *Kor J Pharmacogn* 36: 97-101.
2. Jung NH, Ha JY, Min KR, Shibata F, Nakagawa H, Kang SS, Chang IM, Kim YS. 1998. Reynosis from *Saussurea lappa* as inhibitor on CINC-1 induction in LPS-stimulated NRK-52E cells. *Planta Med* 64: 454-456.
3. Kang SH, Kim JS, Chi HJ, Chang SY, Ha KW. 1999. Isolation and quantitative determination of costunolide from saussurea root. *Kor J Pharmacogn* 30: 48-53.
4. Wedge DE, Galindo JC, Macias FA. 2000. Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs. *Phytochem* 53: 747-757.
5. Park HJ, Jung WT, Basnet P, Kadota S, Namba T. 1996. Syringin 4-O-beta glucoside, a new phenylpropanoid glycoside, and costunolide, a nitric oxide synthase inhibitor, from the stem bark of *Magnolia sieboldii*. *J Nat Prod* 59: 1128-1130.
6. Jeong SJ, Ltokawa T, Shibuya M, Kuwano M, Ono H, Huguchi R, Miyamoto T. 2002. Costunolide, a sesquiterpene lactone from *Saussurea lappa*, inhibits the VEGFR KDR/Flk-1 signaling pathway. *Cancer Lett* 187: 129-133.
7. Ko SG, Koh SH, Jun CY, Nam CG, Bae HS, Shin MK. 2004. Induction of apoptosis by *Saussurea lappa* and *Pharbitis nil* on AGS gastric cancer cells. *Biol Pharm Bull* 27: 1604-1610.
8. Ko SG, Kim HP, Jim DH, Bae HS, Kim SH, Park CH, Lee JW. 2005. *Saussurea lappa* induces G2-growth arrest and apoptosis in AGS gastric cancer cells. *Cancer Lett* 220: 11-19.
9. Lee MG, Lee KT, Chi SG, Park JH. 2001. Costunolide induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition and cytochrome c release. *Biol Pharm Bull* 24: 303-306.
10. Mori H, Kawamori T, Tanaka T, Ohnishi M, Yamahara J. 1994. Chemopreventive effect of costunolide, a constituent of oriental medicine, on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats. *Cancer Lett* 83: 171-175.
11. Chen CN, Huang HH, Wu CL, Lin PC, Hsu JT, Hsieh HP, Chuang SE, Lai GM. 2007. Isocostunolide, a sesquiterpene lactone, induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in human melanoma cells. *Cancer Lett* 246: 237-252.
12. Martin KR. 2007. Using nutrigenomics to evaluate apoptosis as a preemptive target in cancer prevention. *Curr Cancer Drug Targets* 7: 438-446.
13. Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-777.
14. Debatin KM. 2004. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 53: 153-159.
15. Im SS, Kim JR, Lim HA, Jang CH, Kim YK, Konishi T, Kim EJ, Park JHY, Kim JS. 2007. Induction of detoxifying enzyme by sesquiterpenes present in *Inula helenium*. *J Med Food* 10: 503-510.
16. Denizot F, Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89: 271-277.
17. Hodge GL, Flower R, Han P. 1999. Optimal storage conditions for preserving granulocyte viability as monitored by Annexin V binding in whole blood. *J Immunol Methods*

- 225: 27-38.
18. Herault O, Colombat P, Domenech J, Degenne M, Bremone JL, Sensebe L, Bernard MC, Binet C. 1999. A rapid single-laser flow cytometric method for discrimination of early apoptotic cells in a heterogeneous cell population. *Br J Haematol* 104: 530-537.
 19. Cowell JK, Franks LM. 1980. A rapid method for accurate DNA measurements in single cells in situ using a simple microfluorimeter and Hoechst 33258 as a quantitative fluorochrome. *J Histochem Cytochem* 28: 206-210.
 20. Jeon YJ, Lee HS, Yeon SY, Ko JH, An KM, Yu SW, Kang JH, Hwang BY, Kin TY. 2005. Inhibitory effect of dehydrocostuslactone isolated from *Sussureae Radix* on CDK2 activity. *Kor J Pharmacogn* 36: 97-101.
 21. Bocca C, Gabriel L, Bozzo F, Miglietta A. 2004. A sesquiterpene lactone, costunolide, interacts with microtubule protein and inhibits the growth of MCF-7 cells. *Chem Biol Interact* 147: 79-86.
 22. Park HJ, Kwon SH, Han YN, Choi JW, Miyamoto K, Lee SH, Lee KT. 2001. Apoptosis-inducing costunolide and a novel acyclic monoterpene from the stem bark of *Magnolia sieboldii*. *Arch Pharm Res* 24: 342-348.
 23. Moon BK. 2002. Anesthesiology and apoptosis. *J Kor Anesthesiology* 42: 563-574.
 24. Banasiak KJ, Sia Y, Haddad GG. 2000. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol* 62: 215-249.
 25. Amundson SA, Myers TG, Fornace AJ Jr. 1998. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene* 17: 3287-3299.
 26. Rokhlin OW, Bishop GA, Hostager BS, Waldschmidt TJ, Sidorenko SP, Pavloff N, Kierfer MC, Umansky SR, Cohen MB. 1997. Fas-mediated apoptosis in human prostatic carcinoma cell lines. *Cancer Res* 57: 1758-1768.
 27. Kim EJ, Park SY, Hong J, Shin M, Lim SS, Shin HK, Park JHY. 2007. Inhibitory effect of the methanolic extract of *Symphyclocladia latiuscula* on the growth of HT-29 human colon cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 431-438.
 28. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. 2005. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* 84: 627-639.
 29. Lemasters JJ, Quian T, Bradham CA, Brenner DA, Cascio WE, Trost LC, Nishimura Y, Nieminen AL, Herman B. 1999. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *J Bioenerg Biomembr* 31: 305-319.
 30. Yamaguchi H, Chen J, Bhalla K, Wang HG. 2004. Regulation of Bax activation and apoptotic response to microtubule-damaging agents by p53 transcription-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 279: 39431-39437.
 31. Licholson DW, Thornberry NA. 1997. Caspases: Killer pergeases. *Trend Biochem Sci* 22: 299-306.
 32. Ho PK, Hawkins CJ. 2005. Mammalian initiator apoptotic caspases. *FEBS J* 272: 5436-5453.
 33. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 269-290.
 34. Kim EJ, Park SY, Shin HK, Kwon DY, Surh YJ, Park JHY. 2007. Activation of caspase-8 contributes to 3,3'-diindolylmethane-induced apoptosis in colon cancer cells. *J Nutr* 137: 31-36.
 35. Oliver FJ, de la Rubia G, Folli V, Ruiz-Ruiz MC, de Murcia G, Murcia JM. 1998. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson form an un-cleavable mutant. *J Biol Chem* 273: 33533-33539.
 36. Pulmmer ER. 2006. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in cancer. *Curr Opin Pharmacol* 6: 364-368.
 37. Ratnam K, Low JA. 2007. Current development of clinical inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase in oncology. *Clin Cancer Res* 13: 1383-1388.

(2007년 10월 29일 접수; 2007년 12월 4일 채택)