

## Butein의 Jurkat T 림포마 세포에서 발현되는 세포괴사 효과

김나영\*

Children's Hospital Boston, Department of Medicine, and Harvard Medical School,  
Department of Pediatrics, Boston, MA

## Butein-Induced Apoptosis in Human T Lymphoma Jurkat Cells

Nayoung Kim\*

Children's Hospital Boston, Department of Medicine, and Harvard Medical School,  
Department of Pediatrics, Boston MA, 02115

**Abstract** – Butein is a one of polyphenolic compound widely available in numerous plants. It has broad biological activities including antioxidant and anti-inflammatory activities, which contributed to its protective effects against cancer. Evidences that butein influence proliferation of tumor cells make it important to determine how butein affects cell death of various cancers. In this study, we show that butein, a phenolic compound, induces apoptosis in human T lymphoma jurkat cells. We found that treatment of cells with butein increased apoptosis in a dose- and time- dependent manner as determined by staining cells with Annexin V and 7AAD. There was no significant apoptotic cell death when normal lymphocytes and monocytes from healthy donor were treated with butein. We also found caspase-3 activity was increased during butein-induced apoptosis. The butein-induced apoptotic cell death was blocked by the treatment of cells with caspase-3 inhibitor. These results indicate that butein has the potential to provide an effective strategy against cancer with the advantage of being widely available.

**Key words** – Butein, Apoptosis, Anti-oxidant, Polyphenol

천연물로부터 분리된 생리활성물질은 항암치료제 개발을 위한 목적으로 상당한 과학계의 관심과 집중을 받아왔다. 그중에서 폴리페놀계 성분은 항산화작용을 발휘하기 때문에 염증반응 치료나 항암 작용의 목적으로 이용하려는 많은 시도가 이루어져 왔다. 천연물에 존재하는 폴리페놀 성분은 주로 60%가 플라보노이드 계열이고 약 30%가 페놀산 형태로 존재한다.<sup>1,2)</sup> 이들 화합물의 우수한 항산화작용 기전은 실험적 증명을 통해 과학적으로 그 생리활성 작용이 입증되어져 있다.<sup>3)</sup> 지난 수십년간 많은 증거 자료들은 이들 폴리페놀계 성분들은 세포증식을 억제하고 세포괴사(apoptosis) 작용을 유도함으로써 다양한 종류의 암세포를 괴사시킬 수 있다는 사실을 입증하고 있다.<sup>4,13)</sup>

세포괴사(apoptosis) 작용은 생물학에서 세포가 적절한 신호 자극을 받았을 때 스스로를 파괴하는 작용을 말한다. 이는 신체에 그 세포가 더 필요 없거나, 그 세포의 존재가 유기체 전체의 건강을 위협하는 등 여러 가지 경우에 시작

된다. 필요한 세포괴사 작용이 억제될 경우 암 등 여러 질병이 발생할 수 있다. 아포토시스를 일으킨 세포들은 형태적으로 세포가 쭈그러들어 다른 세포로부터 떨어져나가며, 세포 표면에 거품 같은 형태가 나타나고, 핵에 있는 염색사(염색체 DNA와 핵단백질)가 응축하는 등의 변화를 나타낸다. 이렇게 된 세포는 다른 세포에 의해 분해되거나, 작은 조각으로 부서져 다른 포식세포에게 둘러싸인다.<sup>14,17)</sup>

본 연구진은 폴리페놀계 성분에 속하는 butein을 이용한 실험에서 이 화합물이 HL-60 세포에서 apoptosis를 일으켜 항암효과를 발휘할 수 있음을 증명하였다.<sup>18)</sup> Butein (3,4,2',4'-tetrahydroxychalcone)은 폴리페놀계 화합물에 속하며 주로 stem-bark of cashews (*Semecarpus anacardium*), the heartwood of *Dalbergia odorifera*, 그리고 전통적인 중국과 티벳의 천연물 *Caragana jubata*, *Rhus verniciflua* Stokes에 존재한다. 이들 천연물로부터 분리된 성분은 주로 항산화작용과 항염증 효과를 발휘할 수 있다고 보고 되어 왔다.<sup>19,22)</sup> 이들 보고들은 실험적 증명을 바탕으로 butein이 세포괴사를 유도하므로써 다양한 종류의 암세포들, 예를 들어 breast carcinoma, colon carcinoma, osteosarcoma,

\*교신저자(E-mail): nayoung.kim@childrens.harvard.edu  
(FAX): +1-617-730-0255

lymphoma, melanoma, 그리고 hepatic stellate cells에 대한 항암효과를 입증하고 있다.<sup>23-29)</sup>

본 연구진은 실험적 자료를 바탕으로 폴리페놀계열 성분의 항암효과와 관련된 작용기전을 구체적으로 규명함으로써 새로운 항암치료 약물의 개발을 시도하고 있다. 본 논문에서는 이러한 연구 중 butein에 의해 유도되는 Jurkat T 림포아 세포에서의 세포괴사 효과를 나타내는 기전을 연구 하였으며 세포괴사에 관련된 다양한 단백질과, 효소활성을 측정하였다.

## 재료 및 방법

**재료** - Butein 은 Calbiochem-Novabiochem (La Jolla, CA, USA)에서 구입하였으며, 4', 6-diamidino-2-phenylindole, 3'-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, CaspACE assay kit 는 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하였다. RPMI 1640 medium, fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin은 Life Technologies Inc. (Grand Island, NY)에서 구입하였다. Human leukemia HL-60, lymphoma cell MOLT-4 cell과 CCRF-CEM 세포는 American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA)에서 구입하였다.

**세포의 배양** - HL-60 (myeloblastic), MOLT-4 (lymphoblastic), Jurkat (lymphoblastic)과 T cell acute lymphoblastic leukemia cell line인 CCRF-CEM 세포는 10% FBS 및 penicillin (100 µg/ml), streptomycin (100 U/ml)이 포함된 RPMI 1640 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. Jurkat 세포에 시료용액의 여러 농도 (10, 20, 40 µg/ml) 또는 양성 대조군을 처리하고 실험 조건에 따라서 48시간 동안 배양하였다.

**세포독성 시험** - 24 well plate에 1×10<sup>6</sup> cells/well로 세포를 동일하게 분주하고 24시간동안 배양한 후 여러 농도의 시료용액을 두 군으로 나누어 배지에 희석하여 첨가 하였다. 24시간이 지난 후 MTT시약을 넣고 4시간 동안 방치한 후 상등액을 제거하고 형성된 formazan을 DMSO 100 µl를 첨가하여 용해시키고 30분 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

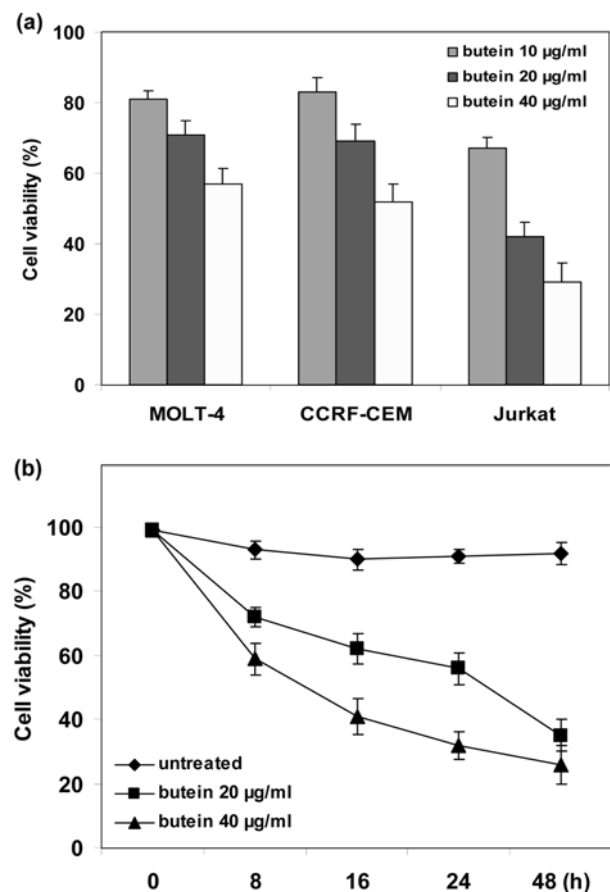
**Apoptosis 측정** - Jurkat 세포 (1×10<sup>6</sup> cells/ml)를 동일하게 분주하고 일정시간 동안 배양한 후 1×10<sup>5</sup> 에서 1×10<sup>6</sup> cells을 10/5 혈청을 함유하는 phosphate-buffered saline (PBS)에 희석한 후 Annexin V-FITC 와 7AAD staining (BD Biosciences, San Diego, California, USA)를 사용하여 제조회사의 지침에 따라서 세포를 염색하였다 세포괴사는 Annexin V-FITC 와 7AAD에 양성을 나타내는 세포의 %로 측정하였다.

**Caspase-3 활성 측정** - Caspase-3 활성은 단백질 50 µg 과 50 mM fluorescent substrate Ac-DEVD-AMC을 사용하여 측정하여 방출된 AMC 양을 spectrofluorometer를 이용하여 360 nm 와 460 nm 파장에서 측정하였다.

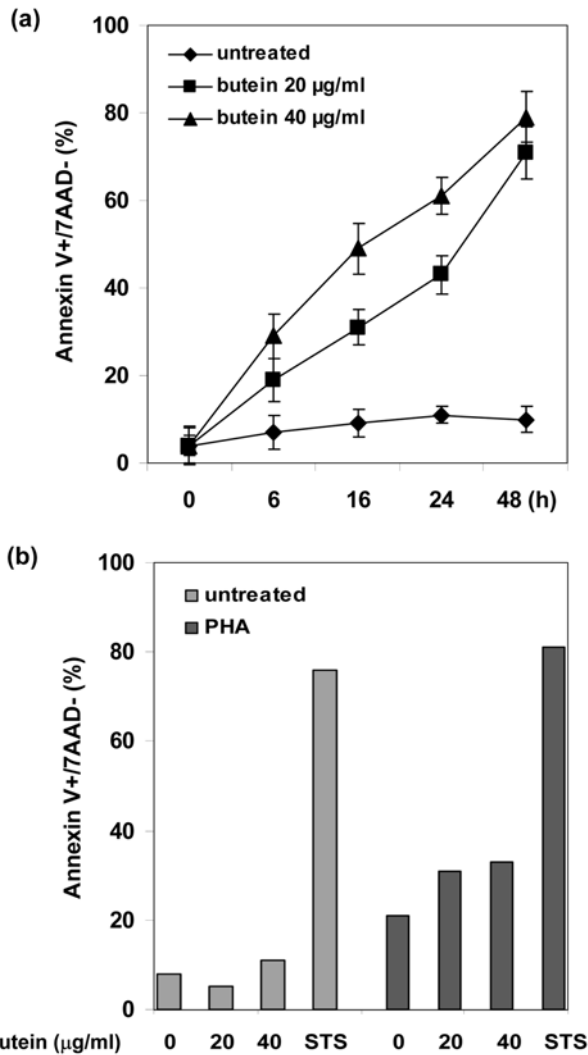
**통계학적 분석** - 실험치의 값은 mean±S.D.로 나타냈으며 분석은 Student's *t*-test로 그 유의성을 나타내었다.

## 결과 및 고찰

**Butein의 세포독성에 대한 효과** - Butein의 다양한 종양 세포들에 대한 세포독성을 측정하기 위해 MTT assay를 수행하였다 (Fig. 1a). 이들 세포들 중, jurkat 세포에 대한 독성작용이 가장 높다는 사실을 확인하였다. Butein은 농도의존적으로 jurkat 세포의 생존 능력을 감소시켰다. Butein의 IC<sub>50</sub>는 18.2 µg/ml로 확인되었으며 20 그리고 40 µg/ml 농

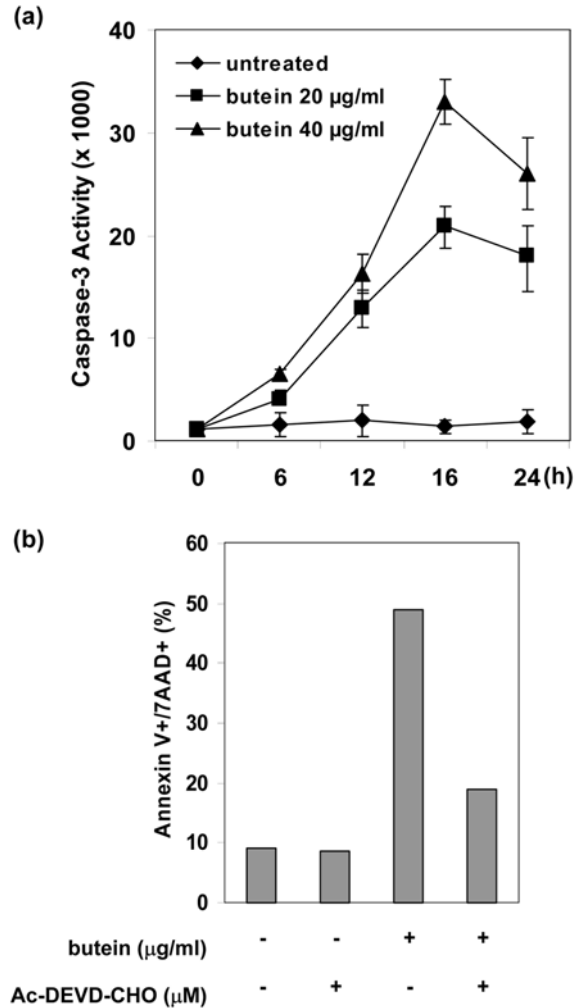


**Fig. 1.** Effects of butein treatment on the cell viability in various cancer cells. (a) Each type of cancer cells or (b) jurkat cells (1×10<sup>6</sup> cells/ml) were treated with butein at indicated concentration for 24 h. Cell viability was determined by using 3'-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide. Data are represented as means±S.E. of three independent experiments.



**Fig. 2.** Levels of apoptosis in butein-treated Jurkat cells and human PBMC. (a) Jurkat cells or (b) human PBMC from healthy donor were treated with butein. Human PBMC were stimulated with or without phytohemagglutinin (PHA) for 48 h and then incubated butein for 24 h. 1 mM of staurosporin (STS) was used as a positive control. The percentage of Annexin V+ and 7AAD- is reported as level of apoptosis. The results are represented as mean±S.E. of three independent experiments.

도에서 세포 생존율은 각각 56%, 32%로 감소됨을 확인하였다 (Fig. 1b). Butein에 의한 세포괴사 효과를 구체적으로 증명하기 위하여, Annexin V과 7AAD를 사용하여 세포염색을 한 후에 flow cytometry analysis를 통한 세포괴사율을 측정하였다 (Fig. 2). Butein은 20 µg/ml와 40 µg/ml의 농도에서 24 시간 동안 각각 43%와 61%의 세포괴사를 유도하였다. Butein에 의한 세포괴사 효과는 농도 및 시간 의존적임을 확인하였다 (Fig. 2a). 정상세포에 대한 butein의 작용을 확인하기 위해서 건강한 사람의 혈액으로부터 PBMC



**Fig. 3.** Activation of caspase-3 in the butein-induced apoptosis. (a) Caspase-3 activity in the butein-treated Jurkat cells. Cells were treated with butein (20 and 40 µg/ml) at indicated time periods, and then caspase-3 activity was measured as described in Materials and Methods. Results are means±S.E. of three independent experiments. (b) Inhibition of butein-induced apoptosis by caspase-3 inhibitor. Cells were pretreated with caspase-3 inhibitor, Ac-DEVD-CHO (50 µM) for 1 h and further incubated with 40 mg/ml of butein for 16 h. Apoptosis was measured using flow cytometry by staining the cells with Annexin V-FITC and 7AAD. The results are represented as mean±S.E. of three independent experiments.

를 분리하여 같은 실험을 실시하였고 butein의 세포독성 작용은 정상적인 세포에서는 발생하지 않았음을 확인하였다 (Fig. 2b). Butein에 의한 세포괴사 효과는 caspase-3 효소의 활성화를 유발 시켰으며 (Fig. 3a) 효소저해제를 처리했을 때 butein에 의한 세포괴사 작용은 현저히 감소됨을 확인하였다 (Fig. 3b). 이와 같은 사실은 caspase-3 효소 활성이 butein에 의한 세포괴사에 중요한 인자로 작용함을 입증하고 있다.

본 연구진은 폴리페놀계 화합물을 다량 함유하는 여러 천

연물의 성분 중에서 새로운 항암 작용을 지닌 약물을 검색 할 하는 과정에서 *Dalbergia odorifera*에 주로 존재하는 butein의 jurkat T lymphoma 세포에 대한 항암효과를 발견하였다. 지난 수십년간의 실험적 입증을 통해 제시된 이들 폴리페놀계 성분들의 탁월한 세포증식 억제와 세포괴사 (apoptosis) 작용을 유도함으로써 다양한 종류의 암세포를 괴사시킬 수 있는 항암 효과들은 앞으로 더 많은 in vivo 실험과 임상 실험을 토대로 입증 되어져야 할 것이며, 이들 중 butein은 탁월한 후보 물질의 하나로서 평가될 수 있을 것이다.

### 인용문헌

- Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**: 317-333.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. and Jiménez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**: 727-747.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M. and Pridham, J. B. (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res.* **22**: 375-383.
- Bergamaschi, G. V., Rosti, M., Danova, L., Ponchio, C. and Lucotti, M. (1993) Cazzola: Inhibitors of tyrosine phosphorylation induce apoptosis in human leukaemic cell lines. *Leukemia* **7**: 2012-2018.
- Constantinou, A. I., Kamath, N. and Murley, J. S. (1998) Genistein inactivates bcl-2, delays the G2/M phase of the cell cycle, and induces apoptosis of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *Eur. J. Cancer.* **34**: 1927-1934.
- Csokay, B., Prajda, N., Weber, G. and Olah, E. (1997) Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin. *Life Sci.* **60**: 2157-2163.
- Fioravanti, L., Cappelletti, V., Miodini, P., Ronchi, E., Brivio, M. and Di Fronzo, D. (1998) Genistein in the control of breast cancer cell growth: insights into the mechanism of action in vitro. *Cancer Lett.* **130**: 143-152.
- Pagliacci, M. C., Smacchia, M., Migliorati, G., Grignani, F., Riccardi, C. and Nicoletti, I. (1994) Growth-inhibitory effects of the natural phyto-genistein in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur. J. Cancer* **11**: 1675-1682.
- Shao, Z. M., Wu, J., Shen, Z.Z. and Barsky, S. H. (1998) Genistein inhibits both constitutive and EGF-stimulated invasion in ER-negative human breast carcinoma cell lines *Anti-cancer Res.* **18**: 1435-1439.
- Kang, T. B. and Liang, N. C. (1997) Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells. *Biochem. Pharmacol.* **54**: 1013-1018.
- Lepley, D. M. and Pelling, J. C. (1997) Induction of p21/WAF1 and G1 cell cycle arrest by the chemopreventive agent apigenin. *Mol. Carcinogen* **19**: 74-82.
- Bellosillo, B., Pique, M., Barragan, M., Castano, E., Vilamor, N., Colomer, D., Montserrat, E., Pons, G. and Gil, J. (1998) Aspirin and salicylate induce apoptosis and activation of caspase in B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells. *Blood* **92**: 1406-1414.
- Samaha, H. S., Kelloff, G. J., Steele, V., Rao, C. V. and Reddy, B. S. (1997) Modulation of apoptosis by sulindac, curcumin, phenyl-3-methylcaffeate, and 6-phenylhexyl isothiocyanate: apoptotic index as a biomarker in colon cancer chemoprevention and promotion. *Cancer Res.* **57**: 1301-1305.
- Budihardjo, I., H., Oliver, M., Lutter, X. and Wang, X. (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**: 269-290.
- Daniel, N. N. and Korsmeyer, S. J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell* **116**: 205-219.
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M. and Kaufmann, S. H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 383-424.
- Strasser, A., O'Connor, L. and Dixit, V. M. (2000) Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* **69**: 217-245.
- Kim, N. Y., Pae, H. O., Oh, G. S., Kang, T. H., Kim, Y. C., Rhew, H. Y. and Chung, H. T. (2001) *Pharmacol. Toxicol.* **88**: 261-266
- Ramanathan, R., Tan, C. H. and Das, N. P. (1992) Cytotoxic effects of plant polyphenols and fat-soluble vitamins on malignant human cultured cells. *Cancer Lett.* **62**: 217-214.
- Yit, C. C. and Das, N. P. (1994) Cytotoxic effects of butein on human colon adenocarcinoma cell proliferation. *Cancer Lett.* **82**: 65-72.
- Chan, S. C., Chang, Y. S., Wang, J. P., Chen, S. C. and Kuo, S. C. (1998) Three new flavonoids and antiallergic, anti-inflammatory constituents from heartwood of *Dalbergia odorifera*. *Planta Med.* **64**: 153-158.
- Cheng, Z. Y., Kuo, S. C., Chan, S. C., Ko, F. N. and Teng, C. M. (1998) Antioxidant properties of butein isolated from *Dalbergia odorifera*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1392**: 291-299.
- Wang, Y., Chan, F. L., Chen, S. and Leung, L. K. (2005) The plant polyphenol butein inhibits testosterone-induced proliferation in breast cancer cells expressing aromatase. *Life Sci.* **77**: 39-51.
- Samoszuk, M., Tan, J. and Chorn, G. (2005) The chalcone butein from *Rhus verniciflua* Stokes inhibits clonogenic growth of human breast cancer cells co-cultured with fibroblasts. *BMC Complement Altern. Med.* **5**: 1-5.
- Kang, H. M., Kim, J. H., Lee, M. Y., Son, K. H., Yang, D. C., Baek, N. I. and Kwon, B. M. (2004) Relationship between flavonoid structure and inhibition of farnesyl protein transferase. *Nat. Prod. Res.* **18**: 349-356.
- Jang, H. S., Kook, S. H., Son, Y. O., Kim, J. G., Jeon, Y. M., Jang, Y. S., Choi, K. C., Kim, J., Han, S. K., Lee, K. Y., Park, B. K., Cho, N. P. and Lee, J. C. (2005) Flavonoids purified from *Rhus verniciflua* Stokes actively inhibit cell growth and

- induce apoptosis in human osteosarcoma cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1726**: 309–316.
27. Lee, J. C., Lee, K. Y., Kim, J., Na, C. S., Jung, N. C., Chung, G. H. and Jang, Y. S. (2004) Extract from *Rhus verniciflua* Stokes is capable of inhibiting the growth of human lymphoma cells. *Food Chem. Toxicol.* **42**: 1383–1388.
28. Iwashita, K., Kobori, M., Yamaki, K. and Tsushida, T. (2000) Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**: 1813–1820.
29. Lee, S. H., Seo, G. S., Kim, H. S., Woo, S. W., Ko, G. and Sohn, D. H. (2006) 2,4,6'-Tris(methoxymethoxy) chalcone attenuates hepatic stellate cell proliferation by a heme oxygenase-dependent pathway. *Biochem. Pharmacol.* **72**: 1322–1333.

(2008년 5월 27일 접수)