

## Berberine에 의한 HepG2 세포의 사멸과정에서 활성기산소와 p38 MAP kinase의 역할에 관한 연구

현미선<sup>1</sup> · 우원홍<sup>1</sup> · 허정무<sup>2</sup> · 김동호<sup>2</sup> · 문연자<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, <sup>2</sup>한국원자력연구원 정읍방사선과학연구소

## The Role of ROS and p38 MAP kinase in Berberine-Induced Apoptosis on Human Hepatoma HepG2 Cells

Mee-Sun Hyun<sup>1</sup>, Won-Hong Woo<sup>1</sup>, Jung-Mu Hur<sup>2</sup>, Dongho Kim<sup>2</sup> and Yeun-Ja Mun<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

<sup>2</sup>Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research institute, Jeongeup 580-185, Korea

Received March 4, 2008; Accepted June 5, 2008

Berberine is an isoquinoline alkaloid used in traditional Chinese medicine and has been isolated from a variety of plants, such as *Coptis chinensis* and *Phellodendron amurense*. It has a wide spectrum of clinical applications such as in anti-tumor, anti-microbial, and anti-inflammatory activities. However, it is still unknown that berberine related with reactive oxygen species (ROS)-mediated apoptosis pathway in human hepatoma HepG2 cells. In the present study, we are examined the molecular mechanism of ROS- and p38 MAP kinase-mediated apoptosis by berberine in HepG2 cells. Berberine increased cytotoxicity effects by time- and dose-dependent manner. LD<sub>50</sub> was detected 50 μM at 48h of exposure to berberine. Nuclei cleavage and apoptotic DNA fragmentation were observed in cells treated with 50 μM of berberine for 48h. Moreover, berberine induced the activating of caspase-3, p53, p38 and Bax expression, whereas the expression of anti-apoptotic signaling pathways, Bcl-2, was decreased. Additionally, berberine-treated cells had an increased level of generation of ROS and nitric oxide (NO). These results indicated that berberine induces apoptosis of HepG2 cells may be mediated oxidative injury acts as an early and upstream change, triggers mitochondrial dysfunction, Bcl-2 and Bax modulation, p38 and p53 activation, caspase-3 activation, and consequent leading to apoptosis.

**Key words:** Apoptosis, Berberine, Hepatoma, p38 MAPK, ROS

### 서론

Apoptosis는 선택적인 세포소실을 일으키는 생리적인 과정으로 배 발생과정에 특이적으로 작용할 뿐 아니라 유해한 세포의 제거 등에 관여하여 개체의 항상성을 유지하는 중요한 조절 기구로 작용하고 있다.<sup>1,2)</sup> 세포내에서 apoptosis를 일으키는 신호 전달 경로는 mitogen-activated protein kinase(MAPK) cascade와 protease cascade에 의한 경로가 있다.<sup>3)</sup> MAPK는 여러 가지 외부자극에 의해 세포의 성장, 사멸, 분화 등에 관여하는데 extracellular signal-regulated kinase(ERK), c-Jun N-terminal kinase(JNK/SAPK), p38 kinase로 구성되어 있으며, 전사조절인자들을 인산화를 통해 여러 유전자들의 발현을 조절한다.<sup>4,5)</sup>

ERK는 특징적으로 세포의 성장 및 증식과 관련되어 다양한 성장인자에 의해 활성화되며, JNK/SAPK와 p38 MAPK는 세포사멸을 유도하는 여러 인자들(UV조사, heat shock, 그리고 염증성 사이토카인)에 의해서 활성화되는 것으로 알려져 있다.<sup>6-8)</sup> Caspase계열은 11종이 존재하고 이들은 단백질 분해효소에 의해 유도되는 분절현상 활성을 통해 최종적으로 caspase-3가 분절되어 apoptosis가 유도된다.<sup>9)</sup>

포유동물에서 apoptosis의 조절에 관여하는 유전자로서 암유발유전자(proto-oncogene)인 B cell lymphoma-2(Bcl-2)가 발견된 이후<sup>3,10)</sup> Bcl-2와 구조적으로 유사한 많은 단백질들이 밝혀져 이제는 거대한 Bcl-2 family를 구성하였다. 지금까지의 연구 결과를 바탕으로 이들 Bcl-2계열의 종류를 살펴보면, 세포의 사멸(pro-apoptotic Bcl-2 family)에 관여하는 것으로 Bad, Bax, Bid, Bik, Bim등이 보고되어 있으며, 세포의 생존(anti-apoptotic Bcl-2 family)에 관여하는 것으로 Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-wL 등이 보고되었다.

\*Corresponding author

Phone: +82-63-850-6942; Fax: +82-63-850-5195

E-mail: yjmun@wonkwang.ac.kr

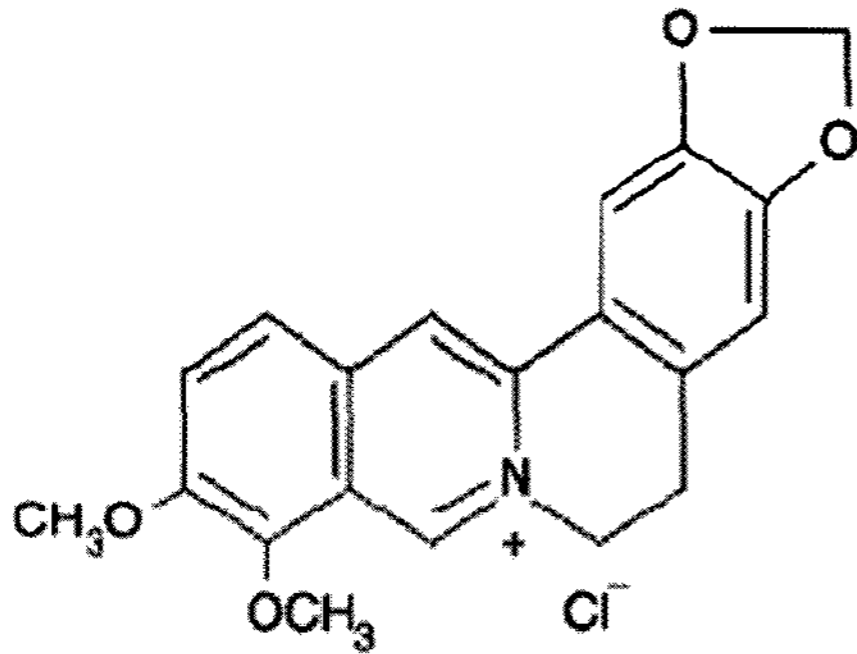


Fig. 1. Chemical structure of berberine.

Mitochondria에서 pro-apoptotic Bcl-2 family는 세포질로 cytochrom-c를 방출시켜 caspase를 활성화하고 reactive oxygen species(ROS)를 생산하여 결과적으로 apoptosis가 유도된다.<sup>9)</sup> 그러나 ROS의 관련 연구를 보면 apoptosis가 유발되는 세포에서 anti-apoptotic 효과를 나타내고 있으며<sup>11,12)</sup>, 한편으로 화학요법이나 방사선 치료 시 암세포에 apoptosis를 유발하는 인자로도 알려져 있다.<sup>9,13)</sup> ROS와 더불어 산화적 스트레스로 Nitric Oxide(NO)도 암세포에서 약물이나 방사선 치료 시 소량의 발현은 세포의 사멸을 억제하는 효과가 있으나 지속적으로 증가하면 세포의 사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다.<sup>14,15)</sup>

p53은 핵심적인 종양억제단백질로 DNA 손상시 p53 단백질이 활성화되고 세포주기는 G1단계에서 머무르며 DNA를 수선하게 되는데, 이 때 DNA의 수선이 성공적이지 않을 경우 p53 유전자의 삽입으로 wild type p53단백의 발현이 회복되면 세포 내에서 apoptosis나 세포성장이 억제된다. p53은 산화-환원에 관계된 유전인자들을 활성화하고, 이들 유전인자로부터 만들어진 생성물들이 반응성이 강한 산소를 발생하며 결국 산화과정에 의해 세포의 mitochondria 구성 물질들이 분해됨으로써 세포사멸 단계에 이르게 된다.<sup>16-18)</sup>

Berberine은 황백이나 황련에 들어있는 주된 성분으로 중의학의 오랜 역사를 가진 약재로 이용되고 있으며 항암, 항균, 항생 작용을 하는 것으로 널리 알려져 있다(Fig. 1). 또한 인간 면역 결핍바이러스억제, 항산화작용이 있으며, 여러 암세포주에서 세포증식억제와 세포독성 효과를 유발시킨다는 보고가 있다.<sup>11,12,19)</sup> 지금까지의 berberine의 항암효과에 관한 많은 연구가 진행되었는데, 특히 사람의 간암세포와 대장암세포에서 항암효과의 기전은 세포주의 진행을 정지시키고 caspase-3와 mitochondria의 Bcl-2 family에 영향을 주어 DNA와 단백질 대사에 손상을 주어 효과적으로 암세포의 증식을 억제시킨다.<sup>11,12)</sup> 최근 보고에 의하면 berberine이 간암세포에서 mitochondria를 경유한 caspase-3활성에 의한 apoptosis 기전이 보고되었다.<sup>11)</sup> 이러한 연구결과를 통하여 berberine의 여러 효과들이 많이 알려져 있으나 berberine에 의해 유도되는 apoptosis의 기전에서 ROS와 p38 MAP kinase의 관련성에 대해서는 아직 알려져 있지 않다. 이에 본 연구에서는 사람의 간암세포주인 HepG2 세포를 이용하여 berberine에 의한 세포의 사멸기전에서 ROS와 p38 MAPK의 역할을 규명하고자 하였다. 본 연구결과에 의하면 berberine에 의한 세포사멸과정에서 p38 MAPK가 세포내의

ROS와 NO의 생성을 증가시키고 생성된 ROS가 mitochondria의 Bax발현을 통해 cytochrom c를 cytosol로 방출시켜 caspase-3의 활성을 유도하는 일련의 과정을 통하여 berberine에 의해 HepG2 세포의 사멸을 유도됨을 확인하였다.

## 재료 및 방법

**시약 및 실험재료.** 실험에 필요한 RPMI 1640, 항생제, trypsin 및 fetal bovine serum(FBS)은 Gibco-BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, 배양용기(96-well plate, 24-well plate, 10 cm dish)는 Falcon(Becton Dickinson, San Jose, CA) 제품을 사용하였다. 실험에 사용된 약제 berberine (2,3-methylenedioxyprotoberberine chloride), MTT(methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl, tetrazolium bromide)는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, Bcl-2, Bax 및 caspase-3, p53, p38 등의 항체는 Santa Cruz(San Diego, CA), anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 enhanced chemiluminescence kit(ECL kit)는 Amersham(Buckinghamshire, England)에서 구입하여 사용하였다. Genomic DNA 추출에 사용한 Wizard Genomic DNA purification kit는 Promega (Medison, WI) 제품을 각각 구입하여 사용하였다.

**HepG2 세포배양.** Berberine의 세포독성을 실험하기 위해 사람 간암 세포주인 HepG2(KCLB 58065) 세포를 한국 세포주은행(서울대학교 의과대학)에서 분양 받아 사용하였다. 세포배양을 위해 10% fetal bovine serum이 함유된 RPMI1640 배양액으로 세포 배양기에서 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건으로 배양하여 본 실험의 apoptosis현상과 이에 연관된 생화학 및 분자생물학적 실험을 수행하였다.

**세포 생존율.** 세포 생존율은 세포 배양용기(24-well plate)에 HepG2 세포(2×10<sup>4</sup> cells/well)를 1 ml씩 분주하여 24시간 후, berberine을 각각의 농도별로 처리하였다. 각각의 배양세포에 배양액을 제거후 1/10 MTT 용액(5 mg/ml)을 첨가된 배지로 교체하였다. 3시간 후 배양액을 제거하고 DMSO(1 ml)를 첨가하여 세포를 용해시킨 후 ELISA reader(Molecular Devices Co., CA)를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

**DAPI 염색.** HepG2 세포(2×10<sup>4</sup>cells/well)를 6 well 배양용기에 분주하고 배양기에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 18시간 이상 배양하여 세포를 부착시킨 후, berberine을 처리하여 48시간 배양하였다. 세포를 고정하기위하여 PBS로 2회 세척 후 4% paraformaldehyde 용액으로 30분 동안 실온에서 고정하고 PBS로 3회 세척하였다. 세포의 핵은 형광염료인 DAPI(2 µg/ml)로 30분간 염색하고 PBS로 3회 세척하여 형광 현미경(Olympus X 70, Japan)으로 관찰 하였다.

**Annexin-V FITC 염색에 의한 검출.** HepG2 세포(2×10<sup>6</sup> cells/well)에 berberine(50 µM)을 처리하여 대조군과 24시간과 48시간에서 각각 apoptosis가 유발되어진 정도를 Annexin-V-FITC/PI 염색법으로 확인하였다. 세포를 PBS로 세척하고 trypsin으로 떼어낸 후 PBS로 1회 세척하였다. Binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>) 85 µl에 세포를 부유시킨 후 10 µl의 Annexin V-FITC와

5  $\mu$ M의 PI로 15분간 암반응 시켰다. Binding buffer를 300  $\mu$ l를 첨가하여 flow cytometer(Beckman FC500, CA)로 분석하였다.

**Western blotting.** HepG2 세포에 berberine을 처리하고 일정 시간 후 수거하여, PBS로 2회 세척한 후 각각의 세포에 세포 용해 완충용액(50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml aprotinin)을 첨가하여, 4°C에서 30분간 반응시키고 13,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 얻은 세포 용해액은 Bradford 방법을 이용하여 단백질정량을 하였다. 동량의 세포 용해액(단백질 200  $\mu$ g)은 2xsample buffer와 혼합하여 98°C에서 5분간 끓인 후에 SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 Nitrocellulose membrane상에 이동시켰다. Nitrocellulose membrane은 blocking buffer(5% skim milk)와 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적 항체결합을 억제시켰다. Bcl-2, Bax, p38, p53 그리고 caspase-3에 대한 항체는 PBS에 1:1,000으로 희석하여 상온에서 90분 반응 후 0.05%(v/v)의 Tween-20이 포함된 PBS(PBST)로 3회 세척 후 이차항체 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 1시간 반응시켰다. Nitrocellulose membrane은 PBST로 3회 세척 후 ECL kit(amersham, England)를 사용하여 ECL 필름에 감광시켰다.

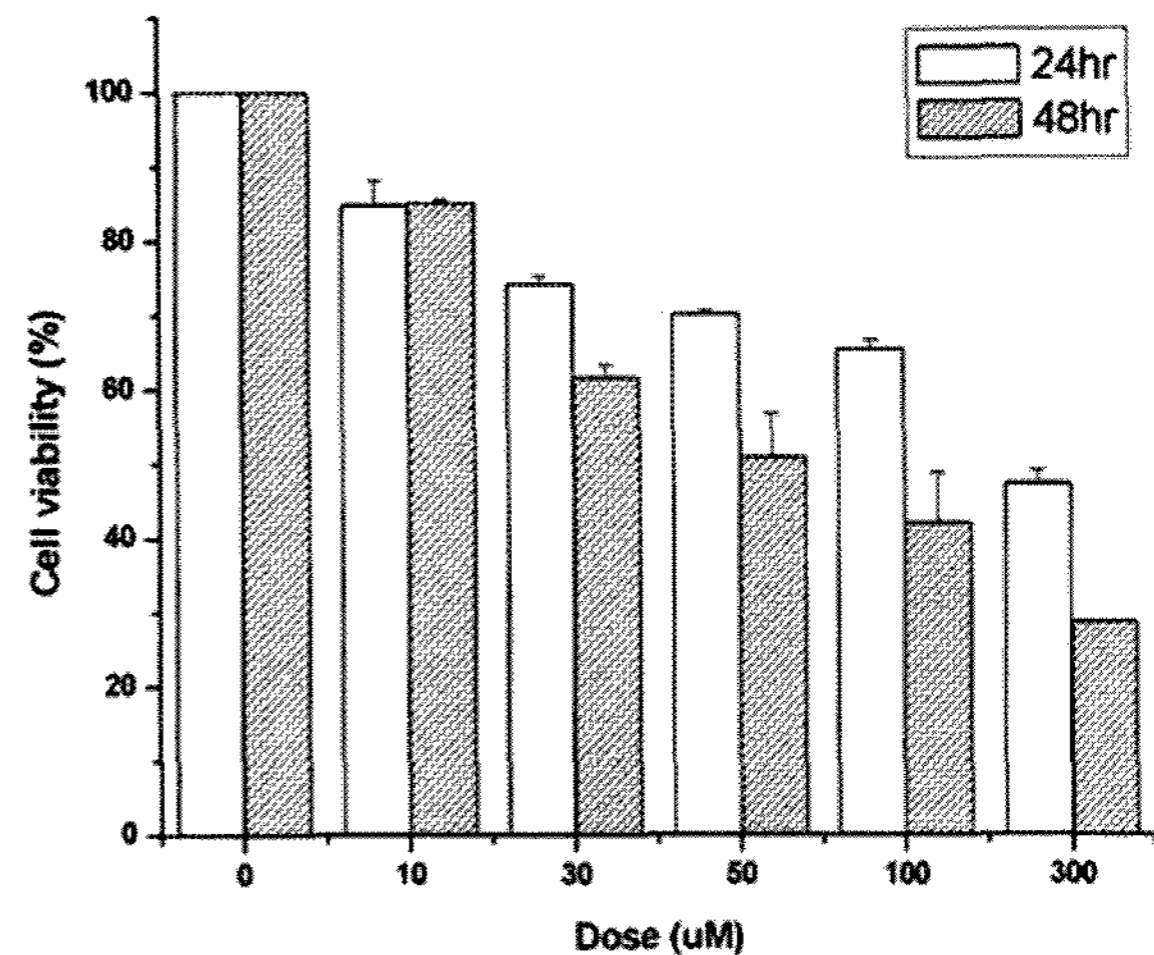
**Nitric oxide(NO) 측정.** HepG2 세포를 24 well 세포배양용기에 심고 berberine을 농도별로 처리하여 24시간과 48시간 배양한 후 배양액을 수집하여 Griess reagent법을 이용하여 배양액 내에 NO의 양을 측정하였다. 96 well 세포배양용기에 배양액 100  $\mu$ l와 Griess reagent(1% sulphanilamide와 0.1% naphthylethylethylendiamide를 포함한 5%(v/v) phosphoric acid) 100  $\mu$ l를 분주하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 sodium nitrite(sigma-Aldrich, USA)를 구입하여 작성하였다.

**Reactive oxygen species(ROS) 분석.** 세포내에 생성된 ROS는 세포내에 투과되는 비형광상태의 carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA(6-carboxy-2',7'-dichloro-dihydrofluoresceine diacetate, dicarboxymethylester)를 이용하여 측정하였다. HepG2 세포( $2 \times 10^4$  cells/well)에 berberine(50  $\mu$ M)을 처리하고 각각 24, 48시간 배양한 세포에 5  $\mu$ M의 carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA를 37°C에서 30분간 반응시킨 후 세포를 PBS로 2회 세척하였다. Trypsin으로 세포를 떼어내어 Opti-MEM 배지에 재부유 시켰다. 산화에 유발된 형광의 비율은 flow cytometer(Beckman FC500, CA)로 480-530 nm에서 측정하였다.

**통계적 분석 방법.** 모든 실험의 표시된 결과는 3번 수행하였으며, 통계분석은 mean $\pm$ S.D로 표시하였고, ANOVA에 의해 분석하였다. 통계적 유의성은  $p \leq 0.05$ 로 판정하였다.

## 결 과

**Berberine에 의한 apoptosis 유도.** 사람의 간암세포인 HepG2 세포에 시간 및 농도별로 berberine을 처리하여 MTT방법으로 세포독성을 관찰하였다. 그 결과 berberine에 의해 세포독성이 농도 의존적으로 증가하였으며, LD<sub>50</sub>값은 50  $\mu$ M처리 후 48시간에 관찰되었다(Fig. 2). Berberine에 의한 세포사멸은 Annexin



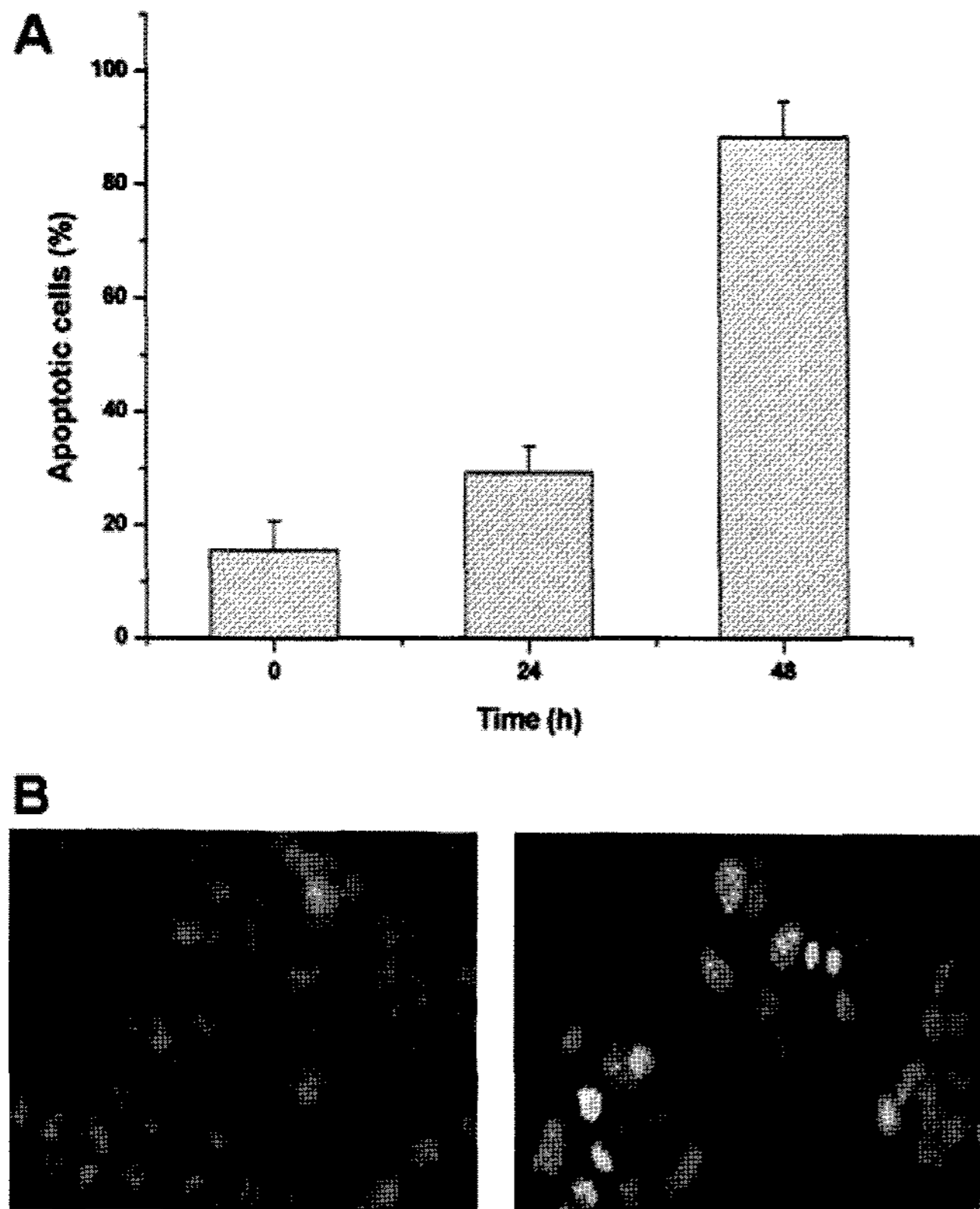
**Fig. 2. Effect of berberine on the cell viability of HepG2 cells.** HepG2 cells were treated with 0.1% medium (as control) or berberine (10-300  $\mu$ M) at 37°C for 24 and 48 h. The proportion of survival cells was measured by MTT assay. The experiments were performed in triplicate. Data presented as means $\pm$ S.D. of three independent experiments.

V-FITC/PI 염색을 이용하여 Berberine 50  $\mu$ M 농도로 24시간과 48시간 배양한 후 apoptosis의 백분율을 측정하였다. Annexin-V의 염색된 부분인 초기 apoptosis와 Annexin-V와 PI에 염색된 부분인 진행된 apoptosis의 양은 24시간과 48시간 각각 29.3%와 88.3%를 나타내었다(Fig. 3A). 또한 DAPI 염색으로 핵의 형태를 확인해 본 결과 berberine을 처리한 군에서 apoptosis의 특징인 핵의 응축과 분절이 확인되었다(Fig. 3B).

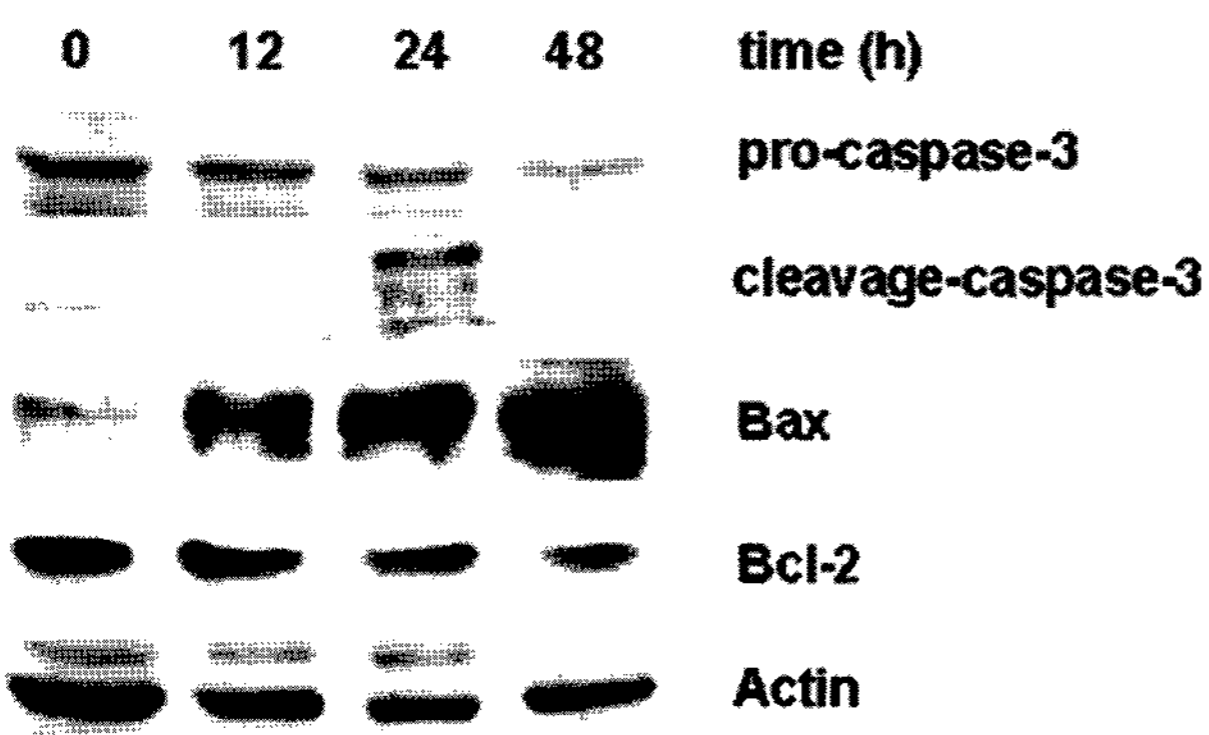
**Berberine에 의한 Bcl-2 family와 caspase-3의 발현.** Caspase는 다양한 자극에 의한 apoptosis 유도에 중요한 역할을 하는데, caspase-3의 활성화는 DNA fragmentation이 나타나는 전 단계에서 일어난다. 또한 Bcl-2 family protein은 세포의 죽음 과정을 유도하거나 억제하는 역할을 함으로써 apoptosis를 조절한다.<sup>20)</sup> 본 실험에서 berberine 처리 후 처리시간에 따른 caspase-3의 활성화와 mitochondria 계열의 Bcl-2 family에서 Bcl-2와 Bax의 발현을 확인하였다. 그 결과 caspase-3의 활성이 시간 의존적으로 유발되었으며, anti-apoptosis protein인 Bcl-2의 발현은 berberine 처리 후 시간이 지남에 따라 서서히 감소되었고, 상대적으로 Bax의 발현은 시간 의존적으로 증가하였다(Fig. 4).

**Berberine에 의한 산화적 스트레스에 의한 세포독성.** Berberine에 의한 세포의 죽음에 산화적 스트레스의 관련 여부를 확인하고자 berberine을 다양한 농도로 처리하여 48시간 배양 후 배양액 내에 생성된 NO의 양을 측정하였다. 그 결과 berberine의 농도에 비례하여 NO의 양이 증가하였다(Fig. 5A). 또한 ROS는 berberine 50  $\mu$ M 농도로 0, 24 그리고 48시간 배양한 후 H<sub>2</sub>DFF-DA로 형광 염색하여, flow cytometry assay로 측정하였다. 결과, berberine을 처리하지 않은 대조군에 비해서 berberine을 처리한 군에서 24시간에서 급격히 증가를 보였으나 48시간에서 ROS의 생성이 약간 감소하였다(Fig. 5B).

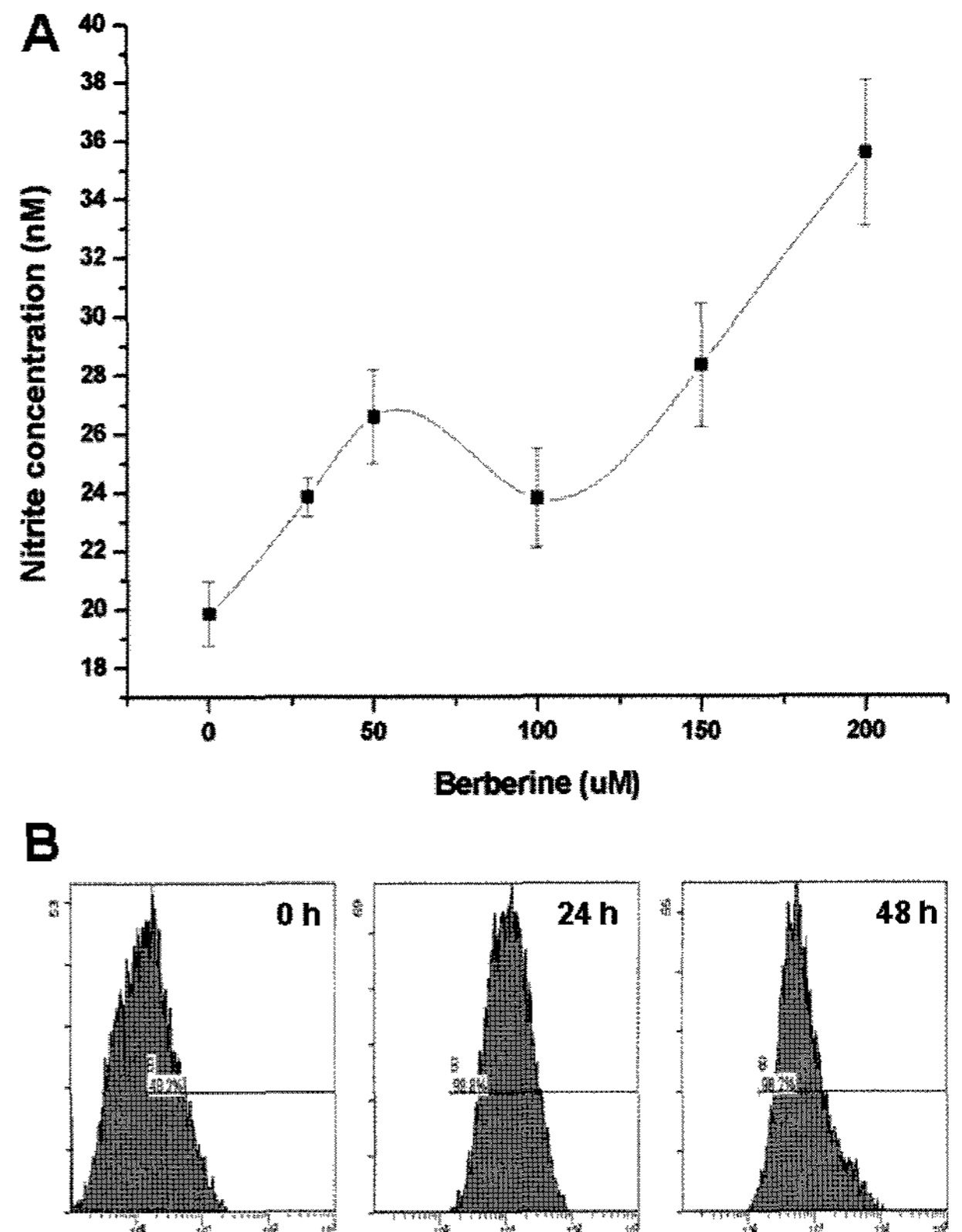
**Berberine에 의한 p53과 p38 MAPK의 활성화.** p53은 종양 억제 유전자로 외부자극에 의해 DNA 손상이 생긴 경우, 발현



**Fig. 3. Berberine induces apoptosis in HepG2 cells.** (A) Assessment of cell death by flow cytometry. Cell were treated of berberine for 48 h then harvested for analysis of apoptosis using the Annexin V-FITC/PI apoptosis cells detection kit. Total percentage of apoptotic cells in each treatment group is summarized with data represented as the mean±S.D. from two separate experiments. (B) Changes in nuclei by DAPI staining. HepG2 cells were treated with 0.1% medium (as control) or berberine (50 μM) for 48 h, and stained with DAPI. Apoptotic cells were measured under fluorescence microscopy. Apoptotic cells indicate condensed and fragmented nuclei (arrowhead). Magnification ×200. Peperentative photographs are shown from three repeated experiments.



**Fig. 4. The expression level of caspase-3 and Bcl-2 family protein by berberine.** Western immunoblot analysis of pro-caspase-3, cleavage-caspase-3, Bcl-2 and Bax expression in HepG2 cells. To define regulation of Bcl-2 and Bax expression in berberine induced HepG2 cell death, cells were treated with berberine (50 μM) for 0, 12, 24 and 48 h. The cells were harvested and analyzed by SDS-PAGE and subsequently immunoblotted with antisera against caspase-3, Bax, and Bcl-2. Actin was used as the loading control.

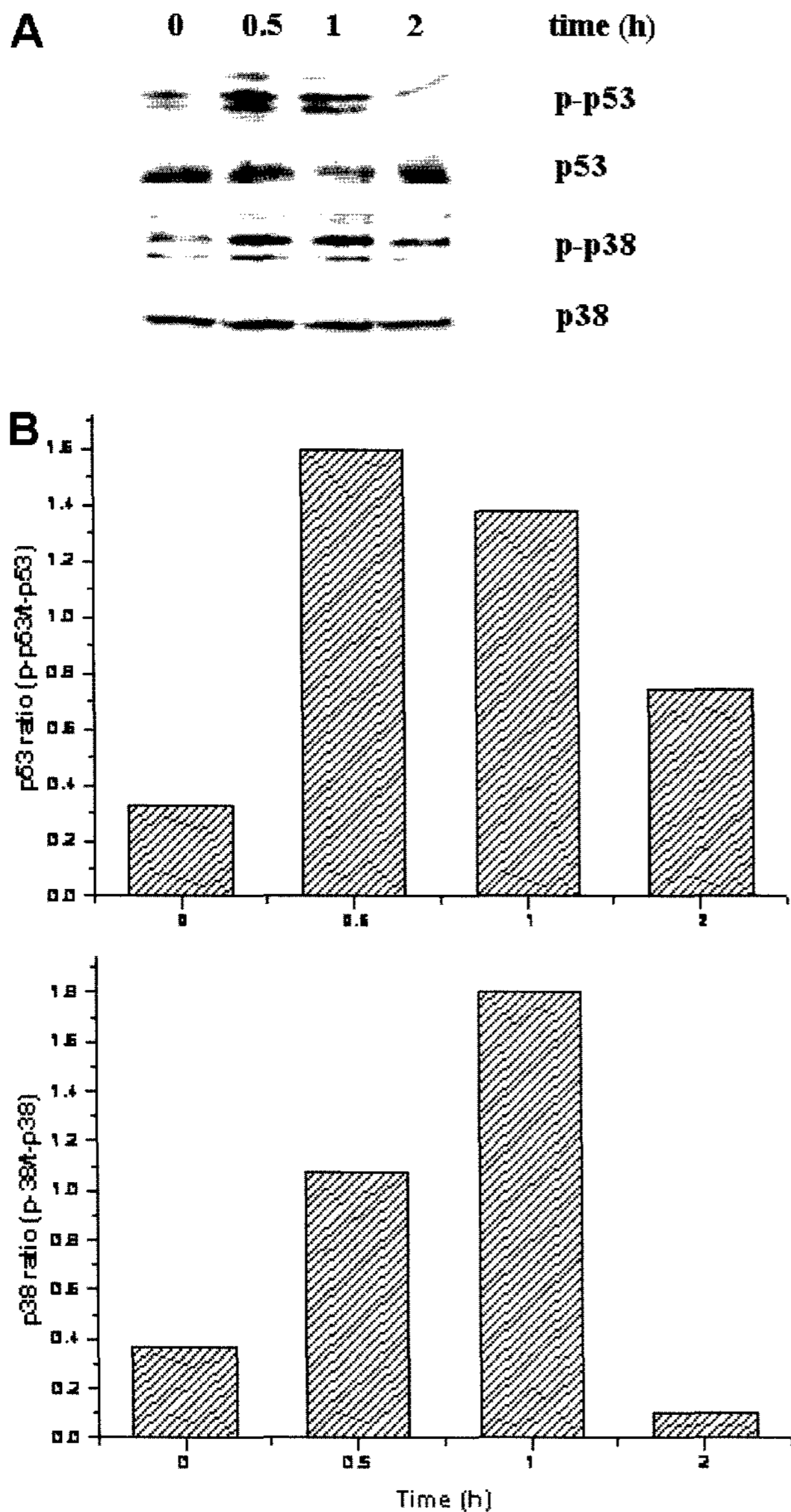


**Fig. 5. Berberine induced oxidation stress in HepG2 cells.** (A) Generation of nitric oxide following berberine treatment of HepG2 cells. HepG2 cells were treated with berberine for 48 h, and then the culture media were collected. Nitrite was measured by Griess reagent. (B) Induction of ROS production following berberine treatment of HepG2 cells. After treatment the cells were load with DCFH-DA and fluorescence was measured at 490 nm excitation and 530 nm emission using flow cytometry.

이 증가하고, 증가된 p53은 cell cycle arrest와 apoptosis의 두 가지 경로에 관여하게 된다. 본 실험의 결과, p53은 berberine 처리 후 30분에 급격히 증가하여 1시간까지 유지되었다(Fig. 6). MAPK는 세포의 증식, 분화, 그리고 세포의 생존과 세포사멸을 포함하는 다양한 생물학적 기능을 조절한다고 알려져 있다. 본 실험에서 berberine 처리 시 MAPK의 활성화 신호 경로에 대한 효과를 확인하기 위하여 MAP family인 p38 MAPK를 Western blot으로 확인하였다. 그 결과, p38 MAPK의 활성화는 berberine 처리 후 30분에 급격히 증가하여 2시간까지 유지되었다(Fig. 6).

### 고 찰

최근 암과 이와 관련된 질환들의 치료 및 예방에 한방요법이 나 천연물에서 추출한 물질을 이용한 연구가 점차 증가되고 있다. Berberine은 황련과 황백의 주성분으로 알려져 있으며, 다양한 세포에서 항암 및 항염 효과가 있는 것으로 보고되었다.<sup>11,12,19)</sup> 특히 berberine은 간암 및 대장암세포에서 항암효과 유발 시 mitochondria의 Bcl-2 계열을 통한 caspase 활성을 통해서 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다.<sup>10,12)</sup>



**Fig. 6. Berberine activated p38 and p53.** (A) The cells were treated with 50  $\mu$ M berberine an interval each 30 minutes during 2 hours. Aliquots of the total lysate containing an equivalent amount of protein were used. (B) Densitometric analyses of the levels of p53 and p38 MAPK phosphorylations represented in A.

Apoptosis를 유발시키는 신호전달 기전 중 중요한 기전은 caspase의 활성화이며<sup>11,12)</sup>, caspase는 세포질에서 pro-form으로 존재하고 특정 위치의 proteolytic 과정에 의해 활성화된다고 알려져 있다. 본 실험에서 사람의 간암세포주인 HepG2 세포에서 berberine의 항암효과를 조사한 결과 50  $\mu$ M의 berberine을 48시간 처리 시 효과적인 세포고사가 유발되었으며, 이때의 세포독성은 necrosis가 아닌 apoptosis에 의해 유도되는 것을 Annexin V 발현과 핵의 분절현상을 관찰함으로써 명확히 알 수 있었다.

Bcl-2는 암유전자로서, 다른 암유전자와는 달리 세포증식에는 관여하지 않고 세포의 생존조절, 즉 apoptosis를 억제하는 기능이 있으며, Bcl-2는 산화-환원 상태조절, 세포내 이온의 분포조절, caspase cysteine protease 활성화, mitochondria 막전위, 핵

DNA 분절화, 스트레스에 의한 apoptosis 신호전달계(JNK 및 p38)의 활성조절 등의 기능을 통해 세포를 죽음으로부터 보호한다고 알려져 있다. 반대로 Bcl-2 family에 속하는 Bax 단백질은 apoptosis를 촉진시키는 단백질이며 Bcl-2와의 hetero- 또는 homodimer를 형성함으로써 apoptosis의 조절에 깊이 관여하고 있다.<sup>20)</sup> 본 연구 결과에서도 berberine에 의해 Bcl-2의 발현이 감소되면서 상대적으로 Bax의 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 caspase-3의 활성화도 관찰되었다. 이 결과를 통해서, berberine에 의한 apoptosis는 Bcl-2와 Bax가 관여하고 있으며, 미토콘드리아를 경유하여 유발되는 것임을 알 수 있다. Apoptosis에 있어 산화적 스트레스에 의한 ROS의 역할 또한 중요한 요인으로 알려져 있다.<sup>13)</sup> 세포내의 ROS 증가는 세포의 산화적 스트레스를 증가시켜 세포의 손상을 유발시키는데 berberine이 HL-60세포에서 산화적 스트레스를 유발시켜 ROS를 증가시킨다는 보고가 있다.<sup>9)</sup> 본 실험에서도 사람의 간암세포에서 berberine에 의해 ROS가 현저하게 증가되는 것이 관찰되어 산화적 스트레스가 진행됨을 알 수 있었다. 산화적 스트레스 유발 시 NO의 발현도 나타나는데, NO의 발현은 세포의 산화적 스트레스에 대한 방어기전과 세포의 죽음을 유도하는 두 가지 기능을 가지고 있다. 본 연구에서 berberine을 처리한 군에서는 농도 의존적으로 NO의 증가가 관찰되어 이를 통해서 berberine에 의한 NO의 발현은 세포의 독성을 유발하는 것임을 알 수 있었다.

p53은 종양 억제 단백질로서 비정상적인 세포의 성장을 억제하고 세포내에서 여러 경로를 통해 조절인자로서의 역할을 하고 있다.<sup>21)</sup> 어떤 자극에 의해 세포의 DNA가 손상된 경우 p53이 활성화되는데 DNA의 손상이 적은 경우 p53은 p21 유전자를 활성화 시키고 세포주기를 정지시켜 DNA의 수복이 일어날 수 있도록 하며, 심각한 DNA손상이 생긴 경우에 p53이 전사 조절인자로서 apoptosis를 촉진하는 Bcl-2 계열 단백질인 Bax의 발현을 증가시키고 Bcl-2의 발현을 감소시킴으로써 세포의 사멸을 유도 한다.<sup>22)</sup> 본 연구에서 berberine에 의한 p53의 발현양상을 조사해 본 결과, p53은 berberine 처리 후 30분에 급격히 증가하여 1시간까지 유지되었다. 이 결과를 통해서 berberine이 p53을 활성화시키고 이를 통해 Bcl-2의 감소를 유발하여 세포주기를 정지시킴으로써 결국 세포손상을 유발하는 것을 알 수 있었다.

MAPK의 신호전달 경로에 대하여 많은 연구가 보고되었으며, p38 MAPK는 JNK, ERK와 함께 MAP kinase family를 이루는 효소로서 세포외부로부터의 자극에 대해 반응하는 신호전달과정에서 중요한 역할을 한다. p38 MAPK는 stress, heat shock, radiation 등과 같은 일련의 자극에 의해 활성화되어 염증반응, apoptosis, 세포 분화 등 다양한 생물학적 반응을 유도한다고 알려져 있다.<sup>23-26)</sup> 따라서 본 연구에서 MAPK의 family에 속한 p38의 활성도를 western blot 분석을 통하여 조사하였다. 그 결과 berberine에 의해 세포의 독성 유발 시 p38의 활성화가 증가되는 것이 관찰되었으며 이를 통해 berberine에 의한 apoptosis는 MAPK의 경로를 경유하여 유발됨을 알 수 있었다.

본 연구결과를 통하여, berberine이 사람의 간암세포에 농도 의존적으로 세포사멸을 유도하였으며 이는 apoptosis를 통한 것

임을 알 수 있었다. 특히 berberine이 p53의 발현을 통하여 Bcl-2의 발현을 감소시키고 이를 통해 세포주기의 정지를 유도하며 ROS와 NO의 생성과 p38 MAP kinase의 활성을 통한 Bax의 발현을 유도함을 알 수 있었다. 향후 berberine의 임상활용에 있어 명확한 메커니즘 규명을 위해 *in vivo*에 대한 연구도 병행하여 수행되어야 할 것으로 사료된다.

## 초 록

Berberine은 전통적인 중의약재로 이용되어지는 isoquinoline alkaloid로 황련, 황백과 같은 식물에서 주로 추출되며, 약리효과로는 항암, 항염, 항균과 같은 다양한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러나 간암세포에서 berberine의 산화적 스트레스에 의한 세포사멸기전에 대해서는 아직 밝혀진 바 없다. 따라서 본 연구는 사람의 간암세포인 HepG2 세포에서 berberine의 세포사멸기전에 reactive oxygen species(ROS)와 MAP kinase의 연관성을 조사하였다. Berberine은 HepG2 세포에서 처리 시간과 농도에 의존적으로 세포독성효과를 보였으며, LD<sub>50</sub>은 berberine(50 μM) 처리 후 48시간에서 관찰 되었고, 세포고사의 특징인 핵의 응축 및 분절, DNA의 분절이 확인되었다. 또한 berberine에 의해 caspase-3, p53, p38 그리고 Bax의 발현이 현저하게 증가된 반면, anti-apoptotic 신호기전인 Bcl-2의 발현은 감소되었다. 이와 더불어 세포 내 nitric oxide(NO)와 ROS의 생성도 증가되었다. 본 연구 결과 HepG2 세포에서 berberine은 산화적 스트레스인 ROS와 NO의 생성을 유발하고 p38 MAP kinase와 p53의 인산화를 유도하였으며 미토콘드리아에서 Bcl-2의 감소와 bax의 증가, caspase-3의 활성을 경유하여 DNA의 손상을 통한 세포고사가 이루어지는 것을 확인 하였다.

**Key words:** Apoptosis, Berberine, Hepatoma, p38 MAPK, ROS

## 참고문헌

- Mountz, J. D., Zhou, T., Wu, J., Wang, W., Su, X. and Cheng, J. (1995) Regulation of apoptosis in immune cells. *J. Clin. Immunol.* **15**, 1-16.
- Woo, M., Hakem, R., Soengas, M. S., Duncan, G. S., Shahinian, A., Kägi, D., Hakem, A., McCurrach, M., Khoo, W., Kaurman, S. A., Senaldi, G., Howard, T., Lowe, S. W. and Mak, T. W. (1998) Essential contribution of caspase 3/ CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev.* **6**, 806-819.
- Nagata, S. (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.* **256**, 83-86.
- Robinson, M. J. and Cobb, M. H. (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 180-186.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J. and Greenberg, M. E. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science.* **270**, 1326-1331.
- Kummer, J. L., Rao, P. K. and Heidenreich, K. A. (1997) Apoptosis induced by withdrawal of trophic factor is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 20490-20494.
- Chen, Y. R., Wang, X., Templeton, D., Davis, R.J. and Tan, T. H. (1996) The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J. Biol. Chem.* **271**, 31929-31936.
- Kawasaki, H., Morooka, T., Shimohama, S., Kimura, J., Hirano, T., Gotoh, Y. and Nishida, E. (1997) Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 18518-18521.
- Lin, S., Fujii, M. and Hou, D. X. (2003) Rhein induces apoptosis in HL-60 cells via reactive oxygen species-independent mitochondrial death pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* **418**, 99-107.
- Jacobson, M. D. (1996) Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 83-86.
- Hwang, J. M., Kuo, H. C., Tseng, T. H., Liu, J. Y. and Chu, C. Y. (2006) Berberine induces apoptosis through a mitochondria/caspases pathway in human hepatoma cells. *Arch. Toxicol.* **80**, 62-73.
- Jantova, S., Cipak, L. and Letasiova, S. (2007) Berberine induces apoptosis through a mitochondrial/caspase pathway in human promonocytic U937 cells. *Toxicol. In Vitro.* **21**, 25-31.
- Simbula, G., Columbano, A., Ledda-Columbano, G. M., Sanna, L., Deidda, M., Diana, A. and Pibiri, M. (2007) Increased ROS generation and p53 activation in alpha-lipoic acid-induced apoptosis of hepatoma cells. *Apoptosis.* **12**, 113-123.
- Gardner, C. R., Heck, D. E., Yang, C. S., Thomas, P. E., Zhang, X. J., DeGeorge, G. L., Laskin, J. D. and Laskin, D. L. (1998) Effects of antitumor compounds isolated from *Pteris semipinnata* L on DNA topoisomerases and cell cycle of HL-60 cells. *Hepatology.* **27**, 748-754.
- Wu, F., Wilson, J. X. and Tyml, K. (2004) Ascorbate protects against impaired arteriolar constriction in sepsis by inhibiting inducible nitric oxide synthase expression. *Free Radic. Biol. Med.* **37**, 1282-1289.
- Tyner, S. D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebranious, N., Igelmann, H., Lu, X., Soron, G., Cooper, B., Brayton, C., Park S. H., Thompson, T., Karsenty, G., Bradley, A. and Donehower, L. A. (2002) p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature.* **415**, 45-53.
- Conseiller, E., Debussche, L., Landais, D., Venot, C., Maratrat, M., Sierra, V., Tocque, B. and Bracco, L. (1998) CTS1: a p53-derived chimeric tumor suppressor gene with enhanced in vitro apoptotic properties. *Clin. Invest.* **101**, 120-127.
- Roth, J. A., Nguyen, D., Lawrence, D. D., Kemp, B. L., Carrasco, C. H., Ferson, D. Z., Hong, W. K., Komaki, R., Lee, J. J., Nesbitt, J. C., Pisters, K. M., Putnam, J. B., Schea, R., Shin, D. M., Walsh, G. L., Dolormente, M. M., Han, C. I., Martin, F. D., Yen, N., Xu, K., Stephens, L. C., McDonnell, T. J., Mukhopadhyay, T. and Cai, D. (1996) Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nat. Med.* **2**, 985-991.
- Mantena, S. K., Sharma, S. D. and Katiyar, S. K. (2006)

- Berberine inhibits growth, induces G1 arrest and apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells by regulating Cdk-cyclin cascade, disruption of mitochondrial membrane potential and cleavage of caspase 3 and PARP. *Carcinogenesis*. **27**, 2018-2027.
20. Mantena, S. K., Sharma, S. D. and Katiyar, S. K. (2006) Berberine, a natural product, induces G1-phase cell cycle arrest and caspase-3-dependent apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 296-308.
21. Hattangadi, D.K., DeMasters, G. A., Walker, T. D., Jones, K. R., Di, X., Newsham, I. F. and Gewirtz, D. A. (2004) Influence of p53 and caspase 3 activity on cell death and senescence in response to methotrexate in the breast tumor cell. *Biochem. Pharmacol.* **68**, 1699-1708.
22. Tan, J., Zhuang, L., Leong, H. S., Iyer, N. G., Liu, E. T. and Yu, Q. (2005) 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.* **65**, 9012-9020.
23. Somwar, R., Kim, D. Y., Sweeney, G., Huang, C., Niu, W., Lador, C., Ramlal, T. and Klip, A. (2001) GLUT4 translocation precedes the stimulation of glucose uptake by insulin in muscle cells: potential activation of GLUT4 via p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem. J.* **359**, 639-649.
24. Wang, X. S., Diener, K., Manthey, C. L., Wang, S., Rosenzweig, B., Bray, J., Delaney, J., Cole, C. N., Chan-Hui, P. Y., Mantlo, N., Lichenstein, H. S., Zukowski, M. and Yao, Z. (1997) Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 23668-23674.
25. Ono, K., Han, J. (2000) The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal.* **12**, 1-13.
26. Huang, Q., Wu, L. J., Tashiro, S., Onodera, S., Li, L. H. and Ikejima, T. (2005) Silymarin augments human cervical cancer HeLa cell apoptosis via p38/JNK MAPK pathways in serum-free medium. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **7**, 701-709.