

상기생과 봉독이 간암 세포주 Hep G2에 대해 미치는 항암 기전 비교

김승욱, 김보람, 허 경, 임성우
동국대학교 한의과대학 비계내과학교실

Comparative Study of Korean *Mistletoe Lectin* and *Bee Venom* on the Anti-Cancer Effect and Its Mechanisms of Action in Hepatocellular Carcinoma Cells

Sung-uk Kim, Bo-ram Kim, Kyung Heo, Seong-woo Lim
3rd Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dong-Guk University

ABSTRACT

Background and Objectives : Korean mistletoe lectin (*Viscum album coloratum* agglutinin, VCA) and bee venom (BV) have been reported to induce apoptosis in various cancer cell lines *in vitro* and to show antitumor activity against a variety of tumors in animal models. However, the comparative effect of VCA and BV on the anti-cancer effect and mechanisms of action has not been determined. In this study, the effect in a human hepatocellular carcinoma cell line, Hep G2 cells, was examined.

Methods : Cytotoxic effects of VCA and BV on Hep G2 cells were determined by 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay *in vitro*. The apoptotic cell death was then confirmed by propidium iodide staining and DNA fragmentation analysis. The mechanisms of action were examined by the expression of anti-apoptotic proteins and activation of mitogen-activated protein kinases. The involvement of kinase was examined in VCA or BV-induced apoptosis by using kinase inhibitors.

Results : VCA and BV killed Hep G2 cells in a time and dose-dependent manner. Treatment of Hep G2 cells with VCA activated poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) known as a marker of apoptosis, and mitogen-activated protein kinases signaling pathways including MAPK/ERK, p38 MAPK and JNK. BV also activated PARP-1, MAPK/ERK, and p38 MAPK but not JNK. The expression level of anti-apoptotic molecule, Bcl-X, was decreased by VCA treatment but not by BV. Finally, the phosphorylation level of ERM proteins involved in the cytoskeleton homeostasis was decreased by both stimuli. VCA-induced apoptosis was partially inhibited by in the presence of JNK and p38 inhibitor, but BV only by p38 inhibitor.

Conclusions : VCA-induced apoptosis is dependent on the activation of p38 and JNK, while BV-induced apoptosis is mediated by p38 activation in Hep G2 cells.

Key words : Mistletoe extract, Bee Venom, Hep G2 cell, Apoptosis

1. 서론

상기생의 성미와 주치는 “桑上寄生 味苦平 主腰

痛 小兒背強 癰腫 安胎 充肌膚 堅髮齒 長鬚眉 其實 明目 輕身 通神 一名寄屑 一名寓木 一名宛童 生川谷”이라 하였고, 癰腫, 金瘡, 腰膝酸痛, 筋骨痿弱, 偏枯, 脚氣, 風寒濕痺, 胎漏, 血崩, 産後乳汁不下 등에 사용한다고 알려져 있다¹. 현재 연구로 밝혀진 상기생의 효능은, 그 추출물의 면역 조절 효과

· 교신저자: 임성우 경기도 고양시 일산동구 식사동 814
동국대학교 일산한방병원 한방내과
TEL: 031-961-9043
E-mail: omdlsw@naver.com

로 악성림프종, 다발성 골수종, 백혈병과 같은 악성 종양의 치료, 악성 종양의 일차 치료 후 재발을 방지할 목적, 자궁경부 상피내 종양, 만성 B형 간염, C형 간염과 같은 전암 병변, 장의 용종 치료, 일차성 골수 질환 및 치료 후 골수 억제 환자의 치료, 말기 환자의 치료 등을 보고하고 있으며^{2,3}, 최근에는 상기생의 항암 효과에 대한 실험은 apoptosis의 유도 및 유발효과, 면역 강화 기능으로 종양 억제 효과 등이 보고되었다⁴⁻⁷. 봉독은 오래전부터 인체의 질병 치료에 사용하였으며, 봉독의 생화학적 성분 및 약리작용과 기전⁸⁻¹⁰, 과민성과 독성¹¹ 등의 연구가 활발하게 진행되어 왔다. 봉독의 효능에 관하여 진통¹², 면역 기능 증강 작용¹³, 항암 효과^{14,15} 등의 국내 보고가 있고, 외국에서는 면역요법¹⁶, 단순포진¹⁷, 다발성 경화증¹⁸, 종양¹⁹ 등의 질병 치료 등에 대한 연구가 보고되었다. 저자는 최근 항암 효과와 관련한 유사한 연구가 이루어지고 있는 상기생과 봉독의 종양면역 기전을 연구하여 항암 치료의 가능성을 넓히기 위해, 상기생과 봉독이 간암 세포주인 Hep G2의 apoptosis 유도에 영향을 주는지 비교 검토한바 유의한 결과와 차이점을 얻었기에 보고하고자 한다.

II. 실험

1. 재 료

1) 상기생

상기생 (*Viscum album var. coloratum*)은 청운당 농산 (경남, 대한민국)에서 구입하여 정선 한 후 270g을 분쇄한 후 3차 증류수 1L에 혼합하여 4°C에서 48시간 동안 추출하여 여과하고 원심분리하여 (15000mg, 10min, 4°C) 깨끗한 상층액만을 얻는다. 상층액은 96시간 동안 동결건조 (Ilshin, Korea) 후 2.5g의 상기생 분말을 얻고 분말은 3차 증류수에 녹인 후, 0.2 μ m-syringe filter (Sartorius-stedim biotech, Germany)로 여과 후 실험 전까지 -80°C에 보관하였다.

2) 봉 독

봉독 (*Apis mellifera ligustica*)은 Sigma (USA)사의 lyophilized bee venom powder를 1g을 200ml의 증류수에 녹여 사용하였다.

2. 방 법

1) 세포주와 세포배양

사용한 hepatoma cell line, Hep G2 세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD)에서 구입하였고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Invitrogen, USA)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen, USA)을 사용하여 배양하였다. 오염 방지를 위해 항생제로 100 unit/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin (Gibco/BRL, USA)을 첨가하였다. Trypsin-EDTA (Gibco/BRL, USA)를 처리하여 계대 배양하였고 배지는 2-3일마다 교환하여 주었다.

2) 세포 활성도 측정 (MTT assay)

MTT {tetrazolium3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma} assay는, MTT formazan의 흡광도가 580nm의 파장에서 최대가 되어, 이 파장에서 측정된 흡광도가 살아있고 대사가 왕성한 세포의 산화환원력을 반영한 Sladowski의 방법을 따라 행하였다².

MTT assay는 먼저 12 well plate에 Hep G2 세포 (5x10³cells/well)를 16시간 배양한 후 여러 농도의 상기생 추출액을 첨가하여 24시간 동안 배양하여 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma) 2 mg/ml를 넣고, incubator에서 4시간 배양한 후 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)로 용해시켜 580nm의 파장에서 microplate reader (Molecular devices, USA)로 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 계산하였다.

세포 생존율 (Cell Viability, %)은, 정상군의 값을 control로 하고 이때의 O.D. 값을 세포의 생존도가 100% 라고 정의하고, 나머지 군의 측정된 O.D. 값을 상대치로 환산하여 값을 얻었다.

즉, Cell Viability = (실험군 값 / 대조군 값) × 100 이다.

3) 억제 약물 처리

단백질 활성 억제제인 p38 MAPK inhibitor (SB203580), MAPK inhibitor (PD98059), JNK inhibitor (SP600125) (Calbiochem, USA)는 상기생 추출액과 봉독을 처리하기 30분 전에, 미리 전 처리한 후, 24시간뒤 세포 생존율을 MTT assay 법으로 시행하였다.

4) Western blot 분석법

모든 세포 용해질들은 표본 완충제 (62.5 mmol/l Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol) 내의 boiling cell에 의해 만들어졌다. 단백질 정량은 bicinchoninic acid (BCA, Pierce)법을 사용하였다. 정량된 단백질 시료 50µg 은 4-12% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gradient gel (Invitrogen) 전기 영동법 (SDS-PAGE)으로 분리되었고, nitrocellulose paper (Amersham)로 옮겼다. 단백질을 옮겨진 막을 Ponceau-S로 염색하여 단백질이 완전하게 옮겨졌는지 확인하고, 0.1% Tween 20을 포함하는 Tris-buffered saline (TBS-T)로 씻은 후 5% 탈지분유 액으로 30분 이상 blocking 하였다. 항 인산화 p38 (p-p38), p38, 항 인산화 MAPK (p-MAPK), MAPK, 항 인산화 ERM (p-ERM), moesin, 항 인산화 JNK (p-JNK), JNK 항체, PARP-1, Bcl-x, actin (Cell signaling tech., USA)과 함께 4°C에서 16시간 동안 반응시킨 후 막을 TBS-T에서 10분씩 3회 세척한 후 blot을 2차 항체와 함께 1시간 동안 반응시켰다. 2차 항체 반응 뒤 막을 씻고 enhanced chemiluminescence system (ECL, Pierce)으로 원하는 단백질을 가시화 하였다. 단백질의 가시화 및 정량 분석은 image 장비 (LAS-3000, Fuji)를 이용하였다.

5) DNA fragmentation

Hep G2 세포 (5x10⁵cells)에 10 µg/ml의 봉독과 50 µg/ml의 상기생 처리한 후 16시간과 24시간에 각각 세포를 회수하여 800 rpm에서 5분간 원심분리한 후 10mM Tris (pH 7.4), 10mM EDTA (pH

8.0), 0.5% Triton X-100 등이 들어간 완충액으로 부유시킨 후 4°C에서 30분간 반응시킨다. 여기에 20 mg/l의 RNase A와 20 mg/l의 proteinase K를 넣고 37°C에서 1시간 더 반응시키고 난 후 원심분리하여 genomic DNA를 얻는다. 여기에 TE buffer (10mM Tris (pH7.4), 10mM EDTA (pH 8.0))를 넣어 DNA를 녹이고 1% agarose gel containing SYBR green에 전기영동하여 밴드를 확인하였다.

6) FACS (Fluorescence activated cell sorter) 분석

Hep G2 세포 (2x10⁶cells)에 10 µg/ml의 봉독과 50 µg/ml의 상기생을 처리한 후 24시간에 각각 세포를 회수하여 cold PBS로 두 번 씻어준 후 70% cold ethanol로 상온에서 30분간 세포를 고정시킨다. 그 후에 RNA를 제거하기 위해 0.05 mg/ml의 RNase A를 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 시료에 50 µg/ml의 Propidium iodide (PI)를 넣고 어두운 곳에서 30분간 반응시킨다. DNA 분석은 ELITE ESP flow cytometer (Beckman-Coulter Inc., USA)를 사용하였다.

7) Data 분석 및 통계처리

모든 측정값은 평균값 표준오차 (mean±S.E.)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 Windows 용 SPSS Program ver 12.0.1 의 one-way ANOVA를 시행하였으며, 사후 검증은 Tukey test를 통해 검증하였다. 전체 실험의 통계적인 유의성은 p값이 0.05이하인 경우에 유의한 것으로 인정하였다.

III. 성 적

1. 상기생 (VCA)이 간암 세포 생존율에 미치는 영향
 상기생이 간암 세포 생존율에 미치는 영향을 조사하기 위해 간암 세포에 추출한 상기생을 농도별로 처리한 후 24시간과 48시간 후에 세포 생존율을 MTT assay 법으로 관찰하였다. 24시간 경과 후에 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml 농도에서 세포활성도가 각각 67.4%, 61.9%, 51.8%, 36.9%, 24.7%로 저하되었고, 48시간 경과

후에 각각 39.8%, 33.5%, 20.4%, 10.4%, 6.7%로 저하되었다(Fig. 1).

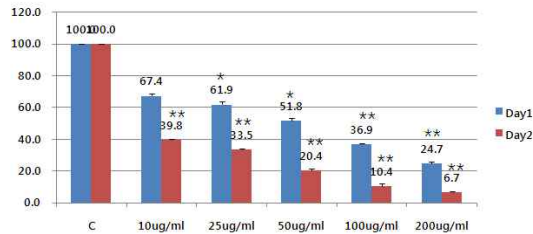


Fig. 1. Dose dependent cytotoxicity effect of VCA in Hep G2 cells.

Hep G2 cells were exposed to different concentration of 10-200 $\mu\text{g/ml}$ of VCA. Cell viability was measured by MTT assay at 24 h and 48 h after VCA addition. Data, expressed as percentage of control (C), are the mean \pm S.E. of three separate experiments. * $p < 0.05$ vs control, ** $p < 0.01$ vs control

2. 봉독 (BV)이 간암 세포 생존율에 미치는 영향

봉독을 농도별로 간암 세포에 처리한 후 24시간과 48시간 후에 세포의 생존율에 미치는 효과를 MTT assay 법으로 관찰하였다. 아래와 같이 24시간 경과후에 5 $\mu\text{g/ml}$, 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 세포활성도가 각각 69.1%, 41.1%로 저하되었고, 48시간 경과 후에 각각 68.3%, 30.0%로 저하되었다(Fig. 2).

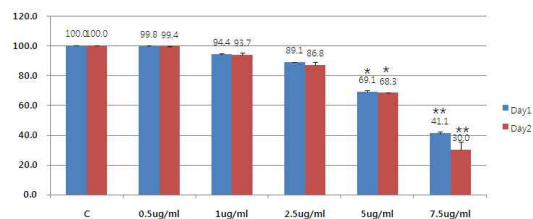


Fig. 2. Dose dependent cytotoxicity effect of BV in Hep G2 cells.

Hep G2 cells were exposed to different concentration of 0.5-7.5 $\mu\text{g/ml}$ of BV. Cell viability was measured by MTT assay at 24 h and 48 h after BV addition. Data, expressed as percentage of control (C), are the mean \pm S.E. of three separate experiments. * $p < 0.05$ vs control, ** $p < 0.01$ vs control

3. 상기생과 봉독의 간암 세포 사멸 기전 연구

1) DNA fragmentation

상기생과 봉독의 간암 세포 사멸이 apoptosis를 통해 이루어지는지를 관찰하기 위해 핵 내의 chromosome DNA가 잘려지는지 전기영동을 통해 관찰하였다. 봉독과 상기생에 의해 16시간과 24시간에 chromosome DNA가 사다리 모양으로 잘려진 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

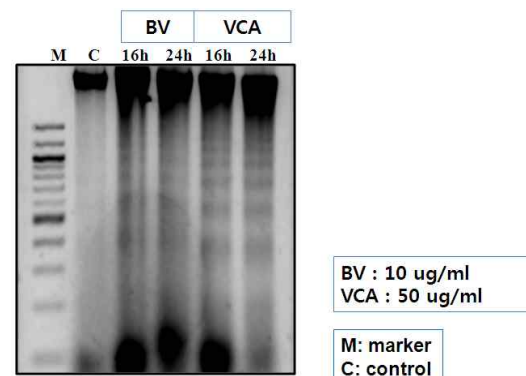


Fig. 3. Electrophoretic analysis of genomic DNA of Hep G2 cells treated with VCA (50 $\mu\text{g/ml}$) and BV (10 $\mu\text{g/ml}$).

Cells were incubated for 16 and 24 h with or without VCA and BV. The genomic DNA was analysed by electrophoresis on a 1% agarose gel containing SYBR green.

2) PARP-1 발현

상기생과 봉독이 세포 사멸을 유도할 때 핵이 잘려지는 것을 전기영동을 통해서 관찰하였는데, 이때 PARP-1이 활성화되는지를 Western blot으로 확인하였다. 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 상기생과 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 봉독을 Hep G2 세포에 처리한 후 Western blot 분석으로 PARP-1의 활성도를 측정할 결과 대조군에 비해 실험군의 Hep G2 세포의 PARP-1의 활성도가 시간이 경과할수록 증가하였다(Fig. 4).

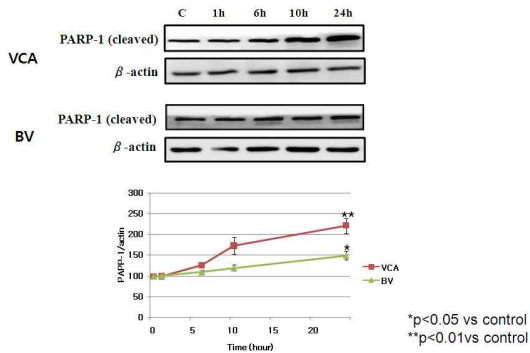


Fig. 4. Effect of VCA and BV on the expression of cleaved PARP-1 in Hep G2 cells. Hep G2 cells treated with VCA (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and BV (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for the indicated time.

After that, whole cell lysates were electrophoresed in SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-cleaved PARP-1 or actin antibody. The intensity of cleaved PARP-1 and actin bands were quantitated by densitometric analysis, and the amounts of cleaved PARP-1 were normalized versus actin. The data represent the means \pm S.E. of three independent experiments. C: Unstimulated cells.

3) Bcl-x 발현

상기생과 봉독이 세포 사멸을 유도할 때 Bcl-x의 발현 양을 Western blot으로 확인하였다. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 상기생과 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 봉독을 Hep G2 세포에 처리한 후 Western blot 분석으로 Bcl-x의 발현 양을 측정된 결과 상기생으로 처리된 Hep G2 세포에서는 Bcl-x의 발현 양이 6시간 이후부터 유의하게 줄기 시작해서 24시간까지 지속적으로 그 양이 줄어들었다. 그러나 봉독으로 처리된 Hep G2 세포에서는 유의성 있는 Bcl-x의 발현 양의 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 5).

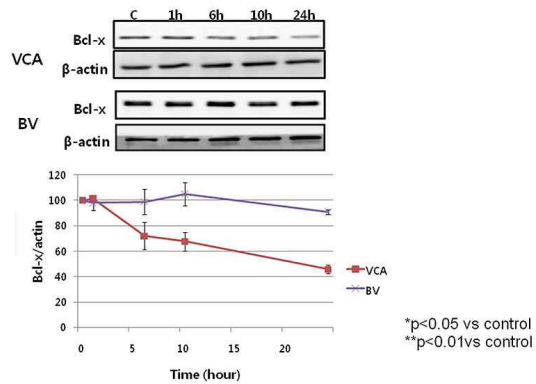


Fig. 5. Effect of VCA on the expression of Bcl-x in Hep G2 cells. Hep G2 cells treated with VCA (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and BV (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for the indicated time.

After that, whole cell lysates were electrophoresed in SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-Bcl-x or actin antibody. The intensity of Bcl-x and actin bands were quantitated by densitometric analysis, and the amounts of Bcl-x were normalized versus actin. The data represent the means \pm S.E. of three independent experiments. C: Unstimulated cells.

4) FACS analysis

상기생과 봉독 처리 후 9시간 후에 세포를 고정하고 핵을 염색하여 세포 주기별 분포를 flow cytometer를 이용하여 관찰하였다. 상기생으로 처리한 후의 G0/G1 phase는 62.3 \pm 2.3, 봉독으로 처리한 후의 G0/G1 phase는 52.1 \pm 4.8으로 증가하였으며, 상기생으로 처리한 후의 S phase는 7.2 \pm 1.1, 봉독으로 처리한 후의 S phase는 10.5 \pm 2.9로 감소하였다(Table 1, Fig. 6).

Table 1. Effect of VCA and BV on the cell cycle of Hep G2 cells

	G0/G1	G2/M	S
Control	36.7 \pm 3.1	21.4 \pm 4.2	13.8 \pm 2.6
VCA	62.3 \pm 2.3*	19.1 \pm 2.4	7.2 \pm 1.1*
BV	52.1 \pm 4.8*	28.6 \pm 1.6	10.5 \pm 2.9*

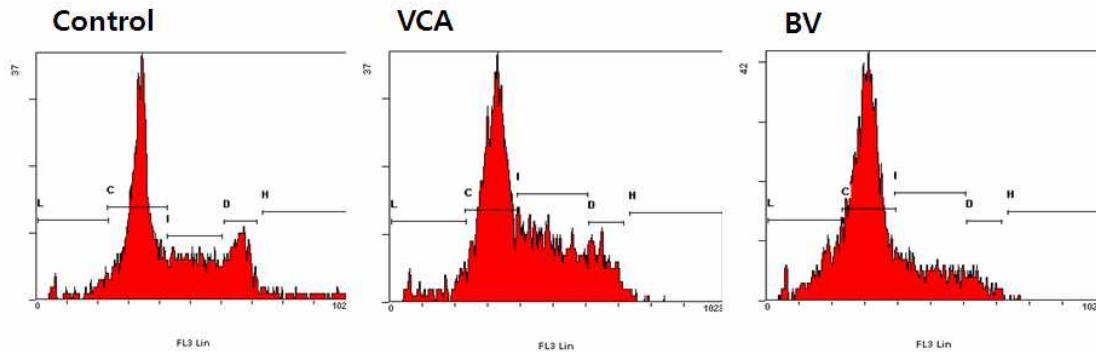


Fig. 6. Effect of VCA and BV on the cell cycle of Hep G2 cells.

Hep G2 cells treated with VCA (50 $\mu\text{g/ml}$) and BV (10 $\mu\text{g/ml}$) for 9 h and then fixed and stained with PI.
* $p < 0.05$ vs control.

5) MAPK family의 활성화

상기생과 봉독이 간암 세포를 어떤 기전으로 사멸시키는가를 확인하기 위해 세포가 스트레스를 받거나 사멸시 활성이 증가된다고 보고된 단백질 중 MAPK family 로 MAPK/ERK, p38 MAPK, JNK의 활성을 인산화 특이 항체를 이용하여 관찰하였다. 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 상기생과 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 봉독을 Hep G2 세포에 처리한 후 인산화 특이 항체를 이용하여 Western blot 분석으로 ERK의 활성도를 측정된 결과 상기생으로 처리한 후 6시간 이후부터 Hep G2 세포의 ERK 인산화가 대조군에 비해 3배 이상 증가하기 시작하여 24시간까지 지속되었다. 이에 반해 봉독으로 처리한 경우에는 1시간 후에 ERK의 인산화가 2배 정도 증가하였다가 6시간 후에는 대조군 수준으로 되돌아왔다 (Fig. 7).

50 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 상기생과 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 봉독을 Hep G2 세포에 처리한 후 인산화 특이 항체를 이용하여 Western blot 분석으로 p38의 활성도를 측정된 결과 상기생으로 처리한 후 6시간 이후부터 Hep G2 세포의 p38 인산화가 대조군에 비해 3배 이상 증가하기 시작하여 24시간까지 지속되었다. 이에 반해 봉독으로 처리한 경우에는 1시간 후에 p38의 인산화가 2배 정도 증가하였다가 6시간

후에는 대조군 수준으로 되돌아왔다 (Fig. 8).

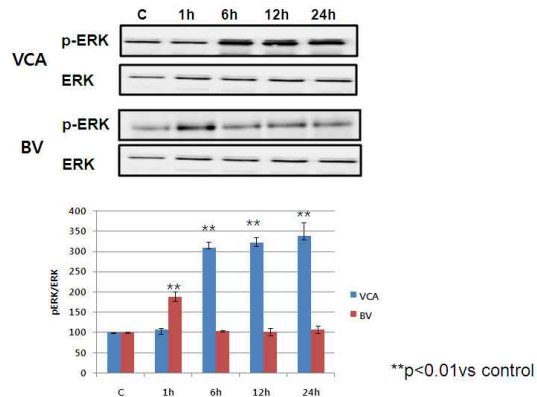


Fig. 7. VCA and BV induces ERK phosphorylation in Hep G2 cells.

Hep G2 cells were seeded in 6 well plates and were stimulated with 50 $\mu\text{g/ml}$ of VCA and 10 $\mu\text{g/ml}$ of BV for 1, 6, 12, or 24 h. After that, whole cell lysates were electrophoresed in SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-p-ERK or ERK antibody. The intensity of phosphorylation and total ERK bands were quantitated by densitometric analysis, and the amounts of phosphorylated ERK were normalized versus total ERK. The data represent the means \pm S.E. of three independent experiments. C: Unstimulated cells.

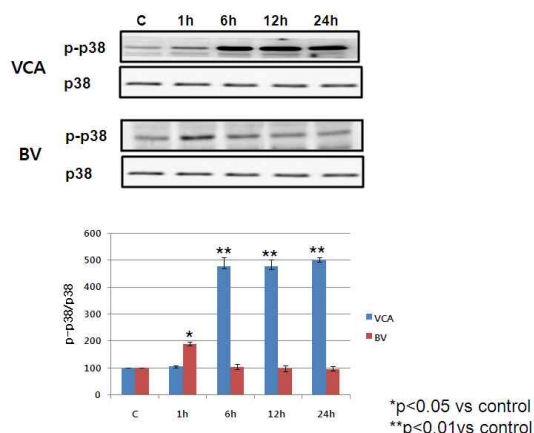


Fig. 8. VCA and BV induces p38 phosphorylation in Hep G2 cells.

Hep G2 cells were seeded in 6 well plates and were stimulated with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of VCA and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of BV for 1, 6, 12, or 24 h. After that, whole cell lysates were electrophoresed in SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-p-p38 or p38 antibody. The intensity of phosphorylation and total p38 bands were quantitated by densitometric analysis, and the amounts of phosphorylated p38 were normalized versus total p38. The data represent the means \pm S.E. of three independent experiments. C: Unstimulated cells.

50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 상기생과 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 봉독을 Hep G2 세포에 처리한 후 인산화 특이 항체를 이용하여 Western blot 분석으로 JNK의 활성도를 측정 한 결과 상기생으로 처리한 후 6시간 이후부터 Hep G2 세포의 JNK 인산화가 대조군에 비해 3배 이상 증가하기 시작하여 24시간까지 지속되었다. 이에 반해 봉독에서 JNK의 활성은 관찰되지 않았다(Fig. 9).

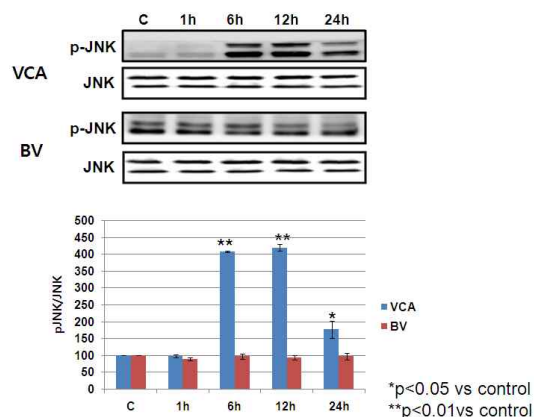


Fig. 9. VCA induces JNK phosphorylation in Hep G2 cells.

Hep G2 cells were seeded in 6 well plates and were stimulated with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of VCA 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of BV for 1, 6, 12, or 24 h. After that, whole cell lysates were electrophoresed in SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-p-JNK or JNK antibody. The intensity of phosphorylation and total JNK bands were quantitated by densitometric analysis, and the amounts of phosphorylated JNK were normalized versus total JNK. The data represent the means \pm S.E. of three independent experiments. C: Unstimulated cells.

6) ERM proteins family의 활성화

세포사멸에 관련된 또 다른 단백질로 세포 골격에 영향을 미치는 것으로 알려진 ERM 단백질의 활성 정도를 Western blot으로 시행하였다. 상기생에 의한 ERM 단백질의 인산화는 24시간 후에 감소하였다. 그러나 봉독에서는 그 보다 앞서서 6시간 이후부터 감소하기 시작하여 24시간까지 지속적으로 감소하였다(Fig. 10).

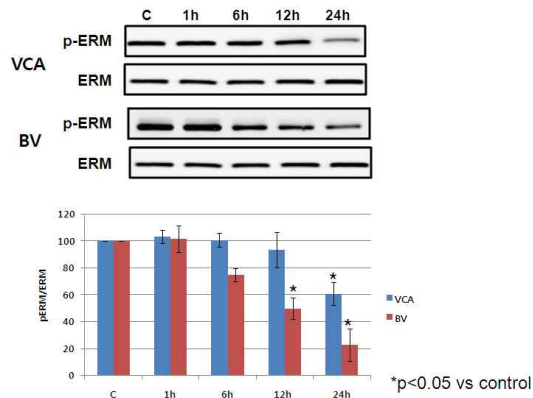


Fig. 10. VCA and BV induces ERM proteins phosphorylation in Hep G2 cells.

Hep G2 cells were seeded in 6 well plates and were stimulated with 50 μg/ml of VCA and 10 μg/ml of BV for 1, 6, 12, or 24 h. After that, whole cell lysates were electrophoresed in SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-p-ERM or ERM antibody. The intensity of phosphorylation and total ERM bands were quantitated by densitometric analysis, and the amounts of phosphorylated ERM were normalized versus total ERM. The data represent the means ± S.E. of three independent experiments. C: Unstimulated cells.

7) 세포 사멸 신호전달 체계 규명

상기생과 봉독에 의한 세포 사멸의 신호전달 경로를 밝히고자 세포가 스트레스를 받거나 사멸시에 활성화 된다고 알려진 단백질 중 JNK, p38, ERK의 활성 억제제를 이용하였다. 이러한 억제제를 세포에 미리 투여한 후 상기생과 봉독을 처리하여 세포가 사멸되는지를 24시간 후에 MTT assay 법을 시행하였다. 상기생에 의한 세포 사멸은 JNK와 p38 억제제에 의해 부분적으로 억제되었다. 봉독의 세포 사멸 효과는 p38 억제제에 의해서만 부분적으로 억제되었다(Fig. 11, 12).

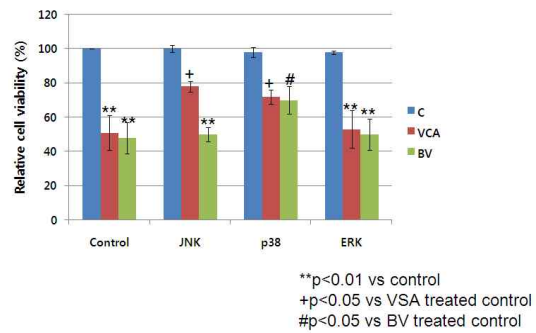


Fig. 11. MAPK family activation involved in the VCA and BV-induced cytotoxicity effect in Hep G2 cells.

Hep G2 cells were pre-treated with 15 uM JNK, p38 or ERK inhibitor, SP600125, SB203580 or PD98059, respectively for 30 min before the addition of 50 μg/ml of VCA and 10 μg/ml of BV. Cell viability was measured by MTT assay at 24 h after addition. Data, expressed as percentage of control (Con), are the mean ± S.E. of three separate experiments.

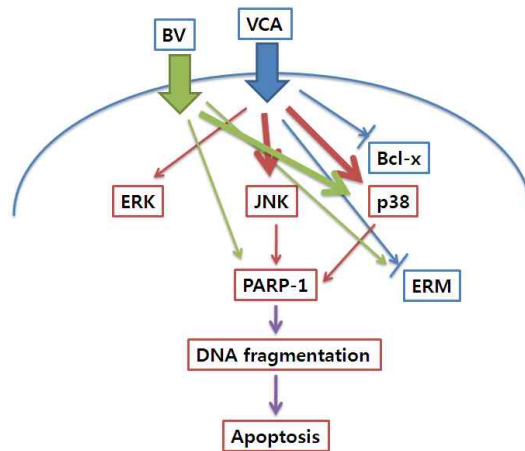


Fig. 12. Signaling pathway activated by VCA and BV treatment in Hep G2 cells.

IV. 고찰

전 세계적으로 암의 치료에 대한 수많은 연구가 진행되고 있고, 한의학에서도 단미 한약제와 처방

을 중심으로 항암에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다²⁰.

상기생과 봉독은 최근 면역 기능 조절과 항암 효과에 대한 다양한 연구가 이루어지고 있는데, 상기생의 항암 효과에 대한 연구로는 박 등⁵의 lectin-II 성분이 사람의 골수성 백혈병 세포인 U937 cells에 대해 apoptosis를 유발 보고, Stoss M 등⁶의 *Viscum album* L.에서 추출한 면역 조절 물질의 암과 AIDS에 대한 길항 효과 보고, Fischer S 등⁷은 상기생 추출물의 처리에 의하여 CD4+의 T 림프구의 조절이 민감하게 반응한다고 하였다.

이와 같은 연구에 기초하여, 상기생 추출물의 항암 치료는 단독으로 혹은 보조적으로 사용되고 있으며, 기존 요법의 치료 효과를 증진시키거나 부작용을 감소시켜 임상적으로 종양의 성장 억제와 환자의 생존율의 증가에 기여한다고 한다²¹. 또한 면역계에 대한 비특이적인 자극을 통하여 악성 종양에 대한 저항을 증가시켜 세포 독성과 면역 조절 기능을 갖고²² 상기생 추출물은 세포 독성 작용을 하는 A-chain과 탄수화물과 결합하는 B-chain으로 구성되어 있으며 이들의 상호 작용에 의해 세포사를 유도한다.

봉독의 항암 효과에 대한 연구로는 권 등¹³이 봉독 성분 약침을 이용하여 면역학적 항암 효과를 연구 발표하였고, 박 등^{14,15}이 봉독 성분 전체를 이용해서 DNA 합성에 관련된 세포 분열 억제 및 apoptosis 유발과 각각에 관련된 유전자의 변화를 관찰해 항암 효과를 연구발표 하였다.

하지만 항암 치료에 사용되고 있는 상기생과 달리 봉독은 아직 임상적으로 항암 치료에 다용되는 약물은 아니다.

항암 유도 효과와 관련한 apoptosis는 발생 및 분화 과정뿐만 아니라 세포 손상 및 감염, 방사선, 약물에 의해서도 나타날 수 있는 과정으로 일종의 프로그램화 된 세포사멸을 유도한다. 따라서 주위 조직에 부작용 없이 apoptosis가 일어나는 세포만 제거되어 조직의 항상성을 유지하는데 중요한 작

용을 한다²³.

Apoptosis 과정에는 여러 종류의 단백질 및 효소, 유전자 등의 발현 및 이들의 상호 작용이 나타나게 되며, 많은 악성 종양의 경우에 apoptosis의 감소 현상이 나타나게 되는데, 연구에 의하면 모든 항암제가 암세포에 apoptosis를 유발한다고 하였고²⁴, 동물 실험에서 apoptosis 유도 물질, 또는 항체의 투여 후 세포사의 시작은 결국 종양 세포를 감소시키는 것으로 알려졌다^{25,26}.

Apoptosis에 관련되어 세포의 증식, 분화, 사멸 등 다양한 기능을 담당하는 MAPK (mitogen-activated protein kinase)는 세포 외 자극을 세포막에서부터 세포내 핵까지 전달하는 대표적인 신경 전달 경로로 성장호르몬, 사이토카인, 스트레스 등의 수용체로부터 활성화된 신호를 세포 내로 전달한다. MAPK는 크게 ERK (세포의 신호활성 효소), JNK (c-JUN N-terminal 활성화효소), p38 MAPK로 분류할 수 있고²⁷, ERK (ERK1/2)는 성장호르몬의 신호 전달에 주로 관여하며 세포의 증식 및 분화에 중추적인 역할을 담당하며, 스트레스 활성화 효소로 분류되는 p38 MAPK와 JNK는 세포 외부의 스트레스성 자극에 의해 활성화되며, 염증 반응, 세포 사멸 등을 매개하는 것으로 알려져 있다²⁸.

저자는 최근 종양 치료에 사용하는 상기생과 봉독의 항암 기전을 비교하고자 간암 세포주 Hep G2에 상기생과 봉독을 투여한 후 MTT assay 법을 이용한 농도별, 시간별에 따른 각각의 세포 활동도와 세포 생존 및 사멸에 관여하는 단백질의 활성화 정도를 측정하였다.

본 실험에서 MTT assay 법에 의한 세포의 생존율을 보았을 때, 상기생과 봉독이 Hep G2 세포의 생존율을 농도 의존적으로 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 두 물질의 항암 효과를 비교해 보면, 상기생으로 처리한 Hep G2 세포는 24시간 뒤 48시간까지 지속적으로 생존율이 감소하였으나 봉독으로 처리한 Hep G2 세포는 24시간 후의 생존율과 48시간 후의 생존율에 차이가 없었다.

이러한 결과는 상기생이 봉독에 비해 약효가 오래 지속됨을 보여준다(Fig. 1, Fig. 2).

일반적으로 독성으로 세포의 사망이 발생하면 괴사, 염증 및 세포사 중 한 경로를 통하여 세포의 사망이 이루어진다. 괴사는 빠른 시간 내에 발생하는 집단적 세포사를 말하며, 이러한 집단적 세포사의 특징은 세포막이 먼저 파괴되는 형태를 띤다. 하지만 apoptosis로 알려진 세포사는 세포 내부의 여러 경로를 통하여 핵의 응축 및 붕괴를 유발하여 세포사가 이루어진다. Apoptosis의 생화학적 사건으로서 가장 깊이 있게 연구된 것은 핵 DNA 이중 나선의 절단이다. 이 절편들은 agarose gel 전기영동상에서 특징적인 DNA의 사다리(ladder) 형태로 나타난다⁶¹. 상기생과 봉독에 의한 Hep G2 세포의 사멸이 apoptosis에 의해 이루어지는지 확인하기 위해 IC₅₀ 값인 상기생 50 µg/ml 과 봉독 10 µg/ml 을 처리한 Hep G2 세포를 16시간과 24시간 후에 관찰한 결과 DNA가 사다리 형태로 잘려진 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

이러한 핵 DNA 이중 나선의 절단에 관여하는 단백질로 PARP-1이 알려져 있고 PARP-1은 zinc 의존적으로 DNA와 결합하는 단백질로 DNA 절단이 유발되었을 때 활성화되는 것으로 알려져 있다²⁹. PARP-1은 활성화되면 29kDa의 작은 밴드가 증가하는데, 상기생과 봉독에 의해 PARP-1의 잘려진 밴드가 시간이 지남에 따라 증가하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4). 따라서 이러한 결과는 상기생과 봉독이 세포 사멸을 유도할 때 괴사가 아닌 apoptosis 유발에 의해 이루어졌음을 의미한다.

일반적으로 apoptosis는 일련의 세포내 신호 전달 체계를 통해서 이루어지는데 그 중 세포 사멸을 억제시키는 단백질의 발현양을 줄이는 것도 apoptosis를 촉진하는데 기여한다. 이러한 세포 사멸을 억제하는 대표적인 단백질로 Bcl family 단백질이 있는데 상기생만이 Bcl-x의 발현양을 6시간 이후부터 유의하게 줄이기 시작해서 24시간까지

지속적으로 그 양이 줄어들었다. 이러한 결과는 봉독과 상기생의 세포 사멸 신호전달 체계가 다를 것을 제시한다(Fig. 5).

상기생과 봉독이 세포사를 유도할 때 어떤 세포 주기를 정지시켜서 세포 증식을 억제하고 세포 사멸을 유도하는지를 FACS로 관찰한 결과 상기생과 봉독 처리에 의해 G0/G1 phase의 세포 수는 통계적으로 유의하게 증가하였으며 새롭게 합성되는 S phase의 수도 줄어들었다. 이러한 결과는 상기생과 봉독이 부분적으로 G0/G1의 세포 주기를 정지시키는 것에도 관여할 가능성이 있음을 제시한다 (Table 1, Fig. 6).

이러한 apoptosis가 진행되면 일련의 세포내 신호 전달 체계가 활성화 된다. MAPK family (MAPK/ERK, p38 MAPK, JNK)가 그 대표적인 단백질로 알려져 있다²⁷. JNK와 p38은 osmotic stress, UV irradiation, heat shock, oxidative stress, proinflammatory cytokines 등과 같은 외부 스트레스에 의해 활성화되는 단백질로 잘 알려져 있으며³⁰, p38과 JNK의 활성을 특이적으로 억제시키는 약물에 의해 외부 스트레스에 의한 세포 사멸이 억제되는 것으로 알려져 있다²⁸. 반대로 MAPK family 단백질은 세포 생존이나 분화에도 관여하는 것으로 알려져 있으며 이는 세포내 MAPK family 단백질의 활성화 정도나 기간의 밸런스에 의해 조절되어 지속적으로 활성화되는 경우는 세포 사멸을 유도하지만 일시적으로 활성화된 경우는 세포 생존이나 분화를 유도하는 것으로 보고되었다³⁰. 본 연구에서는 상기생으로 처리한 Hep G2 세포에서 MAPK/ERK, p38 MAPK, JNK의 인산화가 6시간 이후부터 3배 이상 증가하기 시작하여 24시간까지 지속되었다. 그러나 봉독으로 처리한 Hep G2 세포에서는 MAPK/ERK와 p38 MAPK만 1시간 후에 인산화가 2배 정도 증가하였다가 6시간 후에는 대조군 수준으로 되돌아왔으며 JNK의 활성은 관찰되지 않았다(Fig. 7, 8, 9).

ERM 단백질은 세포질 내에서 분자내 상호 작

용을 통해 불활성 상태로 존재하다가 외부에서 신호가 전달되면 그 결합이 풀리면서 활성화되어 세포막 단백질과 골격 단백질을 연결시켜준다. 이러한 ERM 단백질의 탈인산화는 세포 사멸 초기에 미세음모의 손상과 더불어 일어나며 이로 인해 ERM 단백질은 세포질로의 이동이 증가한다³¹. Western blot으로 ERM의 활성을 측정한 결과 상기생에 의한 ERM 단백질의 인산화는 24시간 후에 감소하였으나 봉독에서는 그 보다 앞서서 6시간 이후부터 감소하기 시작하여 24시간까지 지속적으로 감소하였다. 그러나 ERM 단백질의 양은 변화하지 않았으므로 이는 ERM 단백질의 인산화만 저하되었음을 나타낸다(Fig. 10).

상기생과 봉독에 의한 세포 사멸의 신호 전달 경로를 밝히기 위해 JNK, p38, ERK의 활성 억제제를 미리 투여한 후 MTT assay 법을 시행하였다. 상기생에 의한 세포 사멸은 JNK 와 p38 억제제에 의해 부분적으로 억제되었으며, 봉독에 의한 세포 사멸은 p38 억제제에 의해서만 부분적으로 억제되었다(Fig. 11, 12).

상기생의 경우는 기존의 결과와 일치하는 것으로 Fig. 7, 8, 9에서와 같이 JNK 와 p38의 활성이 6시간 이후부터 24시간까지 지속적이고, 활성화 정도가 대조군의 3배 이상 강하게 나타나므로 세포 사멸을 유도하는 데 있어서 중요한 매개 역할을 하는 것을 입증하는 것이다. 그러나 봉독의 경우는 기존의 결과와 달리 p38의 1시간 후에 2배 정도의 일시적인 활성화도 불구하고 p38 활성 억제제 처리에 의해 세포 사멸이 부분적으로 억제되었다.

이러한 결과는 일시적인 p38의 활성화로도 세포 사멸이 부분적으로 유도될 수 있음을 시사하는 것으로 다른 세포내 신호 전달 체계가 관여함을 제시한다.

대해 미치는 Apoptosis 효과와 그 기전을 비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 상기생과 봉독은 모두 농도 의존적으로 Hep G2 세포의 세포 생존율을 감소시켰다.
2. 상기생은 48시간까지 시간 의존적으로 Hep G2 세포의 세포 생존율을 지속적으로 감소시켰다. 봉독은 24시간과 48시간의 세포 생존율의 차이가 없었다.
3. 상기생과 봉독을 투여한 Hep G2 세포는 모두 DNA fragmentation이 관찰되었다.
4. 상기생과 봉독을 투여한 Hep G2 세포는 모두 G0/G1 phase의 세포 수가 증가하고, S phase의 세포 수가 감소하였다.
5. 상기생을 투여한 Hep G2 세포는 Bcl-x의 발현 양이 감소되었으나, 봉독을 투여한 Hep G2 세포는 Bcl-x의 변화가 없었다.
6. 상기생과 봉독을 투여한 Hep G2 세포는 모두 PARP-1이 활성화되었다.
7. 상기생을 투여한 Hep G2 세포는 MAPK/ERK, p38 MAPK, JNK가 6시간 이후부터 인산화가 증가하여 24시간까지 지속되었다. 봉독을 투여한 Hep G2 세포는 1시간 이후에만 MAPK/ERK, p38 MAPK의 인산화가 2배 정도 증가하였다가 6시간 후에는 대조군 수준으로 되돌아왔으며, JNK의 활성은 관찰되지 않았다.
8. 상기생과 봉독을 투여한 Hep G2 세포는 모두 ERM 단백질의 인산화가 저하되었다.
9. ERK, P38, JNK 억제 처리한 Hep G2 세포에 상기생과 봉독을 투여한 결과, 상기생에 의한 세포 사멸은 JNK, P38 억제제에 의해 억제되었으며, 봉독에 의한 세포 사멸은 P38 억제제에 의해 억제되었다.

V. 결 론

상기생과 봉독이 간암 세포주 Hep G2 세포에

참고문헌

1. 辛民敎. 原色臨床本草學. 서울: 南山堂; 1991, p.

- 233-8.
2. Stein GM, Schetzel M, Büssing A. Mistletoe in immunology and the clinic(short review). *Anticancer Research* 1998;18:3247-9.
 3. Stein GM, Pfüller U, Schietzel M. Viscotoxin-free aqueous exyracts from European mistletoe (*Viscum album L.*) stimulate activity of human granulocytes. *Anticancer Research* 1999;19:2925-8.
 4. 신민교, 송오준, 황금택. 상기생 및 곡기생 전탕액이 마우스의 항종양 면역반응에 미치는 영향. *본초분과학회지*. 1994;9(1):25-47.
 5. Park RK, Kim MS, So HS, Jung BH, Moon SR, Chung SY, Ko CB, Kim BR, Chung HT. Activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in mistletoe lectin II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. *Biochemical Pharmacology*. 2000;60(11):1685-91.
 6. Stoss M, Peter E, Gorter RW. Decrease of Activated Lymphocytes Four and Nine Hours after a Subcutaneous Injection of a *Viscum album L.* Extract in Healthy Volunteers. *Nat Immun*. 1998;16(5-6):185-97.
 7. Fischer S, Scheffler A, Kabelitz D. Oligoclonal *in vitro* response of CD4 T cells to vesicles of mistletoe extracts in mistletoe-treated cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 1997; 44(3):150-6.
 8. Deregnaucourt C, Schrevel J. Bee venom phospholopase A2 induces stage-specific growth arrest of the intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* via modifications of human serum components. *J Biol Chem*. 2000;275(51):39973-80.
 9. Han HJ, Lee JH, Park SH, Choi HJ, Yang IS, Mar WC, Kang SK, Lee HJ. Effect of Bee Venom and Its Melittin on Apical Transporters of Renal Proximal Tubule Cells. *Kidney & blood pressure research*. 2000;23(6):393-9.
 10. Lee J, Lim W, Eun SY, Kim SJ, Kim J. Inhibition of apamin-sensitive K⁺ current by hypoxia in adult rat adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch*. 2000;439(6):700-4.
 11. von Garnier C, Astori M, Kettner A, Dufour N, Heusser C, Corradin G, Spertini F. Allegen-derived long poptide immunotherapy down-regulates specific IgE response and protects from anaphylaxis. *Eur J Immunol*. 2000;30(6):1638-45.
 12. 윤형석, 김용석, 이재동. 통증 관련 봉독연구에 대한 고찰. *대한약침학회지*. 2000;3(1):157-75.
 13. 權奇祿, 高炯均. 봉약침요법의 면역반응에 관한 임상적 연구. *대한침구학회지*. 2000;17(1):169-74.
 14. 朴贊烈, 南相水, 金昌煥, 李裁東, 姜成吉, 李潤浩, 安秉哲. 藥鍼用蜂毒액이 黑色腫細胞에 미치는 抗癌效果에 對한 分子生物學的 研究. *東西醫學研究所論文集*. 2001;2000:183-200.
 15. 박찬열, 서정철, 최도용, 안병철. 봉독약침의 항암효과에 대한 분자생물학적 연구. *대한약침학회지*. 2000;3(1):1-19.
 16. Millward-Sadler SJ, Wright MO, Davies LW, Nuki G, Salter DM. Mechanotransduction via integrins and interleukin-4 results in altered aggrecan and matrix metalloproteinase 3 gene expression in normal, but not osteoarthritic, human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2000;43(9):2091-9.
 17. Yasin B, Pang M, Turner JS, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ, Lehrer RI, Wagar EA. Evaluation of the inactivation of infectious Herpes simplex Virus by host-defense Peptides. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2000;19(3):187-94.
 18. Brañas P, Jordan R, Fry-Smith A, Burls A, Hyde C. Treatments for fatigue in multiple sclerosis : a rapid and systematic review. *Health Technol Assess*. 2000;4(27):1-61.

19. Gerst JE, Salomon Y. Inhibition by melittin and fluphenazine of melanotropin receptor function and adenylate cyclase in M2R melanoma cell membranes. *Endocrinology*. 1987;121(5):1766-72.
20. 공현식, 박동원, 류기원, 류봉하. 韓國韓醫學의 腫瘍研究에 對한 現況;(1980年 以後의 雜誌에 報告된 論文을 中心으로). *대한한방중앙학회지*. 1995;1(1):55-81.
21. Kovacs E, Hajto T, Hostanska K. Improvement of DNA repair in lymphocytes of breast cancer patients treated with *Viscum album* extract (Iscador). *Eur J Cancer*. 1991;27(12):1672-6.
22. Bocci V. Mistletoe (*viscum album*) lectins as cytokine inducers and immunoadjuvant in tumor therapy. A review. *J Biol Regul Homeost Agents*. 1993;7(1):1-6.
23. Krammer PH, Behrmann I, Daniel P, Dhein J, Debatin KM. Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr Opin Immunol*. 1994;6: 279-89.
24. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer* 2. 2002;2:277-88.
25. Janssen O, Scheffler A, Kabelitz D. *In vitro* effects of mistletoe extracts and mistletoe lectins. Cytotoxicity towards tumor cells due to the induction of programmed cell death (apoptosis). *Arzneimittelforschung*. 1993;43(11):1221-7.
26. Kimura C, Zhaoa QL, Kondo T, Amatsu M, Fujiwara Y. Mechanism of UV-Induced Apoptosis in Human Leukemia Cells: Roles of Ca²⁺/Mg²⁺-Dependent Endonuclease, Caspase-3, and Stress-Activated Protein Kinases. *Experimental Cell Research*. 1998;239:411-22.
27. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. 1995;270:1326-31.
28. Borsello T, Clarke PG, Hirt L, Vercelli A, Repici M, Schorderet DF, Bogousslavsky J, Bonny C. A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nature Medicine*. 2003;9:1180-6.
29. Chiarugi A. Poly(ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator? The 'suicide hypothesis' revisited? *Trends in pharmacological sciences*. 2002;23(3): 122-9.
30. Matsuzawa A, Ichijo H. Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1780(11):1325-36.
31. Kondo T, Takeuchi K, Doi Y, Yonemura S, Nagata S, Tsukita S. ERM (ezrin/radixin/moesin)-based molecular mechanism of microvillar breakdown at an early stage of apoptosis. *J Cell Biol*. 1997;139(3):749-58.