

知母에탄올추출물의 HT-29대장암세포 Apoptosis 유도효과

김태현¹ · 김범호¹ · 전병국¹ · 윤정록¹ · 우원홍¹ · 문연자² · 이장천³ · 이부균⁴ · 박영규⁵ · 임규상⁶

¹ 원광대학교 한의학 전문대학원 한약자원개발학과

² 원광대학교 한의과 대학 해부학 교실

³ 부산대학교 한의학전문대학원 약물의학부

⁴ 세명대학교 한의과대학 본초방제학 교실

⁵ 원광대학교 교육개발센터

⁶ 원광대학교 한의학전문대학원, 한국 전통의학 연구소

Effect of Anemarrhenae Rhizoma Ethanol Extract on Apoptosis Induction of HT-29 Human Colon Cancer Cells

*Tae-Hyun Kim¹ · Pom-Ho Kim · Byoung-Kook Jeon¹ · Jeong-Rock Yoon¹ · Won-Hong Woo¹ ·
Yeun-Ja Mun² · Jang-Cheon Lee³ · Boo-Kyun Lee⁴ · Young-Gue Park⁵ · Kyu-Sang Lim⁶*

Objective : In this study, we investigated the effects of ethanol extract of Anemarrhenae Rhizoma (EAR) on the proliferation and apoptosis induction of HT-29 human colon cancer cells.

Methods : Cell viability of HT-29 cells were measured by MTT assay and apoptosis-related proteins were assessed using western blotting. Chromatin condensation of HT-29 cells stained with Hoechst 33258.

Results : In the present study, we demonstrated that EAR exhibited significant cytotoxicity in HT-29 cells. The induction of apoptosis in HT-29 cells by EAR treatment was characterized by chromatin condensation and the activation of caspase-3. EAR-induced apoptosis is accompanied by the release of cytochrome c and the specific proteolytic cleavage of PARP. EAR was appeared cytotoxic effect to HT-29 cells in a dose-dependent manner. Concomitantly, EAR treatment led to increase in the caspase-9. The reduction of Bcl-2 and truncation of Bid were induced by EAR.

Conclusion : We studied that the EAR induced apoptosis in human colon adenocarcinoma HT-29 cells. These results indicated that EAR can cause apoptosis through mitochondria/caspase pathway in human HT-29 cells.

Key words : Colon cancer, Apoptosis, Mitochondria, Caspase, Bcl-family

교신저자 : 임규상, 원광대학교 한의학 전문대학원
(Tel: 063-850-6916, E-mail: kslim@wku.ac.kr)

* 이 논문은 2010년도 원광대학교 교내 연구비 지원에 의하여 수행
되었음.

• 접수 2011/02/21 • 수정 2011/03/29 • 채택 2011/04/06

서 론

전 세계적으로 대장암은 전체 암 발병율의 9.4%를 점유하고 남성의 경우 4위, 여성의 경우 3위를 차지하고 있으며, 최근 우리나라의 경우도 식생활 습관의 변화와 환경오염 등으로 대장암 발병율이 점점 증가추세에 있다^{1,2)}. 대장은 소화 및 흡수되고 남은 음식물이 머무르는 곳으로 많은 종류의 세균이 번식하고 있고 대장점막이 있는 곳이면 어디서나 암이 생기지만, S상 결장과 직장에서 주로 암이 발생하며, 대장암의 경우 점점 서구화 되는 식생활과 과도한 스트레스, 불규칙적인 생활습관으로 인하여 발생율이 점점 증가하고 있는 추세이다³⁾.

Programmed cell death라고도 알려져 있는 apoptosis는 능동적인 기작으로 정상적인 세포의 수를 조절하는데 있어 필요한 과정이며 다양한 원인의 손상에 의해 유도된다. 그리고 유해한 세포의 제거 등에 관여하여 개체의 항상성을 유지하는 중요한 조절 기구로 작용 하고 있으며 이는 내·외부적인 신호 전달에 의해 일어나는 과정이다. Apoptosis가 일어났을 때 세포의 형태학적인 특징으로는 세포막 박리, 세포막 융기가 돌출하는 현상(membrane blebbing), 핵의 응축(nuclear condensation), 포스파티딜 세린(phosphatidyl serine)의 외부로의 노출, DAN의 분절(DNA fragmentation) 등이 있다^{4,6)}.

Apoptosis는 2가지 경로로 나누어진다. Intrinsic pathway는 미토콘드리아의 막전위 소실로 인해 세포질로 방출된 cytochrome c가 Apaf-1을 형성하여 caspase-9을 활성화시키고, caspase-9은 하위 신호인 caspase-3, -6, -7의 활성을 유도하는 경로이다. 그리고 extrinsic pathway는 death receptor인 Fas, TNF receptor를 경유하여 Fas-associated death domain protein(FADD), caspase-8의 활성을 일으키는 경로이다^{7,8)}.

지모(知母, *Anemarrhena asphodeloides* Bunge)

는 백합과에 속한 다년생 초본으로 싹과 수염뿌리를 제거하고 벌에 말린 것을 모지모(毛地母)라고 하며 외피를 벗겨서 벌에 말린 것을 광지모(光知母)라 한다. 한방에서 知母는 근경(根莖)을 사용하는데, 근경에는 약 6%의 saponin이 함유되어 있다. 약리 작용으로는 해열작용, 강심작용, 이뇨작용, 항균작용, 거담작용, 진정작용, 혈당강하작용, 항암작용이 있으며 해열제로 사용된다⁹⁾. 知母에 대한 연구로는 인간 폐암 세포주 A-549와 백혈병 세포주 HL-60에서 항암활성을 나타내었다고 보고되었으나^{10,11)} 인간 대장암 세포주인 HT-29에 대한 항암활성 기전에 관한 연구는 보고된 바 없다.

이에 저자는 知母에탄올추출물이 인간 대장암 세포주에서 apoptosis 유도효과와 그 작용기전을 조사하기 위하여 세포생존율, 세포의 형태학적 변화, apoptosis 관련 단백질을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 약 재

본 실험에 사용된 知母는 경북 영천시 화산면에서 생산된 제품을 삼흥 건재약업사(서울)에서 구입한 것을 사용하였다.

2) 세포주

인간 대장암 유래 세포인 HT-29 세포주는 한국 세포주 은행(서울)에서 구입하여 사용하였다.

3) 시약 및 기기

RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), antibiotic-antimycotic, trypsin-EDTA은 Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA)에서, bovine serum albumin(BSA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), dimethylsulfoxide

(DMSO), phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF), leupeptin, aprotinin, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine(TEMED)는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Bcl-2, Bax, Bid 및 pro-caspase-3, -9, antibody는 Santa Cruz(San Diego, CA, USA)에서, cytochrome c, PARP는 Cell signaling(Beverly, MA, USA)에서, anti-goat, anti-rabbit, anti-mouse IgG HRP conjugate antibody는 Zymed Laboratories Inc.(San Francisco, CA, USA)에서 구입하였다. 단백질 정량 시약은 Bio-Rad(CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

원심분리기(centrifuge HA-12, micro 17TR centrifuge), clean bench, CO₂ incubator는 한일 기기(Inchun, 한국)사 제품을, ELISA reader는 Bio-TEK(Winooski, USA)사 제품을, electrophoresis power supply는 Amersham(Buckinghamshire, England)사 제품을, ChemiDoc image analysis는 Bio-Rad(CA, USA)사 제품을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

知母 200g에 에탄올 2L를 가하여 실온에서 sonication 시킨 후 3일간 추출한 것을 일차로 거즈 여과 한 다음 filter paper로 vacuum pump를 이용하여 여과하였다. 여과된 知母 추출물을 rotary evaporator로 감압 농축하여 4.49 g(수득율 : 2.25%)의 건조된 추출물을 얻어 시료로 사용하였다. 지모 에탄올추출물 시료는 DMSO에 녹여 사용하였으며, DMSO는 최종 0.01% 이하의 농도 범위에서 사용하였다.

2) 세포배양

분양받은 HT-29 세포는 10% FBS, 100 units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin,

0.25 μ g/mL amphotericin B를 첨가한 RPMI 1640을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 그리고 48시간 주기로 배양액을 교체하여 주었으며 0.25% trypsin EDTA로 세포를 떼어내어 계대 배양하였다.

3) 세포 생존률 측정

HT-29세포를 24-well 배양용기에 2×10^4 cell/well의 밀도로 분주하여 24 시간 배양 후 知母에탄올추출물을 처리하고 24, 48시간 배양하였다. 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyletetrazolium bromide(MTT) 용액을 0.5 mg/mL이 되도록 처리하고 3시간 배양하였다. MTT 용액을 처리한 배지를 제거하고 실온에서 건조시킨 후 DMSO로 용해시켜 ELISA reader(Bio-TEK, Winooski, USA)를 이용하여 540 nm파장의 흡광도를 측정하였다.

4) Hoechst 33258 염색

HT-29 세포를 6-well 배양용기에 3×10^5 cell/well의 밀도로 분주하고 24시간 배양하여 세포를 부착시킨 후, 知母에탄올추출물을 처리하고 24시간 배양하였다. PBS로 세포단층을 씻어낸 후 4% formaldehyde로 실온에서 30분 동안 세포를 고정하고 PBS로 3회 세척하였다. Hoechst 33258의 최종 농도가 2 μ g/mL이 되도록 PBS에 희석하여 세포에 첨가하고 30분 동안 어두운 곳에서 염색한 후 형광 현미경으로 관찰하였다.

5) Western blot 분석

HT-29 세포를 10 cm 배양용기에 1×10^6 개씩 부착시키고 知母에탄올추출물을 처리하여 48시간 배양하였다. 배양된 세포를 모두 수거하여 lysis buffer(50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM EGTA, 2 mM PMSF, 10 μ g/mL leupeptin, 10 μ g/mL aprotinin)로 4°C에서 60분간 용해시킨 후, 13,000 rpm에서 30분간 원

심분리 하여 얻은 세포 용해액은 Bradford 방법을 이용하여 단백질정량을 하였다. 동량의 세포 용해액(단백질 100 μg)은 2×sample buffer와 혼합하여 95°C에서 5분간 끓인 후 12% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 하여 단백질을 분리하였다. 전기영동이 끝난 후 polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)에 전이시켰다. Membrane은 5% skim milk-TBST(20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에서 1시간 동안 blocking하고, Bcl-2, Bax, Bid, pro-caspase-3, pro-caspase-9, cytochrome c, PARP 등의 측정하고자 하는 1차 항체를 각각 첨가하여 4°C에서 16시간 또는 실온에서 2시간 반응시켰다. TBST로 3회 세척한 후 이차항체 anti-goat, anti-rabbit, anti-mouse IgG conjugated horse-radish peroxidase와 1시간 반응시켰다. TBST로 3회 세척 후 WEST-ZOL®(plus) Western blot detection system(iNtRON, Korea)을 사용하여 ChemiDoc으로 촬영하였다.

6) 통계 처리

모든 실험은 3회 반복하였으며, 분석 수치는 mean \pm S.D로 나타내었고, 통계분석은 ANOVA Test에 의해 분석되었다. 통계적 유의성은 $p \leq 0.05$ 로 판정하였다.

결 과

1. 세포생존률에 미치는 영향

知母에탄올추출물이 HT-29세포의 생존률에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하고 24, 48시간 배양 하였다. 배양 후 MTT를 3시간 처리하였으며 세포내에 형성된 formazan은 DMSO로 용해하여 측정하였다. 실험 결과 知母에탄올추출물에 의한

세포증식은 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 24시간 후 87%, 84%, 80%, 73%, 64% 48시간 후 87%, 77%, 66%, 48%, 41%로 나타났다 (Fig. 1).

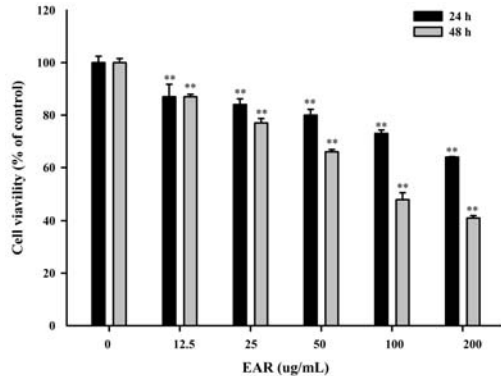


Fig. 1. Effect of EAR on the cell viability of HT-29 cells. HT-29 cells were treated with EAR at 37°C for 24, 48 hours. The proportion of survival cells was measured by MTT assay. The experiments were performed in triplicate. Data presented as means \pm S.D. of three independent experiments.

2. 핵의 응축과 분절

Apoptosis의 특징으로는 세포의 수축, 세포막 박리, 포스파티딜 세린의 외부로의 노출, 핵의 응축과 분절 등이 있다. 知母에탄올추출물을 처리 하였을 때 핵의 응축과 분절이 일어났는지 확인하기 위하여 Hoechst 33258 염색을 실시하였다.

HT-29 세포에 知母에탄올추출물을 각각 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리하고 24시간 배양한 후 염색하였다. 대조군에서는 apoptosis의 특징적인 형태가 관찰되지 않았으나(Fig. 2A) 知母에탄올추출물 처리군에서 농도 의존적으로 핵이 응축 및 분절된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2B-C).

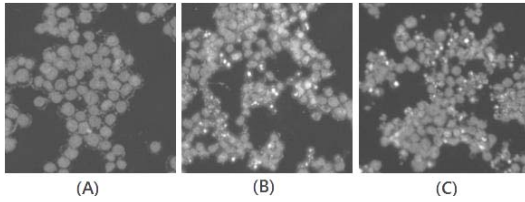


Fig. 2. Effect of EAR on the chromatin condensation and fragmentation in HT-29 cells.

Cells were treated with EAR or without EAR for 24 hours at 37°C. HT-29 cells were stained with hoechst 33258 and then were observed under a fluorescence microscope. A: Control, B: 100 µg/mL EAR, C: 150 µg/mL EAR.

3. Caspase 단백질 발현에 미치는 영향

Apoptosis의 조절단계 활성화 경로 중에서 caspase-9은 미토콘드리아로부터 방출된 cytochrome c와 보조인자인 Apaf-1과의 결합에 의해 활성화된다. 이렇게 활성화된 caspase의 연쇄 활성화로 인해 세포 내에서 32 kDa인 비활성형으로 존재하는 pro-caspase-3를 활성화하게 된다.

知母에탄올추출물을 100, 150, 200 µg/mL 농도로 처리하고 48시간 배양한 후 western blot을 이용하여 확인 하였다. 실험 결과 知母에탄올추출물에 의한 pro-caspase-3, -9은 농도 의존적으로 감소된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

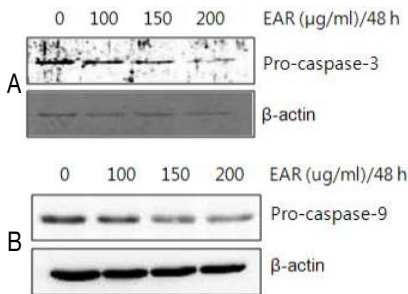


Fig. 3. Effect of EAR on the protein expression levels of pro-caspase-3, -9, in HT-29 cells.

Cells were incubated for 48 hours at 37°C with the 100, 150, 200 µg/mL of EAR. Equal protein of the total lysates were analyzed by gradient 12% SDS-PAGE. The reduction of pro-caspase-3, -9 were detected by Western blot.

4. Bcl-2 family 단백질 발현에 미치는 영향

Bcl-2 family 단백질은 pro-survival에 속하는 Bcl-2 sub-family(Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w)와 pro-apoptosis에 속하는 Bax sub-family(Bax, Bak), BH3 sub-family(Bid, Bad, Noxa, PUMA, Hrk)로 나눌 수 있다. Apoptosis 신호가 전달되면 세포질에 존재하던 Bid가 truncation되어 tBid로 변하여 미토콘드리아로 유입된다. 또한 Bax, Bak이 활성화 되고 미토콘드리아막에 pore을 형성하여 cytochrome c의 방출을 일으켜 apoptosis를 유도한다.

知母에탄올추출물을 100, 150, 200 µg/mL 처리한 후 48시간동안 배양하고 western blot을 이용하여 확인 하였다. 실험 결과 Bax의 발현에는 변화가 없었지만 Bcl-2 단백질의 발현량이 농도 의존적으로 감소하였고, Bid의 단편화 현상도 확인할 수 있었다(Fig. 4).

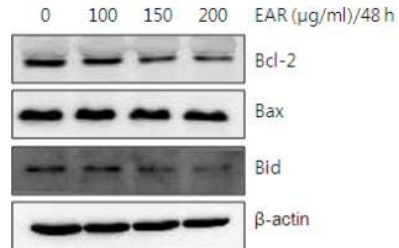


Fig. 4. Effect of EAR on the protein expression levels of Bcl-2 family in HT-29 cells.

Cells were incubated for 48 hours at 37°C with the 100, 150, 200 µg/mL of EAR. Equal protein of the total lysates were analyzed by gradient 12% SDS-PAGE.

5. Cytochrome c의 유리에 미치는 영향

미토콘드리아 내막에 존재하는 cytochrome c는 apoptosis 신호에 의해 외부로 방출되면 apoptosis protease activating factor(Apaf-1)과 결합하고 pro-caspase-9와 apoptosome을 형성하게 된다. 활성화된 caspase-9은 하위 caspase인 caspase-3, -6,

-7을 활성화 시켜 apoptosis를 일으킨다.

知母에탄올추출물을 100, 150, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하고 48시간 배양한 후 western blot을 시행 하였다. 실험 결과 농도 의존적으로 cytochrome c의 방출이 증가된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

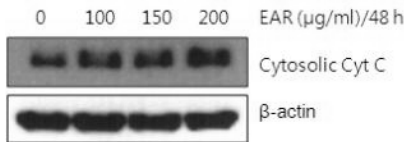


Fig. 5. Effect of EAR on the release of cytochrome c in HT-29 cells.

Cells were incubated for 48 hours at 37°C with the 100, 150, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of EAR. Equal protein of the total lysates were analyzed by gradient 12% SDS-PAGE. The release of cytochrome c were detected by Western blot.

6. PARP 분절

Poly ADP ribose polymerase(PARP)는 DNA 수복에 관여하는 효소로 세포의 생존에 중요한 역할을 한다. Apoptosis시 활성화된 caspase-3에 의해 PARP가 분해되고 더 이상 DNA 수복에 관여할 수 없게 되므로 apoptosis가 일어나게 된다.

知母에탄올추출물을 100, 150, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하고 48시간 배양한 후 western blot을 시행 하였다. 실험 결과 116 kDa의 PARP 단백질이 89 kDa으로 분절된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

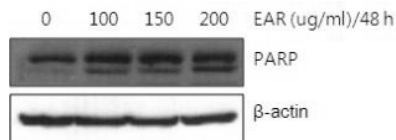


Fig. 6. Effect of EAR on the cleavage of PARP in HT-29 cells.

Cells were incubated for 48 hours at 37°C with the 100, 150, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of EAR. Equal protein of the total lysates were analyzed. The cleavage of PARP were detected by Western blot.

고 찰

대장암은 미국 등 서구사회에서 암 발병률과 이로 인한 사망률에서 2위를 차지하고 있다. 1900년대 이전만 하더라도 미국에서조차도 흔하지 않은 암이었지만 경제발전과 더불어 산업화 진행에 따른 생활의 변화로 인하여 대장암 발병률이 점점 증가 하였으며 근처 일본에서도 세계 2차 대전 이후 변한 생활습관과 서구화된 식습관으로 인하여 대장암 발병률 위험성이 증가했다고 보고 있다. 우리나라 뿐 만 아니라 아시아 여러 개발도상국들도 마찬가지로 대장암 발병률이 점점 증가 하고 있는 추세이다¹²⁾. 한국 중앙 암 등록 본부에서 2009년 12월에 발표한 자료에 따르면 2007년 우리나라에서 발생한 전체 암 인구수는 161,920명으로 이중 대장암 환자가 20,558명으로 전체 암환자의 12.7%를 차지하였고 위암, 갑상샘암 다음의 발병률을 보였고, 성별에서는 남자는 4위, 여자는 3위를 차지할 정도로 높은 발병률을 나타내었다^{1,2,13)}.

Apoptosis는 자발적이고 능동적인 현상으로 자신의 세포 생성과 사멸에 균형을 유지함으로써 조직의 개체나 항상성 유지에 필수적인 과정이다. 이러한 apoptosis의 능력을 소실하게 되면 형질 변화를 일으킨 개체는 이상증식을 멈추지 않고 계속하게 되며 결국 암이나 자가면역질환 등과 같은 여러 질병을 원인이 된다¹⁴⁾.

知母는 중국이 원산지로서 산과 들에서 자생하며 근경(根莖)을 사용하는데, 유효성분으로는 크게 saponin, xanthone류 등의 timosaponin, anemarsaponin, markogenin, sarsasapogenin이 함유되어 있다. 약리 작용으로는 해열작용, 강심작용, 이뇨작용, 항균작용, 거담작용, 진정작용, 혈당강하작용, 항암작용이 있으며 해열제로 사용된다⁹⁾. 그리고 지모의 항암활성성분에 관하여 발표된 논문에 따르면 지모 saponin으로부터 분리된 timosaponin A-III의 성분이 폐암 세포주 A-549와 백혈병 세포주 HL-60

에서 항암활성을 나타내었다고 보고되었다^{10,11)}.

본 연구에서는 HT-29 세포를 대상으로 知母에 탄올추출물에 의한 세포사멸 기전을 조사 하였다. 먼저 HT-29 세포 생존률에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시한 결과 농도 의존적으로 세포 생존율이 현저히 감소하였으며 LD₅₀ 값은 200 µg/mL로 측정되었다. 그리고 Hoechst 33285 염색을 통하여 세포의 형태학적인 모습을 관찰한 결과 apoptosis의 형태학적 특징인 세포 수축, 핵의 응축 및 분절을 유도하여 apoptotic body 형성을 일으키는 것을 확인 할 수 있었다. 이에 知母에탄올추출물에 의한 HT-29 세포독성은 apoptosis를 통한 세포사멸인지 예상할 수 있었으며 따라서 western blot 통해 apoptosis 관련 단백질을 조사 하였다.

Bcl-2 family 단백질은 미토콘드리아 내막에 존재하는 단백질로 미토콘드리아 의존적인 내인성 경로와 관련되어 있다. 그리고 미토콘드리아의 막 투과성과 cytochrome c의 방출을 제어하여 세포사멸을 조절하는 것으로 알려져 있다. Bcl-2 family 단백질은 anti-apoptotic protein(Bcl-2 and Bcl-xL), pro-apoptotic protein(Bak and Bax), Bcl-2 homology domain(BH)₃-only protein(Bid, Bad, Noxa, PUMA, Hrk)으로 나누어진다. 이 중 대표적인 apoptosis 관련 단백질로는 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2와 pro-apoptotic 단백질인 Bax가 있다. Anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2는 pro-apoptotic 단백질인 Bax와 평상시 heterodimer를 형성하여 Bax 작용을 저해하여 apoptosis 작용을 억제하는 반면, 방사선, 약물, 활성 산소종(ROS)등 외부 여러 자극으로 인하여 apoptosis가 유도되면 pro-apoptotic protein인 Bax는 미토콘드리아의 막전위를 유발시켜 cytochrome c의 방출을 일으켜 세포사멸을 유도한다^{15 ~ 17)}.

본 실험에서 HT-29 세포에 대하여 세포독성을 나타내었던 知母에탄올추출물이 세포사멸에 중요한

인자인 Bcl-2 family 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 western blot을 실시하였다. 실험 결과 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2의 발현이 줄어든 것을 확인 할 수 있었으며 Bid의 단편화 현상도 관찰할 수 있었다. 하지만 pro-apoptotic 단백질인 Bax의 발현에는 아무런 변화가 관찰되지 않았다.

Cysteine aspartic acid proteases인 caspase들은 활성화부위에 cystein이 있고, 세포사멸 과정에 효소 내부에서 절단을 통해 활성화 되는 zymogen들이다¹⁸⁾. 세포사멸 과정에서 caspase들은 N-terminal prodomain이 제거되고 다시 단백질 내부에서 절단이 일어나 큰 단위체(p20)와 작은 단위체(p10)가 결합하여 활성을 나타낸다. Caspase는 initiator caspase와 effector caspase로 구분된다. Initiator caspase인 caspase-2, -8, -9, -10는 death-inducing 신호에 의해 활성화 되며 이렇게 활성화된 initiator caspase는 effector caspase인 caspase-3, -6, -7에 작용하여 활성화 시킨다. 활성화된 effector caspase는 lamin A, DNA fragmentation factor, a-fodrin과 PARP 등의 세포 단백질의 분열을 통해 세포사멸을 일으킨다. 외인성 경로인 Fas receptor에 ligand가 결합하면서 활성화되는 caspase-8은 caspase-3를 활성화 시킬 수 있을 뿐만 아니라 Bcl-2 homology domain(BH)₃-only protein인 Bid를 분절한다^{19,22)}. 분절된 tBid(truncated version)는 미토콘드리아에 작용하여 Bax와 상호작용을 통해 세포사멸을 일으킨다. 반면 caspase-9은 미토콘드리아 막전위 소실로 인하여 미토콘드리아로부터 방출된 cytochrome c에 의한 내인성 경로를 통하여 활성화된다^{23,24)}. 손상된 DNA의 복구를 돕는 효소인 poly ADP ribose polymerase(PARP)는 핵 내에 존재하며 활성화된 caspase-3의 주요한 표적 단백질 중의 하나로 caspase-3에 의해 분절화된다²⁵⁾. 이렇게 분절화 된 PARP는 더 이상 세포의 생존을 유지할 수 없게 되어 세포사멸을 유도

하게 된다.

본 실험에서 知母에탄올추출물이 caspase 발현과 cytochrome c 유리 그리고 PARP 분절화에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 western blot를 실시하였다. 실험 결과 pro-caspase-3, -9의 발현양이 줄어든 것과 미토콘드리아로부터 방출된 cytochrome c를 확인할 수 있었으며 PARP의 분절을 관찰할 수 있었다. 이는 내인성 경로인 미토콘드리아를 경유하여 세포사멸을 일으키는 것으로 예상된다.

결론

서구화 되는 식생활과 과도한 스트레스, 불규칙적인 생활습관으로 인하여 발생율이 점차 증가하고 있는 대장암에 대하여 효과적인 항암물질을 개발하고자 사람의 대장암 세포주인 HT-29 세포를 이용하여 천연물질인 知母에탄올추출물의 세포생존율과 형태학적인 변화, 그리고 apoptosis 관련 단백질 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 知母에탄올추출물은 농도 의존적으로 세포의 증식을 억제하였다.
2. 知母에탄올추출물은 apoptosis의 특징 중 하나인 핵의 응축이 관찰되었다.
3. 知母에탄올추출물에 의해 pro-caspase-3, -9의 발현이 농도 의존적으로 감소하였다.
4. 知母에탄올추출물은 anti-apoptotic 신호기전인 Bcl-2의 발현을 감소 시켰고 homology domain (BH)3-only protein인 Bid의 단편화 현상을 유도하였다.
5. 知母에탄올추출물에 의해 미토콘드리아로부터 방출된 cytochrome c를 확인하였다.
6. 知母에탄올추출물은 caspase-3의 표적 단백질인 PARP의 분절을 확인하였다.

이상의 결과 知母에탄올추출물은 사람의 대장암 세포주인 HT-29 세포에서 농도 의존적인 apoptosis를 유발하였으며 이는 미토콘드리아/caspase 경로에 의한 것임을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Koh SJ, Kim JS. The reasons for the increased incidence of colorectal cancer in Korea. *Korean J Med*. 2010;79:97-103.
2. Tenesa A, Dunlop MG. New insights into the aetiology of colorectal cancer from genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* 2009;10:353-8.
3. Terzic J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138:2101-14.
4. Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;12:979-87.
5. Heath-Engel HM, Chang NC, Shore GC. The endoplasmic reticulum in apoptosis and autophagy: role of the BCL-2 protein family. *Oncogene*. 2008;27(50):6419-33.
6. Pathak S, Sharma CH, Jayaram HN, Singh N. Apoptotic signaling induced by benzamide riboside : an in vitro study. *Mol Cell Biochem*. 2009;328(2):67-73.
7. Wang S. The promise of cancer therapeutics targeting the TNF-related apoptosis-inducing ligand and TRAIL receptor pathway. *Oncogene*. 2008;27(48):6207-15.
8. Ashkenazi A. Targeting the extrinsic

- apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008;19(3-4):325-31.
9. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 외. 중약대사전. 서울:정담출판사. 1997:3951-57.
 10. 김현태, 곽용호, 성재덕, 김금숙, 박창기, 한상익. 지모의 유효성분 분리 및 HPLC 정량 분석. *한국약용작물학회지.* 1999;7(1):45-50.
 11. 이정옥, 이승호, 유시용, 안종웅, 최상운, 노계성, 김성기. 지모의 항암활성성분에 관한 연구. 1995;26(1):47-50.
 12. 김영호. 대장암의 조기 발견 및 치료에 대한 전략 ; 대장암의 유전학적 관련성의 최신지견. *대한내과학회지.* 2010;79(2):113-8.
 13. 중앙암등록본부. 2007년 국가암등록사업 연례 보고서.
 14. Williams GT. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell.* 1991; 65(7):1097-8.
 15. Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy.* 2008;4(5):600-6.
 16. Suen DF, Norris KL, Youle RJ. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev.* 2008;22(12):1577-90.
 17. Nemeč KN, Khaled AR. Therapeutic modulation of apoptosis: targeting the BCL-2 family at the interface of the mitochondrial membrane. *Yonsei Med J.* 2008;49(5):689-97.
 18. 김진우, 조철오. Apoptosis의 분자적 특징과 조절 기작. *Ajou Med J.* 1998;3(1):1-11.
 19. Tsang WP, Kwok TT. Let-7a microRNA suppresses therapeutics-induced cancer cell death by targeting caspase-3. *Apoptosis.* 2008;13(10):1215-22.
 20. Kim R, Emi M, Tanabe K. Caspase-dependent and -independent cell death pathways after DNA damage. *Oncol Rep.* 2005;14(3):595-9.
 21. Selvakumar P, Sharma RK. Role of calpain and caspase system in the regulation of N-myristoyltransferase in human colon cancer. *Int J Mol Med.* 2007;19(5):823-7.
 22. Chai F, Truong-Tran AQ, Ho LH, Zalewski PD. Regulation of caspase activation and apoptosis by cellular zinc fluxes and zinc deprivation. *Immunol Cell Biol.* 1999;77(3):272-8.
 23. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998; 281(5381):1305-8.
 24. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;(15):269-90.
 25. Eeva J, Nuutinen U, Ropponen A, Matto M, Eray M, Pellinen R, Wahlfors J, Pelkonen J. The involvement of mitochondria and the caspase-9 activation pathway in rituximab-induced apoptosis in FL cells. *Apoptosis.* 2009;14(5):687-98.