

Apoptosis Induction by Methanol Extract of *Prunus mume* Fruits in Human Leukemia U937 CellsYou Jeong Chung¹, Cheol Park¹, Yong Kee Jeong³ and Yung Hyun Choi^{1,2,*}¹Department of Biochemistry, Research Institute of Oriental Medicine, Dongeui University College of Oriental Medicine, Busan 614-052, Korea²Department of Biomaterial Control, Graduate School and Blue-Bio Industry Regional Innovation Center, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea³Department of Medical Bioscience, Graduate School and Department of Biotechnology, College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea Korea

Received March 19, 2011 / Revised March 24, 2011 / Accepted March 24, 2011

In the present study, the pro-apoptotic effects of methanol extract of *Prunus mume* fruits (MEPM) in human leukemia U937 cells were investigated. It was found that exposure to MEPM resulted in growth inhibition in a concentration-dependent manner by inducing apoptosis. The induction of apoptotic cell death in U937 cells by MEPM was correlated with a down-regulation of inhibitor of apoptosis protein (IAP) family, such as X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) and survivin, anti-apoptotic Bcl-2, up-regulation of FasL and cleavage of Bid. MEPM treatment also induced the proteolytic activation of caspase-3, caspase-8 and caspase-9, and degradation of caspase-3 substrate proteins, such as poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) and β -catenin. In addition, apoptotic cell death induced by MEPM was significantly inhibited by z-DEVD-fmk, a caspase-3 specific inhibitor, which demonstrates the important role of caspase-3 in the apoptotic process by MEPM in U937 cells. Taken together, these findings suggest that *P. mume* extracts may be a potential chemotherapeutic agent for the control of human leukemia cells and further studies will be needed to identify the active compounds.

Key words : *Prunus mume*, U937, apoptosis, caspase-3

서 론

인체에서 비정상적으로 조절되며 침윤 및 전이를 유발하는 질병인 암은 산업의 발달과 생활의 서구화에 따라 급격하게 증가되고 있는 추세이지만, 아직도 암의 발생기전이 명확히 밝혀져 있지 않아서 난치성 질병으로 분류되고 있다[30]. 특히 악성 hematopoietic tumor인 혈구암은 백혈구의 비정상적인 증식을 유발시키는 특징을 가지며 혈액 또는 골수에서 유발되는 암으로서 인체에서 발병하는 여러 종류의 암 중에서 여섯 번째로 발병율이 높은 것으로 알려져 있다[4]. 혈구암은 임상 및 병리학적으로 급성 및 만성 혈구암으로 구분되어지는데 급성 혈구암의 경우에는 어린이나 젊은 층에서 주로 발병하지만 만성 혈구암의 경우에는 나이가 많은 사람에게 주로 발병하는 것으로 알려져 있다. 또한 혈구암은 골수에 위치하는 림프구에서 유발되는 급성 림프구성 백혈병(acute lymphocytic leukemia)과 과립성 백혈구 및 단핵 백혈구에서 유발되는 골수성 백혈병(myelogenous leukemia)으로 구분되어진다[1,15]. 이러한 혈구암은 화학적 저항성을 가지고 있으므로 치료가 어려우며 재발의 확률도 매우 높은 것으로 보고되어지고 있으며, 혈구암의 치료를 위하여 사용되어지고 있는 다양한

종류의 항암제들은 개개인에 따라서 약리작용이 다르게 나타나고 독성에 의한 부작용이 문제점으로 지적되고 있다. 따라서 혈구암을 치료하는데 있어서 보다 더 효과적인 항암 물질을 발굴하고 이러한 항암 물질의 분자 및 세포 수준에서의 기작을 밝힘으로써 생약 및 천연물을 이용한 치료제의 개발이 요구되어지고 있다.

Programmed cell death라고 불리는 생리학적 과정이며 손상된 세포들의 제거를 위한 중요한 수단인 apoptosis는 개체의 발생단계나 DNA 손상, 바이러스 감염 등에 의한 유전적 조절 하에서 일어나는 정교한 개체의 생존을 위한 방어기전으로 알려져 있다. 이러한 apoptosis의 특징으로는 세포의 수축, 염색질 응축, DNA 단편화, 세포막의 수포화 현상 및 세포 표면에 phosphatidylserine의 발현 등과 같은 형태적 또는 생화학적 변화를 동반한다[18,20,21,37]. 일반적으로 apoptosis는 extrinsic (death receptor-mediated) 및 intrinsic (mitochondrial-mediated) pathway로 구별되며, 이러한 과정은 caspases, death receptors 및 Bcl-2 family 등과 같은 여러 유전자들에 의하여 조절되는 것으로 알려져 있다[13,16,24]. Extrinsic pathway의 경우에는 세포막에 존재하는 death receptor에 특정ligand가 결합함으로써 시작되어 initiator caspase인 caspase-8의 활성화를 유발하며, 이렇게 활성화된 caspase-8은 effector caspase인 caspase-3을 직접적으로 활성화시킴으로서 DNA의 단편화 현상 및 apoptosis를 유발하는

***Corresponding author**

Tel : +82-51-850-8649, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

것으로 알려져 있다[25,43]. 하지만 몇몇 세포의 경우에는 활성화된 caspase-8이 직접적으로 caspase-3을 활성화 시키는 것이 아니라 Bcl-2 homology 3 (BH3)-only protein인 Bid의 단편화를 통한 truncated Bid (tBid)의 형성을 유발시킴으로써 intrinsic pathway를 통한 apoptosis를 유발하기도 한다[27,32]. 또 다른 apoptosis 과정인 intrinsic pathway는 약물, 방사선 또는 reactive oxygen species (ROS) 등과 같은 여러 종류의 물리적 및 화학적인 자극에 의한 Bcl-2 family 단백질들의 발현 변화와 그에 따른 mitochondrial dysfunction에 의하여 유발되는 것으로 알려져 있다[28]. 이러한 mitochondrial dysfunction은 caspase-9를 활성화시키고 활성화된 caspase-9는 caspase-3을 활성화시켜 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 및 β -catenin 등과 같은 기질 단백질들의 분해를 동반한 DNA 단편화를 유발함으로써 apoptosis를 일으키게 된다[18,26,28]. 특히 cystein-containing aspartate-specific protease family인 caspase는 Bcl-2 family 및 inhibitor of apoptosis protein (IAP) family 등과 같은 여러 종류의 유전자들에 의해서 조절된다. Bcl-2 family 단백질들은 세포의 죽음에 관여하는 pro-apoptotic 단백질인 Bax 및 Bad와 세포의 생존에 관여하는 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2 및 Bcl-X_L의 발현 정도에 의하여 mitochondrial dysfunction을 유발함으로써 intrinsic pathway를 통한 apoptosis 과정을 조절하는 것으로 알려져 있다[3,17,19,49]. 한편 baculovirus에 감염된 곤충세포에서 처음 발견된 IAP family는 척추동물 및 *Drosophila melanogaster* 등에서 apoptosis를 조절하는 것으로 알려져 있다[8,42]. 특히 caspase-3 및 caspase-9와 결합하여 이들의 활성을 억제함으로써 Bcl-2 family 단백질에 의해 유발된 apoptosis를 억제하는 것으로 알려져 있다[9-11,14]. 최근 연구에 따르면 많은 종류의 항암 및 암예방 효능이 있는 것으로 알려진 다양한 물질들은 apoptosis 유발에 의한 세포의 죽음을 일으키는 것으로 알려져 있으며, 새로운 항암제 개발에 있어서도 apoptosis 유발이 중요한 기전으로 연구되어지고 있다[22,33].

장미과(Rosaceae)에 속하며 한국, 일본 및 중국 등지에 분포하는 매화(*Prunus mume*)의 열매인 매실은 구연산, 사과산, 화박산 등과 같은 유기산과 함께 풍부한 비타민 및 무기질이 많이 함유되어 있어 피로회복, 간기능 향상, 소화불량, 위장장애, 만성 변비, 피부미용 등에 효과가 좋아서 예로부터 민간처방 약재로 사용되었을 뿐만 아니라 매실주, 매실장아찌, 매실정과, 매실잼 및 매실차 등과 같은 건강식품으로 사용되어져 왔다. 또한 최근 연구에 따르면 free radical scavenger, influenza A virus 억제, *Helicobacter pylori*의 운동성 억제, 혈액 유동성 개선 및 항염증 작용 등과 같은 많은 약리학 및 생물학적 활성을 가지는 것으로 알려져 있어 많은 관심을 받고 있다[5,6,23,34,51]. 또한 매실은 많은 인체 암세포에 있어서 항암활성을 가지는 것으로 보고되어지고 있으나[35,36,38], 항암 효능

에 따른 분자생물학적 기작에 대해서는 명확히 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 매실 추출물의 항암 효능 검증과 관련 기전 연구를 실시하기 위하여 매실의 메탄올 추출물(methanol extract of *P. mume* fruits, MEPM)에 의한 인체 혈구암세포인 U937 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하였고, 이와 연관된 apoptosis 유도 기전 해석을 시도하였다.

재료 및 방법

시료준비

본 실험에 사용된 매실은 동의대학교 부속 한방병원에서 제공 받았으며, 메탄올 추출물(MEPM)을 얻기 위하여 흐르는 물로 충분히 세척하고 건조시킨 후 잘게 분쇄하였다. 건조된 매실 100 g 당 methanol 1 l를 첨가하여 60°C, 150 rpm으로 3일간 교반 후 상층액만 분리하여 3,000 rpm에서 20분간 원심분리시켜 찌꺼기를 제거한 다음 Whatman 필터(No. 2)로 걸러내고 감압 농축과정을 통하여 고형성분을 얻어내어 막자사발로 잘게 마쇄하고 밀봉시켜 -70°C에 보관하였다. 이를 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 이용하여 100 mg/ml의 농도로 만든 다음 적정 농도로 배지에 희석하여 처리하였다.

실험재료

본 실험에서 단백질 분석을 위하여 사용된 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), death receptor (DR) 4, DR5, Fas, FasL, actin, Bcl-2, Bcl-X_L, Bax, Bad, Bid, survivin, XIAP, cIAP-1, cIAP-2, caspase-3, caspase-8, caspase-9, PARP 및 β -catenin 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, immunoblotting을 위해 2차 항체로 사용된 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse 및 anti-rabbit 항체는 Amersham Life Science Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다. 또한 caspase의 *in vitro* 활성 측정을 위한 colorimetric assay kit는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였으며, caspase-3의 활성을 억제하기 위하여 사용된 caspase-3 specific inhibitor인 z-DEVD-fmk는 CalBiochem (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다.

세포배양

실험에 사용된 인체 혈구암세포주인 U937 세포는 한국생명공학연구소(KRIBB, Daejeon, Korea)에서 분주 받았으며, 암세포의 배양을 위해 10%의 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 및 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 RPMI-1640 배지(Gibco BRL)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 성장배지의 교환을 매 48시간마다 실시하여

적정수의 세포를 유지하였다.

Hemocytometer를 이용한 세포 생존율의 측정

MEPM 처리에 의한 세포의 생존율을 측정하기 위하여 세포 배양용 6 well plate에 인체 혈구암세포인 U937 세포를 1×10^5 개/ml의 개수로 well 당 2 ml씩 분주한 다음 MEPM을 적정농도로 처리하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 48시간 후 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 배지를 제거하고 phosphate-buffered saline (PBS)를 각 well 당 1 ml을 첨가하여 세포를 부유시킨 다음 0.5% trypan blue solution (Gibco BRL)을 동량으로 첨가하여 2분간 처리하였다. 처리된 sample을 hemocytometer에 적용한 후 도립 현미경을 이용하여 살아있는 세포를 계수하였으며, 이에 따른 결과를 Microsoft EXCEL program을 사용하여 분석하였다.

MTT assay에 의한 세포 성장억제 조사

MEPM 처리에 의한 세포의 성장억제 정도를 확인하기 위하여 MTT assay를 이용하였다. 먼저 U937 세포에 MEPM을 적정농도로 처리하고 48시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 200 µl씩 분주하고 37°C에서 3시간 동안 다시 배양하였다. 배양이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)를 1 ml씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 96 well plate에 200 µl씩 옮겨서 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 세 번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 Microsoft EXCEL program을 사용하여 분석하였다.

도립 현미경을 이용한 세포의 성장과 형태의 관찰

MEPM 처리에 의한 U937 세포의 형태 변화 정도를 살펴보기 위하여 세포 배양용 100 mm dish에 세포를 1×10^5 개/ml 정도로 분주한 후 MEPM을 적정 농도로 희석 처리하여 배양하였다. 48시간 경과 후 MEPM 처리농도에 따른 성장 정도와 형태의 변화를 도립 현미경을 이용하여 200배의 배율로 관찰한 다음 Axio Vision 프로그램을 이용하여 사진 촬영을 하였다.

DAPI staining에 의한 세포핵의 형태 관찰

Apoptosis가 유발되었을 경우 특이적으로 나타나는 핵의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 MEPM이 처리된 세포를 모은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 37% formaldehyde 용액과 PBS를 1:9의 비율로 섞은 fixing solution을 모아진 세포에 500 µl 첨가하여 충분히 섞

은 후, 상온에서 10분 동안 고정하였다. 고정된 세포를 2,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 fixing solution을 제거하고 PBS 200 µl에 부유시킨 후 세포가 포함되어 있는 PBS 80 µl를 slide glass 위에 떨어뜨리고 1,000 rpm에서 5분간 cyto-spin하여 세포를 slide glass에 부착하였다. 세포가 부착된 slide glass를 PBS로 2~3회 정도 세척하고 PBS가 마르기 전에 0.2%의 Triton X-100 (Amresco, Solon, OH, USA)을 첨가하여 상온에서 10분간 고정한 후 2.5 µg/ml 농도의 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) 용액을 처리하여 상온에서 15분간 염색하였다. 염색이 끝난 후 DAPI 용액을 충분히 세척하고 mounting solution을 처리한 후 형광 현미경을 이용하여 400배의 배율로 각 농도에 따른 암세포의 핵의 형태 변화를 관찰한 다음 Axio Vision 프로그램을 이용하여 사진 촬영을 하였다.

DNA 단편화 분석

Apoptosis 유발의 또 다른 증거인 DNA 단편화 현상의 분석을 위하여 정상 및 MEPM이 48시간 동안 처리된 세포들을 모은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 상층액이 제거된 세포에 850 µl의 lysis buffer [5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100]를 첨가하여 상온에서 30분간 lysis 시킨 다음 14,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심 분리하여 찌꺼기가 제거된 상층액 750 µl를 회수하였다. 회수된 상층액에 proteinase K solution (Sigma)을 0.5 mg/ml의 농도로 처리하여 50°C에서 3시간 동안 반응시킨 후 750 µl의 phenol : chloroform : isoamyl alcohol 혼합 용액 (25:24:1, Sigma)을 첨가하고 30분간 회전교반 시킨 다음 14,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 여기서 얻어진 상층액 600 µl에 300 µl의 isopropanol (Sigma)과 100 µl의 5 M NaCl를 첨가하여 4°C에서 24시간 동안 반응시킨 후, 14,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심 분리시켜 상층액을 제거하고 DNA pellet을 추출하였다. DNA pellet에 RNase A가 적당량 들어 있는 TE buffer를 이용하여 녹인 후, 6× gel loading dye (Bioneer, Daejeon, Korea)를 섞어 주었다. 마지막으로 1.6% agarose gel을 만들어서 1시간 동안 50 V로 전기영동 시킨 후 ethidium bromide (EtBr, Sigma)로 염색하여 DNA 단편화 현상을 확인하였다.

Flow cytometry 분석

인체 혈구암세포에서 MEPM이 유발하는 apoptosis 정도를 정량적으로 분석하기 위하여 정상 및 MEPM이 48시간 동안 처리된 세포들을 모은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 PBS를 이용하여 2~3회 정도 세척하였다. 준비된 세포는 CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 고정 및 염색을 하여 4°C, 암실에서 30분 동안 반응을 시켰다. 반응시

킨 세포를 35-mm mesh를 이용하여 단일세포로 분리한 후 FACSCalibur (Becton Dickinson)를 적용시켜 형광반응에 따른 Cellular DNA content 및 histogram을 CellQuest software 및 Modifit LT (Becton Dickinson) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

준비된 세포에 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]를 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 상층액에 있는 총 단백질을 분리하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 정량한 다음 동량의 Laemmli sample buffer (Bio-Rad)를 섞어서 sample을 만들었다. 동량의 sample을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후, nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시켰다. 분리된 단백질이 전이된 nitrocellulose membrane을 5% skim milk를 처리하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 1차 항체를 처리하여 상온에서 2시간 이상 또는 4°C에서 over night 시킨 다음 PBS-T로 세척(15분간 1번, 5분간 5번)하고 처리된 1차 항체에 맞는 2차 항체 (PBS-T로 1:1500으로 희석하여 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 반응이 끝난 후 암실에서 Enhanced Chemiluminescence (ECL) slution (Amersham Life Science Corp.)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 발현양을 분석하였다.

In vitro caspase-3, -8 및 -9의 activity 측정

Apoptosis 유발에 있어서 중요한 작용을 하는 것으로 알려진 caspase의 활성 정도가 MEPM 처리에 의하여 어떠한 변화를 유발하는지 알아보기 위하여 정상 및 MEPM이 처리된 배지에서 48 시간 배양된 세포를 모은 뒤 상기와 동일한 방법으로 단백질을 추출하고 정량하였다. 150 µg의 단백질이 함유된 50 µl의 sample에 기질 100 µM이 함유된 reaction buffer [40 mM HEPES (pH 7.4), 20% glycerol (v/v), 1 mM EDTA, 0.2% NP-40 and 10 mM DL-DTT] 50 µl를 혼합하여 각 sample 당 총 volume이 100 µl가 되게 하였다. 여기에 caspase 종류에 따른 기질 5 µl를 첨가하여 37°C, 암실에서 3시간 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm의 흡광도를 이용하여 반응의 정도를 측정하였다. 실험에 사용된 기질은 caspase-3의 경우에는 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-p-nitroaniline (pNA)이었고 caspase-8의 경우에는 Ile-Glu-Thr-Asp (IETD)-pNA이었고, caspase-9은 Leu-Glu-His-Asp (LEHD)-pNA였다.

결 과

U937 세포의 생존율 및 증식에 미치는 MEPM의 영향

MEPM의 처리에 따른 U937 세포의 생존율 및 증식에 미치는 영향을 알아 보기위하여 MEPM을 적정 농도로 48시간 동안 처리한 후 hemocytometer counting 및 MTT assay를 실시하였다. Fig. 1A 및 B에 나타낸 바와 같이 U937 세포에 MEPM을 처리하였을 경우 처리 농도 의존적으로 생존율의 감소 및 증식이 억제된다는 것을 알 수 있었으며, 이러한 생존율 및 증식억제 현상과 동반된 세포의 형태 변화를 조사하였다. Fig. 2A에 나타낸 바와 같이 MEPM 처리 농도가 증가할수록 전체적인 세포의 밀도가 감소하였고 apoptosis 유발 시 특이하게 관찰되는 membrane blebbing 현상을 포함한 심한 형태적 변형이 관찰되었다. 이상의 결과에서 MEPM 처리에 따른 생존

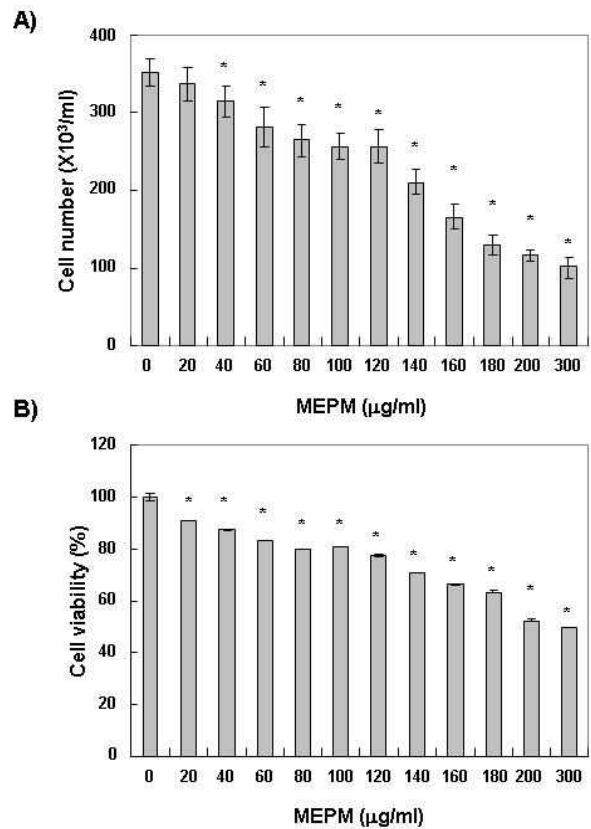


Fig. 1. Growth inhibition of human leukemia U937 cells after treatment with MEPM. Cells were seeded into 6-well plate at 1×10⁵ cells/ml and treated with the indicated concentrations of MEPM for 48 hr. Cell number (A) and viability (B) were determined by hemocytometer counts of trypan blue excluding cells and MTT assay, respectively. Results are expressed as percentage of the vehicle treated control±SD of three separate experiments. Significance was determined using a Student's t-test (*, p<0.05 vs. untreated control).

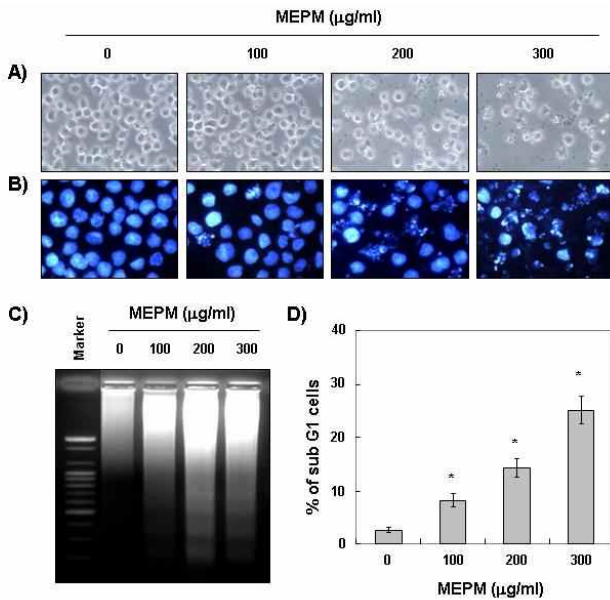


Fig. 2. Induction of apoptosis by MEPM treatment in human leukemia U937 cells. Cells were seeded into 6-well plate at 1×10^5 cells/ml and treated with the indicated concentrations of MEPM for 48 hr. (A) Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, $\times 200$. (B) Stained nuclei with DAPI solution were photographed with a fluorescent microscope using a blue filter. Magnification, $\times 400$. (C) To analyze the DNA fragmentation, the genomic DNA was extracted, electrophoresed in a 1.6% agarose gel and then visualized by EtBr staining. (D) To quantify the degree of apoptosis induced by MEPM, the cells were evaluated for sub-G1 DNA content, which represents the fractions undergoing apoptotic DNA degradation, using a flow cytometer. Results are expressed as percentage of the vehicle treated control \pm SD of three separate experiments. Significance was determined using a Student's t-test (*, $P < 0.05$ vs. untreated control).

을 감소 및 증식억제 현상이 apoptosis 유발과 연관이 있음을 추측할 수 있었다.

Apoptosis 유발에 미치는 WECM의 영향

MEPM 처리에 의해 유발되는 생존율 감소, 증식억제 및 형태변화가 apoptosis 유발과 직접 연관이 있는지를 확인하기 위하여 정상 및 MEPM이 처리된 배지에서 48시간 동안 배양된 U937 세포 핵의 형태변화, DNA 단편화 현상 및 sub-G1기 세포의 빈도를 조사하였다. 먼저 Fig. 2B에 나타난 바와 같이 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DAPI 염색을 실시하고 형광현미경을 이용하여 관찰한 결과, MEPM이 처리되지 않은 정상 배지에서 자란 U937 세포에서는 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나 MEPM이 처리된 세포의 경우는 MEPM의 처리 농도의 증가에 따른 밀도의 감소와 더불어

apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 염색질 응축에 의한 apoptotic body가 관찰되었다. 또한 apoptosis 유발의 또 다른 직접적인 증거에 해당하는 DNA 단편화 여부를 agarose gel 전기영동으로 조사한 결과, Fig. 2C에 나타난 바와 같이 MEPM을 처리하지 않았을 경우에는 DNA 단편화에 의한 DNA laddering 현상을 관찰할 수 없었지만 MEPM 처리 농도 증가에 따라 DNA laddering이 점차 증가되었음을 알 수 있었으며, 이는 MEPM 처리에 의하여 endonuclease가 활성화되어 chromosomal DNA가 단편화되었음을 의미하는 것이다. 다음으로 MEPM 처리에 따른 apoptosis 유발 정도를 정량적으로 비교 분석하기 위하여 상기와 동일한 조건으로 배양된 U937 세포를 대상으로 flow cytometry를 이용하여 apoptosis가 유발되었을 것으로 예상되는 sub-G1기에 해당하는 세포를 측정된 결과는 Fig. 2D에 나타난 바와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 정상 배지에서 자란 암세포에서의 자연적 apoptosis 유발 빈도는 약 2.6%로 매우 낮았으나 MEPM 처리 농도가 증가할수록 sub-G1기의 세포의 빈도가 증가하여 300 µg/ml 처리군에서는 약 25.1%에 해당하는 세포가 sub-G1기로 관찰되었다. 이상의 결과는 MEPM 처리에 의한 생존율 감소, 증식억제 및 형태변화는 apoptosis 유발과 밀접한 연관이 있음을 알 수 있었다.

Apoptosis 조절 단백질의 발현에 미치는 MEPM의 영향

일반적으로 apoptosis는 DR4, DR5, Fas, TRAIL 및 FasL를 포함하는 death receptor 및 ligand에 의하여 유발되는 extrinsic pathway와 Bcl-2, Bcl-X_L, Bax, Bad 및 Bid를 포함하는 Bcl-2 family member에 의하여 유발되는 intrinsic pathway를 경유하여 활성화 되는 것으로 알려져 있다. 따라서 MEPM에 의하여 유발되는 apoptosis에 이들 유전자가 어떠한 영향을 미쳤는지를 확인하였다. 먼저 extrinsic pathway의 활성화에 관여하는 death receptor 및 ligand들의 발현 정도를 확인한 결과, Fig. 3에 나타난 바와 같이 TRAIL, DR4, DR5 및 Fas의 발현에는 큰 변화가 나타나지 않았지만 FasL의 경우에는 MEPM 처리농도 의존적으로 발현이 증가되는 것으로 나타났다. 다음으로 MEPM 처리에 따라 intrinsic pathway의 활성화에 관여하는 Bcl-2 family member들의 발현이 어떠한 영향을 미치는지를 확인하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 anti-apoptotic 유전자인 Bcl-2의 발현이 MEPM 처리농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났으며, pro-apoptotic 유전자로서 death receptor를 통한 caspase-8의 활성화로 인하여 단편화 현상이 유발되는 것으로 알려진 Bid 단백질의 경우 단편화된 형태인 tBid의 발현이 증가하는 것으로 나타났다. 또한 apoptosis 유발에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 caspase와 결합함으로써 그들의 활성을 억제함으로써 apoptosis 유발을 억제하는 것으로 알려진 IAP family의 발현에 MEPM이 어떠한 영향을 미치는 지를 확인한 결과, cIAP-1 및 cIAP-2

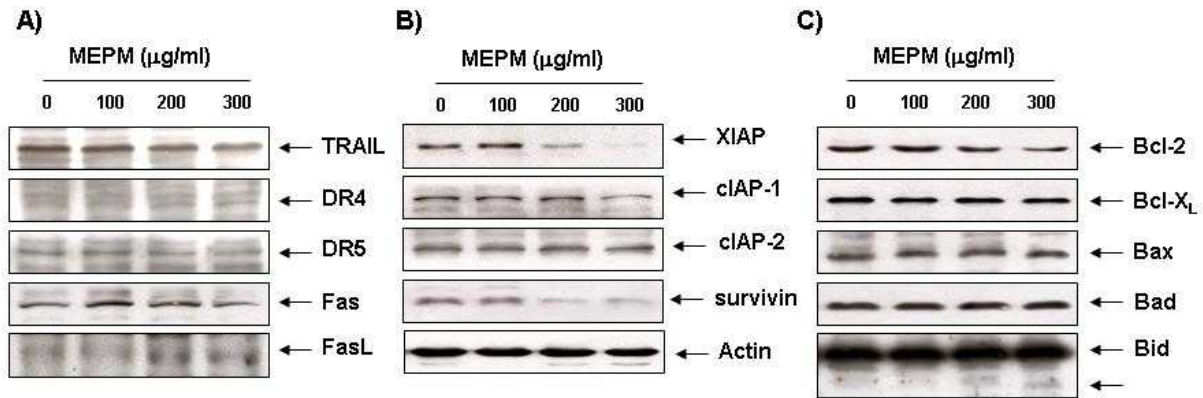


Fig. 3. Expression levels of apoptosis-related proteins by MEPM treatment in human leukemia U937 cells. The cells were treated with the indicated concentrations of MEPM for 48 hr. The cells were lysed and then equal amounts of cell lysates (30 µg) were separated on SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies and the proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

의 발현에는 큰 변화가 관찰되지 않았지만, XIAP 및 survivin의 경우에는 발현 감소가 관찰되었다. 이상의 결과를 살펴볼 때 MEPM에 의하여 유발되는 apoptosis는 extrinsic pathway 및 intrinsic pathway가 모두 관여할 수 있음을 알 수 있었다.

Caspase의 활성 및 기질 단백질의 발현에 미치는 MEPM의 영향

Extrinsic 및 intrinsic pathway의 활성화를 통한 apoptosis 유발에 있어서 여러 종류의 caspase가 관여하는 것으로 알려져 있는데 이들 중 특히 caspase-3, -8 및 -9가 중요한 유전자로 밝혀져 있다. 따라서 MEPM 처리에 의한 apoptosis 유발에 있어서 이들 유전자들이 어떠한 영향을 미치는지를 Western blotting 및 *in vitro* caspase activity assay를 통하여 확인하였다. 먼저 caspase의 발현 정도를 확인한 결과, Fig. 4A에서 나타난 바와 같이 caspase-3 및 -8의 경우에는 활성형 단백질의 발현이 MEPM 처리 농도 의존적으로 증가하였음을 알 수 있었고, caspase-9의 경우에는 불활성형 단백질의 발현이 감소하는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 재확인하기 위하여 caspase의 활성 정도를 직접 분석한 결과, Fig. 4B에 나타난 바와 같이 MEPM 처리에 따라 caspase-3, -8 및 -9의 활성 정도가 급격하게 증가되었다. 다음으로 활성화된 caspase-3에 의하여 특이하게 분해가 일어나는 몇 가지 기질 단백질의 발현에 미치는 MEPM의 영향을 조사하였는데, Fig. 4A에서 볼 수 있듯이 MEPM의 처리에 의하여 DNA repair와 genomic stability에 관여하는 PARP 단백질의 경우에는 주단백질의 발현 감소와 더불어 단편화된 단백질의 발현 증가가 관찰되었으며, 세포내 골격 유지와 부착성 세포의 전사 조절에 중요한 역할을 하는 β-catenin 단백질의 경우에는 단편화된 단백질은 관찰되지 않았지만 주단백질의 발현 감소가 관찰되었다. 이상의 결

과를 살펴볼 때 MEPM 처리에 따른 인체 혈구암세포인 U937 세포에서의 apoptosis 유발은 FasL의 발현 증가로 인한 caspase-8의 활성화와 연계된 Bid의 단편화와 Bcl-2의 발현감소에 따른 caspase-9의 활성화 및 caspase-3의 활성화와 더불어 기질단백질들의 단편화 등과 같은 전형적인 extrinsic 및 intrinsic pathway를 동시에 경유하여 일어난다는 것을 알 수 있었다.

Caspase-3 inhibitor에 의한 apoptosis의 억제

이상의 결과에서 MEPM 처리에 따른 인체 U937 세포에서의 apoptosis 유발에 있어서 caspase-3의 활성화가 중요한 역할을 하는 것으로 나타났으므로 caspase-3의 활성을 억제하였을 경우에 apoptosis가 억제되는지를 여러 가지 방법으로 조사하였다. 먼저 DAPI 염색을 이용하여 핵의 형태를 관찰한 결과, Fig. 5A에서 나타난 바와 같이 MEPM이 처리된 배지에서 자란 암세포의 경우는 전형적인 염색질 응축의 증가가 관찰되었지만, caspase-3 특이적 저해제인 z-DEVD-fmk를 1시간 선처리하여 caspase-3의 활성을 억제한 다음 MEPM을 처리하였을 경우에는 정상배지에서 자란 세포와 마찬가지로 염색질 응축 현상은 관찰되지 않았다. 다음으로 MEPM에 의하여 유발된 증식억제가 z-DEVD-fmk에 의하여 회복되는지를 확인한 결과, Fig. 5B에 나타난 바와 같이 z-DEVD-fmk를 선처리하였을 경우 MEPM 단독 처리군에 비교하여 현저하게 회복되는 것으로 나타났다. 마지막으로 z-DEVD-fmk가 MEPM에 의하여 유발된 DNA 단편화에 어떠한 영향을 미치는지를 관찰한 결과, Fig. 5C에 나타난 바와 같이 MEPM을 단독으로 처리했을 경우에는 DNA 단편화 현상이 유발되었지만 이러한 현상이 z-DEVD-fmk 선처리에 의하여 현저하게 감소되었다. 이상의 결과로 인체 혈구암세포주인 U937 세포에서 MEPM에

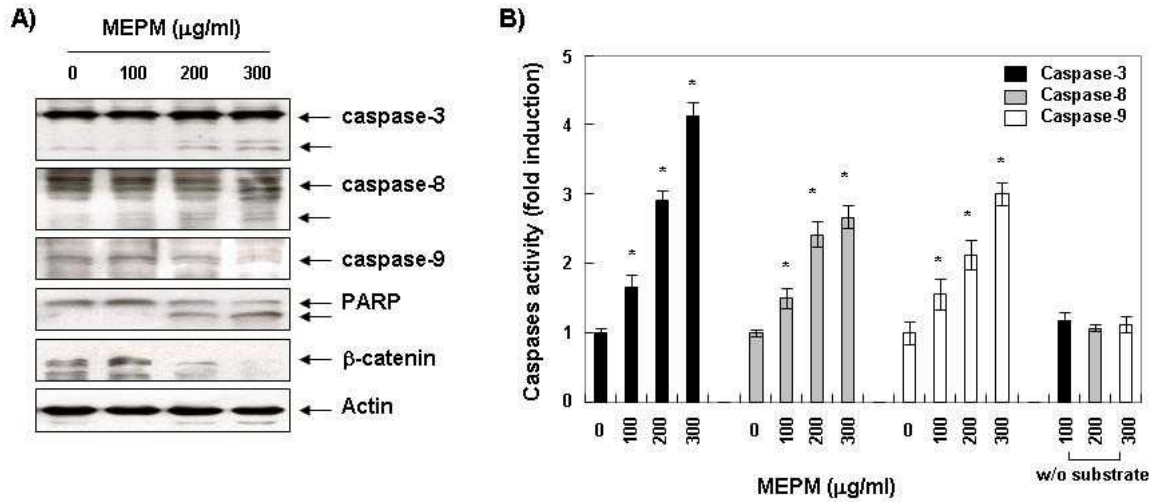


Fig. 4. Activation of caspases and the degradation of the PARP and β -catenin protein by MEPM treatment in human leukemia U937 cells. The cells were treated with the indicated concentrations of MEPM for 48 hr. (A) The cells were lysed and then equal amounts of cell lysates (30 μ g) were separated on SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control. (B) Caspases (-3, -8, and -9) activities were determined using caspase assay kits obtained from R&D according to the protocol of the manufacturer. Results are expressed as percentage of the vehicle treated control \pm SD of three separate experiments. Significance was determined using a Student's t-test (*, $p < 0.05$ vs. untreated control).

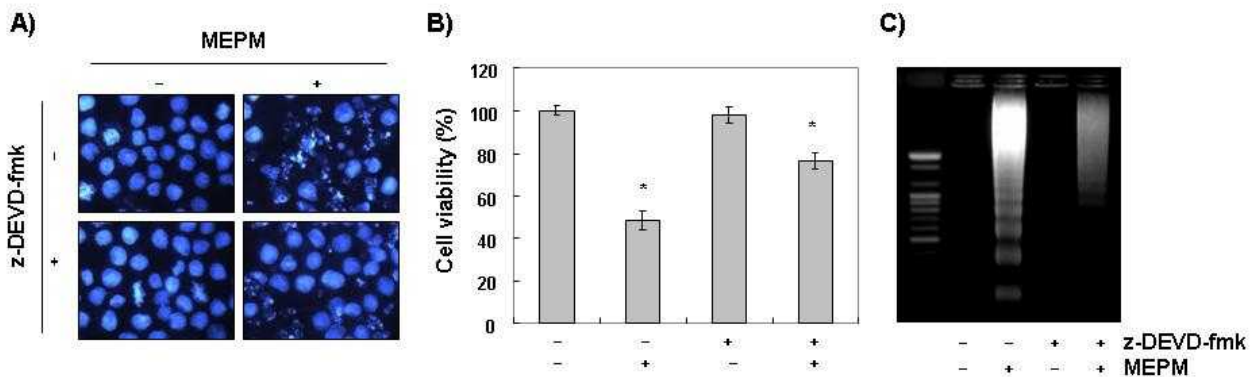


Fig. 5. Inhibition of MEPM-induced apoptosis by the caspase-3 inhibitor in human leukemia U937 cells. U937 cells were pretreated for 1 hr with or without z-DEVD-fmk (50 μ M), and then with MEPM (300 μ g/ml) for an additional 48 hr. (A) The cells were stained with DAPI for 10 min and photographed with a fluorescence microscope using a blue filter. Magnification, $\times 400$. (B) The growth inhibition was measured by the metabolic-by-based MTT assay. Results are expressed as percentage of the vehicle treated control \pm SD of three separate experiments. Significance was determined using a Student's t-test (*, $p < 0.05$ vs. untreated control). (C) DNA fragmentation was analyzed by extracting the fragmented DNA and separating it by electrophoresis in a 1.6% agarose gel containing EtBr.

의하여 유발되는 apoptosis에 있어서 caspase-3이 중요한 조절자로서 역할을 하는 것으로 생각된다.

고찰

장미과에 속하며 동아시아에 널리 분포하는 과일나무인 매화의 열매인 매실은 예로부터 건강식품으로 사용되었을 뿐만

아니라 다양한 질환을 치료하는 민간처방 약재로 사용되어져 왔다[31]. 최근 매실 추출물의 다양한 약리 효과가 보고되어져 오고 있으나[5,6,23,34-36,38,51], 매실 추출물에 의한 항암작용 및 그에 따른 분자생물학적 기작에 대해서는 명확히 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서는 인체 혈구암세포인 U937 세포에서 매실의 메탄올 추출물(MEPM)이 유발하는 항암효과 및 항암 기전을 조사하였다. 이를 위하여 정상 및 MEPM이 함유된 배

지에서 48시간 동안 배양된 암세포들을 대상으로 생존율 및 증식 억제 정도를 조사한 결과, 정상배지에서 자란 암세포와 비교해서 MEPM이 함유된 배지에서 자란 암세포의 생존율 감소 현상 및 증식 억제 정도가 처리농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 이러한 생존율 감소 및 증식 억제 현상이 암세포의 형태 변화에 영향을 미치는지를 확인한 결과, MEPM 처리 농도 의존적으로 급격한 세포 수의 감소 현상이 나타났으며, 특히 apoptosis 유발 시 특이하게 관찰되는 membrane blebbing 현상 등과 같은 형태적 변형이 관찰되었다(Fig. 2A). MEPM 처리에 의하여 나타나는 생존율 감소, 증식 억제 및 형태 변화가 apoptosis 유발과 어떠한 연관성이 있는지를 확인하기 위하여 먼저 암세포의 핵 형태 변화를 관찰한 결과, 처리 농도의 증가에 따라 핵의 밀도 감소와 더불어 nucleosome의 linker DNA 부분의 절단을 유발함으로써 나타나는 DNA 단편화 현상으로서 apoptosis 유발 시 전형적으로 관찰되는 염색질 응축에 의한 apoptotic body 형성 및 DNA 단편화 현상 증가를 관찰할 수 있었고, flow cytometry 분석에 의한 apoptosis 유도의 정량적 증가를 제시하였다(Fig. 2B-D).

Apoptosis는 세포의 성장과 조직의 항상성을 조절하는데 있어서 매우 중요한 역할을 하며, 암의 치료에 있어서 apoptosis의 유발이 중요한 표적으로 생각되어 진다[7,12,48,50]. 일반적으로 apoptosis 과정은 caspases, death receptor 및 Bcl-2 family 등과 같은 여러 유전자들이 관여하며, extrinsic 및 intrinsic pathway에 의해서 유발된다[13,16,24,44]. DR4, DR5 및 Fas 등과 같은 death receptor에 TRAIL 및 FasL 등과 같은 ligand가 결합함으로써 유발되는 extrinsic pathway는 caspase-8을 활성화시킴으로서 하위단계에 있는 caspase-3의 활성화에 직접적으로 관여하거나 Bid의 단편화를 통한 tBid의 형성을 유발시킴으로서 intrinsic pathway를 통한 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있다[2,27,32,40]. Intrinsic pathway의 조절에 있어서 중요한 역할을 하며 mitochondria 외막에 존재하고 있는 Bcl-2 family는 Bcl-2 및 Bcl-X_L 등과 같은 anti-apoptotic 유전자와 Bax, Bak, Bad, Bim 및 Bid 등과 같은 pro-apoptotic 유전자로 구성되어 있으며, 이들 사이에 균형이 깨어지게 되면 mitochondria의 기능 이상을 통한 apoptosis를 유발한다[20,25,29,45]. 한편 caspase와 직접적으로 결합하는 것으로 알려진 IAP family는 apoptosis 유발 시 중요한 역할을 하는 caspases의 활성을 억제함으로써 apoptosis를 억제하는 것으로 알려져 있다. 따라서 IAP family의 발현 억제는 caspases의 활성을 억제하지 못함으로써 apoptosis가 유발되는데 중요한 역할을 하게 된다[9,41]. 본 연구에서 MEPM 처리에 의해 유발된 apoptosis에 있어서 extrinsic 및 intrinsic pathway에 관여하는 유전자들이 어떠한 영향을 미치는지를 확인한 결과, MEPM 처리 농도 의존적으로 FasL의 발현 증가와 더불어 Bcl-2의 발현 감소 및 Bid의 단편화에 따른 tBid의 발현이 증가하였으며, IAP family 중 XIAP 및 survivin의 발현이

감소하는 것으로 나타났다(Fig. 3).

세포가 정상적으로 성장 및 생존할 때 핵과 mitochondria의 외막에 불활성 상태인 proenzyme 형태로 존재하고 있는 caspase는 large subunit 와 small subunit로 구성되어 있으며 apoptosis를 유발하는 세포 내외의 자극에 의하여 활성화되어 표적 단백질들의 분해를 유발한다. 이러한 caspase는 initiator caspase인 caspase-8 및 -9와 effector caspase인 caspase-3, -6 및 -7 등으로 나누어지는데, 세포 내외부의 다양한 신호전달에 의해서 initiator caspase가 활성화되면 하위단계에 있는 effector caspase를 활성화시킴으로서 여러 종류의 기질 단백질들은 분해함으로써 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있다 [39,46,47]. 또한 많은 선행연구에서 caspase의 활성화 자체가 apoptosis의 유발에 대한 증거가 될 수 있다고 보고되고 있으므로 apoptosis 유발에 있어서 caspase의 활성화가 매우 중요하다고 생각되어 진다. 따라서 본 연구에서는 MEPM이 여러 종류의 caspase 중 apoptosis 유발에 직접적으로 관여하는 것으로 알려진 caspase-3, -8 및 -9의 발현 및 활성화에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다. 먼저 caspase의 발현 정도를 확인한 결과, caspase-3 및 -8의 경우에는 활성형 단백질의 발현이 증가하였고 caspase-9의 경우에는 불활성형 단백질의 발현이 감소하는 것으로 나타났으며, *in vitro* assay에서도 세 종류의 caspase의 활성이 현저하게 증가하였음을 확인하였다(Fig. 4A 및 B). 또한 caspase-3의 기질단백질인 PARP 및 β -catenin 단백질이 MEPM의 처리에 의하여 발현이 감소되거나 단편화가 유발되는 것으로 나타났다(Fig. 4A). 이상의 결과를 살펴보면 MEPM에 의해 유발되는 apoptosis에 있어서 여러 가지 유전자들이 관여를 하지만 특히 caspase-3이 apoptosis의 최종 단계에서 중요한 역할을 하는 것으로 생각되어 caspase-3 특이적인 저해제인 z-DEVD-fmk를 이용하여 caspase-3의 활성을 억제하였을 경우에 MEPM에 의하여 유발되는 apoptosis가 억제되는지를 여러 가지 방법을 이용하여 확인하였다. Fig. 5에 나타낸 바와 같이 MEPM을 단독으로 처리하였을 경우에 유발되는 apoptotic body의 형성이 z-DEVD-fmk의 선처리에 의하여 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, MEPM에 의하여 유발된 증식억제 및 DNA 단편화 현상 또한 z-DEVD-fmk의 선처리에 의하여 회복되는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합해 보면 인체 혈구암세포주인 U937 세포에 MEPM을 처리하였을 경우에 유발되는 생존율 감소, 증식 억제 및 형태 변화는 apoptosis 유발과 밀접한 연관이 있음을 알 수 있었다. 이러한 apoptosis 유발에는 FasL의 발현 증가를 통한 caspase-8의 활성화와 이로 인한 Bid 단백질의 단편화와 함께 Bcl-2 단백질의 발현 감소에 의한 caspase-9 및 -3의 활성화와 기질단백질들의 분해가 중요한 역할을 하는 것으로 생각되어지며, IAP family 중 XIAP 및 survivin의 발현 감소로 인하여 caspase의 활성이 억제되지 못하는 것도 apoptosis 유도에 어느 정도 관여했을 것으로 생각되어지며,

z-DEVD-fmk 선처리에 의하여 MEPM에 의하여 유발된 apoptosis가 억제되었다. 따라서 MEPM 처리에 의하여 유발되는 apoptosis는 extrinsic 및 intrinsic pathway를 모두 경유하는 multiple apoptotic pathway에 의하여 조절되어짐을 알 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 농림부 농림기술개발사업의 지원(610003-03-1-SU000)에 의하여 이루어진 결과의 일부입니다.

References

- Abramson, N. and B. Melton. 2000. Leukocytosis: basics of clinical assessment. *Am Fam Physician*. **62**, 2053-2060.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit. 1999. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol*. **11**, 255-260.
- Burlacu, A. 2003. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med*. **7**, 249-257.
- Chang, H., H. Lin, L. Yi, J. Zhu, Y. Zhou, M. Mi, and Q. Zhang. 2010. 3,6-Dihydroxyflavone induces apoptosis in leukemia HL-60 cells via reactive oxygen species-mediated p38 MAPK/JNK pathway. *Eur J Pharmacol*. **648**, 31-38.
- Choi, H. J., O. H. Kang, P. S. Park, H. S. Chae, Y. C. Oh, Y. S. Lee, J. G. Choi, G. H. Lee, O. H. Kweon, and D. Y. Kwon. 2007. *Mume fructus* water extract inhibits pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Med Food*. **10**, 460-466.
- Chuda, Y., H. Ono, M. Ohnishi-Kameyama, K. Matsumoto, T. Nagata, and Y. Kikuchi. 1999. Mumefural, citric acid derivative improving blood fluidity from fruit-juice concentrate of Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc). *J Agric Food Chem*. **47**, 828-831.
- Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer. 2004. Cell death: critical control points. *Cell*. **116**, 205-219.
- De Laurenzi, V. and G. Melino. 2000. Apoptosis. The little devil of death. *Nature*. **406**, 135-136.
- Deveraux, Q. L. and J. C. Reed. 1999. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev*. **13**, 239-252.
- Deveraux, Q. L., N. Roy, H. R. Stennicke, T. Van Arsedale, Q. Zhou, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, G. S. Salvesen, and J. C. Reed. 1998. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome *c* by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J*. **17**, 2215-2223.
- Deveraux, Q. L., R. Takahashi, G. S. Salvesen, and J. C. Reed. 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*. **388**, 300-304.
- Fesik, S. W. 2005. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer*. **5**, 876-885.
- Fulda, S. and K. M. Debatin. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. **25**, 4798-4811.
- Gao, Z., Y. Tian, J. Wang, Q. Yin, H. Wu, Y. M. Li, and X. Jiang. 2007. A dimeric Smac/diablo peptide directly relieves caspase-3 inhibition by XIAP. Dynamic and cooperative regulation of XIAP by Smac/Diablo. *J Biol Chem*. **282**, 30718-30727.
- Gilliland, D. G., C. T. Jordan, and C. A. Felix. 2004. The molecular basis of leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 80-97.
- Gupta, S. 2003. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Int J Oncol*. **22**, 15-20.
- Häcki, J., L. Egger, L. Monney, S. Conus, T. Rossé, I. Fellay, and C. Borner. 2000. Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene*. **19**, 2286-2295.
- Han, S. I., Y. S. Kim, and T. H. Kim. 2008. Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. *BMB Rep*. **41**, 1-10.
- Harris, M. H. and C. B. Thompson. 2000. The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death Differ*. **7**, 1182-1191.
- Jin, Z. and W. S. El-Deiry. 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*. **4**, 139-163.
- Kekre, N., C. Griffin, J. McNulty, and S. Pandey. 2005. Pancratistatin causes early activation of caspase-3 and the flipping of phosphatidyl serine followed by rapid apoptosis specifically in human lymphoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. **56**, 29-38.
- Khan, N., V. M. Adhami, and H. Mukhtar. 2008. Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of cancer. *Biochem Pharmacol*. **76**, 1333-1339.
- Kim, B. J., J. H. Kim, H. P. Kim, and M. Y. Heo. 1997. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (II): anti-oxidative activity and free radical scavenging activity. *Int J Cosmet Sci*. **19**, 299-307.
- Korsmeyer, S. J. 1999. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res*. **59**, 1693s-1700s.
- Kroemer, G. and J. C. Reed. 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*. **6**, 513-519.
- Lawen, A. 2003. Apoptosis-an introduction. *Bioessays*. **25**, 888-896.
- Lazebnik, Y. A., S. H. Kaufmann, S. Desnoyers, G. G. Poirier, and W. C. Earnshaw. 1994. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*. **371**, 346-347.
- Li, H., H. Zhu, C. J. Xu, and J. Yuan. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. **94**, 491-501.
- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri, and X. Wang. 1997. Cytochrome *c* and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. **91**, 479-489.
- Liu, X., C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson, and X. Wang. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome *c*. *Cell*. **86**, 147-157.
- Loeb, L. A., K. R. Loeb, and J. P. Anderson JP. 2003. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. **100**, 776-781.
- Lu, B., X. Wu, Y. Dong, J. Gong, and Y. Zhang. 2009.

- Mutagenicity and safety evaluation of ethanolic extract of *Prunus mume*. *J. Food Sci.* **74**, T82-88.
32. Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome *c* release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481-490.
 33. Meiler, J., and M. Schuler. 2006. Therapeutic targeting of apoptotic pathways in cancer. *Curr. Drug Targets* **7**, 1361-1369.
 34. Miyazawa, M., H. Utsunomiya, K. Inada, T. Yamada, Y. Okuno, H. Tanaka, and M. Tatematsu. 2006. Inhibition of *Helicobacter pylori* motility by (+)-Syringaresinol from unripe Japanese apricot. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 172-173.
 35. Mori, S., T. Sawada, T. Okada, T. Ohsawa, M. Adachi, and K. Keiichi. 2007. New anti-proliferative agent, MK615, from Japanese apricot "*Prunus mume*" induces striking autophagy in colon cancer cells in vitro. *World J. Gastroenterol.* **13**, 6512-6517.
 36. Nakagawa, A., T. Sawada, T. Okada, T. Ohsawa, M. Adachi, and K. Kubota. 2007. New antineoplastic agent, MK615, from UME (a Variety of) Japanese apricot inhibits growth of breast cancer cells *in vitro*. *Breast J.* **13**, 44-49.
 37. Okada, H., and T. W. Mak. 2004. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 592-603.
 38. Okada, T., T. Sawada, T. Osawa, M. Adachi, and K. Kubota. 2007. A novel anti-cancer substance, MK615, from ume, a variety of Japanese apricot, inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells by suppressing Aurora A kinase activity. *Hepatogastroenterology* **54**, 1770-1774.
 39. Oliver, F. J., G. de la Rubia, V. Rolli, M. C. Ruiz-Ruiz, G. de Murcia, and J. M. Murcia. 1998. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J. Biol. Chem.* **273**, 33533-33539.
 40. Peter, M. E. and P. H. Krammer. 2003. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* **10**, 26-35.
 41. Roy, N., Q. L. Deveraux, R. Takahashi, G. S. Salvesen, and J. C. Reed. 1997. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* **16**, 6914-6925.
 42. Salvesen, G. S., and C. S. Duckett. 2002. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 401-410.
 43. Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Krammer, and M. E. Peter. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* **17**, 1675-1687.
 44. Shi, Y. 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell* **9**, 459-470.
 45. Shtilbans, V., M. Wu, and D. E. Burstein. 2010. Evaluation of apoptosis in cytologic specimens. *Diagn. Cytopathol.* **38**, 685-697.
 46. Slee, E. A., M. T. Harte, R. M. Kluck, B. B. Wolf, C. A. Casiano, D. D. Newmeyer, H. G. Wang, J. C. Reed, D. W. Nicholson, E. S. Alnemri, D. R. Green, and S. J. Martin. 1999. Ordering the cytochrome *c*-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol.* **144**, 281-292.
 47. Stennicke, H. R. and G. S. Salvesen. 1998. Properties of the caspases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1387**, 17-31.
 48. Sun, S. Y., N. Jr Hail, and R. Lotan. 2004. Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. *J. Natl. Cancer Inst.* **96**, 662-672.
 49. Thomenius, M. J., N. S. Wang, E. Z. Reineks, Z. Wang, and C. W. Distelhorst. 2003. Bcl-2 on the endoplasmic reticulum regulates Bax activity by binding to BH3-only proteins. *J. Biol. Chem.* **278**, 6243-6250.
 50. Yang, L., Z. Cao, H. Yan, and W. C. Wood. 2003. Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy. *Cancer Res.* **63**, 6815-6824.
 51. Yingsakmongkon, S., D. Miyamoto, N. Sriwilajaroen, K. Fujita, K. Matsumoto, W. Jampangern, H. Hiramatsu, C. T. Guo, T. Sawada, T. Takahashi, K. Hidari, T. Suzuki, M. Ito, Y. Ito, and Y. Suzuki. 2008. *In vitro* inhibition of human influenza A virus infection by fruit-juice concentrate of Japanese plum (*Prunus mume* SIEB. et ZUCC). *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 511-515.

초록 : 인체 백혈병세포에서 매실 추출물에 의한 apoptosis 유도

정유정¹ · 박 철¹ · 정영기³ · 최영현^{1,2,*}

(동의대학교 ¹한의학대학 생화학교실 및 한의학연구소, ²대학원 바이오물질제어학과 및 블루바이오소재 개발 센터, ³동아대학교 생명공학과 및 대학원 의생명과학과)

예로부터 한국, 일본 및 중국에서 민간처방 약재 및 건강식품으로 사용되어온 매실은 다양한 효능을 가지는 것으로 알려져 있으나 인체 암세포에서 유발하는 항암작용 및 그에 따른 분자생물학적 기작에 대해서는 명확히 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서는 인체 혈구암 U937 세포에서 매실의 메탄올 추출물(MEPM)이 유발하는 항암효과 및 항암기전을 조사한 결과, MEPM 처리 농도 의존적으로 암세포의 성장억제 및 apoptosis를 유발하는 것으로 나타났다. MEPM에 의해서 유발되는 apoptosis에는 XIAP 및 survivin 등과 같은 IAP family의 발현 감소와 더불어 FasL의 발현 증가, Bcl-2의 발현 감소 및 Bid의 단편화 현상이 관여하는 것으로 나타났으며, 두 가지 apoptosis 유발 개시 및 최종 apoptosis 단계에서 중요한 역할을 하는 caspase-8과 -9 및 -3의 활성화와 그에 따른 다양한 기질단백질의 발현 감소 및 단편화가 동반되었음을 알 수 있었다. 또한 인위적인 caspase-3의 활성 차단으로 MEPM에 의하여 유발되는 apoptosis가 현저하게 억제되는 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 MEPM은 암세포의 chemotherapeutic agent로서의 가능성을 확인하였지만 향후 지속적인 연구를 통하여 활성물질의 동정 및 관련 기전의 비교 등이 지속적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.