

# 영지 약침액이 인체 위암 세포 성장억제 및 세포사멸 유발에 미치는 영향

이병훈<sup>1</sup> · 김홍기<sup>2</sup> · 김철홍<sup>2</sup> · 윤현민<sup>2</sup> · 송준호<sup>2</sup> · 장경전<sup>2</sup>

<sup>1</sup>부산 명한의원, <sup>2</sup>동의대학교 한의과대학 침구학교실

## Induction of Apoptosis in AGS Human Gastric Cancer Cell by Ethanol Extract of *Ganoderma lucidum*

Byung-Hoon Lee<sup>1</sup>, Hong-Gi Kim<sup>2</sup>, Cheol-Hong Kim<sup>2</sup>, Hyoun-Min Youn<sup>2</sup>,  
Choon-Ho Song<sup>2</sup>, Kyung-Jeon Jang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Myung Oriental Medicine Clinic in Busan, <sup>2</sup>Department of Oriental Medicine,  
Graduate School, Dongeui University

### Abstract

**Objectives :** *Ganoderma lucidum*(Ganoderma or lingzhi, 靈芝) is a well-known oriental medical mushroom containing many bioactive compounds. The possible mechanisms involved in its effects on cancer cells remain to be elucidated. In the present study, the anti-proliferative and apoptotic activities of the *G. lucidum* ethanol extract(GEE), in AGS human gastric cancer cells were investigated.

**Methods :** It was found that exposure of AGS cells to GEE resulted in the growth inhibition in a dose and time dependent manner as measured by trypan blue count and MTT assay. The anti-proliferative effect of GEE treatment in AGS cells was associated with morphological changes and formation of apoptotic bodies, and the flow cytometry analysis confirmed that GEE treatment increased the populations of apoptotic-sub G1 phase. Growth inhibition and apoptosis of AGS cells by GEE were connected with a concentration and time-dependent up-regulation of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL) expression.

**Results :** The levels of XIAP and survivin expression, members of IAP family proteins, were gradually down-regulated by GEE treatment. However other members of IAP family proteins such as cIAP-1 and cIAP-2 remained unchanged in GEE-treated AGS cells. GEE treatment also induced the proteolytic activation of caspase-3, caspase-8 and caspase-9 and a concomitant degradation of poly(ADP-ribose) polymerase(PARP) protein, a caspase-3 substrate protein. Additionally, GEE-induced apoptosis was associated with the inhibition of Akt activation in a concentration and time-dependent manner, and pre-treatment with LY294002, a phosphoinositide 3-kinase(PI3K)/Akt inhibitor, significantly increased GEE-induced growth inhibition and apoptosis.

**Conclusions :** Therefore, *G. lucidum* has a strong potential as a therapeutic agent for preventing cancers such as gastric cancer cells.

**Key words :** *ganoderma lucidum*, apoptosis, TRAIL, XIAP, cancers

## 1. 서 론

위암은 우리나라에서 가장 흔한 암으로서 남자의 경우 전체 암 발생자 중 약 24%(1위) 정도를 차지하고, 여자는 약 15.3%(2위)를 차지하고 있다. 구미에서 위암의 발생 추이는 현저하게 감소하고

· Corresponding author: Kyung-Jeon Jang, Dongeui University  
Korean Hospital, Yangjung-dong, Jin-gu, Busan  
614-710, Korea  
Tel: +82-51-850-8752, Fax: +82-51-867-5162  
E-mail: kjjang59@empal.com

· Received May 17, 2012, Revised May 25, 2012.  
Accepted June 4, 2012

This Work was supported by Dong-eui University Foundation Grant(2010).

있으나 우리나라에서는 아직도 높은 발생률을 보이고 있는데, 2005년 통계 기준으로 위암 사망률은 인구 100,000명당 남자 29.4명 및 여자 15.7명으로 다른 장기에 비해 높은 편이다. 최근 위암의 조기 발견과 예방의 중요성이 감소되면서 위암으로 인한 사망률의 증가는 다소 줄어들고 있으나 여전히 우리나라의 경우 다양한 암종에서 매우 높은 빈도를 차지하고 있다<sup>1)</sup>.

위암은 여러 가지 요인이 복합적으로 작용하여 발생하게 되는데, 위수술의 과거력, 만성 위축성 위염, 악성빈혈, 헬리코박터 파이로리균의 감염, 용종성 폴립같은 병변성 원인이나 식이적 원인(질산염 화합물, 짠 음식, 저단백, 저비타민 식이, 음주, 흡연) 및 가족력에 의한 유전성 요인 등을 원인 요인으로 생각할 수 있다<sup>2)</sup>.

영지는 微溫無毒하며 甘微苦하여 心, 脾, 肺, 肝, 腎經에 들어가며 養心安神, 補氣益血, 止咳平喘하는 효능이 있다<sup>3)</sup>. 또한 polysaccharide, triterpene, nucleoside, steroid, fatty acid, alkaloid, 단백질, 아미노산, 무기염류 등이 포함되어 있어 利尿作用, 解毒作用, 補肝作用, 調壓作用이 뛰어나며, 強心, 強壯, 強精 작용에 탁월한 효능이 있는 것으로 알려져 있으며, 抗菌作用, 抗厭症作用과 免疫作用 뿐만 아니라 抗癌作用 등의 약리 효과가 우수한 것으로 밝혀져 오고 있다<sup>4)</sup>.

영지를 약침액으로 조제하여 연구한 바, 알레르기 반응을 억제하고, 지방세포의 분화를 억제하는 효능이 발표되었으나, 영지 추출물 및 영지 약침액에 의한 구체적인 항암 기전은 아직 완전히 밝혀지지 않은 상태이다<sup>4)</sup>.

이에 본 연구에서는 영지 약침액의 항암효과 및 그와 연관된 기전을 조사하기 위하여 gastric adenocarcinoma(AGS) 인체 위암세포를 대상으로 영지 약침액 처리에 따른 암세포 증식 및 생존을 억제 조건을 설정하여 동일 조건에서 영지 약침액에 의한 위암세포의 증식억제가 특히 세포사멸(apoptosis) 유도를 통하여 이루어지고 있음을 확인하였

다. 또한 세포사멸과 연관된 다양한 유전자들의 발현 변화를 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료 및 시약

#### 1) 영지 약침액

본 실험에 사용된 영지(*Ganoderma lucidum*, 靈芝)는 동의대부속한방병원에서 공급 받은 것으로, 갓부분 500 g을 증류수로 수침(水沈)하여 4 L의 25% ethanol을 첨가하여 10시간 동안 실온에서 추출(*G. lucidum* ethanol extract, GEE)하였다. 추출된 용액을 원심분리하여 상층액을 분리하고, 0.2 mm 여과지에서 여과하여 rotary evaporator로 500 ml이 되도록 감압농축하였다. 실온에서 냉각시킨 뒤 감압필터를 사용하여 불순물을 제거하고 고압멸균하여 -20°C에 보관하였다가 실험직전 배지에 희석하여 사용하였다.

#### 2) 시약

단백질 분석을 위하여 사용된 tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL), death receptor 4(DR4), DR5, Fas, Fas ligand(FasL), actin, Bcl-2, Bcl-XL, Bax, Bad, Bid, XIAP, cIAP-1, cIAP-2, survivin, caspase-3, caspase-8, caspase-9 및 poly(ADP-ribose) polymerase(PARP) 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc.(Santa Cruz, CA, USA) 및 CalBiochem(San Diego, CA, USA)에서 구입하였으며, immunoblotting을 위해 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Life Science Corp.(Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다. 또한 caspases의 *in vitro* 활성 측정을 위한 colorimetric assay kit는 R&D Systems

(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다.

## 2. 암세포배양

실험에 사용한 AGS 인체위암세포는 생명공학연구원(KRIBB, Taejeon, Korea)에서 분양 받았으며 90%의 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL)에 1%의 penicillin 및 streptomycin(Gibco BRL)이 포함된 성장배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 조건하에서 배양하였다. 배지는 매 48시간마다 교환해주었고, 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA, Gibco BRL)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 적정수의 세포를 분주하여 재 배양하였다.

## 3. Hemocytometer를 이용한 세포 생존율의 측정

세포 배양용 6 well plate에 AGS 위암세포를 3×10<sup>4</sup>개/ml의 개수로 well당 2 ml씩 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후 영지 약침액을 적정농도로 처리하여 배양하였다.

72시간 후 배지를 제거하고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 부유시켜서 phosphate-buffered saline(PBS)를 각 well 당 적정량을 첨가하여 세포를 모은 다음, 2,000 rpm으로 5분간 원심 분리 하였다. 상층액을 제거하고 세포만 남긴 다음 다시 PBS를 1 ml 첨가하여 잘 섞은 후 세포 부유액과 0.5% trypan blue(Gibco BRL)를 동량으로 섞은 후 2분간 처리한 후 도립 현미경(Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 살아있는 세포를 계수하였으며, 아울러 영지 약침액 처리에 따른 위암세포의 형태 변화를 동시에 관찰하였다. 이에 따른 결과를 Microsoft EXCEL program을 사용하여 분석하였다.

## 4. MTT assay에 의한 세포 성장억제 조사

세포배양용 6 well plate에 AGS 인체 위암 세포를 3×10<sup>4</sup>개/ml로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 영지 약침액을 배지에 희석하여 처리하여 72 시간 배양 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt(MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 시약을 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 200 µl씩 분주하고 3시간동안 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.

## 5. DAPI staining에 의한 위암세포 핵의 형태 관찰

영지 약침액 처리에 의한 암세포의 apoptosis 유발 여부 확인을 위한 핵의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 준비된 세포를 모은 다음 37% formaldehyde 용액과 PBS를 1 : 9의 비율로 섞은 fixing solution을 모아진 세포에 500 µl 첨가하여 충분히 섞은 후, 상온에서 10분 동안 고정하였다. 2,000 rpm으로 5분간 원심 분리한 후 상층액을 제거하고 PBS 200 µl 를 넣어서 충분히 섞은 후, slide glass 위에 80 µl 정도 떨어뜨려 1,000 rpm에서 5분간 cytospin하였다. PBS로 2~3회 washing하고 PBS가 다 마르기 전에 0.2%의 Triton X-100(Amresco)을 첨가하여 상온에서 10분간 고정하였다. 그 후 다시 PBS로 washing하고 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) 용액을 세포가 고정된 slide glass 위에 적당량을 떨어뜨린 후 빛을 차단하고 상온에서 염색시켰다. 15분 정도 염색시킨 후, PBS로

DAPI 용액을 충분히 세척하고 증류수로 재빨리 세척한 다음 absolute alcohol을 이용하여 탈수과정을 거친 slide glass 위에 mounting solution을 처리한 후 형광 현미경(Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 400배의 배율로 각 농도에 따른 암세포의 핵의 형태 변화를 관찰한 다음 Axio Vision 프로그램을 이용하여 사진 촬영을 하였다.

## 6. Flow cytometry 분석

영지 약침액 처리에 따른 위암세포의 apoptosis 유발에 관한 정량적 분석을 실시하기 위하여, 영지 약침액이 함유된 배지에서 72시간 동안 배양시킨 암세포들을 씻어 내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고 세포들만 모았다. 여기에 다시 PBS를 첨가하여 충분히 씻은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리 한 후 상층액만 버리고 남은 세포에 CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 고정 및 염색을 하여 4°C, 암실에서 30분 동안 반응을 시킨 다음 DNA flow cytometry (Becton Dickinson)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 ModiFit LT(Becton Dickinson) 프로그램으로 분석하였다.

## 7. Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

영지 약침액이 처리된 배지에서 자란 AGS 세포들을 PBS로 씻어 내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 원심분리를 하여 세포를 모았다. 이렇게 모아진 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 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 정량 한 다음 동량의 Laemmli sample buffer(Bio-Rad)를 섞어서 sample을 만들었다. 이렇게 만든 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate(SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane(Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 5% skim milk를 함유한 PBS-T(0.1% Tween 20 in PBS)에 담구어 상온에서 1시간 정도 incubation하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 PBS-T로 15분(5분간 3번)정도 세척하였다. 준비된 membrane에 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. 다시 PBS-T로 세척(10분간 4번)하고 enhanced Chemiluminescence(ECL) 용액(Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 양을 분석하였다.

## 8. *In vitro* caspase-3, -8 및 -9 활성 변화의 측정

영지 약침액 처리에 의한 caspases의 활성화 정도를 알아보기 위하여 영지 약침액이 처리된 배지에서 72시간 배양된 세포를 모은 뒤 단백질을 추출하고 정량하여 각각 150 µg의 단백질을 fluorogenic peptide 기질 100 µM이 함유된 extraction buffer [40 mM HEPES(pH 7.4), 20% glycerol(v/v), 1 mM EDTA, 0.2% NP-40 and 10 mM DL-DTT] 50 µl에 혼합하였으며, microtiter plate에 다시

extraction buffer에 희석하여 각 sample 당 총 volume이 100  $\mu$ l가 되게 하였다. 실험에 사용된 기질은 caspase-3의 경우에는 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-p-nitroaniline(pNA) 이었고 caspase-8의 경우에는 Ile-Glu-Thr-Asp(IETD)-pNA이었으며, caspase-9은 Leu-Glu-His-Asp(LEHD)-pNA였다. 준비된 plate를 37°C에서 3시간동안 incubation 시킨 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm의 흡광도를 이용하여 반응의 정도를 측정하였다.

### 9. 세포 내 ROS 생성 측정

세포 내에 ROS 생성은 DCFH-DA 염색 시약을 이용하여 측정하였다. 영지 약침액이 함유된 배지에서 24시간 동안 배양시킨 암세포들에 DCFH-DA를 20분 간 처리한 후 세포들을 모았다. 여기에 다시 PBS를 첨가하여 충분히 씻은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리 한 후 상층액만 버리고 남은 세포를 PBS에 부유 시킨 다음 DNA flow cytometry에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 ModiFit LT 프로그램으로 분석하였다.

## III. 결 과

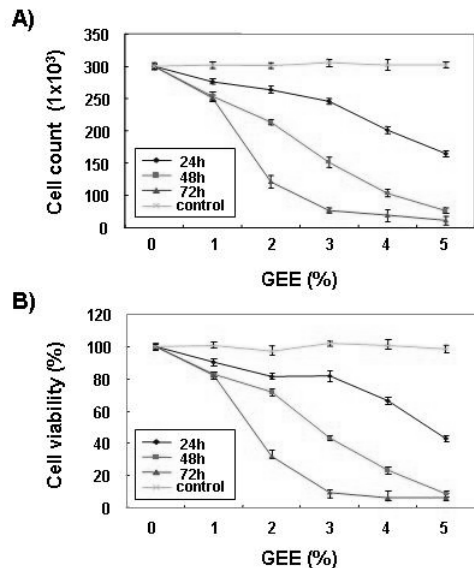
### 1. AGS 위암세포의 성장과 생존율에 미치는 영향

영지 약침액 처리에 따른 AGS 인체 위암세포의 생존율과 세포성장 정도를 알아보기 위하여 영지 약침액을 농도별로 24, 48 및 72시간 동안 처리한 후, hemocytometer로 살아있는 세포의 수를 먼저 계수하였다. Fig. 1A의 결과에 나타난 바와 같이 인체 위암세포주인 AGS 세포에서 영지 약침액의 처리 시간 및 농도의 증가에 따라 살아 있는 세포의 수가 점차 감소되어 2% 처리군에서 72시간 후 살아 있는 세포의 수는 30% 이하로 현저하게 감소하였다. 그리고 MTT assay를 통한 세포 생존율

조사에서도 hemocytometer를 이용한 세포계수 결과와 유사한 결과를 얻었다(Fig. 1B). 이상의 결과에서 살펴볼 때 AGS 위암세포는 영지 약침액에 의해 세포성장과 생존율이 농도와 시간에 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다.

### 2. AGS 위암세포의 형태에 미치는 영향

영지 약침액에 의한 AGS 위암세포의 성장 및 증식억제와 연관된 암세포의 전체적인 형태 변화를 관찰하기 위하여 다양한 농도의 영지 약침액을



**Fig. 1. Effects of *G. lucidum* ethanol extract (GEE) on the viability and cell proliferation of AGS human gastric carcinoma cells.**

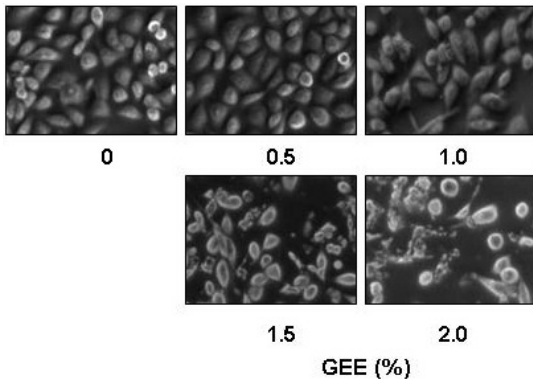
(A) AGS cells were seeded at  $3 \times 10^4$ /ml in a 6-well plate and incubated for 24 h. The cells were treated with variable concentrations of GEE for the indicated times, trypsinized and the viable cells were scored by hemocytometer counts of trypan blue-excluding cells. (B) The cells were seeded at  $3 \times 10^4$ /ml in a 6-well plate and incubated for 24 h. Cells were treated with variable concentrations of GEE for the indicated times. The growth inhibition was measured by the metabolic-based MTT assay.

72시간 동안 처리한 후 도립 현미경을 이용하여 관찰하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 영지 약침액의 처리 농도가 증가할수록 암세포의 밀도가 매우 감소하면서 암세포 표면이 현저히 돌출되면서 긴 분지를 형성하는 구조로 바뀌었으며, 점차 부착력을 상실하고 배지 위로 부유되는 경향성이 증가하는 것과 같은 심한 형태적 변화가 관찰되었다.

### 3. AGS 위암세포 핵의 형태에 미치는 영향

영지 약침액 처리에 따른 AGS 위암세포의 성장 억제, 생존율 감소 및 형태변화가 apoptosis 유발과 연관이 있는지를 조사하였다. 이를 위한 AGS 위암세포 핵의 형태에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 정상 및 영지 약침액이 처리된 배지에서 배양된 암세포를 고정시킨 후 DAPI 염색을 실시하여 형광현미경하에서 관찰한 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같다.

결과에서 나타난 바와 같이 영지 약침액 처리군의 경우 처리 농도가 증가할수록 핵의 밀도 감소



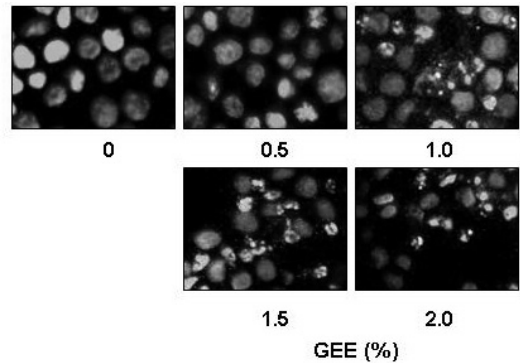
**Fig. 2. Morphological changes of AGS human gastric carcinoma cells after treatment with GEE.** The cells were seeded at  $3 \times 10^4$ /ml in a 6-well plate and incubated for 24 h. Cells were treated with variable concentrations of GEE for 72 h. Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification,  $\times 200$ .

와 더불어 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 염색질 응축 현상이 매우 증가되었다. 이상의 결과는 영지 약침액 처리에 의한 성장 억제, 생존율 감소 및 형태변화가 apoptosis와 직접적인 연관이 있음을 보여주는 것이다.

### 4. 세포사멸 유발의 정량화

이상의 결과에서 AGS 위암세포의 영지 약침액 처리에 의한 암세포의 생존율 억제는 세포사멸 유발과 직접적인 연관이 있었기에 영지 약침액 처리에 따른 세포사멸 유발의 정도를 정량적으로 분석하였다. 이를 위하여 정상 및 영지 약침액이 처리된 배지에서 자란 세포를 모아 cell cycle test kit를 사용하여 염색한 후 flow cytometry를 이용하여 세포주기의 sub-G1기에 해당되는 세포의 빈도를 증가시켰다.

Fig. 4에 나타난 바와 같이 영지 약침액의 처리 농도 및 시간이 증가할수록 sub-G1기의 세포 빈도



**Fig. 3. Formation of chromatin condensation by GEE treatment in AGS human gastric carcinoma cells.**

Cells were treated with GEE for 72 h and then stained with DAPI solution. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescent microscope using blue filter. Magnification,  $\times 400$ .

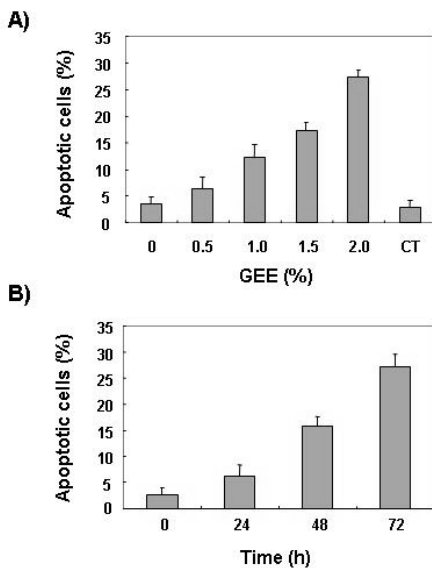
가 증가하여 2% 농도에서 72 시간 처리된 경우 약 27.5% 정도의 세포에서 apoptosis가 유발되었음을 알 수 있었다.

### 5. Fas/FasL, DRs 및 TRAIL의 발현에 미치는 영향

현재까지 apoptosis의 유발 경로는 세포막에 존재하는 death receptor를 경유하는 extrinsic pathway와 mitochondria의 기능 손상에 연관된 intrinsic pathway로 크게 나눌 수 있다. 이상에서 관

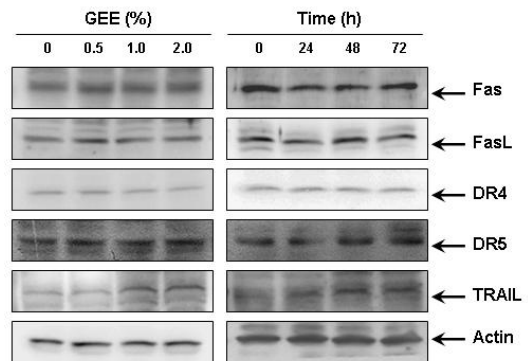
찰된 영지 약침액에 의한 AGS 위암세포의 apoptosis 유발 기전 해석을 위하여 Fas/FasL, DRs 및 TRAIL과 같은 apoptosis 유발의 extrinsic pathway 개시에 중요한 death receptor에 속하는 유전자들의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위하여 Fig. 5에 나타낸 바와 같이 다양한 농도 및 시간 동안 영지 약침액이 함유된 배지에서 자란 AGS 위암세포의 총 단백질을 대상으로 Western blotting 을 실시하였다.

제시된 결과에서 알 수 있듯이 조사된 인자들 중, Fas, FasL, DR4 및 DR5는 큰 변화를 보여주지 않았으나, TRAIL의 경우 영지 약침액 처리 농도 및 시간의 증가에 따라 매우 증가하였다. 이는 영지 약침액이 apoptosis 유발에서 Fas/FasL 경로 보다는 TRAIL 발현 증가를 통한 extrinsic pathway의 활성화가 될 수 있을 가능성을 보여 주는 결과이다(Fig. 5).



**Fig. 4. Increase of sub-G1 cell population by GEE treatment in AGS human gastric carcinoma cells.**

Exponentially growing cells at 50% confluency were treated with the various concentrations of GEE for 72 h(A) or with 2% of GEE for the indicated times(B). The cells were trypsinized and pellets were collected. The cells were fixed and stained with CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit, and analyzed by flow cytometry. The percentages of cells with hypodiploid DNA(sub-G1 phase) contents represent the fractions undergoing apoptotic DNA degradation. Data are means average of two separate experiments.



**Fig. 5. Effects of GEE treatment on the levels of TRAIL, DR4, DR5, Fas and FasL expression in AGS human gastric carcinoma cells.**

AGS cells were treated with the various concentrations of GEE for 72 h(left) or with 2% of GEE for the indicated times(right). The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto 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.

## 6. Bcl-2 family의 발현에 미치는 영향

Mitochondria의 외막에 존재하며 mitochondrial membrane potential(MMP,  $\Delta\psi_m$ )의 유실을 통한 apoptosis 유발에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 Bcl-2 family에 속하는 몇 가지 유전자 발현의 정도에 미치는 영지 약침액의 영향을 Western blotting 방법으로 조사한 결과는 Fig. 6에 나타난 바와 같다.

Fig. 6의 결과에서 알 수 있듯이 대표적인 pro-apoptotic 인자로 알려진 Bax 및 Bad의 단백질 발현은 영지 약침액 처리에 따라 큰 변화가 없었으나, 대표적인 anti-apoptotic 인자인 Bcl-2의 발현은 영지 약침액 처리 농도 및 시간의 증가에 따라 현저하게 감소되었다. 또한 extrinsic pathway와 intrinsic pathway의 중계 역할을 하는 것으로 알려진 Bid의 단백질 발현은 현저하게 감소되었다. 그러나 본 연구에서 사용된 Bid 항체로는 Bid의 단편화된 형태(tBid)의 발현 증가는 관찰할 수 없었다. Bid의 경우 단편화된 tBid가 세포질에서 mitochondria로 이동함으로써 mitochondria 내에 존재하는 apoptosis 유발 인자들을 세포질로 유출시키는 작용을 한다.

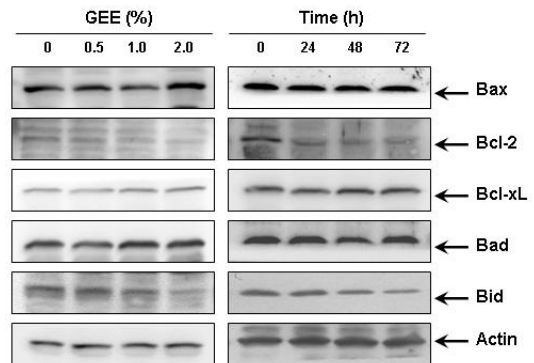
비록 본 연구에서 tBid의 형태를 관찰할 수 없었으나 Bid의 발현이 감소된 점은 영지 약침액에 의한 apoptosis 유발이 extrinsic pathway 및 intrinsic pathway를 동시에 공유할 수 있을 것이다. 또한 Bax 및 Bad의 발현이 큰 변화가 없었지만 Bcl-2의 발현 증가로 상대적인 pro-apoptotic 인자들의 발현이 매우 증대된 점 등으로 미루어 Bcl-2 family에 속하는 인자들이 영지 약침액에 의한 apoptosis 유발에 매우 중요한 역할을 할 수 있음을 알 수 있었다.

## 7. IAP family의 발현에 미치는 영향

Apoptosis 유발의 가장 핵심적인 역할을 하는

caspase와 결합하여 그들의 활성을 억제함으로써 apoptosis 유발을 억제하는 것으로 알려진 inhibitor of apoptosis protein(IAP) family에 속하는 다양한 유전자들이 영지 약침액의 처리에 의하여 어떠한 변화가 나타나는지를 조사하였다. 이를 위하여 동일 조건에서 배양된 AGS 위암세포의 총 단백질을 이용한 Western blotting 방법에 준한 결과는 Fig. 7에 나타난 바와 같다.

결과에서 알 수 있듯이 영지 약침액 처리군에서 조사된 IAP family에 속하는 유전자 중, cIAP-1 및 cIAP-2의 발현에 영지 약침액은 아무런 변화를 미치지 못하였다. 그러나 XIAP 및 survivin의 발현은 영지 약침액 처리 농도 및 시간 의존적으로 발현이 매우 감소되었다. 이상의 결과는 영지 약침액 처리에 의한 AGS 위암세포의 apoptosis 유발에 IAP family 인자들의 선택적 발현 저하가 관련되어 있으며, 이들의 발현 저하는 caspase의 활성 증



**Fig. 6. Effects of GEE treatment on the Bcl-2 family member proteins in AGS human gastric carcinoma cells.**

AGS cells were treated with the various concentrations of GEE for 72 h(left) or with 2% of GEE for the indicated times(right). The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto 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.



가에 어느 정도 영향을 줄 수 있을 것으로 추정된다.

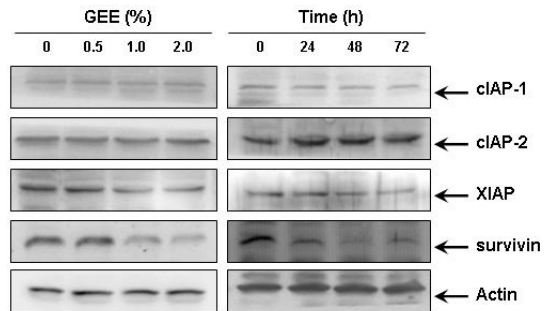
### 8. Caspases의 발현 및 활성화에 미치는 영향

Extrinsic 및 intrinsic pathway를 포함한 전체적인 apoptosis 유발에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 caspases의 발현 및 그들의 활성화에 미치는 영지 약침액의 영향을 조사하였다. 이를 위하여 다양한 농도의 영지 약침액이 72시간 처리된 AGS 위암세포를 대상으로 apoptosis 유발 경로에서 extrinsic pathway의 대표적인 initiator caspase인 caspase-8, intrinsic pathway의 대표적인 initiator caspase인 caspase-9 및 두 경로의 공통된 대표적인 effector caspase에 해당되는 caspase-3의 발현을 해당 항체를 이용한 immunoblotting 법 및 각 caspase의 fluorogenic peptide 기질을 이용한 in vitro 활성화의 정도를 직접 측정하였다.

Fig. 8에 나타낸 결과에서 알 수 있듯이 영지 약침액의 처리 농도가 증가함에 따라 조사된 3 가지 caspase의 활성화에 해당되는 단편화된 단백질의 발현이 모두 증가되었다. 이상의 Western blotting에 의한 결과를 재확인하고 이들 caspases의 활성을 정량적으로 비교하기 위하여 caspases의 활성화 정도를 직접 분석한 결과, Fig. 9에 나타난 바와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 영지 약침액의 처리 농도 증가에 따라 조사된 3가지 caspase의 활성이 모두 처리 농도 의존적으로 증가되어 2.0%의 영지 약침액 72시간 처리에 의하여 모두 4~5배의 증가를 보여 주었다.

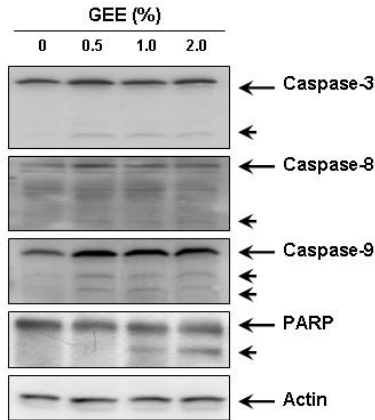
한편 DNA repair 및 genomic stability에 관여하며 apoptosis 유도의 가장 뚜렷한 마커로 사용되는 caspase-3의 대표적인 기질 단백질인 PARP의 발현에 미치는 영지 약침액의 영향을 조사한 결과는 Fig. 8에 나타낸 바와 같다. 정상적인 PARP 단백질은 약 116 kDa의 분자량을 가지나 caspase-3의

활성화로 apoptosis가 일어난 세포에서는 단편화되어 85 kDa 크기의 단백질로 분해된다. Fig. 8에 제시한 결과에서 알 수 있듯이 1.0%의 영지 약침액이 희석된 배지에서 배양된 AGS 위암세포에서 단편화된 단백질의 발현이 관찰되었으며, 2.0% 영지 약침액 처리군에서는 85 kDa로 단편화된 PARP의 발현이 매우 증가되었다. 이는 영지 약침액 처리에 의하여 AGS 위암세포에서 caspase-3의 활성화에 의한 결과이며, 특히 caspase-9 뿐만 아니라 caspase-8도 영지 약침액 처리에 의하여 활성화된 점은 영지 약침액 처리에 의한 AGS 위암세포의 apoptosis 유발에는 extrinsic pathway와 intrinsic pathway가 동시에 관여하고 있음을 보여주는 결과이다.



**Fig. 7. Effects of EGG on the levels of anti-apoptotic IAP family members in AGS human gastric carcinoma cells.**

AGS cells were treated with the various concentrations of GEE for 72 h(left) or with 2% of GEE for the indicated times (right). The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti- cIAP-1, anti-cIAP-2, anti-XIAP and anti-survivin antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.



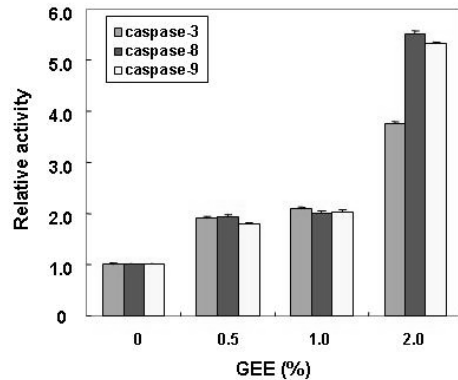
**Fig. 8. Effects of GEE treatment on the levels of caspase-3, -8, -9 and PARP expression in AGS human gastric carcinoma cells.**

AGS cells were treated with the various concentrations of GEE for 72 h. The cells were lysed, and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-caspase-3, anti-caspase-8, anti-caspase-9 and anti-PARP antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

### 9. 세포 내 ROS 생성에 미치는 영향

다양한 세포 내·외 신호에 의하여 발생하는 ROS는 DNA 및 mitochondria의 손상을 유발시키면서 apoptosis 유발 촉진 신호로 작용하기도 한다. 다음은 이상에서 관찰된 영지 약침액에 의한 AGS 위암세포의 apoptosis 유발이 ROS 생성과 연관성이 있는지의 여부를 조사하였다. 이를 위하여 2%의 영지 약침액이 희석된 배지에서 자란 AGS 위암세포를 대상으로 DCFH-DA를 처리한 후 DNA flow cytometry 분석을 실시하였다.

Fig. 10의 결과에서 알 수 있듯이 영지 약침액의 처리 1시간부터 ROS의 생성이 대조군에 비하여 증가되었으며, 이는 3시간 처리까지 지속되었다. 그러나 그 후부터는 대조군의 수준으로 다시 회복되는 경향성을 보여주어 영지 약침액 처리 초기 단



**Fig. 9. Activation of caspase-3, caspase-8 and caspase-9 by GEE treatment in AGS human gastric carcinoma cells.**

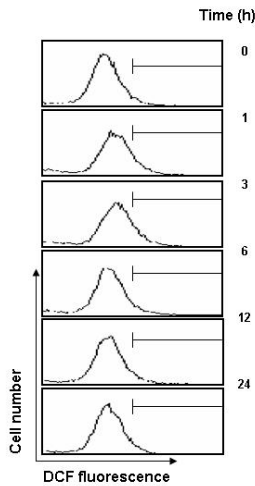
AGS cells were treated with indicated concentrations of GEE for 72 h, collected and then lysed. Aliquots (150 µg proteins) were incubated with DEVD-pNA, IETD-pNA and LEHD-pNA for caspase-3, caspase-8 and caspase-9 activity, respectively, at 37°C for 3 h. The released fluorescent products were measured. The data shown are means±SD of three independent experiments.

계에 ROS의 생성이 동반되었음을 알 수 있었다.

이러한 영지 약침액 처리에 따른 초기 ROS의 생성이 위암세포의 증식 억제 및 apoptosis 유발에 필수적으로 요구되는지의 여부를 조사하기 위하여 대표적인 ROS scavenger인 N-acetyl-L-cysteine (NAC)을 1시간 선처리 후 영지 약침액을 다시 처리하여 그에 따른 암세포의 증식 및 apoptosis 유발의 정도를 비교하였다. Fig. 11의 결과에서 알 수 있듯이 NAC에 의한 인위적인 ROS의 생성 억제는 영지 약침액에 의한 AGS 위암세포의 증식억제나 apoptosis 유발에 큰 영향을 미치지 못하였다. 이는 영지 약침액에 의한 ROS의 생성이 apoptosis 유발과는 연관성이 없음을 의미하는 것이다.

### 10. Akt 단백질의 발현 및 인산화에 미치는 영향

Akt는 phosphoinositide 3-kinase(PI3K)의 신호

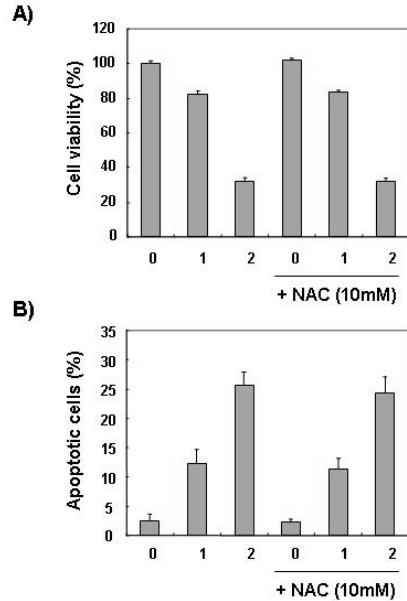


**Fig. 10. Increased ROS generation by GEE treatment in AGS human gastric carcinoma cells.**

AGS cells were treated with 2% GEE for the indicated times and collected. The cells were stained with DCF2HDA for flow cytometry analysis. At each time point, the fluorescent intensity was measured using a flow cytometer.

기전의 하위 단백질로써 세포의 생존과 증식에 중요한 역할을 하는 단백질이다. 영지 약침액 항암활성의 또 다른 기전 해석을 위하여, 영지 약침액에 의한 위암세포의 증식억제 및 apoptosis 유발에 이 단백질의 비활성화가 동반되는지의 여부를 조사하였다. 이를 위하여 영지 약침액이 처리된 배지에서 배양된 암세포를 대상으로 Akt 단백질의 발현 및 그들의 활성화 변화를 조사하였으며, 활성화의 여부는 인산화의 정도로서 판정하였다.

Fig. 12A에 나타난 결과에서 알 수 있듯이 영지 약침액의 처리 농도 증가에 따라 Akt 단백질 전체의 발현에는 큰 변화가 없었지만, 영지 약침액의 처리 농도가 증가할수록 Akt의 활성형인 인산화된 Akt(pAkt)의 발현은 현저하게 감소되었다. 이러한 경향성은 영지 약침액의 처리 시간 증가에 따른 결과에서도 유사하였다(Fig. 12B). 따라서 이러한 영지 약침액 처리에 따른 Akt의 인산화 감소가 apoptosis 유발에 직접적으로 관여하는지의 여부를

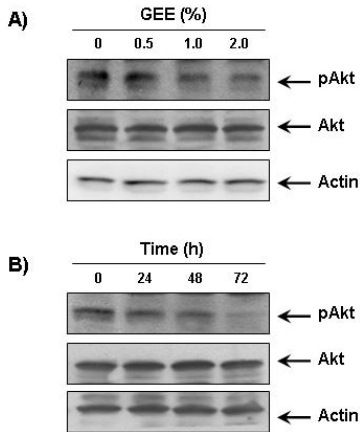


**Fig. 11. Effect of N-acetyl-L-cysteine(NAC), a ROS scavenger, in GEE-induced growth inhibition and apoptosis in AGS human gastric carcinoma cells.**

(A) AGS cells were treated with or without NAC(10 mM) for 1 h before challenge with 1.0% and 2.0% GEE for 72 h. The cell viability was then determined using a MTT assay. (B) The cells under the same conditions as(A) were evaluated for sub-G1 DNA content using a flow cytometer. Results represent the mean of triplicate determinations.

조사하였다. 이를 위하여 PI3K/Akt 특이적 저해제로 알려진 LY290042를 처리하여 Akt 활성을 인위적으로 다소 억제시켰을 경우 영지 약침액에 의한 apoptosis 유발이 더욱 증가되는지의 여부를 조사하였다.

Fig. 13A의 결과에서 알 수 있듯이 영지 약침액 단독 처리에 의하여 Akt의 비활성화나 PARP의 단편화가 이루어지지 않는 조건에서 Akt의 활성을 인위적으로 억제시켰을 경우, LY290042 단독 처리군에 비하여 PARP의 단편화 정도가 현저하게 증가되었다. 아울러 정량적인 평가에서도 Akt 저해제와 영지 약침액의 동시 처리에 의하여 AGS의 위



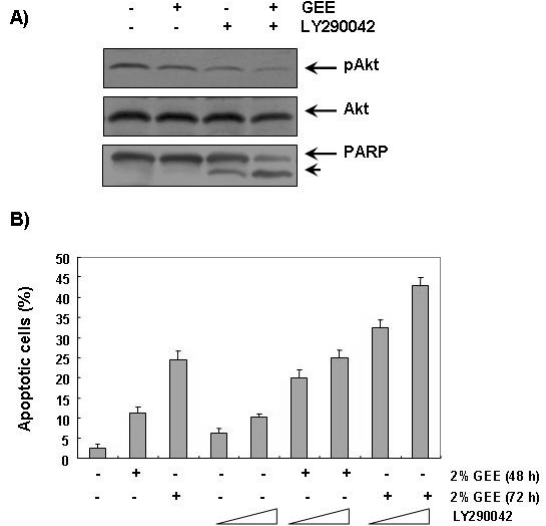
**Fig. 12. Inactivation of Akt by GEE treatment in AGS human gastric carcinoma cells.**

AGS cells were treated with the various concentrations of GEE for 72 h(A) or with 2% of GEE for the indicated times(B). The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with anti-phospho-Akt(pAkt) and anti-Akt antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

암세포 apoptosis 유발이 매우 증가될 수 있음을 알 수 있었다(Fig. 13B). 이는 영지 약침액에 의한 apoptosis 유도에 Akt의 비활성화가 매우 중요한 역할을 하고 있음을 의미한다.

#### IV. 고 찰

암이란 악성 종양을 총칭하는 용어로 개체를 구성하는 정상 세포가 각종 자극에 의하여 유전자의 형질 전환이 발생하고 그 결과 변형 세포가 유전적으로 무절제한 증식을 함으로써 형성된 변형 세포 집단을 뜻하며, 빠른 성장, 침윤, 체내 각 부위의 확산 및 전이 등과 같은 특성이 있어 생명의 위협을 초래한다. 전 세계적으로 이러한 암으로 인한 사망률이 증가하고 있으며, 우리나라의 경우도 예외가 아니다. 그 중에서 위암은 우리나라에서 매



**Fig. 13. Increase of GEE-induced apoptosis by inhibition of Akt signal pathway in AGS human gastric carcinoma cells.**

(A) AGS cells were treated with 25  $\mu$ M LY294002, a PI3K/Akt inhibitor, for 1 h before a challenge with 2.0% GEE for 72 h. The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with anti-pAkt, anti-Akt and anti-PARP antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. (B) AGS cells were treated with LY294002(12.5 and 25  $\mu$ M) for 1 h before a challenge with 2.0% GEE for 48 h and 72 h. The cells were evaluated for sub-G1 DNA content using a flow cytometer. Data are means average of two separate experiments.

우 높은 빈도를 차지하고 있다<sup>1)</sup>.

한의학에서 癌은 腫瘍, 腸覃, 癭瘤, 癭贅, 癥瘕, 積聚, 噎膈, 反胃, 惡瘡, 岩 등의 범주에서 취급하고 있으며, 발생 원인은 外感邪氣, 七情의 변화, 飮食失調 및 精氣虛弱 등으로 인하여 氣滯血瘀가 되거나 臟腑의 기능이 失調되어 발생하는 것으로 볼 수 있으며, 治法으로 益氣建脾, 滋陰補血 등의 扶正法과 清熱解鬱, 祛濕解毒 등의 祛邪法 및 扶正祛邪의 방법이 제시되고 있다<sup>5)</sup>.

영지는 微溫無毒하며 甘微苦하여 心, 脾, 肺, 肝,

腎經에 들어가며 養心安神, 補氣益血, 止咳平喘하는 효능이 있으며<sup>3)</sup>, polysaccharide, triterpene, nucleoside, steroid, fatty acid, alkaloid, 단백질, 아미노산, 무기염류 등이 포함되어 있어 利尿作用, 解毒作用, 補肝作用, 調壓作用이 뛰어나고, 強心, 強壯, 強精 작용에 탁월한 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 抗菌作用, 抗厭症作用과 免疫作用 뿐만 아니라 抗癌作用 등의 약리 효과가 우수한 것으로 밝혀져 오고 있는데<sup>4)</sup>, 영지를 약침액으로 조제하여 연구한 바, 영지 약침액에 의한 구체적인 항암 기전은 아직 완전히 밝혀지지 않은 상태이다<sup>4)</sup>.

본 연구에서는 영지 약침액의 항암활성에 대한 기전 해석의 시도로써 영지 약침액이 인체 위암세포주인 AGS 세포의 증식과 생존율에 미치는 영향과 이와 연관된 apoptosis 유발 여부 및 관련 기전을 조사하였다. 이를 위하여 먼저 정상배지 및 영지 약침액이 함유된 배지에서 자란 AGS 위암세포의 성장 및 생존율을 trypan blue와 MTT assay를 이용하여 비교 분석하였다. Fig. 1A 및 B에 나타난 바와 같이 정상배지에 비해서 영지 약침액이 처리된 배지에서 자란 세포에서 증식 및 생존율의 억제현상이 뚜렷하게 관찰되었다. 이러한 증식억제 및 생존율의 감소현상이 세포의 형태에 어떠한 영향을 미치는 지를 확인한 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같이 영지 약침액 처리에 따라 세포질의 응축 및 부착 능력의 상실에 따라 배지 위로 부유하는 세포가 증가하는 등의 심한 형태적 변형을 동반하였다. 이러한 영지 약침액의 처리에 의한 암세포 증식 억제, 생존율 감소 및 형태 변화가 apoptosis 유발과 밀접한 연관성이 있을 것으로 기대되어 이에 대한 증거를 제시하기 위하여 암세포의 핵 형태 변화를 관찰한 결과, Fig. 3에 나타난 바와 같이 영지 약침액을 처리하지 않은 암세포에서는 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나 영지 약침액이 처리된 암세포의 경우, 처리 농도 의존적으로 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 염색질 응축에 의한 apoptotic body의 증가

현상을 관찰할 수 있었다<sup>6)</sup>. 이는 nucleosome의 linker DNA 부분의 절단에 의한 DNA 단편화의 결과이므로 영지 약침액 처리에 의한 암세포의 증식 억제, 생존율의 감소 및 형태적 변형이 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음을 시사하여 주는 것으로 생각된다. 또 다른 apoptosis 유발에 관한 증거로서 flow cytometry 분석에 의한 apoptosis 유발 세포군에 해당하는 sub-G1기에 속하는 세포들의 빈도를 확인함으로써 apoptosis 유발정도를 정량적으로 조사한 결과는 Fig. 4A 및 B에 나타난 바와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 영지 약침액 처리 농도 및 시간 의존적으로 sub-G1기에 해당하는 세포의 증가가 관찰되었다. 이상의 결과에서 영지 약침액 처리에 의한 인체 위암세포주인 AGS 세포에서의 증식억제, 생존율 감소 및 형태변화는 apoptosis의 유발과 밀접한 관계가 있다는 것을 알 수 있었다.

Programmed cell death라고도 불리는 apoptosis는 개체 보존 수준에서 손상된 세포들의 제거를 위한 중요한 수단으로써 개체의 발생단계나 DNA 손상, 바이러스 감염 등에 의한 유전적 조절하에서 일어나는 정교한 개체의 생존을 위한 방어기전으로 알려져 있으며, 만약 apoptosis 과정이 실패하게 되면 암과 같은 여러 가지 질병의 원인이 되는 것으로 알려져 있다<sup>7)</sup>. 이러한 apoptosis 유발은 intrinsic pathway 및 extrinsic pathway의 두 가지 중요한 apoptotic pathway로 구분되어 진다. 특히 extrinsic pathway의 경우는 FasL 또는 TRAIL과 같은 death receptor들에 의하여 조절되며, 이때 caspase-8은 이 과정의 중요한 initiator caspase로 작용한다<sup>8)</sup>. 먼저 FasL의 경우에는 tumor necrosis factor(TNF) receptor superfamily에 속하는 Fas (CD95/Apo-1)와 결합함으로써 apoptosis를 개시하는 것으로 알려져 있다<sup>9)</sup>. 또 다른 death receptor ligand인 TRAIL은 Apo-2 ligand로 알려져 있으며 두 가지 death domain-containing agonistic receptor인 DR4 및 DR5와 결합함으로써 apoptosis를 유발

하는 것으로 알려져 있다. 하지만 osteoprotegerin, DcR1(TrAIL-R3) 및 DcR2(TrAIL-R4)와 같은 세 종류의 decoy receptor와 결합을 하게 되면 TrAIL signaling이 억제된다<sup>10)</sup>. 특히 정상세포는 TrAIL에 대한 저항성을 가지는 반면 암세포의 경우에는 TrAIL에 대해 독성을 가지므로 암세포에서만 특이적으로 작용하는 새로운 항암물질로서의 가능성을 인정받고 있으며 이에 관한 많은 연구가 진행되고 있다<sup>11)</sup>. 따라서 본 실험에서는 인체 위암 세포주인 AGS 세포에서 영지 약침액에 의한 apoptosis 유발에 있어서 death receptor 및 death receptor ligand가 관여를 하는지 확인한 결과, Fig. 5에 나타난 바와 같이 Fas, FasL, DR4 및 DR5는 영지 약침액 처리에 따라 그들의 발현에 아무런 변화가 관찰되지 않았지만 TrAIL의 경우에는 영지 약침액 처리시간 및 농도 의존적으로 단백질의 발현양이 현저하게 증가하는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 살펴볼 때 영지 약침액에 의한 apoptosis 유발에 있어서 TrAIL의 발현 증가로 인한 death receptor와의 결합증가 등과 같은 extrinsic pathway의 활성화가 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

Apoptosis pathway 중 intrinsic pathway에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 Bcl-2 family에 속하는 단백질들은 네 가지의 Bcl homology(BH) domains(BH1 - BH4) 중 최소한 한 개의 domain을 포함하고 있으며, mitochondria 외막에 존재하여 mitochondria 보존과 mitochondria에 의해 유도되는 apoptosis를 조절하는 중요한 조절자이다<sup>12)</sup>. Bcl-2 family 단백질들은 apoptosis를 억제하는 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-W, Bfl-1, Bcl-B와 apoptosis를 유발하는데 관여하는 pro-apoptotic 단백질인 Bax, Bak, Bcl-XS, Bok 및 BH3 only 단백질인 Bid, Bim, Bad, Puma, Noxa으로 구성되어 있다<sup>13)</sup>. Bcl-2 family의 anti- 및 pro-apoptotic 단백질들은 서로 결합하여 복합체를 형성하는데 이들 사이의 균형이 깨어지게 되

면 mitochondrial membrane의 permeability 변화가 유발되어 mitochondria의 기능이 상실됨으로써 mitochondria 내부로부터 cytosol로 cytochrome c가 방출되어 cysteine-related proteases인 caspases, 종양 억제 유전자인 p53, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절함으로써 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다<sup>14)</sup>. 본 실험에서는 영지 약침액이 인체 위암세포주인 AGS 세포에서 유발하는 apoptosis에 있어서 Bcl-2 family에 속하는 단백질들에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다. Fig. 6에 나타난 바와 같이 영지 약침액을 농도 및 시간별로 처리한 결과 pro-apoptotic 단백질인 Bax 및 Bad의 발현에는 큰 변화가 나타나지 않았지만 대표적인 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2의 발현이 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 death receptor의 활성화를 통한 apoptosis 유발에 중요한 역할을 하는 Bid 단백질의 경우에도 단편화된 형태인 tBid를 관찰할 수 없었으나 발현양 자체가 현저하게 감소하는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 살펴볼 때 영지 약침액에 의한 AGS 세포에서의 apoptosis 유발은 extrinsic pathway 및 intrinsic pathway가 동시에 작용하는 것으로 판단되며 이로 인한 mitochondria membrane의 permeability 변화와 그에 따른 cytochrome c의 방출이 중요한 역할을 하는 것으로 생각되어진다.

Caspases 의존적인 apoptosis는 여러 단계로 조절되는데 그 중 IAP family 단백질들은 caspases와의 직접적인 결합을 통하여 그들의 효소적 활성을 억제하는 것으로 알려져 있다. IAP family는 전사 조절인자인 nuclear factor kappa B(NF- $\kappa$ B)에 의해 조절되며 apoptosis 유발 시 중요한 역할을 하는 caspases와의 결합을 통하여 caspases를 직접적으로 억제하는 등 apoptosis의 신호전달 연구에서 있어서 매우 중요한 유전자로써 human IAPs는 현재까지 8가지가 밝혀져 있다<sup>15)</sup>. 현재까지 밝혀진 8가지 중, human IAPs는 한 개 이상의 baculovirus

IAP repeat(BIR) domain을 가지며, 이들 중 일부는 caspases의 ubiquitination 및 degradation을 조절하는 RING finger domain 또는 protein-protein interaction 기능을 하는 caspase-recruitment domain(CARD)을 가지는 것으로 알려져 있다<sup>16)</sup>. IAP의 중요한 기능으로는 BIR domain 의존적인 상호작용 및 caspase-3, caspase-7 및 caspase-9의 억제를 통한 apoptosis의 억제기작이다. 특히 IAP family 중 가장 강력한 IAP로 알려진 X-linked IAP(XIAP)는 caspases와 높은 친화력을 가지는 것으로 알려져 있는데 XIAP의 BIR3 domain은 caspase-9와 결합하는 반면에 BIR1 및 BIR2 domain은 활성화형 caspases-3 및 caspase-7과 결합함으로써 apoptosis를 억제한다<sup>17)</sup>. 이 외에도 다른 IAP family인 cIAP-1, cIAP-2 및 survivin의 경우에도 다양한 caspases와의 결합을 통하여 apoptosis를 억제하는 것으로 알려져 있다<sup>18)</sup>. 본 실험에서는 영지 약침액 처리에 의하여 IAP family 단백질들의 발현에 어떠한 변화가 나타나는지를 조사한 결과, Fig. 7에 나타난 바와 같이 cIAP-1 및 cIAP-2의 발현에는 큰 변화가 관찰되지 않았지만 XIAP 및 survivin의 경우에는 영지 약침액 처리농도 및 시간의존적으로 발현양의 현저한 감소가 관찰되었다. 따라서 영지 약침액에 의한 apoptosis 유발에 있어서 IAP family들의 발현변화에 의한 caspases의 활성화가 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

Apoptosis 유발에 있어서 caspase protease라는 효소가 중요한 조절인자로서 작용하는 것으로 알려져 있는데, 이들은 세포가 정상적으로 성장 및 생존할 때에는 핵과 mitochondria의 외막에 불활성 상태인 proenzyme 형태로 존재하지만 apoptosis 유발 신호에 의하여 활성화되면 많은 기질 단백질들은 분해함으로써 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>19)</sup>. 이들 caspases는 apoptosis 과정 중 초기에 작용하는 caspase-2, caspase-8, caspase-9 및 caspase-10 등과 같은 initiator caspases와 후기에 작용하는 caspase-3, caspase-6 및 caspase-7 등과

같은 effector caspases로 나누어진다. Initiator caspases 중 caspase-8은 활성화된 death receptor에 의해 형성된 DISC에 의하여 활성화되며, caspase-9는 mitochondria에서 유리된 cytochrome c에 의해서 형성된 apoptosome에 의하여 활성화되어 effector caspases인 caspase-3을 활성화시킴으로써 많은 표적 단백질들을 분해하여 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>20)</sup>. Caspase-3이 활성화되면 많은 표적 단백질들을 분해하여 apoptosis를 유발하게 되는데 가장 대표적인 기질 단백질로는 DNA repair, DNA stability 및 전사조절에 관여하는 PARP 단백질 등이 존재한다. PARP 단백질은 nuclear enzyme으로서 DNA repair 동안 DNA의 결합을 인지하는 F1 및 F2라고 하는 두 개의 zinc finger motif를 가지고 있으며 molecular nick sensor 기능을 하는 N-terminal DNA binding domain과 NAD<sup>+</sup>가 결합하는 C-terminal catalytic domain으로 구성되어 있다<sup>21)</sup>. Caspase-3가 활성화되면 PARP 단백질의 Asp214와 Gly215 사이에서 분해가 일어나서 116 kDa의 분자량을 가진 PARP 단백질이 85 및 24 kDa의 단편으로 proteolytic cleavage가 유발되는 것으로 알려져 있다<sup>22)</sup>. 본 실험에서는 여러 종류의 caspases 중 intrinsic pathway 및 extrinsic pathway를 통한 apoptosis 유발에 직접적으로 관여하는 것으로 알려진 caspase-3, -8 및 -9의 발현과 기질단백질인 PARP 단백질의 단편화 현상에 미치는 영지 약침액의 영향에 대해서 조사하였다. Fig. 8에서와 같이 caspase-3, caspase-8 및 caspase-9의 경우에는 비활성형 단백질의 감소는 관찰되지 않았지만 활성화형 단백질의 발현이 현저하게 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 활성화형 단백질의 증가를 재확인하기 위해서 *in vitro* assay를 이용하여 조사한 결과, Fig. 9에 나타난 바와 같이 조사된 caspases 모두에서 활성 정도가 현저하게 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한 caspase-3의 기질단백질인 PARP의 경우에도 영지 약침액 처리 농도 증가에 의하여 단편화 정도의 증

가가 관찰되었다. 이상의 결과를 살펴보면 영지 약침액 처리에 의한 AGS 위암세포에서의 apoptosis 유발은 extrinsic pathway 및 intrinsic pathway를 통한 caspase-8 및 caspase-9의 활성화로 인하여 caspase-3 활성화 및 기질단백질인 PARP로 연결되고 있음을 알 수 있었다.

ROS는 살아있는 세포에서의 물질대사과정 중에 지속적으로 생산이 되고 있으며, 이러한 생리적인 조건에서의 세포 내 ROS 유지는 산화환원반응의 균형과 증식에 중요한 역할을 한다<sup>23)</sup>. 그러나 ROS가 과도하게 축적되면 lipid peroxidation, protein oxidation, enzyme inactivation 및 oxidative DNA damage 등과 같은 세포손상을 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>24)</sup>. 일반적으로 대부분의 암세포에서는 ROS가 증가되어 있으며, 물질대사의 활성화 및 ROS 생산의 증가와 연관된 oxidative stress를 가진다. 따라서 암세포에서는 ROS 제거억제 및 외부로부터의 ROS의 첨가 등과 같은 약간의 ROS stress에 대해서도 손상을 입기 쉬운 생화학적 특징을 가진다<sup>25)</sup>. 또한 ROS의 생성을 증가시키는 약물에 의해서 apoptosis가 유발될 수 있는 것으로 보고되어지고 있다<sup>26)</sup>. 따라서 본 실험에서는 먼저 다양한 세포 내·외 신호에 의하여 발생하는 ROS가 영지 약침액 처리에 의해서도 증가되는지를 확인하였다. Fig. 10에 나타난 바와 같이 영지 약침액을 처리하였을 경우 처리 1시간부터 ROS의 생성이 증가되는 것으로 나타나 3시간 정도까지 지속되었으며 이후에는 다시 감소하는 것으로 나타났다. 이는 영지 약침액이 초기 단계에서 ROS의 생성을 증가시킨다는 것을 보여주는 결과이다. 이러한 ROS의 증가가 apoptosis 유발에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 ROS inhibitor인 NAC을 1시간 선처리하여 ROS의 생성을 인위적으로 억제시킨 다음 영지 약침액을 처리한 결과, Fig. 11에서와 같이 AGS 위암세포의 증식억제나 apoptosis 유발에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다. 이상의 결과로서 영지 약침액이 ROS의 생성을 증가

시키지만 이는 영지 약침액에 의한 apoptosis 유발과는 아무런 연관성이 없다는 것을 알 수 있었다.

한편 serine/threonine tyrosine kinase인 Akt는 PI3K의 신호기전의 하위 단백질로서 여러 종류의 암세포에서 Akt는 과발현되어 있으며, anti-apoptotic signaling pathway에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>27)</sup>. 일반적으로 Akt는 Bad, glycogen synthase kinase 3 $\beta$ (GSK3 $\beta$ ) 및 FOXO transcription factor 등의 단백질을 인산화시키는 것으로 알려져 있다. Pro-apoptotic 단백질인 Bad의 경우 인산화되면 mitochondria로의 translocation이 억제가 되어 기능을 하지 못하는 것으로 알려져 있으며, GSK3 $\beta$ 의 경우는 pro-apoptotic mediator로써 mitochondrial permeability를 증가시켜 apoptosis 유발에 관여하지만 Akt에 의해서 인산화가 되면 불활성화되는 것으로 알려져 있다. 또한 FOXO transcription factor는 Bim, Bcl-6, FasL 및 TRAIL 등의 발현을 조절함으로써 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있다. 하지만 FOXO transcription factor가 Akt에 의하여 인산화되면 빠르게 핵으로부터 세포질로 재배치가 되어 유전자의 transcription을 하지 못하게 된다<sup>28)</sup>. 따라서 본 실험에서는 영지 약침액에 의한 apoptosis 유발에 있어서 Akt가 관여하는지를 확인하기 위하여 Akt 단백질의 발현 변화를 조사한 결과, Fig. 12에 나타난 바와 같이 전체 단백질의 발현에는 아무런 변화가 나타나지 않았지만 인산화된 Akt의 발현은 처리농도 및 시간 의존적으로 현저히 감소하는 것으로 조사되었다. 영지 약침액 처리에 의한 pAkt의 감소가 apoptosis 유발에 직접적으로 관여하는지를 확인하기 위하여 PI3K/Akt 특이적 저해제인 LY290042를 1시간 선처리하여 Akt의 활성을 억제시킨 다음 영지 약침액을 처리하여 apoptosis 유발 정도가 증가하는지를 확인하였다. Fig. 13에 나타난 바와 같이 영지 약침액 단독 처리군에 비하여 Akt의 활성을 인위적으로 억제시켰을 경우 PARP의 단편화 현상이 현저하게 증가되었으며,



apoptosis의 유발 정도도 증가하는 것으로 나타났다. 이는 영지 약침액에 의한 apoptosis 유도에 있어서 Akt의 비활성화가 중요한 역할을 한다는 것을 의미하는 결과이다.

이상의 결과에서 영지 약침액에 의한 인체 위암 세포주인 AGS 세포에서의 증식억제, 생존율 감소 및 형태변화는 apoptosis 유발과 밀접한 연관이 있었으며, 이러한 apoptosis 유발에는 TRAIL의 발현 증가를 통한 caspase-8의 활성화 등과 같은 extrinsic pathway 및 Bcl-2의 발현 감소를 통한 caspase-9의 활성화 등과 같은 intrinsic pathway가 모두 관여하여 effector caspase인 caspase-3의 활성화와 그에 따른 기질단백질인 PARP의 단편화를 유발하는 것으로 나타났다. 또한 caspases의 활성화를 억제하는 것으로 알려진 IAP family 중 XIAP 및 survivin의 발현 감소가 이러한 과정에 연관되어 있었으며, 암세포의 성장과 생존에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 Akt의 인산화 억제가 영지 약침액에 의한 인체 위암세포주인 AGS 세포에서의 apoptosis 유발에 관여하는 것으로 나타났다. 본 실험에서 도출된 결과들은 영지 약침액의 생화학적 항암기전 해석을 이해하고 향후 지속적인 연구를 위한 귀중한 자료로 사용 될 것으로 생각된다.

## V. 결 론

영지 약침액의 항암활성과 관계된 분자생물학적 연구를 위하여 AGS 위암세포의 증식억제 및 생존율 저하와 연관된 apoptosis 유발에 미치는 유전자들의 발현 및 활성변화를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 영지 약침액은 처리 농도와 시간에 비례하여 AGS 위암세포의 증식과 생존율을 감소시켰다.
2. 농도 의존적으로 형태변화를 일으켰다.
3. 농도의 증가에 따른 apoptotic body 관찰을 보였다.

4. 농도 및 시간 의존적으로 세포의 빈도를 증가시켰다.
5. apoptosis 유발에서 death receptor와 유관한 유전자인 TRAIL의 발현을 증가시켰다.
6. Bcl-2 family에 속한 유전자 중 anti-apoptotic Bcl-2의 발현을 억제하였고, Bid의 발현을 감소시켰다.
7. 농도와 시간에 비례하여 IAP family 유전자들 중 XIAP 및 survivin 발현을 현저하게 감소시켰다.
8. caspase-3, caspase-8 및 caspase-9의 단편화에 따른 활성화를, 특히 caspase-3 기질단백질인 PARP의 단편화를 농도 의존적으로 증가시켰다.
9. ROS 생성을 증가시켰다.
10. Akt 활성을 현저하게 감소시켰으나 Akt 저해제 동시 처리에 의한 apoptosis 유발을 매우 증가시켰다.

이상의 결과로 영지 약침액의 AGS 위암세포의 증식 억제 및 생존율 저하는 내외적인 경로가 동시에 관여된 apoptosis 유도에 의한 것이며, Akt 활성의 억제가 경로의 활성화와 밀접한 연관성이 있음을 알 수 있었다.

## 감사의 글

This Work was supported by Dong-eui University Foundation Grant(2010).

## 참고문헌

1. Kim JY, Kwon O. Garlic intake and cancer risk: an analysis using the Food and Drug Administration's evidence-based review system for the scientific evaluation of health claims. *Am J Clin Nutr.* 2009 ; 89 : 257-64.

2. Mbulaiteye SM, Hisada M, El-Omar EM. Helicobacter Pylori associated global gastric cancer burden. *Front Biosci.* 2009 ; 14 : 1490-4.
3. A joint compilation committee of the college of oriental medicine in Korea. *Herbology*(5th edition). Seoul : Younglimsa. 1999 : 498-9.
4. Kang KH, Youn HM. Study on anti-allergic effect of ganoderma lucidum herbal acupuncture and ganoderma lucidum extract. *Journal of Pharmacopuncture* 2007 ; 10(3) : 37-46.
5. Kon Ga. A study on Cancer and Lump. Seoul: Sungbosa. 1984 : 25-7.
6. Shi L, Nishioka WK, Th'ng J, Bradbury EM, Litchfield DW, Greenberg AH. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science.* 1994 ; 263 : 1143-5.
7. Evans VG. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol Int.* 1993 ; 17 : 461-76.
8. Peták I, Houghton JA. Shared pathways: death receptors and cytotoxic drugs in cancer therapy. *Pathol Oncol Res.* 2001 ; 7 : 95-106.
9. Timmer T, de Vries EG, de Jong S. Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application? *J Pathol.* 2002 ; 196 : 125-34.
10. LeBlanc HN, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ.* 2003 ; 10 : 66-75.
11. Belka C, Jendrossek V, Pruschy M, Vink S, Verheij M, Budach W. Apoptosis-modulating agents in combination with radiotherapy- current status and outlook. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004 ; 58 : 542-54.
12. Nikiforos K, Kontogeorgos G. Bcl-2 Gene family in endocrine pathology: a review. *Endocr Pathol.* 2000 ; 11 : 205-13.
13. Reed JC. Drug insight: cancer therapy strategies based on restoration of endogenous cell death mechanisms. *Nat Clin Pract Oncol.* 2006 ; 3 : 388-98.
14. Scorrano L, Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 ; 304 : 437-44.
15. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, McKenzie AE. The inhibitors of apoptosis(IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene.* 1998 ; 17 : 3247-59.
16. Checinska A, Hoogeland BS, Rodriguez JA, Giaccone G, Krzyt FA. Role of XIAP in inhibiting cisplatin-induced caspase activation in non-small cell lung cancer cells: a small molecule Smac mimic sensitizes for chemotherapy-induced apoptosis by enhancing caspase-3 activation. *Exp Cell Res.* 2007 ; 313 : 1215-24.
17. Huang Y, Park YC, Rich RL, Segal D, Myszka DG, Wu H. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell.* 2001 ; 104 : 781-90.
18. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas(CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.* 1998 ; 58 : 5315-20.
19. Rao L, White E. Bcl-2 and the ICE family of apoptotic regulators: making a connection. *Curr Opin Genet Dev.* 1997 ; 7 : 52-8.
20. Singhal S, Vachani A, Antin-Ozerkis D, Kaiser LR, Albelda SM. Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: a

- review. Clin Cancer Res. 2005 ; 11 : 3974-86.
21. Muller S, Briand JP, Barakat S, Lagueux J, Poirier GG, De Murcia G, et al. Auto-antibodies reacting with poly(ADP-ribose) and with a zinc-finger functional domain of poly(ADP-ribose) polymerase involved in the recognition of damaged DNA. Clin Immunol Immunopathol. 1994 ; 73 : 187-96.
  22. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, et al. Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. Cell. 1995 ; 81 : 801-9.
  23. Nicotera TM, Privalle C, Wang TC, Oshimura M, Barrett JC. Differential proliferative responses of Syrian hamster embryo fibroblasts to paraquat-generated superoxide radicals depending on tumor suppressor gene function. Cancer Res. 1994 ; 54 : 3384-8.
  24. Randerath K, Randerath E, Smith CV, Chang J. Structural origins of bulky oxidative DNA adducts(type II I-compounds) as deduced by oxidation of oligonucleotides of known sequence. Chem Res Toxicol. 1996 ; 9 : 247-54.
  25. Huang P, Feng L, Oldham EA, Keating MJ, Plunkett W. Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. Nature. 2000 ; 407 : 390-5.
  26. Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. Cancer Res. 1991 ; 51 : 794-8.
  27. Hawes BE, Luttrell LM, van Biesen T, Lefkowitz RJ. Phosphatidylinositol 3-kinase is an early intermediate in the G beta gamma-mediated mitogen-activated protein kinase signaling pathway. J Biol Chem. 1996 ; 271 : 12133-6.
  28. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). Cell. 1996 ; 87 : 619-28.