

## T24 방광암세포에서 Luteolin과 TRAIL의 복합 처리에 따른 Apoptosis 유도

박현수<sup>1</sup> · 최영현<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>부산대학교 한의학전문대학원  
<sup>2</sup>동의대학교 한의과대학 생화학교실  
<sup>3</sup>항노화연구소 및 Blue-Bio 소재개발센터

### Induction of Apoptosis by Combination Treatment with Luteolin and TRAIL in T24 Human Bladder Cancer Cells

Hyun Soo Park<sup>1</sup> and Yung Hyun Choi<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>School of Korean Medicine, Pusan National University, Gyeongnam 626-870, Korea  
<sup>2</sup>Dept. of Biochemistry, College of Oriental Medicine, Donggeui University, Busan 614-052, Korea  
<sup>3</sup>Anti-Aging Research Center and Blue-BioIndustry RIC, Donggeui University, Busan 614-714, Korea

**ABSTRACT** Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) can selectively induce apoptosis by targeting cancer cells. However, some cancer cells are resistant to TRAIL-induced cytotoxicity. One method of overcoming TRAIL resistance is combination treatment with reagents to sensitize cells to TRAIL. Luteolin, a flavonoid, has been shown to have anti-cancer effects by inducing apoptosis and cell cycle arrest in various cancer cell lines *in vitro*. In this study, we investigated the effects of combination treatment with non-toxic concentration of TRAIL and luteolin in T24 human bladder cancer cells. Combined treatment with luteolin and TRAIL significantly inhibits cell proliferation via activation of caspases by inducing Bid truncation, up-regulation of Bax and down-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). However, the apoptotic effects of combination treatment with luteolin and TRAIL were significantly inhibited by specific caspases inhibitors. Taken together, these results indicate that combination treatment with TRAIL and luteolin can induce apoptosis in TRAIL-resistant cancer cells through down-regulation of XIAP and modulation of tBid and Bax expression.

**Key words:** T24, luteolin, TRAIL, apoptosis, caspase

## 서 론

전 세계인의 사망원인 중 높은 비율을 차지하고 있는 암은 여러 가지 요인에 의해 발병하며 정상세포와는 달리 활발한 증식과 침윤 및 전이를 유발하는 질병으로 정의된다. 중앙암 등록본부에서 발표된 2010년 국가암등록통계에 따르면 방광암은 60~70대에서 주로 발생하며, 특히 남성의 경우 전체 암중에서 7번째로 많이 발생하였다. 방광암 유발의 제일 큰 원인으로는 흡연이 있으며, 이 외에 직업적인 특성상 여러 가지 화학물질에 많이 노출되는 경우와 유전, 세균에 의한 요로감염 등이 거론되고 있지만 아직 불명확한 점이 많다 (1). 방광암은 수술 후에도 재발 확률이 높은 것으로 알려져 있어 (2,3) 방광암을 치료하는데 있어서 더욱 효과적인 생리 활성을 갖는 물질을 발굴하고 그와 관련된 분자 및 세포수준에서의 기전을 밝히는 것이 중요하다고 할 수 있다.

세포의 죽음은 크게 apoptosis와 necrosis로 나뉜다.

물리적 상해나 여러 가지 독성에 의해 유발되어 염증반응을 일으키는 necrosis와는 달리 apoptosis는 능동적인 세포의 죽음 과정으로 주변 조직에 염증반응 없이 식세포작용에 의해 깨끗이 제거되는 특징이 있다. 이러한 현상은 세포 내부의 정교한 신호전달에 의해 일어나며, 생체의 발생 및 항상성 유지에 중요한 역할을 한다(4-6). 현재까지 밝혀진 apoptosis가 일어나는 기전은 Bcl-2 family 단백질들에 의해 mitochondrial membrane permeability의 변화가 유발되어 caspase 단백질들의 활성화가 일어나 apoptosis가 일어나는 intrinsic pathway와 세포외부의 apoptotic ligands에 의해 세포막에 있는 여러 가지 death receptor(DR)와 결합하여 death-inducing signaling complex(DISC)를 형성하여 caspase 단백질들을 활성화시켜 apoptosis를 일으키는 extrinsic pathway로 나눌 수 있다(7,8).

최근 인간의 수명연장과 식습관의 변화로 암 발생률이 증가하고 있는데 암의 예방과 치료에 효과적인 방법 중의 하나가 천연물질의 활용이다. 특히 천연 식품에 많이 함유되어 있는 플라보노이드류는 항염증 및 항산화를 비롯하여 다양한 암종류에 항암활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다

Received 19 April 2013; Accepted 16 May 2013

\*Corresponding author.

E-mail: choiyh@deu.ac.kr, Phone: 82-51-850-7413

(9-11). 플라보노이드 계열 중 하나인 luteolin은 식물의 잎에 많이 함유되어 있고 인체 내에서 여러 가지 생리활성 기능을 가지고 있다고 알려져 있다(12). 최근 연구에 따르면 HepG2 간암 세포주에서 luteolin이 c-Jun NH2-terminal kinase(JNK)의 활성화와 Bax/Bak의 mitochondria로의 이동을 유도하여 apoptosis를 일으킨다고 보고되었으며(13), 구강편평세포암종에서 G1 arrest와 apoptosis를 일으켜 세포증식을 억제한다고 보고되었다(14). 최근 본 연구실에서는 폐암세포를 이용하여 luteolin에 의한 apoptosis가 소포체(endoplasmic reticulum) 경로를 통하여 이루어지며, 이 과정에서 autophagy가 관여하고 있음을 밝힌 바 있다(15). 아울러 신장암세포에서의 luteolin에 의한 apoptosis 유도는 Akt 경로의 불활성화와 연관이 있었으며(16), 전립선 암 세포에서는 vascular endothelial growth factor receptor 경로를 차단함으로써 암세포의 증식을 억제시킬 수 있음이 보고된 바 있다(17). 이 외에도 HeLa 자궁경부암세포와 HepG2 간암세포, HT29 대장암 세포에서 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL)의 감수성을 증가시켜 apoptosis를 일으킨다고 알려져 있으며(18), 폐암세포 및 자궁 경부암세포에서도 luteolin은 TRAIL 저항성을 극복할 수 있는 것으로 보고되었다(19,20). 이러한 결과들은 luteolin과 TRAIL의 복합 처리를 통해 단일물질 처리보다 더 적은 양의 농도를 사용하기 때문에 암 치료에서 보다 안전하고 효과적인 방법으로 제시될 수 있지만, 방광암세포에서는 아직 알려진 바가 없다.

본 연구에서는 TRAIL 저항성 T24 인체 방광암세포에서 luteolin과 TRAIL의 복합 처리를 통해 apoptosis가 효과적으로 유발될 수 있음을 확인했으며 그와 관련된 기전에 관한 유의적인 결과를 얻어 이를 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

본 실험에 사용된 luteolin은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 100 mM 농도로 녹여 사용하였다. TRAIL은 Koma Biotech(Seoul, Korea)에서 구입하여 3차 distilled water(D.W)에 녹여 사용하였다. 암세포의 증식억제 정도를 측정하기 위한 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT)와 세포 핵의 형태변화 관찰을 위한 4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. Caspase-3 억제제인 z-Asp-Glu-Val-Asp(DEVD)-fmk와 caspase-8 억제제인 z-Ile-Glu-Thr-Asp(IETD)-fmk, caspase-9 억제제인 z-Leu-Glu-His-Asp(LEHD)-fmk 및 pan-caspase 억제제인 z-VAD-fmk은 Calbiochem(San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. 단백질 발현 분석을 위한 western blotting에 사용된 1차 및 2차 항체는 모두 Santa Cruz Biotechnology

(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

### 세포 배양 및 MTT assay

실험에 사용한 T24 세포는 American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)에서 분주 받아 10%의 태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 1%의 penicillin 및 streptomycin이 포함된 RPMI-1640 배지(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. Luteolin과 TRAIL 처리에 따른 세포 증식 억제 정도를 측정하기 위하여 6-well plate에 T24 세포를 well당 2×10<sup>5</sup>개를 분주하고 luteolin 및 TRAIL을 적정 농도로 처리시간을 달리하여 배양하였다. 그 후 MTT 시약을 0.5 mg/mL 농도가 되게 처리하여 2시간 동안 배양하고, 배지를 제거한 후 DMSO를 2 mL씩 분주하여 well에 생성된 formazan을 모두 녹인 후 ELISA reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 세포 핵 형태 관찰을 위한 DAPI 염색

Apoptosis 유발 시 특이적으로 변화하는 핵의 형태인 염색질 응축 유무를 관찰하기 위하여 luteolin과 TRAIL의 단독 및 복합 처리된 배지에서 배양된 세포들을 모은 다음 37% formaldehyde 용액과 phosphate buffered saline(PBS)을 1:9의 비율로 섞은 fixing solution으로 상온에서 10분 동안 고정하고 DAPI 시약을 이용하여 암조건의 상온에서 15분간 염색시켰다. 염색된 세포를 PBS 및 증류수로 세척하고 mounting solution을 처리한 후 형광 현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 400배의 배율로 핵의 형태를 관찰하였다.

### 세포주기 측정을 위한 flow cytometry 분석

Luteolin과 TRAIL의 단독 및 복합 처리 그리고 caspase 활성화 억제에 따른 세포주기 분석을 위해 준비된 세포를 모은 후 PBS로 충분히 씻고 Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit(BD Bioscience, San Jose, CA, USA)를 사용하여 고정 및 propidium iodide(PI)를 처리하여 4°C, 암조건에서 10분 이상 염색시켰다. 염색된 세포를 25-mm mesh를 이용하여 단일세포로 분리한 후 FACSCalibur(BD Bioscience)를 이용하여 형광반응에 따른 cellular DNA content 및 histogram을 Cell Quest software 프로그램(BD Bioscience)을 이용하여 분석하였다.

### 단백질 분리, 전기영동 및 western blot analysis

준비된 세포들을 모아 PBS로 씻어내고 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 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심분리

하여 그 상층액을 모았다. 상층액의 단백질을 Bio-Rad 단백질 정량시약(Hercules, CA, USA)을 사용하여 측정 한 다음 동량의 laemmli sample buffer(Bio-Rad)를 섞어 sample을 만들었다. 이렇게 만든 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate(SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane(Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Keene, NH, USA)으로 전이시킨 후, 5% skim milk를 함유한 PBS-T(0.1% Tween 20 in PBS)를 처리하여 비특이적인 단백질에 대해 blocking을 실시하였다. 준비된 membrane에 1차 항체를 처리하여 4°C에서 overnight하고 PBS-T로 세척한 후 2차 항체를 사용하여 실온에서 1시간 정도 반응시켰다. 다시 PBS-T를 이용하여 세척하고 enhanced chemiluminescence(ECL) 용액(Amersham Life Science Co., Arlington Heights, IL, USA)을 처리하여 특정단백질 양을 분석하였다.

### *in vitro* caspase activity 측정

Luteolin과 TRAIL의 단독 및 복합 처리에 따른 caspase의 활성화 정도를 정량적으로 측정하기 위해 준비된 세포들을 모아 단백질을 추출하고 정량하였다. 준비된 단백질(150 µg/50 µL)을 96-well micro plate에 각각 분주하고 2× reaction buffer를 각각 50 µL씩 넣어 주어 총 100 µL가 되게 한 후 각각의 caspase 기질을 첨가하였다. 준비된 plate를 37°C 암상태에서 3시간 동안 incubation 시킨 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. Caspase 활성 측정을 위한 colorimetric assay kit는 R&D Systems(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다.

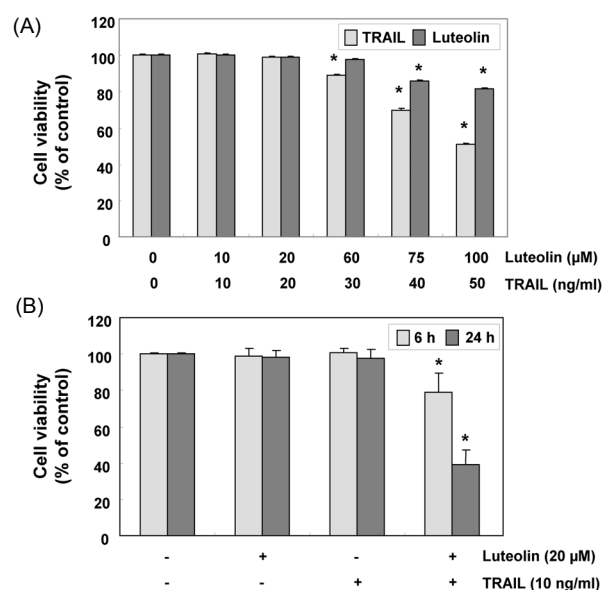
### 통계 처리

모든 실험결과는 SPSS ver. 18.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 이용하여 평균(mean)±표준편차(SD)로 나타냈다. 각 실험군의 분석 항목별 통계의 유의성 검증은 분산분석(analysis of variance, ANOVA)을 한 후, Student' *t*-test와 Duncan's multiple range test를 이용하여 *P*<0.05 수준에서 검증하였다.

## 결 과

### Luteolin과 TRAIL의 복합 처리에 의한 세포증식억제

Luteolin과 TRAIL의 단독 혹은 복합 처리가 T24 방광암 세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 luteolin 및 TRAIL을 적정 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후 MTT assay를 수행하였다. 그 결과 60 µM 농도까지의 luteolin은 세포 증식에 큰 영향이 없었으며, TRAIL의 경우 20 ng/mL까지 증식억제 효과가 관찰되지 않았다(Fig. 1A). 하지만 luteolin 20 µM과 TRAIL 10 ng/mL를 동시에 처리하고 6시간 또는 24시간 배양 후 실시한 MTT assay에서 20% 및 60%



**Fig. 1.** Inhibition of cell growth by combination treatment with luteolin and TRAIL in T24 cells. (A and B) Cells were seeded in 6-well plates at an initial density of  $2 \times 10^5$  cells per well and treated with the indicated concentrations of luteolin or TRAIL (A), or luteolin plus TRAIL for the indicated times. The growth inhibition was measured by MTT assay. The results are expressed as the mean±SD of three independent experiments. Significance was determined using a Student's *t*-test ( $*P < 0.05$  vs. untreated control).

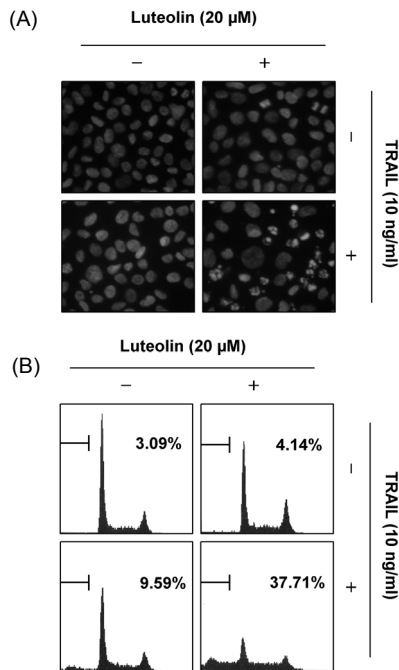
이상의 세포증식억제 현상이 관찰되었다(Fig. 1B).

### Luteolin과 TRAIL의 복합 처리에 따른 apoptosis 유도

Luteolin과 TRAIL의 복합 처리에 따른 증식억제 효과와 apoptosis 유도와 연관이 있는지 알아보기 위하여 T24 세포에 24시간 동안 luteolin과 TRAIL의 단독 또는 복합 처리한 후 세포를 모아 DAPI 염색을 수행하였다. 그 결과 대조군과 luteolin 및 TRAIL을 단독 처리한 군에서는 핵의 변화가 크게 관찰되지 않았지만 복합 처리한 군에서는 전형적인 apoptosis가 일어난 세포에서 관찰할 수 있는 대표적인 현상인 핵의 꼬개짐과 응축현상을 볼 수 있었다(Fig. 2A). 또한 luteolin과 TRAIL의 복합 처리에 의해 일어나는 apoptosis의 정량적인 조사를 위해 flow cytometer를 이용해 세포주기 중 apoptosis가 일어난 세포군을 의미하는 sub-G1(apoptotic cell)에 해당되는 세포의 빈도를 측정해본 결과, luteolin과 TRAIL의 단독 처리군에서는 각각 4.14%와 9.59%인데 반해 복합 처리군에서는 37.71%로 크게 증가하였다(Fig. 2B). 이상의 결과로 luteolin과 TRAIL의 복합 처리에 따른 증식억제는 apoptosis 유도와 밀접한 관련이 있음을 확인하였다.

### Luteolin과 TRAIL의 복합 처리에 따른 Bcl-2 family의 발현 변화

Apoptosis 조절에 핵심적인 조절자로 알려진 Bcl-2

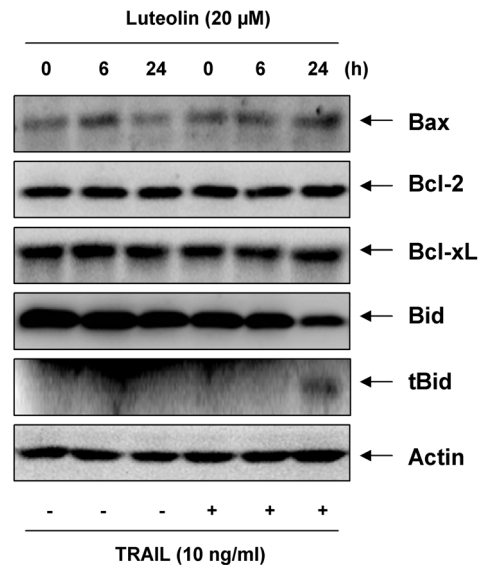


**Fig. 2.** Luteolin enhances TRAIL-mediated apoptosis in T24 cells. (A) After incubation with luteolin (20 μM) in the presence or absence of TRAIL for 24 h, cells were collected and stained with DAPI solution for 15 min at room temperature in the dark. The stained cells were washed with PBS and distilled water, and nuclear morphology was visualized by fluorescent microscope using blue filter. Magnification, ×400. (B) For the quantification of apoptosis level, cells grown under same condition as (A) were collected and evaluated for sub-G1 content by flow cytometer. Results are expressed as percentage of the vehicle treated control±SD of two separate experiments.

family 인자들이 luteolin과 TRAIL의 처리에 의해 유발되는 apoptosis에 어떤 관련성이 있는 지를 조사하기 위하여 western blotting을 수행하였다. 그 결과 luteolin과 TRAIL의 복합 처리 시 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2와 Bcl-xL의 발현 변화는 크게 없었지만, pro-apoptotic 단백질인 Bax의 발현이 다소 증가하였다. 또한 세포질에 있는 Bid의 경우 truncation이 일어나 tBid가 되어 mitochondria로 이동하여 apoptosis를 유도하는 단백질인데 luteolin과 TRAIL의 복합 처리 시 Bid의 발현이 감소하고 tBid의 발현이 증가하였다(Fig. 3).

#### Luteolin과 TRAIL의 복합 처리에 따른 caspase 및 IAP family 인자들의 활성 및 발현 변화

다음은 apoptosis 조절의 또 다른 중심적인 역할을 하는 caspase 단백질들과 caspase 단백질들의 활성을 억제하는 IAP family에 속하는 XIAP와 cIAP-1의 발현변화를 western blotting을 통해 관찰하였다. Fig. 4A의 결과에서 알 수 있듯이 cIAP-1의 발현은 큰 변화가 없었지만 XIAP의 경우 luteolin과 TRAIL의 복합 처리 시 발현이 매우 감소하는 결과를 얻을 수 있었다. 또한 caspase-3의 경우 복합

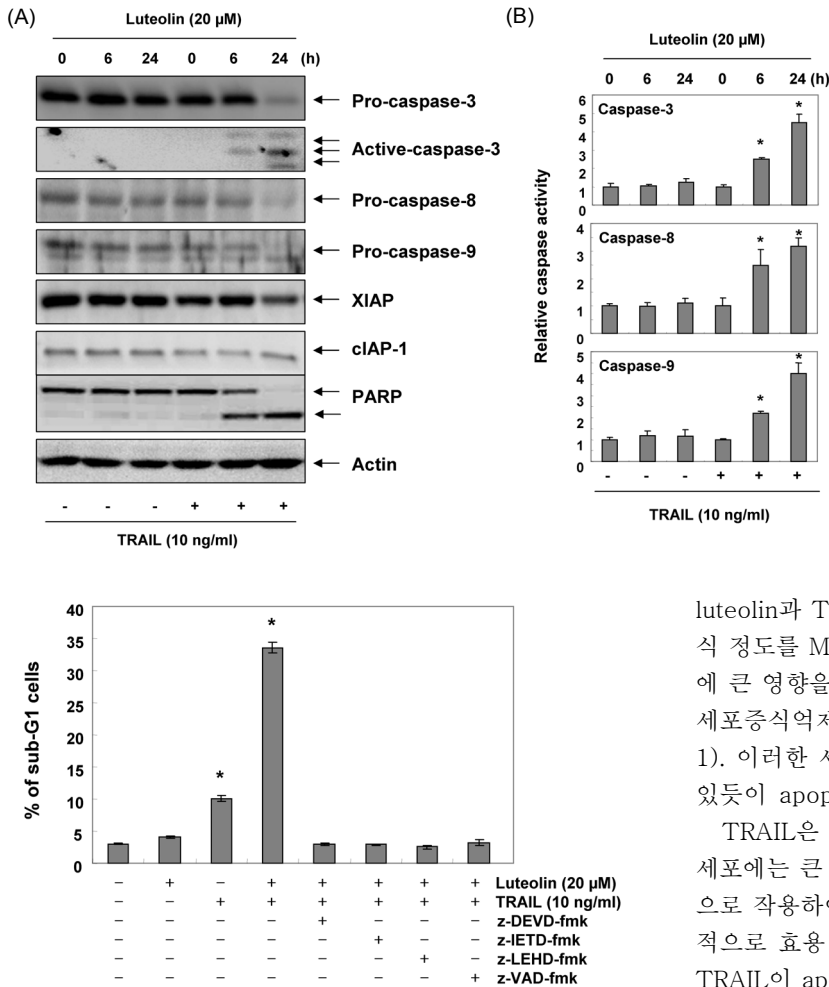


**Fig. 3.** Effects of combination treatment with luteolin and TRAIL on the levels of Bcl-2 family proteins in T24 cells. After incubation with luteolin (20 μM) in the presence or absence of TRAIL for 24 h, cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels. Separated proteins in gels transferred to nitrocellulose and probed with specific antibodies. Actin was used as an internal control.

처리군에서 비활성형의 발현이 감소하였고 대조적으로 활성형의 증가를 볼 수 있었으며, caspase-8 및 -9의 경우에도 비활성형의 발현이 감소함을 확인할 수 있었다. 또한 apoptosis가 일어났음을 보여주는 지표 단백질이면서 활성화된 caspase-3의 표적단백질인 poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)의 단편화가 복합 처리 시간 의존적으로 증가하였다(Fig. 4A). 이러한 caspase 단백질들의 활성 정도를 ELISA를 이용해 정량적으로 분석해 본 결과, luteolin과 TRAIL을 단독 처리한 경우 각각의 caspase activity는 큰 변화가 없었지만 복합 처리 6시간 이후에는 조사된 caspase 모두 3배 이상 활성이 증가되었음을 알 수 있었다(Fig. 4B). 이는 luteolin과 TRAIL의 복합 처리에 따른 apoptosis 유도에서 caspase 단백질들의 활성 증가가 매우 중요한 역할을 하였음을 보여주는 결과이다.

#### Caspase 선택적 저해제가 luteolin과 TRAIL의 복합 처리에 의해 유도된 apoptosis에 미치는 영향

Fig. 4에서 luteolin과 TRAIL의 복합 처리에 의해 caspase 단백질들의 활성도가 일어남을 확인할 수 있었기에 luteolin과 TRAIL의 복합 처리에 의한 apoptosis 유도에 caspase의 활성 증가가 필수적인 지의 여부를 조사하였다. 이를 위하여 각각의 caspase 특이적 억제제를 동시에 처리한 후 apoptosis가 일어난 세포를 정량적으로 분석하였다. Fig. 5의 결과에서 알 수 있듯이 luteolin과 TRAIL의 복합 처리에 의해 sub-G1기에 속하는 세포의 빈도는 약 35% 정도였지만, caspase-3, -8 및 -9의 선택적 억제제(z-



**Fig. 5.** Effects of caspase inhibitors on apoptosis induced by combination treatment with luteolin and TRAIL in T24 cells. Cells were pretreated for 1 h with or without the caspase inhibitors and then treated with luteolin and TRAIL for 24 h. For the quantification of apoptosis level, cells were collected and evaluated for sub-G1 content by flow cytometer. 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).

DEVD-fmk, z-IETD-fmk 및 z-LEHD-fmk)뿐만 아니라 pan-caspase 억제제(z-VAD-fmk)를 각각 선처리 하였을 경우 모두 대조군과 비슷한 수치인 약 3% 정도로 나타났다. 이상의 결과들을 통해 luteolin과 TRAIL의 복합 처리에 의해 유도된 apoptosis는 caspase 의존적으로 일어남을 알 수 있었다.

### 고 찰

본 연구에서는 TRAIL에 저항성을 보이는 인체 방광암세포주인 T24 세포에서 luteolin과 TRAIL의 복합 처리 시 세포 증식에 미치는 영향과 이로 인한 apoptosis 유발 여부 및 관련인자들의 발현 변화를 조사하였다. 이를 위하여 먼저

**Fig. 4.** Effects of combination treatment with luteolin and TRAIL on the expression and activity of caspases in T24 cells. (A) After incubation with luteolin (20 μM) in the presence or absence of TRAIL for 24 h, cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels. Separated proteins in gels transferred to nitrocellulose and probed with the indicated antibodies. Actin was used as an internal control. (B) The cells grown under same condition as (A) were collected and then lysed. The equal amounts of cell lysates were assayed for caspase-3, -8 and -9 activity using DEVD-pNA, IETD-pNA and LEHD-pNA as substrates. The results are expressed as the mean±SD of three independent experiments. Significance was determined using a Student's *t*-test (\**P*<0.05 vs. untreated control).

luteolin과 TRAIL을 각각 단독 혹은 복합 처리하여 세포증식 정도를 MTT assay를 통하여 조사해 본 결과, 세포증식에 큰 영향을 미치지 않았던 각각의 농도에서 복합 처리 시 세포증식억제가 현저하게 증가되었음을 확인하였다(Fig. 1). 이러한 세포증식억제 효과는 Fig. 2의 결과에서 알 수 있듯이 apoptosis 유발과 밀접한 연관이 있었다.

TRAIL은 근래에 밝혀진 apoptosis 유도 인자로서, 정상 세포에는 큰 영향을 거의 주지 않는 반면, 암세포에 특이적으로 작용하여 apoptosis를 유발시킬 수 있기 때문에 임상적으로 효용 가치가 아주 높은 물질 중 하나이다(21-23). TRAIL이 apoptosis를 유도하는 기전은 TRAIL이 ligand로 작용하여 DR4 또는 DR5와 결합하여 신호전달을 시작함으로써 이루어지게 된다. 이로 인해 caspase-8과 FADD, DR과 DISC를 이뤄 caspase-8을 활성화시키게 된다. 여기서 세포의 종류에 따라 두 가지의 서로 다른 apoptotic pathway를 유도한다. 그중 하나는 caspase-8이 직접적으로 effector caspase인 caspase-3를 활성화시키는 type I apoptosis를 유도하는 것이고, 다른 하나는 caspase-8에 의해 세포질에 존재하는 Bid를 tBid로 전환하여 mitochondria로 이동시켜 mitochondria 외막의 교란을 유도하고, 이로 인해 mitochondria 내부에 있던 cytochrome *c*와 같은 apoptotic 인자들이 세포질로 누출된다. 이로 인해 caspase-9과 cytochrome *c*, Apaf-1과 apoptosome을 형성하여 caspase-9이 활성화되어 결국 caspase-3의 활성화가 일어나 apoptosis를 일으키는 type II apoptosis를 유도한다(24). 이러한 기전으로 일어나는 TRAIL에 의한 apoptosis가 암세포의 증식억제에 매우 효과적이고 암세포 특이적으로 일어난다는 결과들이 많이 보고되고 있지만, 최근 연구에 의하면 많은 암세포가 TRAIL에 이미 저항성을 가지고 있음이 확인되어지고 있다. 이러한 저항성은 암세포의 표면에 TRAIL receptor의 결핍 혹은 cFLIP의 과발현, Bcl-2 family 중 anti-apoptotic 인자들의 과발현 등에 의

해 나타나는데(25), TRAIL에 대한 감수성을 높여 저항성을 극복하려는 시도가 최근 활발하게 진행되고 있다.

본 연구결과에 의하면 TRAIL과 luteolin을 각각 단독 처리 시 세포증식에 전혀 영향을 미치지 않는 농도에서 복합 처리할 경우 세포증식억제가 크게 증가하였음을 알 수 있었다. 이 현상은 TRAIL에 저항성을 보이는 T24 세포가 luteolin에 의해 TRAIL 저항성이 극복되었음을 나타내는 것이다. 이 현상에 대한 분자적 기전을 알아보기 위해 western blotting을 수행한 결과 Fig. 3과 같이 luteolin과 TRAIL의 복합 처리시 pro-apoptotic 단백질인 Bax와 tBid의 발현이 증가하였지만, anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2 및 Bcl-xL의 발현은 큰 변화가 없었다. 또한 caspase-3, -8 및 -9의 활성이 크게 증가하였고 이와 반대로 caspases inhibitor 단백질인 XIAP의 발현이 매우 감소하였음을 알 수 있었다 (Fig. 4). 이상의 결과를 종합해보면 luteolin과 TRAIL이 복합 처리된 T24 세포에서는 caspase-8 단백질의 활성화가 일어나 Bid 단백질이 tBid로 전환되어 mitochondria로의 이동 및 mitochondria 외막의 교란이 일어났을 것으로 추정된다. 이러한 현상은 아마도 세포질로의 cytochrome c 유출을 촉진시켜 caspase-9의 활성화에 따른 caspase-3의 활성화가 일어나 apoptosis를 유도하였을 것으로 유추된다. 아울러 pan-caspase 억제제와 caspase-3, -8 및 -9의 선택적 억제제를 모두가 luteolin과 TRAIL의 복합 처리에 의한 apoptosis 유도를 거의 완벽하게 억제시킨 결과(Fig. 5)는 이러한 가정을 잘 뒷받침하여 주는 결과라고 생각된다. 특히 흥미로운 점은 caspase-9 억제제를 선처리 하였을 경우에도 apoptosis가 억제되었는데 이는 luteolin과 TRAIL의 복합 처리에 의한 세포증식억제 현상이 type II apoptosis에 의한 것임을 보여 주는 결과이다.

## 요 약

본 연구에서는 플라보노이드 계열 중의 하나인 luteolin을 이용하여 TRAIL에 저항성을 가지는 T24 방광암세포에서 TRAIL 저항성 극복 가능성을 조사하였다. 본 연구의 결과에 의하면 luteolin 및 TRAIL 각각 단독 처리 시 세포증식에 전혀 영향을 미치지 못한 농도의 복합 처리 시 세포증식억제 효과가 크게 증가하였음을 알 수 있었다. 이러한 증식억제와 연관된 apoptosis 유도는 caspase-8의 활성화에 의한 tBid의 발현 증가와 pro-apoptotic 인자인 Bax의 발현 증가로 인한 caspase-9 및 -3의 활성화로 이어지는 type II apoptosis에 의한 것이라 추측되며, 이러한 가정은 각각의 caspase 선택적 억제제를 이용하여 재확인 하였다. 본 연구 결과는 TRAIL에 저항성을 보이는 암세포에 luteolin이 감수성을 높이는데 효과적일 수 있으며, 암세포에 대한 combination therapy를 위한 기초자료로 활용성이 높을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 논문은 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단(2010-0008843) 및 지식경제부·부산광역시 지원 지역혁신센터사업(RIC08-06-07) 동의대학교 블루바이오 소재개발 및 실용화 지원센터의 지원으로 이루어졌습니다.

## REFERENCES

- Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, Kiemeny L, Kriegmair M, Montironi R, Murphy WM, Sesterhenn IA, Tachibana M, Weider J. 2005. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* 66: 4-34.
- Nargund VH, Tanabalan CK, Kabir MN. 2012. Management of non-muscle-invasive (superficial) bladder cancer. *Semin Oncol* 39: 559-572.
- Smaldone MC, Jacobs BL, Smaldone AM, Hrebinko RL Jr. 2008. Long-term results of selective partial cystectomy for invasive urothelial bladder carcinoma. *Urology* 72: 613-616.
- Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacroce R, Di Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacroce S, Simone S, Bucci R, Farber E. 2002. Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int J Oncol* 21: 165-170.
- Han SI, Kim YS, Kim TH. 2008. Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. *BMB Rep* 41: 1-10.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35: 495-516.
- Lowe SW, Lin AW. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21: 485-495.
- Riedl SJ, Shi Y. 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 897-907.
- Le Marchand L. 2002. Cancer preventive effects of flavonoids—a review. *Biomed Pharmacother* 56: 296-301.
- Arts IC. 2008. A review of the epidemiological evidence on tea, flavonoids, and lung cancer. *J Nutr* 138: 1561S-1566S.
- Romagnolo DF, Selmin OI. 2012. Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence. *J Nutr Gerontol Geriatr* 31: 206-238.
- Seelinger G, Merfort I, Schempp CM. 2008. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. *Planta Med* 74: 1667-1677.
- Lee HJ, Wang CJ, Kuo HC, Chou FP, Jean LF, Tseng TH. 2005. Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. *Toxicol Appl Pharmacol* 203: 124-131.
- Yang SF, Yang WE, Chang HR, Chu SC, Hsieh YS. 2008. Luteolin induces apoptosis in oral squamous cancer cells. *J Dent Res* 87: 401-406.
- Park SH, Park HS, Lee JH, Chi GY, Kim GY, Moon SK, Chang YC, Hyun JW, Kim WJ, Choi YH. 2013. Induction of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis and non-canonical autophagy by luteolin in NCI-H460 lung carcinoma cells. *Food Chem Toxicol* 56: 100-109.
- Ou YC, Kuan YH, Li JR, Raung SL, Wang CC, Hung YY, Chen CJ. 2012. Induction of apoptosis by luteolin involving

- akt inactivation in human 786-o renal cell carcinoma cells. *J Evidence-Based Complementary Altern Med* Vol 2013, Article ID 109105.
17. Pratheeshkumar P, Son YO, Budhraj A, Wang X, Ding S, Wang L, Hitron A, Lee JC, Kim D, Divya SP, Chen G, Zhang Z, Luo J, Shi X. 2012. Luteolin inhibits human prostate tumor growth by suppressing vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis. *PLoS One* 7: e52279. doi: 10.1371/journal.pone.0052279.
  18. Shi RX, Ong CN, Shen HM. 2005. Protein kinase C inhibition and x-linked inhibitor of apoptosis protein degradation contribute to the sensitization effect of luteolin on tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in cancer cells. *Cancer Res* 65: 7815-7823.
  19. Horinaka M, Yoshida T, Shiraishi T, Nakata S, Wakada M, Nakanishi R, Nishino H, Sakai T. 2005. The combination of TRAIL and luteolin enhances apoptosis in human cervical cancer HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 333: 833-838.
  20. Yan J, Wang Q, Zheng X, Sun H, Zhou Y, Li D, Lin Y, Wang X. 2012. Luteolin enhances TNF-related apoptosis-inducing ligand's anticancer activity in a lung cancer xenograft mouse model. *Biochem Biophys Res Commun* 417: 842-846.
  21. Almasan A, Ashkenazi A. 2003. Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 337-348.
  22. Holoch PA, Griffith TS. 2009. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a new path to anti-cancer therapies. *Eur J Pharmacol* 625: 63-72.
  23. Steinwede K, Henken S, Bohling J, Maus R, Ueberberg B, Brumshagen C, Brincks EL, Griffith TS, Welte T, Maus UA. 2012. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) exerts therapeutic efficacy for the treatment of pneumococcal pneumonia in mice. *J Exp Med* 209: 1937-1952.
  24. Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B, Walczak H. 2007. TRAIL signalling: decisions between life and death. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 1462-1475.
  25. Zhang L, Fang B. 2005. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther* 12: 228-237.