

## Effect of a Fibrinolytic Enzyme (BK-17) from *Bacillus subtilis* on Apoptosis Induction in AGS and T24 Human Carcinoma Cells

Hyun Baik<sup>1</sup>, Min Jeong Seo<sup>2,3</sup>, Min Jeong Kim<sup>2</sup>, Hye Hyeon Lee<sup>2</sup>, Byoung Won Kang<sup>3</sup>, Jeong Uck Park<sup>3</sup>, Yung Hyun Choi<sup>4</sup>, Kwon Il Seo<sup>5</sup> and Yong Kee Jeong<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Amaranth-Cosmetics Co., Busan 607-837, Korea, <sup>2</sup>Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

<sup>3</sup>Medi-Farm Industrialization Research Center, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

<sup>4</sup>Department of Biochemistry, College of Oriental Medicine and Research Institute of Oriental Medicine, Department of Biomaterial Control, Graduate School and Blue-Bio Industry Regional Innovation Center, Dongeui University, Busan 614-714, Korea

<sup>5</sup>Department of Food Nutrition, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

Received June 18, 2013 / Revised October 24, 2013 / Accepted October 26, 2013

To investigate the effects of a fibrinolytic enzyme, BK-17, on the growth of human cancer cells, we performed various biochemical experiments, including cell proliferation and viability, and investigated subsequent morphological changes and apoptosis induction. BK-17 treatment of AGS human gastric and T24 human bladder carcinoma cells decreased the viability and the proliferation of the cells in a concentration-dependent manner. Microscopic studies indicated that the antiproliferative effects of the BK-17 treatment were associated with morphological changes, such as membrane shrinking, cell rounding up, and the formation of apoptotic bodies, indicating that BK-17 induced apoptosis in the cell lines. Of note, RT-PCR and Western blotting data indicated that the BK-17 treatment induced the down-regulation of antiapoptotic Bcl-2 members, Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub>, and the up-regulation of proapoptotic Bax members, Bax and Bad, in the AGS cells. BK-17-induced apoptosis of AGS cells was involved in the proteolytic activation of caspase-3, caspase-8, and caspase-9. Taken together, these findings suggest that BK-17 is associated with the induction of apoptotic cell death.

**Key words** : Apoptosis, AGS, fibrinolytic enzyme, Bacillokinase (BK), T24

### 서 론

세포의 여러 가지 활동 중 세포의 사멸은 necrosis와 apoptosis로 구분되며, 이것은 세포의 형태학적 및 생화학적 특성에 의하여 구분될 수 있다. Apoptosis는 개체의 발생단계나 DNA 손상, 바이러스 감염 등에 의한 유전적 조절 하에서 일어나는 정교한 방어기전이라는 점에서 생리적이거나 화학적인 외상에 의한 세포의 죽음인 necrosis와는 구별된다[21]. 또한 apoptosis는 개체의 보존수준에서 손상된 세포들의 제거를 위한 중요한 수단이며, 세포주기 의존적 또는 비의존적으로 동시에 일어날 수 있으나, 정상적인 세포주기의 이탈이나 세포주기조절에 중요한 cyclin-dependent kinases (Cdks) 활성의 변화가 apoptotic cell death의 주원인이 될 수 있다[20].

Apoptosis의 유발에 p53이나 Bcl-2 및 Bax와 같은 유전자가 관여한다는 사실이 알려지면서 apoptosis와 연관된 분자적 기

전이 최근 많이 밝혀지고 있다. 그 중 Bcl-2/Bax family에 속하는 Bcl-2 member 유전자 산물은 apoptosis를 억제하는 반면, Bax member의 과발현이 이루어졌을 때는 apoptosis를 유발시킨다고 알려져 있다[3]. 이들은 서로 dimer를 형성하면서 cytochrome c와 같은 apoptosis 유발에 관여하는 인자들의 조절에 관여한다[13]. 또한 caspase라고 이름 붙여진 ICE/CED-like protease family 역시 apoptosis 유발에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, 이들은 proenzyme 형태로 존재하다가 apoptosis 유도를 활성화시키는 신호에 의해 활성화된 cysteine-related proteases로 되어 직접 또는 간접으로 세포 내에 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여하게 된다[6, 16]. 특히, apoptosis는 암세포의 생장, 증식의 억제와 암세포 파괴의 한 방법으로써 널리 연구되고 있다[19]. 따라서 항암제 개발을 위한 후보물질의 암세포 apoptosis 조절관련 기전해석은 필수적으로 선행되어야 할 분야로 인식되어지고 있다.

본 연구는 *Bacillus subtilis* 유래의 혈전용해효소인 Bacillokinase-17 (BK-17) 생리활성 효능에 관한 가능성을 제시하기 위하여 인체 위암 및 방광암 세포를 이용하여, 이들 암세포의 증식에 미치는 BK-17의 영향을 조사하였다. 그리고 BK-17에 의한 암세포의 증식억제와 연관된 apoptosis 유발에 관한 분자생물학적 기전의 해석을 위하여 apoptosis 유발과 연관된 주요 유전자 산물의 발현에 미치는 BK-17의 영향을 조사하였다.

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7557, Fax : +82-51-206-0848

E-mail : ykj9912@dau.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 재료 및 방법

### 세포배양 및 시료처리

*B. subtilis*에서 혈전용해효소(BK-17)을 순수 분리하여 그 생화학적 특성을 보고하였다[9]. 본 연구에서는 BK-17을 130 unit/ml의 농도로 phosphate-buffered saline (PBS)에 용해하여 4°C에 보관하였으며, 처리 전 세포 배양 배지에 희석하여 사용하였다. 실험에 사용한 AGS 인체 위암세포 및 T24 인체 방광암세포는 생명공학연구소(KRIBB, Taejeon, Korea)에서 분양 받았으며, 세포의 배양과 시약처리를 위하여 90%의 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)와 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Gibco BRL)과 1%의 penicillin 및 streptomycin (Gibco BRL) 등이 포함된 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하의 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였으며, 배지는 매 48시간마다 교환 해주었으며 이를 위해 0.05% trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA, Gibco BRL)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 적정한 수의 세포를 세포배양용 페트리 접시로 옮겼다.

### MTT assay

세포 배양용 6 well plate에 AGS 및 T24 세포를 4×10<sup>4</sup>개/ml의 개수로 well 당 2 ml씩 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 시료를 적정 농도로 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Amresco, Solon, Ohio, USA) 시약을 0.5 mg/ml 농도가 되게 성장배지로 희석하여 2 ml씩 분주하고 3시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 반응시킨 다음 MTT 시약을 깨끗이 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Amresco)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. 3회 반복 실험으로 그에 대한 평균값과 표준 오차를 Microsoft EXCEL program을 이용하여 분석하였다.

### DAPI staining

세포 배양용 100-mm petri dishes에 암세포를 5×10<sup>4</sup> 개/ml의 개수로 dish 당 8 ml씩 정도로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 시료를 적정 농도로 처리한 후 BK-17을 적정 농도 별로 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 48시간 후에 위상차 현미경을 이용하여 200배의 배율로 정상 및 각 처리 농도에 따른 형태의 변화를 관찰한 다음 Kodak 자동카메라용 필름을 이용하여 사진 촬영하였다. BK-17 처리에 의한 apoptosis 유발의 확인을 위한 암세포 핵의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 정상 및 48시간 동안 BK-17이 처리된 세포를 모은 다음 37% formaldehyde solution과 PBS를 1 : 9 비율로 섞은 fixing solution을 500 μl 첨가하여 충분히 섞은 후, 상온에서 10분 동안

고정하였다. 1,000 rpm으로 5분간 원심분리하고 상층액을 제거한 다음 PBS 200 μl를 넣어서 충분히 섞은 후, 슬라이드글라스 위에 세포부유액을 80 μl 떨어뜨린 다음 900 rpm에서 5분간 cytospin하였다. PBS로 2~3회 세척하고 PBS가 마르기 전에 0.2%의 Triton X-100 (Amresco)을 떨어뜨린 후 상온에서 10분간 두었다. 그 후 다시 PBS로 세척하고 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액을 슬라이드 글라스 위에 적당량 떨어뜨린 다음 빛을 차단하여 상온에서 염색시켰다. 10-15분 정도 염색 후, PBS로 DAPI 용액을 충분히 씻어내고 증류수로 재빨리 세척한 다음 absolute alcohol을 이용하여 탈수과정을 거친 슬라이드 글라스 위에 mounting solution을 처리한 후 형광 현미경(Carl Zeiss)을 이용하여 400배의 배율로 각 처리 농도에 따른 핵의 형태변화를 관찰한 다음 AxioVision 프로그램을 이용하여 사진 촬영하였다.

### Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

정상 및 BK-17이 처리된 배지에서 자란 세포들을 PBS로 씻어 내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 원심분리하여 세포를 수집하였다. 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 30분간 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 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. 이렇게 만든 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다[5]. 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 둔 후, 상온에서 1시간 정도 incubation하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 PBS-T로 15분(5분간 3번) 정도 세척하였다. 준비된 membrane에 1차 antibody를 처리하여 상온에서 2시간 이상 또는 4°C에서 over night 시킨 다음 PBS-T로 세척(15분간 1번, 5분간 5번)하고 처리된 1차 antibody에 맞는 2차 antibody (PBS-T로 1:1,500으로 희석하여 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 다시 PBS-T로 세척(10분간 3번, 5분간 3번)하고 Enhanced Chemiluminescence (ECL) 용액(Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 발현 양을 분석하였다. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA) 등에서 구입하였으며(Table 11), 이차 항체로 사용된 peroxidase-labeled

Table 1. Gene-specific primers for RT-PCR

Gene name	Sequence
BaxSense	5'-ATG-GAC-GGG-TCC-GGG-GAG-3'
Antisense	5'-TGG-AAG-AAG-ATG-GGC-TGA-3'
Bcl-2 Sense	5'-CAG-CTG-CAC-CTG-ACG-3'
Antisense	5'-GCT-GGG-TAG-GTG-CAT-3'
Bcl-X <sub>S/L</sub> Sense	5'-CAG-CTG-CAC-CTG-ACG-3'
Antisense	5'-GCT-GGG-TAG-GTG-CAT-3'
XIAPSense	5'-GAA-GAC-CCT-TGG-GAA-CAA-CA-3'
Antisense	5'-CGC-CTT-AGC-TGC-TCT-CTT-CAG-T-3'
cIAP-1Sense	5'-TGA-GCA-TGC-AGA-CAC-ATG-C-3'
Antisense	5'-TGA-CGG-ATG-AAC-TCC-TGT-CC-3'
cIAP-2Sense	5'-CAG-AAT-TGG-CAA-GAG-CTG-G-3'
Antisense	5'-CAC-TTG-CAA-GCT-GCT-CAG-G-3'
SurvivinSense	5'-GCA-TGG-GTG-CCC-CGA-CGT-TG-3'
Antisense	5'-GCT-CCG-GCC-AGA-GGC-CTC-AA-3'
GAPDHSense	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
Antisense	5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

Table 2. List of antibodies used in this study

Antibody	Origin	Company
Actin	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
Bcl-2mouse	monoclonal	Upstate Biotechnology
Bax	rabbit polyclonal	Calbiochem
Bad rabbit	polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
Bcl-X <sub>S/L</sub>	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
XIAP	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
cIAP-1	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
cIAP-2	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
PARP	mouse monoclonal	Phar Mingen
β-cateninrabbit	polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
PLC-γ1	mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology
Caspase-3	mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology
Caspase-8	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
Caspase-9	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology

donkey anti-rabbit 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Life Science에서 구입하였다.

Caspase 활성 분석

본 실험에서 caspase activity 측정을 위하여 사용된 caspase aolorimetric kit는 R&D Systems (Minneapolis, USA)에서 구입하였다. 상기와 동일한 조건인 정상 및 BK-17이 처리된 배지에서 자란 세포들을 PBS로 씻어 내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 원심분리하여 세포를 수집하였다. 이렇게 모아진 세포에 적당량의 lysis buffer를 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 취하여 Bio-Rad 단백질 정량 시약과 그 사용방법에 따라 정량하였다. 이렇게 만들어진 sample 50 µl를 96 well

plate에 분주한 다음 1%의 1 M DTT가 함유된 2x reaction buffer 50 µl를 첨가하였다. 다시 5 µl의 capase colorimetric substrate (DEVD-pNA, IETD-pNA and LEHD-pNA for caspase-3, -8 and -9 activity)를 첨가하여 37°C에서 2시간 정도 반응을 시킨 다음 ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

암세포의 성장억제 및 형태 변화

인체 위암세포인 AGS 및 인체 방광암세포인 T24의 성장에 미치는 혈전용해효소 BK-17의 영향을 MTT assay를 이용하여 조사하였다. Fig. 1에서 나타낸 바와 같이 BK-17을 48시간 동

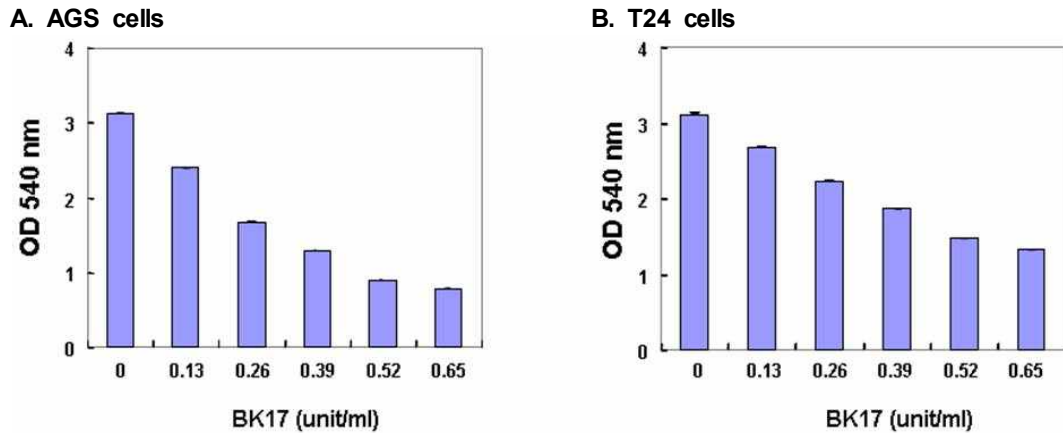


Fig. 1. Inhibition of human gastric AGS (A) and bladder T24 cancer cells (B) growth by the treatment of the fibrinolytic enzyme (BK-17). Cells were treated with variable concentrations of BK-17 for 48 hr and MTT assay was performed. The data shown are means±SD of three independent experiments.

안 처리한 결과 AGS 및 T24 세포 모두에서 처리농도 의존적으로 성장이 억제됨을 알 수 있었다. 특히 정상배지에서 배양된 대조군에 비하여 BK-17이 0.52 unit/ml 처리군의 경우 AGS 및 T24 세포 모두에서 50% 이상의 성장억제 효과가 있었으나, AGS 위암세포에서 다소 세포증식 억제효과가 강하게 나타났다.

있는지의 여부를 조사하였다. Apoptosis가 일어난 세포에서 가장 일반적으로 관찰되는 현상이 DNA의 절단에 의한 염색질의 응축 현상[7]이기 때문에 동일한 조건에서 배양된 두 종류의 세포들을 대상으로 DAPI 염색을 통한 세포의 핵 형태를 비교 조사하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 정상배지에서 배양된 암세포의 경우 핵의 전체가 완전한 형태로 염색이 되는 양상을 보였으나 BK-17 처리농도가 증가할수록 DNA 절단에 의한 염색질의 응축된 형태인 apoptotic body의 형성의 정도가 AGS 및 T24 세포 모두에서 BK-17 처리 농도 의존적으로 증가되는 것으로 관찰되었다. 이상의 결과는 BK-17의 처리에

암세포의 apoptosis에 미치는 BK-17의 영향  
위에서 관찰된 BK-17 처리에 의한 AGS 및 T24 세포의 생존을 저하 및 형태적 변형 유발이 apoptosis 유도과 연관성이

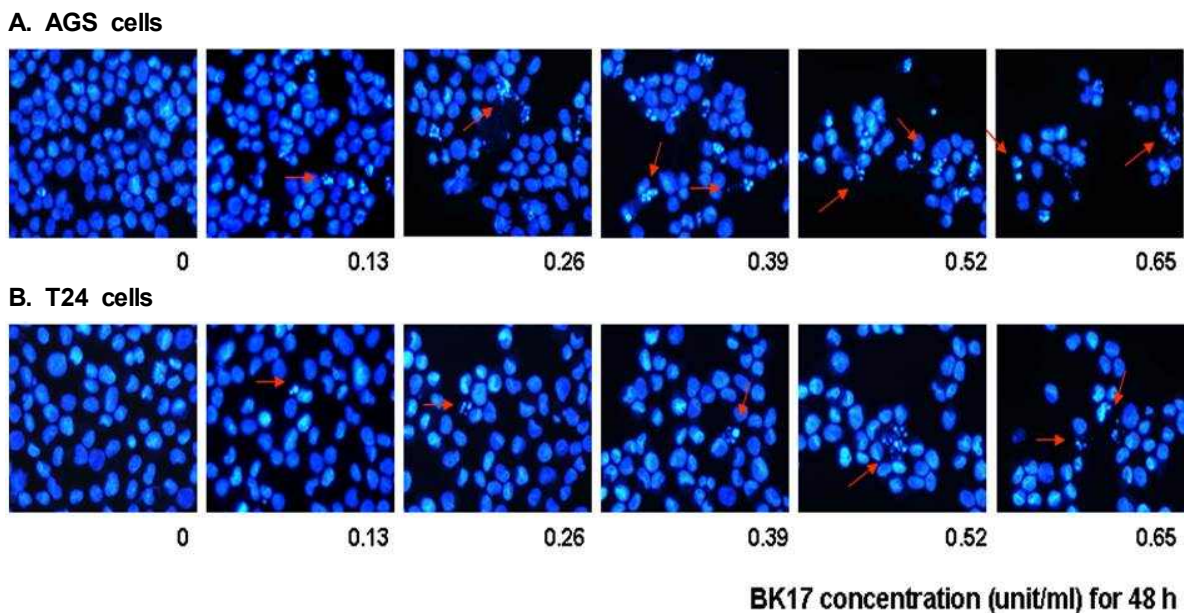


Fig. 2. Induction of apoptotic bodies by the treatment of BK-17 in human gastric AGS (A) and bladder T24 cancer cells (B). Cells were incubated with variable concentrations of BK-17. After 48 hr incubation cells were sampled, fixed, and stained with DAPI. After 10 min incubation at room temperature, stained nuclei were then observed under a fluorescent microscope using a blue filter. Magnification, ×400.

따른 암세포 성장 억제는 apoptosis의 유발과 밀접한 연관성이 있다고 생각되며 BK-17 처리에 의한 세포 증식의 억제 정도와도 밀접한 연관성을 지닌다.

**Bcl-2/Bax family의 발현에 미치는 BK-17의 영향**

BK-17 처리에 의한 세포성장 억제와 연관된 apoptosis 유발에 관여하는 유전자의 탐색을 위하여 apoptosis와 연관성을 가지는 몇 가지 유전자 산물들의 발현을 조사하였다. 먼저 apoptosis의 유발에 관여하는 가장 대표적인 유전자인 Bcl-2/Bax family 중 Bcl-2는 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하고, Bax는 pro-apoptotic 분자로서 apoptosis와 관련이 있다[1, 11]. 이들 유전자는 mitochondria로 부터의 cytochrome c를 유리시켜 종양억제유전자인 p53, cysteine-related protease인 caspases, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절한다. Bcl-2와 Bax는 서로 dimer를 이루며, 만일 Bax가 주종단백질로 heterodimer를 만들면 apoptosis를 촉진시키고, Bcl-2가 주종이면 apoptosis가 억제된다 (Fig. 3). 즉 Bax와 Bcl-2는 서로 heterodimer를 이루으로써 미세한 발현의 차이로 이 현상을 조절한다[15, 17].

본 연구에서는 RT-PCR과 Western blot analysis 방법에 준하여 BK-17에 의한 암세포의 apoptosis가 이들 유전자의 발현 변화와 연관성이 있는지를 AGS 위암세포를 대상으로 조사하였다. Fig. 3A는 mRNA 전사수준을 RT-PCR 방법으로 조사한 결과로서 apoptosis 유발 억제에 관여하는 Bcl-2 및 Bcl-X<sub>S/L</sub>의 발현이 고농도 처리군에서 다소 감소하였으나, apoptosis 유도에 관여하는 Bax의 발현은 거의 변화가 없었다. Fig. 3B에 나타난 단백질 발현의 정도를 살펴보면 mRNA의 경우와 다르

게 Bax 및 Bad의 발현은 BK-17 처리농도 의존적으로 현저히 증가하였지만 Bcl-2 및 Bcl-X<sub>S/L</sub>의 경우는 변화가 없었다. 전사 및 번역 수준에서 이러한 차이의 원인을 규명하기 위한 연구가 차후 이루어져야겠지만, BK-17에 의한 AGS 방광암세포의 apoptosis 유발은 apoptosis 유발에 중요한 결정 요소인 Bax (or Bad)/Bcl-2 (or Bcl-X<sub>S/L</sub>)의 상대적인 비율 증가와 최소한 연관성이 있음을 알 수 있었다.

**Caspases의 발현 및 활성화에 미치는 BK-17의 영향**

한편 caspase protease라는 효소 역시 apoptosis 유발 경로에 중요한 조절인자로 작용하는데, 이들 family에 속하는 단백질들은 세포에서 핵과 mitochondria의 외막에 불활성 형태로 존재하며, Bcl-2/Bax family의 발현 변화에 따라 이들의 활성도가 조절되는 것으로 알려져 있다[1, 16, 10, 17]. 따라서, 지금까지 알려진 caspase 중 apoptosis가 유발된 세포에서 높은 활성도를 보여주는 caspase-3, caspase-8 및 caspase-9의 발현에 미치는 BK-17의 영향을 AGS 위암세포를 대상으로 조사하였다.

Fig. 4의 결과에서 볼 수 있듯이 BK-17의 처리에 의하여 불활성형인 pro-caspase-3, pro-caspase-8 및 pro-caspase-9의 발현 정도는 큰 변화가 없었지만 활성형의 발현은 3가지 caspase 모두에서 처리농도 의존적으로 증가되었다. 이상의 Western blotting의 의한 결과를 재확인하기 위하여 *in vitro* caspase의 활성 정도를 직접 분석한 결과, Fig. 5에 나타난 바와 같이 BK-17이 처리된 AGS 위암세포에서는 처리농도 의존적으로 caspase-3, caspase-8 및 caspase-9의 활성이 모두 증가되었음을 알 수 있었는데, 특히 caspase-8과 caspase-9에 비하

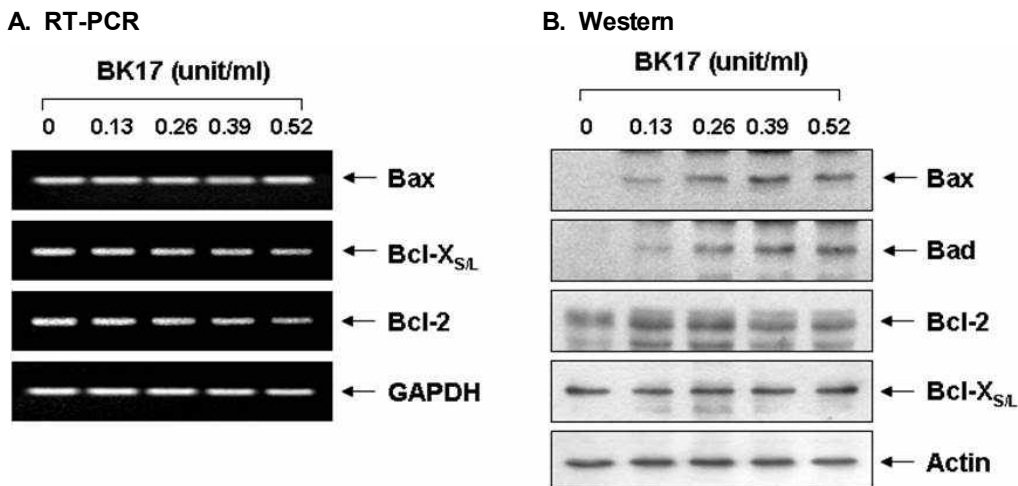


Fig. 3. Effects of BK-17 treatment on the Bcl-2 family expression in human gastric AGS cancer cells. (A) After 48 hr incubation with BK-17, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (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 the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

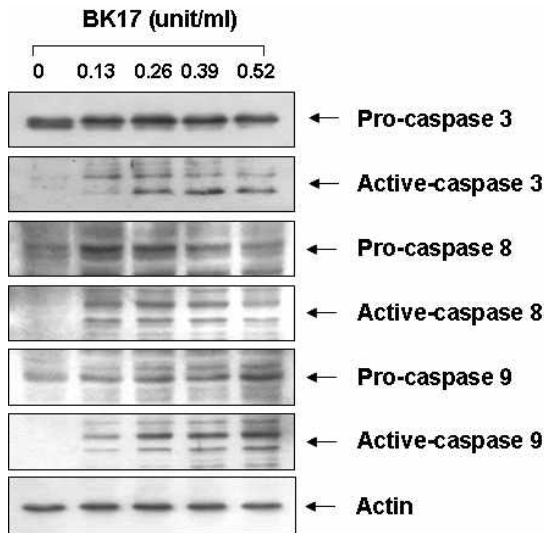


Fig. 4. Effects of the BK-17 treatment on caspases expression in human gastric AGS cancer cells. After 48 hr incubation with BK-17, the cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with anti-caspase-3, -8 and -9 antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

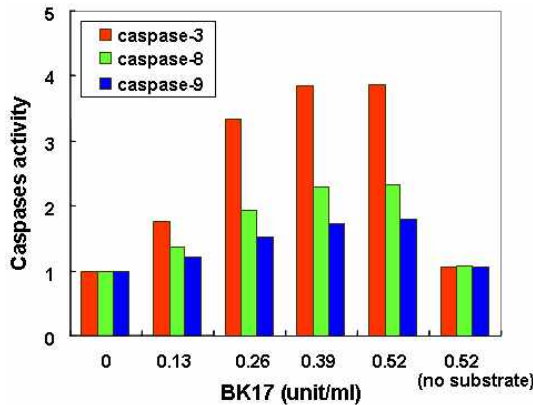


Fig. 5. Activation of caspases by the BK-17 treatment in human gastric AGS cancer cells. Cells were incubated with variable concentrations of BK-17. After 48 hr incubation with BK-17, aliquots were incubated with substrates, DEVD-pNA, IETD-pNA and LEHD-pNA, for *in vitro* caspase-3, caspase-8 and caspase-9 activity, respectively, at 37°C for 1 hr. The released fluorescent products were measured. Data are average values of five separate experiments.

여 caspase-3의 활성 정도가 높았다. 즉 BK-17의 처리에 의한 AGS 위암세포의 apoptosis 유발은 Bcl-2/Bax family 발현 변화와 연관된 caspase의 활성화와 직접 관련이 있음을 알 수 있었다.

IAP family의 발현에 미치는 BK-17의 영향

Apoptosis에 관여하는 여러 인자들 중 최근 밝혀진 또 다른 class인 cIAPs family에 속하는 여러 유전자 산물은 곤충세포에서 바이러스 감염에 의한 apoptosis를 억제하기 위한 baculoviral 단백질 군들로서 외부 신호에 의한 세포 내 anti-apoptotic 활성을 지닌다[2, 8, 18]. 그리고 이들 중 어떤 cIAPs는 caspases와의 직접적인 결합을 통하여 그들의 apoptotic 활성을 억제할 수 있을 것으로 밝혀져, IAP family들의 잠재적인 역할에 대한 관심이 높아지고 있다[2, 18]. 더구나 이들 IAP family의 발현은 전사 조절인자인 nuclear factor kappa B (NF-κB)에 의해 조절 받는 것으로 밝혀져 apoptosis의 신호전달 연구에서의 새로운 영역을 제시하여 주고 있다[2, 12]. 본 연구에서는 이들 유전자 산물들의 발현에 미치는 BK-17의 영향을 조사하여 BK-17의 처리에 따른 apoptosis 유발 과정에 이들 인자들이 관여하는지의 여부를 조사하였다.

Fig. 6에서 나타난 바와 같이 mRNA 수준에서는 XIAP 및 cIAP-2의 발현이 처리농도 의존적으로 감소하였으며 단백질 수준에서는 cIAP-1 및 cIAP-2의 발현에는 큰 변화가 보이지 않았지만 XIAP의 경우 처리농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 BK-17 처리에 따른 apoptosis 유발에서 IAP family 인자들의 선택적인 관여 가능성을 보여줌을 알 수 있었다.

고 찰

보고 된 연구결과에 의하면 혈전분해 단백질이 발암, 암전이, 암진행 촉진 등과 연관이 있었기 때문에 BK-17을 세포수준에서 암 관련 실험을 진행하였다. 인체 암세포의 성장에 미치는 BK-17의 항암작용에 관한 기전을 조사하기 위하여 세포의 증식 및 생존율에 미치는 BK-17의 영향, BK-17에 의한 암세포의 형태변화, apoptosis 유발과 관련된 주요 유전자들의 발현에 미치는 BK-17의 영향을 조사하였다.

BK-17의 처리에 의하여 AGS 인체 위암세포 및 T24 인체 방광암세포의 증식과 생존율은 BK-17 처리 농도 의존적으로 현저히 감소하였음을 MTT assay로 확인하였다. 위상차 및 형광 현미경적 관찰에 의하여 BK-17 처리에 따른 암세포의 증식 억제 효과는 membrane shrinking, cell rounding 및 apoptotic body 형성 등을 관찰할 수 있었으며, 이는 BK-17의 처리에 의하여 이들 두 종류의 암세포들에서 apoptosis가 유도되었음을 예측할 수 있었다. Flow cytometric analysis 결과, 세포주기의 sub-G1군에 속하는 세포의 빈도가 BK-17의 처리에 의하여 처리 농도 의존적으로 증가됨을 확인하였으며, 이러한 효과들은 T24 방광암세포에서 보다 AGS 위암세포에서 다소 강하게 나타났다. RT-PCR 및 Western blotting 분석에 의한 결과에서, AGS 세포에서 BK-17 처리에 의한 apoptosis 유도는 BK-17 처리 농도 의존적으로 anti-apoptotic Bcl-2 members (Bcl-2 및 Bcl-X<sub>L</sub>)의 mRNA 발현 증가 및 pro-apoptotic Bax members

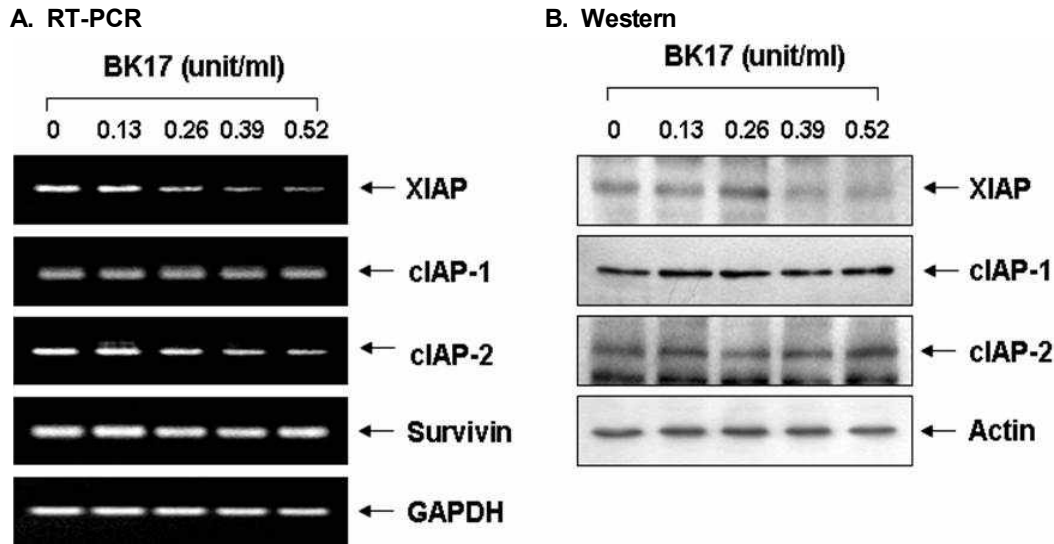


Fig. 6. Effects of BK-17 treatment on the IAP family expression in human gastric AGS cancer cells. (A) After 48 hr incubation with BK-17, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (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 the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

(Bax 및 Bad)의 발현 저하와 연관성이 있음을 알 수 있었다. AGS 세포에서 BK-17은 caspase 효소들(caspase-3, caspase-8 and caspase-9)의 활성을 유도하였으며, 이로 인하여 poly (ADP-ribose) polymerase,  $\beta$ -catenin 및 phospholipase C- $\gamma$ 1 과 같은 caspase 기질 단백질의 분해가 초래되었음을 알 수 있었다. 이상의 결과에서 BK-17에 의한 인체암세포의 증식억제는 apoptosis 유발과 밀접한 연관성이 있음을 알 수 있었으며, BK-17은 인체 암세포의 증식 조절제로서의 잠재력이 우수한 물질로 기대된다.

### 감사의 글

본 연구는 농림수산식품부(농림, 식품, 수산) 기술개발사업(610003-03-1-SB110)의 연구비 지원에 의해서 수행되었습니다.

### References

1. Antonsson, B. and Martinou, J. C. 2000. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* **256**, 50-57.
2. Cheng, J. Q., Jiang, X., Fraser, M., Li, M., Dan, H. C., Sun, M. and Tsang, B. K. 2002. Role of X-linked inhibitor of apoptosis protein in chemoresistance in ovarian cancer: possible involvement of the phosphoinositide-3 kinase/Akt pathway. *Drug Resist Update* **5**, 131-146.
3. Chiarugi, V., Magneli, L., Cinelli, M. and Basi, G. 1994. Apoptosis and the cell cycle. *Cell Mol Biol Res* **40**, 603-612.
4. Choi, Y. H., Kong, K. R., Kim, Y. A., Jung, K. O., Kil, J. H.,

- Rhee, S. H. and Park, K. Y. 2003. Induction of Bax and activation of caspases during  $\beta$ -sitosterol-mediated apoptosis in human colon cancer cells. *Int J Oncol* **23**, 1657-1661.
5. Choi, Y. H., Lee, S. J., Nguyen, P., Jang, J. S., Lee, J., Wu, M. L., Takano, E., Maki, M., Henkart, P. A. and Trepel, J. B. 1997. Regulation of cyclin D1 by calpain protease. *J Biol Chem* **272**, 28479-28484.
6. Evans, V. G. 1993. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol Int* **17**, 461-476.
7. Gerschenson, L. E. and Rotello, R. J. 1992. Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J* **6**, 2450-2455.
8. Holcik, M., Gibson, H. and Korneluk, R. G. 2001. XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis* **6**, 253-261.
9. Jeong, Y. K., Park, J. U., Baek, H., Park, S. H., Kong, I. S., Kim, D. W. and Joo, W. H. 2001. Purification and biochemical characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* BK-17. *World J Microbiol Biotechnol* **17**, 89-92.
10. Jiang, C. Y., Yang, F. and Cheng, S. H. 2004. Fas ligand gene therapy for vascular intimal hyperplasia. *Curr Gene Ther* **4**, 33-39.
11. Jurgensmeier, J. M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D. and Reed, J. C. 1998. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 4997-5002.
12. LaCasse, E. C., Baird, S., Korneluk, R. G. and MacKenzie, A. E. 1998. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* **17**, 3247-3259.
13. Lenaz, G., Bovina, C., Formiggini, G. and Castelli, G. P. 1999. Mitochondria, oxidative stress, and antioxidant defences. *Acta Biochim Pol* **46**, 1-21.

14. Lieberthal, W., Koh, J. S. and Levine, J. S. 1998. Necrosis and apoptosis in acute renal failure. *Semin Nephrol* **18**, 505-518.
15. Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman, B. and Reed, J. C. 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* **9**, 1799-1805.
16. Nagata, S. and Golstein, P. 1996. The Fas death factor. *Science* **267**, 1449-1456.
17. Rosse T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B. and Borner, C. 1998. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* **391**, 496-499.
18. Salvesen, G. S. and Duckett, C. S. 2002. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 401-410.
19. Schultz, D. R. and Harrington, Jr. W. J. 2003. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum* **32**, 345-369.
20. Shi, L., Nishioka, W. K., Th'ng, J., Bradbury, E. M., Litchfield, D. W. and Greenberg, A. H. 1994. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science* **263**, 1143-1145.
21. Zimmermann, K. C., Bonzon, C. and Green, D. R. 2001. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* **92**, 57-70.

---

초록 : 인간 암세포인 AGS와 T24에서의 apoptosis 유도에 미치는 *Bacillus subtilis* 혈전용해효소 BK-17의 영향

백 현<sup>1</sup> · 서민정<sup>2,3</sup> · 김민정<sup>2</sup> · 이해현<sup>2</sup> · 강병원<sup>3</sup> · 박정욱<sup>3</sup> · 최영현<sup>4</sup> · 서권일<sup>5</sup> · 정영기<sup>2,3\*</sup>

(<sup>1</sup>아마라스화장품(주) 부산, <sup>2</sup>동아대학교 생명공학과, <sup>3</sup>동아대학교 Medi-Farm 산업화 연구사업단, <sup>4</sup>동의대학교 한의학과, <sup>5</sup>순천대학교 식품영양학과)

인간 암세포의 생육에 미치는 혈전용해효소(BK-1)의 영향을 조사하기 위해, 세포증식, 생존력, 형태변화 및 apoptosis 유도 등을 포함한 여러 가지 생화학적 실험을 하였다. 그 결과, AGS 인간 위장 암세포 및 T24 인간 방광 암세포상에의 BK-17 처리는 그 암세포들의 생존력 및 생육을 농도의존적 방법으로 감소시켰다. 현미경 관찰은, BK-17 처리에 의한 항 생육 효과는 막 수축, 세포의 rounding up, apoptotic bodies와 같은 형태학적 변화를 나타내었다. 특히, RT-PCR과 Western blotting data는, BK-17 처리가 항 apoptosis Bcl-2 군들 특히 Bcl-2, and Bcl-X<sub>L</sub>의 down-regulation 그리고 AGS 세포에서, apoptosis 촉진 매개체 Bax와 Bad의 up-regulation를 유도했다는 것을 보여주었다. BK-17에 의해 유도된 AGS 세포의 apoptosis는 caspase-3, caspase-8 그리고 caspase-9의 단백질가수분해 활성화와 관련이 있었다. 이상의 결과를 볼 때, BK-17은 apoptotic cell death의 유도와 밀접한 관련이 있다는 것을 보여주고 있다.