

인체 전립선 암세포에서 Methyl Gallate의 항암효과

권순재¹ · 이주혜² · 김재용³ · 문광덕¹ · 이성태⁴ · 서권일^{5*}

¹경북대학교 식품공학과, ²순천대학교 기초과학연구소

³전라남도 천연자원연구원

⁴순천대학교 생물학과, ⁵순천대학교 식품영양학과

Anticancer Activity of Methyl Gallate in RC-58T/h/SA#4 Primary Human Prostate Cancer Cells

Soon Jae Kwon¹, Ju Hye Lee², Jae Yong Kim³, Kwang Deog Moon¹,
Sung Tae Yee⁴, and Kwon Il Seo^{5*}

¹Dept. of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 750-701, Korea

²Research Institute of Basic Science, ⁴Dept. of Biology and, and

⁵Dept. Food and Nutrition, Sunchon National University, Jeonnam 540-742, Korea

³Jeonnam Institute of Natural Resources Research, Jeonnam 529-851, Korea

ABSTRACT In this study, we investigated the anticancer activity of methyl gallate (MG), which is the major biologically active component of *Galla Rhois*, in RC-58T/h/SA#4 human prostate cancer cells. MG inhibited cell proliferation in a dose-dependent manner. Cell death induced by MG increased the population of cells in sub-G1 phase, formation of apoptotic bodies, nuclear condensation, and DNA fragmentation. Apoptosis induced by MG was associated with activation of initiator caspases-8 and -9 as well as effector caspase-3. Endocrine disruptors such as dioxin and bisphenol A increased growth of RC-58T/h/SA#4 cells in charcoal-treated FBS (cFBS) medium. Cell proliferation was highest upon treatment with 1 nM and 0.1 μM dioxin and bisphenol A, respectively. MG also dose-dependently inhibited cell proliferation in RC-58T/h/SA#4 cells treated with endocrine disruptors. These results indicate that MG exerts anticancer effects on RC-58T/h/SA#4 primary human prostate cancer cells.

Key words: methyl gallate, anticancer activity, apoptosis, environmental hormone

서 론

암은 유전 장애, 대사 장애 및 발암물질 등과 같은 매우 다양한 요인에 의해 발생된다. 최근까지 암에 관한 연구가 계속 이어져왔음에도 불구하고 현재까지도 그 발생기전이 정확하게 규명되지 못하고 있으며 발생빈도나 사망률 역시 증가 추세를 나타내고 있다(1). 암의 국가별 사망원인 통계를 살펴보면 암 사망률이 그 나라의 생활수준이나 식생활 습관에 밀접한 관련이 있음을 알 수 있다. 세계적으로 전립선암이나 대장암과 같이 후천적인 영향을 받아 유발되는 암의 발생률과 사망률은 후진국이나 개발도상국보다 선진국인 서양에서 더 높게 나타난다. 최근 우리나라에서도 산업 및 경제의 발달로 인하여 식습관과 환경오염에 의해 유발되는 암의 사망률이 증가하고 있으며(2), 그중에서 전립선암의 발병률은 빠른 속도로 증가하고 있는 추세이다. 2012년 통계청에서 발표한 우리나라의 사망 통계원인에 의하면 전립

선암에 의한 사망률은 2002년 인구 100,000명당 1.5%이었으나, 2012년에 2.9%로 10년간 다른 종류의 암들에 비하여 꾸준한 사망률 증가 추세를 보이고 있다(3). 전립선암은 대부분 비 유전성으로 환경요인과 자연 발생적인 유전자 변성이 전립선암 발생과 밀접한 관련이 있다고 알려져 있으며 유전적인 소인, 남성호르몬인 테스토스테론(testosterone)의 영향, 식이습관 등이 그 원인으로 알려져 있다(4,5). 기존의 전립선암 세포에 관한 연구는 주로 상피로 전이된 형태의 LNCaP-FCG 세포와 척추로 전이된 형태인 PC-3 세포를 들 수 있다. 이러한 세포들은 전립선에서 각각 상피 및 척추로 전이된 후의 형태를 가지고 있어 순수한 전립선암이라고 보기는 어렵다. 하지만 본 연구에 사용된 인체 전립선암 RC-58T/h/SA#4 세포는 전이되기 전 형태의 primary cancer tissue로부터 분리된 세포로서 앞으로 전립선암 연구를 위한 새로운 인체 암세포 배양 모델로서 중요한 역할을 할 것으로 생각된다(6).

최근 기존의 항암제 부작용에 대한 문제점들이 보고되고 있다. 이러한 부작용에 대한 문제점을 해결하기 위하여 인체에 안정성이 입증된 천연물로부터 추출 및 분리한 생리활성

Received 12 September 2013; Accepted 26 February 2014

*Corresponding author.

E-mail: seoki@sunchon.ac.kr, Phone: +82-61-750-3655

을 가지는 물질들을 이용한 기능성 식품 및 항암제 개발에 대한 연구들이 진행되고 있다.

오배자(Galla Rhois)는 울나무과에 속하는 붉나무의 잎에 진딧물이 자상을 주어 생긴 벌레집으로 일본, 중국과 함께 우리나라 각지에 분포하고 있다(7). 예로부터 오배자는 해열, 소염, 지열, 부인병, 건강, 화상, 해독, 노인의 만성 기관지염 및 치질 등의 치료제로 사용되어져 왔다. 오배자의 주성분은 methyl gallate, gallic acid 등과 같은 pyrogallol tannin으로 알려졌다(8). 오배자의 최근 연구동향은 탄닌 화합물 분리 및 항균 활성(9,10), 세포 독성(11)에 관한 연구들이 있다.

오배자의 주요 성분인 methyl gallate(MG)는 methyl-3,4,5-trihydroxybenzoic acid로 일반명으로 gallicin이라고도 한다. MG는 solvent extraction, ultrafiltration, molecular sieve chromatography, reverse octylsine HPLC에 의하여 천연물에서 순수 분리하였다(12). MG에 대한 생리 활성 연구로는 항바이러스성 활성(12), 항산화 활성(13) 및 항균효과(14), 구강암세포의 성장 억제효과(15) 등이 보고되고 있다. MG에 대한 생리활성 연구들이 진행되고 있으나 대부분이 항산화 및 항균효과 등에 대한 연구들만이 진행되고 있으며 암세포의 증식 억제효과 및 세포 사멸 기전에 관련한 항암효과에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 methyl gallate의 인체 전립선 암세포(RC-58T/h/SA#4)에 대한 증식 억제효과 및 apoptosis를 통한 사멸기전에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

암세포 배양 및 methyl gallate 처리

본 실험에 사용한 인체 전립선암 세포주인 RC-58T/h/SA#4는 Center for Prostate Disease Research(Department of Surgery, Uniformed Services University of Health Sciences, Bethesda, MD, USA)로부터 분양받아 실험에 사용하였으며, 100 units/mL의 Antibiotic Antimycotic과 10% FBS(fetal bovine serum)가 첨가된 DMEM 배지를 사용하였다. 암세포는 37°C, 5% CO₂ incubator (HERA cell 150, Heraeus, Hanau, Germany)에서 주 2~3회 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 계대배양 하여 사용하였으며, passage number가 10회 이상일 때는 폐기하고 새로운 세포를 다시 배양하여 실험하였다. Methyl gallate (MG)는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 에탄올로 용해하여 본 연구에 사용하였다.

Charcoal-treated FBS 제조

Serum의 호르몬 활성을 최소화하기 위하여 FBS에 5% charcoal을 처리하여 55°C에서 30분 동안 교반한 후 3,000 rpm, 4°C, 20분간 원심분리 하여 상등액을 취하였고, 이를 2회 반복하여 얻은 상등액을 0.45 µm micro filter로 여과하

여 charcoal-treated FBS(cfBS)를 얻은 후 -20°C에서 보관하여 실험에 사용하였다(16).

암세포 증식 억제효과

Monolayer로 자란 전립선 암세포주를 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 single cell로 만든 후 최종농도가 1×10⁵ cells/mL가 되도록 희석하여 24 well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후, MG를 농도별로 첨가하여 24시간 반응시켜 암세포 증식 정도를 sulforhodamine B(SRB, Sigma-Aldrich Co.) 및 cell counting 방법에 의하여 측정하였다(17,18).

형태학적 관찰

Monolayer로 배양한 RC-58T/h/SA#4 세포를 각 well 당 1×10⁶ 농도로 6 well plate에 분주하고 24시간 배양 후 MG를 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후 위상차 현미경(LP-1, Leica, Wetzlar, Germany)을 이용하여 대조군과 시료처리군의 형태학적 변화를 관찰하였다.

Sub-G1의 함량 측정

Monolayer로 배양한 RC-58T/h/SA#4 세포를 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 single cell로 만든 후 배양액으로 최종농도가 1×10⁶ cells/mL가 되도록 희석하여 6 well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간이 지난 후 각 well의 배양액을 제거한 후 MG를 농도별로 well에 처리하여 24시간 더 배양시킨 후 회수하였다. 회수한 세포를 PBS로 3회 세척하고, 상층액을 제거한 다음 차가운 70% 에탄올 5 mL를 가하고 4°C에서 하루 동안 방치하였다. 고정된 세포를 3회 세척하고 0.1 mg/mL RNase를 처리하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 종료 후 1 mg/mL의 propidium iodide(PI) 용액으로 30분간 염색하였다. 염색된 세포 현탁액은 Flow cytometer(EPICS XL, Beckman Coulter, Brea, CA, USA)를 이용하여 세포주기를 분석하였다(19).

핵 형태학적 관찰

RC-58T/h/SA#4 세포를 1×10⁶ cells/mL 밀도로 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 MG를 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 배양이 종료된 well에서 회수한 세포를 PBS로 3회 세척하고 Hoechst 33258(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 실온에서 20분 염색한 후 형광 현미경으로 관찰하였다(20).

DNA 분절 정량

Monolayer로 배양한 세포를 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 single cell로 만든 후 배양액으로 최종농

도가 1×10^6 cells/mL가 되도록 희석하여 6 well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간이 지난 후 각 well의 배양액을 제거한 후 MG를 농도별로 well에 처리하여 24시간 더 배양시켰다. 세포를 수거하여 용해 완충액(lysis buffer)을 첨가하여 30분간 실온에서 세포를 용해시키고, 200×g에서 10분간 원심분리하였다. 100 µL의 coating solution(biotinylated anti histone)을 96 well plate에 분주하여 흡착시킨 후에 100 µL의 용해시킨 상층액과 peroxidase-coupled anti-DNA antibodies를 차례로 첨가하여 90분간 반응시켰다. 반응이 끝난 각 well에 200 µL의 washing solution을 분주하여 3회 세척하고, 100 µL의 ABTS[2,2' azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] 기질(substrate)을 첨가하여 20분간 반응시킨 후 microplate reader(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 파장 405 nm에서 흡광도를 측정하였다(21).

Caspase 활성 측정

Caspase의 활성은 colorimetric assay kit(BioVision, Milpitas, CA, USA)로 제조사의 방법에 따라 측정하였다. 즉 monolayer로 배양한 RC-58T/h/SA#4 세포를 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 single cell로 만든 후 배양액으로 최종농도가 1×10^7 cells/mL가 되도록 희석하여 10 cm dish에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간이 지난 후 각 dish의 배양액을 제거한 후 다양한 농도의 MG를 dish에 처리하여 24시간 더 배양시켰다. 반응이 종료된 dish에서 회수한 세포를 PBS로 3회 세척 후 상등액을 제거한 세포에 50 µL lysis buffer를 첨가하여 용해하고, caspase-3(DEVD-pNA), caspase-8(IETD-pNA), caspase-9(LEHD-pNA)와 함께 37°C에서 2시간 간격으로 배양하였다. 반응 종료 후 96 well plate 용 microplate reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 활성 정도를 확인하였다(22).

Caspase inhibitor 활성 측정

Monolayer로 배양한 RC-58T/h/SA#4 세포를 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 single cell로 만든 후 배양액으로 최종농도가 1×10^5 cells/mL가 되도록 희석하여 24 well에 분주한 다음의 상등액을 모두 제거하고 MG를 처리하기 2시간 전에 2 µM의 caspase-family inhibitor (z-VAD-fmk)가 첨가된 배양액을 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 2시간 후 MG를 농도별로 처리하고 24시간 더 반응시켰다. 반응이 종료된 후 24 well의 세포를 수거하여 trypan blue 용액으로 염색하여 생존 세포와 죽은 세포를 각각 counting하였다(23).

Western blot을 이용한 단백질 측정

Monolayer로 배양한 세포를 0.25% trypsin-EDTA 용

액으로 처리하여 single cell로 만든 후 배양액으로 최종농도가 1×10^7 cells/mL가 되도록 희석하여 10 cm dish에 첨가한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간이 지난 후 각 dish의 배양액을 제거한 후 다양한 농도로 준비한 시료가 포함된 새 배양액을 dish에 첨가하고 48시간 더 반응시켰다. 반응이 종료된 dish에서 회수한 세포를 PBS로 3회 세척 후 500 µL lysis buffer(50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM NaF, 30 mM Na₄P₂O₇, 1 mM PMSF, 2 µg/mL aprotinin)를 첨가하여 얼음에서 용해하였다. 세포 용해액과 2×sample buffer를 동량으로 섞어 65°C에서 5분간 끓인 후 8%와 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitro-cellulose membrane으로 transfer한 후 blocking buffer(2.5%, 5% BSA)로 상온에서 1시간 반응시킨 후 primary antibody(anti-PARP, anti-Bax, anti-Bcl-2, anti-Bid, anti-cytochrome c)를 희석하여 4°C에서 하루 동안 반응시켰다. T-TBS로 1시간 이상 세척하고 secondary anti-rabbit IgG conjugated HRP를 희석하여 4°C에서 1시간 반응시켰다. 반응 종료 후 membrane을 T-TBS로 1시간 이상 세척하고 enhanced chemiluminescence kit(ECL kit)를 사용하여 필름에 노출시켜 단백질을 확인하였다(19).

통계처리

실험결과는 평균±표준편차로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군 간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's *t*-test를 이용하여 유의성 여부를 판정하였다(*P*<0.05).

결과 및 고찰

Methyl gallate의 RC-58T/h/SA#4 암세포의 증식 억제 효과

MG가 인체 전립선암 세포인 RC-58T/h/SA#4 세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는지를 trypan blue assay를 통하여 확인하였다(Fig. 1A). 배양한 암세포에 MG를 농도별로 처리한 뒤 24시간 더 배양시킨 결과 농도 의존적으로 암세포의 증식을 억제시킴을 알 수 있었다. 특히 250 µM의 농도에서 약 60% 이상의 사멸률을 보여 높은 암세포 증식 억제 효과가 있음을 알 수 있었다. 따라서 MG는 인체 전립선암 세포 증식을 억제하는 효과를 가지고 있음을 추측할 수 있었다. 또한 MG의 첨가에 따른 RC-58T/h/SA#4 세포의 형태학적 변화를 확인하기 위해 농도별로 MG를 처리하여 24시간 반응 후 각 농도별로 형태학적 변화를 현미경으로 관찰하였다(Fig. 1B). 무 처리군의 경우 well plate에 안정적으로 부착되어 정상적인 증식이 이루어진 모습인 반면, MG를 처리한 군의 경우 농도 의존적으로 세포의 증식이 감소하였으며 세포가 well plate로부터 분리되어 배양액에 부유한 모습

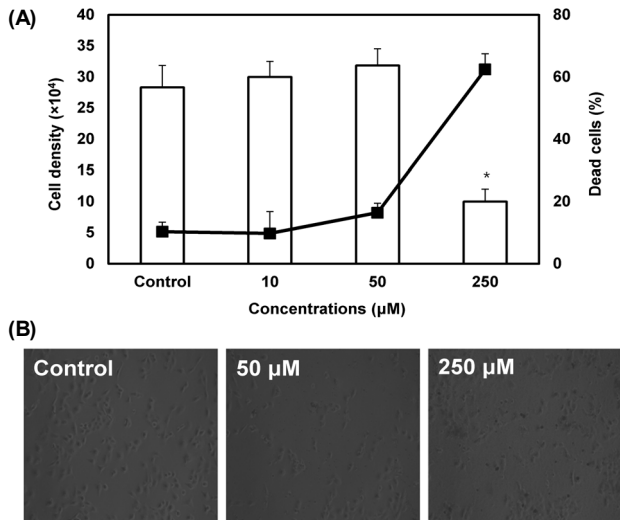


Fig. 1. Effect of MG on the viability of RC-58T/h/SA#4 human prostate cancer cells. (A) Cells were treated with MG (10, 50, and 250 μM) for 24 hr after which the viability of cells was determined by trypan blue exclusion assay. Data values were expressed as mean \pm SD (n=3). Significant differences were compared with the control at $P < 0.05$ using the Student's *t*-test. (B) After 24 hr incubation with 50 and 250 μM MG, cell morphology was visualized by inverted microscopy. Magnification $\times 200$.

이었다. 또한 세포는 일정한 모양을 잃고 크기가 줄어든 것을 미루어 보아 세포의 사멸이 이루어짐을 알 수 있었다.

Methyl gallate가 RC-58T/h/SA#4 세포의 apoptosis에 미치는 영향

MG의 처리에 따른 RC-58T/h/SA#4 세포의 사멸이

apoptosis에 의해 유도되는지를 Hoechst 33258 염색을 통한 핵 관찰, sub-G1 함량 변화 및 DNA 분절량 변화 측정을 통해 확인하였다. 먼저 RC-58T/h/SA#4 세포에 MG를 50 및 250 μM 농도로 첨가하여 24시간 배양한 후 Hoechst 염색하여 핵의 형태 변화를 관찰하였다(Fig. 2A). 즉 대조군의 핵은 손상 없이 형태가 일정한 반면, MG를 처리한 군의 핵은 손상되어 절편되어졌으며, apoptosis의 특징 중 하나인 apoptotic body가 형성된 것을 관찰할 수 있었다. 또한 MG에 의해 유도된 apoptosis 정도를 정량적으로 분석하기 위하여 MG를 농도별로 24시간 처리하고 PI 염색약으로 염색시켜 sub-G1의 함량 변화를 flow cytometry로 분석하였다(Fig. 2B). 분석 결과 MG의 농도에 의존적으로 sub-G1 함량이 증가하였으며, 특히 250 μM 의 농도에서는 sub-G1 함량이 약 19.4%로 증가하였다. Han 등(24)에 따르면 pyrogallol이 인체 폐암 세포주인 Calu-6의 세포의 sub-G1의 함량 변화를 측정된 결과 농도 의존적으로 sub-G1의 함량이 증가한다고 보고하였다. MG의 처리에 따라 RC-58T/h/SA#4 세포에서 apoptosis가 진행될 때 세포에서 나타나는 DNA의 분절을 정량적으로 분석하기 위해 Cell death detection ELISA^{plus} kit(Roche, Basel, Switzerland)를 이용하였다(Fig. 2C). RC-58T/h/SA#4 세포에 MG를 50 및 250 μM 의 농도로 처리하였을 때, 각각 대조군에 비교한 측정값이 각각 1.64, 1.88로 나타났다. Saeki 등(25)은 차카테킨에서 폴리페놀계 물질들을 분리하여 인체 임파선 암세포에 처리한 결과 DNA 분절이 일어났다고 보고하고 있다. 위의 결과들을 종합하여 볼 때 본 실험에서 사용한 폴리페놀계 화합물인 MG의 처리에 따른 RC-58T/h/SA#4 세포의 사멸은 apoptosis와 연관이 있음을 알 수 있었다.

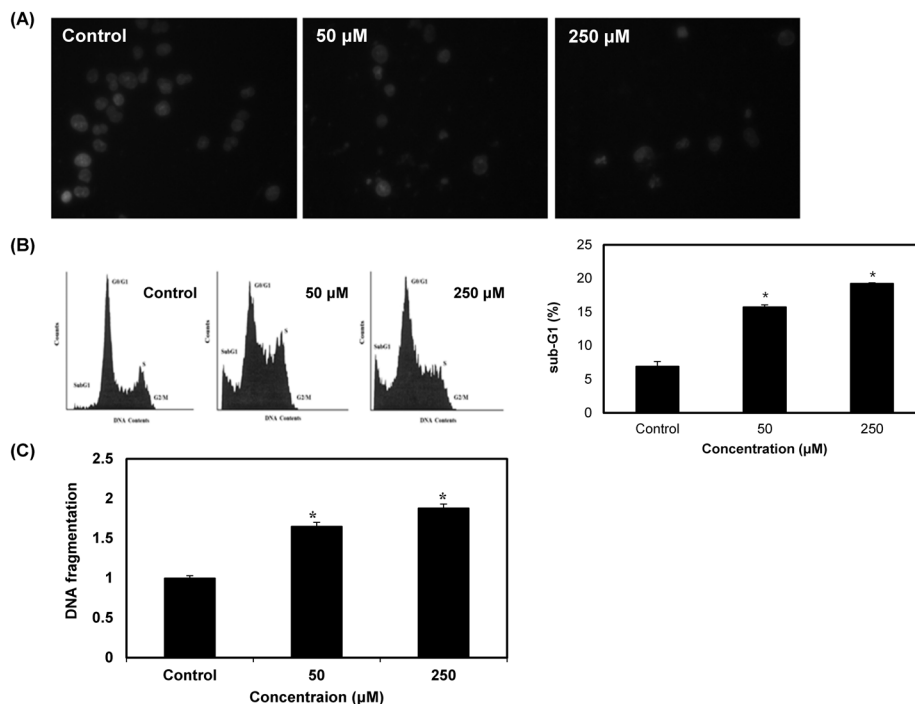


Fig. 2. Effect of MG on apoptosis in RC-58T/h/SA#4 human prostate cancer cells for 24 hr. (A) Apoptotic body formation was observed under a fluorescent microscope after Hoechst 33258 staining (magnification $\times 400$). (B) Sub-G1 content was detected by flow cytometry after propidium iodide staining. Significant differences were compared with the control at $*P < 0.05$ using the Student's *t*-test. (C) DNA fragmentation was measured using cell death detection ELISA^{plus} kit. Data values were expressed as mean \pm SD (n=3). Significant differences were compared with the control at $*P < 0.05$ by Student's *t*-test.

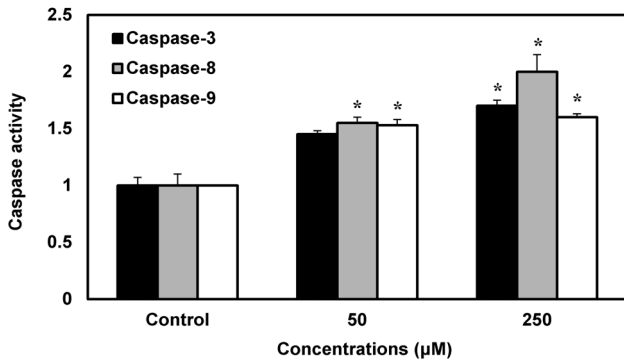


Fig. 3. Caspase activity in RC-58T/h/SA#4 cells treated with MG. Data values were expressed as mean±SD (n=3). Significant differences were compared with the control at **P*<0.05 by Student's *t*-test.

Methyl gallate에 의한 caspase 활성화

MG를 처리한 RC-58T/h/SA#4 세포의 사멸에 있어 caspase-3, -8 및 -9의 활성 여부를 colorimetric assay kit(BioVision)를 사용하여 측정하였다(Fig. 3). 즉 MG를 RC-58T/h/SA#4 세포에 10, 50 및 250 µM 농도로 처리하여 24시간 배양하고 kit를 이용하여 caspase들의 활성을 측정된 결과 농도 의존적으로 활성이 증가하였다. 앞서 실험한 결과를 바탕으로 MG를 처리한 RC-58T/h/SA#4 세포의 apoptosis는 caspase의 활성화에 의해 유도됨을 추측할 수 있었다. 이를 재확인하기 위하여 caspase inhibitor인 z-VAD-fmk를 처리하여 확인하였다(Fig. 4). RC-58T/h/SA#4 세포를 배양하여 z-VAD-fmk 처리군과 무 처리군에 MG를 농도별로 처리한 후 trypan blue assay를 이용하여 측정된 결과 무 처리군의 경우 50 및 250 µM의 농도에서 높은 사멸률을 보였으나, 처리군의 경우 무 처리군에 비해 낮은 사멸률을 나타내었다. 위 결과를 통하여 MG에 의한 인체 전립선 암세포의 apoptotic 세포 사멸 유도가 caspase 활성화 경로에 의한 것임을 증명할 수 있었다. Kang 등(26)은 resveratrol을 RC-58T/h/SA#4 primary 전립선 암세포에

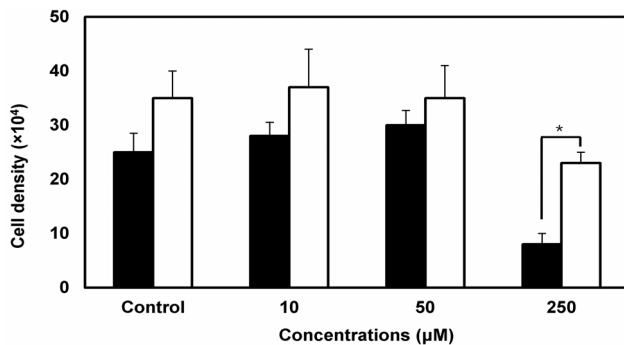


Fig. 4. Effect of caspase inhibitor (z-VAD-fmk) on cell death induced by MG. RC-58T/h/SA#4 cells were preincubated with 10 µM z-VAD-fmk for 2 hr and then treated with various concentrations of MG. Data values were expressed as mean±SD (n=3). Significant differences were compared with the control at **P*<0.05 by Student's *t*-test.

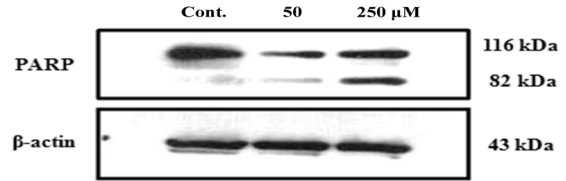


Fig. 5. Effect of MG on the PARP cleavage in RC-58T/h/SA#4 cells. RC-58T/h/SA#4 cells were incubated with 50 and 250 µM MG for 24 hr after which cells were harvested and lysed. Protein lysate were subjected to 12% SDS-PAGE and then immunoblotted with corresponding antibodies.

24시간 처리하였을 때 100 µM 이상의 농도에서 대조군에 비해 약 1.5배 정도 caspase의 활성이 증가하였다고 보고하고 있다.

Methyl gallate에 의한 PARP 단백질 발현의 변화

MG가 RC-58T/h/SA#4 세포에 apoptosis를 유도하는데 관련하는 단백질의 종류를 알아보기 위해 western blot법을 시행하였다. Effector caspase인 caspase-3는 PARP와 같은 단백질들의 cleavage를 유도하여 apoptosis를 유도한다(27). MG가 PARP 단백질의 발현에 cleavage를 유도하여 apoptosis를 유도하였는지 확인한 결과는 Fig. 5와 같다. 즉 MG를 처리하지 않은 경우 cleaved PARP가 발현되지 않았으나, 50 및 250 µM로 처리한 경우 cleaved PARP가 발현되었음을 확인하였으며 높은 농도에서 cleaved PARP의 발현이 높아진 것을 관찰할 수 있었다. Chen 등(28)은 가자나무로부터 분리한 polyphenol 화합물들을 인체 혈구 암 세포인 HL-60에 처리하였을 때 50 µg/mL 이상의 농도에서 caspase-3의 활성을 유도하였으며 cleaved PARP가 발현되었다고 보고하였다. 따라서 MG는 caspase-3의 활성을 유도함으로써 cleaved PARP 단백질의 발현을 증가시켜 apoptosis를 유도함을 확인하였다.

Methyl gallate에 의한 Bcl-2 family 단백질 발현의 변화

MG를 RC-58T/h/SA#4 세포에 처리하였을 때 apoptosis와 가장 밀접한 연관성을 가지는 단백질인 Bcl-2 family 단백질의 발현에 영향을 미치는지를 western blot법을 통해 확인하였다(Fig. 6). Anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가진 Bcl-2 단백질의 발현은 MG 농도가 높아질수록 줄어들었으며, pro-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 유도하는 Bax 단백질의 발현은 농도가 높아질수록 증가함을 확인하였다. 한편 활성화된 caspase-8은 Bid 단백질의 cleavage를 유도하여 tBid 단백질의 발현을 증가시키고 발현된 tBid 단백질은 미토콘드리아로 이동하여 cytochrome c 단백질의 방출을 유도한다. 이를 확인하기 위하여 Bid 단백질의 cleavage와 cytochrome c 단백질의 발현을 확인한 결과 농도가 높아질수록 tBid 단백질의 발현이 증가하였으며 또한 cytochrome c 단백질의 발현이 증가하였음을 확인하였다. Hong과 Kim(29)

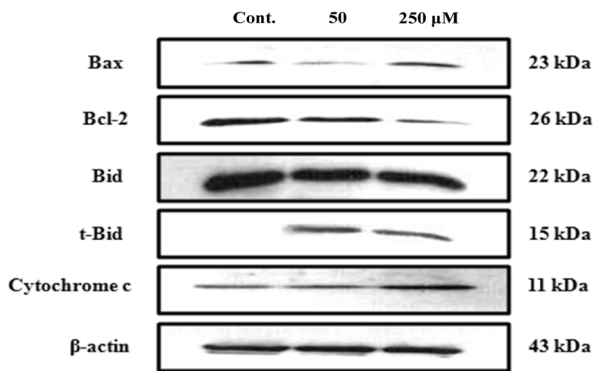


Fig. 6. Effect of MG on the levels of Bcl-2 family proteins in RC-58T/h/SA#4 cells. RC-58T/h/SA#4 cells were incubated with 50 and 250 μ M MG for 24 hr after which cells were harvested and lysed. Protein lysate were subjected to 12% SDS-PAGE and then immunoblotted with corresponding antibodies.

은 인체 유방암 세포인 MDA-MB-231에 epigallocatechin gallate을 처리하였을 때 Bcl-2 family 단백질인 Bax와 Bcl-2의 단백질 발현을 조절함으로써 apoptosis 유도를 통한 세포 사멸을 일으킨다고 보고하고 있다. 위의 결과를 통해 MG는 Bcl-2 family 단백질의 발현에 영향을 주어 RC-58T/h/SA#4 세포에서 apoptosis를 유도하는 것을 알 수 있었다.

Methyl gallate의 처리에 따른 환경 호르몬이 처리된 RC-58T/h/SA#4 세포 증식 억제효과

전립선 암세포에 환경호르몬인 dioxin과 bisphenol A를 호르몬을 제거한 배지에 각각 1 nM과 0.1 μ M의 농도로 처리하여 RC-58T/h/SA#4 세포를 증식시킨 후 MG를 다양한 농도로 처리하여 72시간 동안 배양시켜 증식 억제효과를 측정하였다(Fig. 7). 그 결과 dioxin과 bisphenol A를 처리한 배지 모두에서 농도 의존적으로 암세포의 증식을 억제하는 결과를 보였다. 특히 dioxin과 bisphenol A를 처리한 군 모두 250 μ M의 농도에서 높은 억제율을 나타내었다. Kwon

등(30)은 dioxin과 bisphenol A의 처리에 의해 증식이 유도된 RC-58T/h/SA#4 인체 전립선 암세포에서 산수유 에탄올 추출물이 전립선 암세포의 증식을 억제하였으며, Kim 등(31)은 환경호르몬에 의해 유도된 MCF-7 유방암 세포의 증식이 유자와 탱자의 과피 에탄올 추출물의 처리로 인해 농도 의존적으로 억제되었다고 보고하였다. 따라서 본 실험의 결과로 MG가 환경호르몬으로부터 유도된 RC-58T/h/SA#4 전립선 암세포의 비정상적인 과증식을 억제함을 확인할 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 MG의 RC-58T/h/SA#4 인체 전립선 암세포에 대한 증식 억제 및 apoptosis 유도효과에 대하여 확인하였다. MG는 RC-58T/h/SA#4 세포의 증식을 농도 의존적으로 억제하였다. 이러한 MG에 의한 RC-58T/h/SA#4 세포의 사멸이 apoptosis에 의해 일어나는지를 sub-G1 함량 측정 및 Hoechst 33258 염색을 이용하여 확인하였다. 그 결과 MG를 처리한 군의 sub-G1의 함량이 대조군에 비하여 증가하였으며, methyl gallate를 처리한 군에서 핵의 응축과 apoptotic body 형성을 Hoechst 33258 염색을 통하여 관찰할 수 있었다. 또한 RC-58T/h/SA#4 세포에서 MG가 유도하는 apoptosis의 기전을 확인하기 위하여 다양한 실험을 실시하였다. MG는 DNA의 분절량 증가 및 caspase 활성을 유도하였으며, 활성화된 caspase-8, -9 및 -3에 의해 PARP와 Bid 단백질의 분절을 발현시켰으며, Bcl-2 family 단백질의 발현에 영향을 미쳐 apoptosis를 유도하였음을 확인하였다. 한편 환경호르몬인 dioxin과 bisphenol A를 다양한 농도로 처리한 결과 각각 1 nM, 0.1 μ M 농도에서 가장 높은 전립선 암세포 과다증식을 유도하였으며, 이를 바탕으로 MG를 농도별로 처리한 결과 환경호르몬에 의해 유도된 인체 전립선 암세포의 증식을 농도 의존적으로 억제시켰다. 본 연구 결과 MG는 RC-58T/h/SA#4 전립선 암세포에서

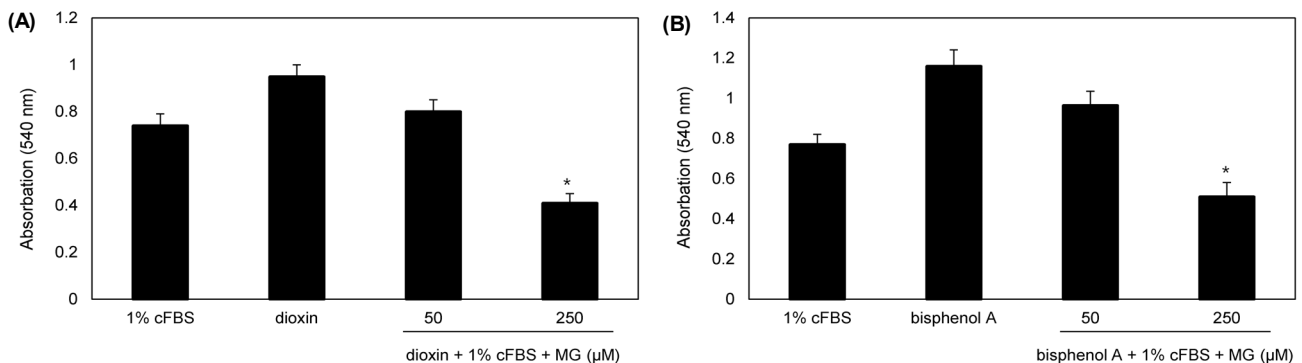


Fig. 7. Effect of endocrine disruptions in RC-58T/h/SA#4 cells treated with MG. (A) RC-58T/h/SA#4 cells were treated with 1% cFBS, 1% cFBS+dioxin and 1% cFBS+dioxin+each concentration of MG for 24 hr. (B) RC-58T/h/SA#4 cells were treated with 1% cFBS, 1% cFBS+bisphenol A and 1% cFBS+bisphenol A+each concentration of MG for 24 hr. Cell viability was determined by SRB assay. Data values are expressed as mean \pm SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with control at * P <0.05 by Student's t -test.

apoptosis 유도를 통한 암세포 성장 억제효과를 가지고 있음을 확인하였으며, 환경호르몬에 의해 유발될 수 있는 암에 대해서도 유사한 보호효과를 가지고 있음을 증명하였다.

REFERENCES

- Park SH, Cho YS, Kwack MJ, Lee HS, Kang CB. 2013. Effect of Kegel exercise on urinary incontinence after radical prostatectomy: Systematic review of randomized controlled trials. *Korean J Adult Nurs* 25: 219-230.
- Song JM. 2003. Epidemiology and natural history of prostate cancer. *Korean J Urological Oncology* 1: 6-9.
- Korea National Statistical Office. 2012. Annual report on the cause of death statistics. Daejeon, Korea. p 14.
- Smith JR, Freije D, Carpten JD, Grönberg H, Xu J, Isaacs SD, Brownstein MJ, Bova GS, Guo H, Bujnovszky P, Nusskern DR, Damber JE, Bergh A, Emanuelsson M, Kallioniemi OP, Walker-Daniels J, Bailey-Wilson JE, Beaty TH, Meyers DA, Walsh PC, Collins FS, Trent JM, Isaacs WB. 1996. Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science* 274: 1371-1374.
- Culing Z, Hobisch A, Cronauer MV, Radmayr C, Trapman J, Hittmair A, Bartsch G, Klocker H. 1994. Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-1, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res* 54: 5474-5478.
- Yasunaga Y, Nakamura K, Ko D, Srivastava S, Moul JW, Sesterhenn IA, McLeod DG, Rhim JS. 2001. A novel human cancer culture model for the study of prostate cancer. *Oncogene* 20: 8036-8041.
- Ha YA. 2008. Studies on cytoprotective and anti-inflammatory effects of isolated from *Galla Rhois*. MS Thesis. Wonkwang University, Iksan, Korea.
- Kwak MJ, Kwon JS, Lee SH. 2008. Natural dyeing of chitosan crosslinked cotton fabrics (*Gallnut*). *J Korean Soc Cloth Ind* 10: 377-384.
- Lee YK, Kim YK, Choi YH, Kim KK. 1999. Antimicrobial effects of the methanol extracts of *Schlectendlaia mimifuehi* Matsumura on *Vibrio* spp. *J AGR Technol Dev Institute* 3: 201-204.
- Lee YC, Oh SW, Hong HD. 2002. Antimicrobial characteristics of edible medicinal herbs extracts. *Korean J Food Sci Technol* 34: 700-709.
- Kim SJ, Yang HY, Lee SG. 2009. Antimicrobial effect and cytotoxicity of *Chinensis galla*. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 23: 412-415.
- Kane CJ. 1986. Studies on purification and characterization of a novel herpesvirus inhibitor from natural. *Diss Abstr Int (Sci)* 47: 1530.
- Lee YC, Oh SW, Hong HD. 2002. Antimicrobial characteristics of edible medicinal herbs extracts. *Korean J Food Sci Technol* 34: 700-709.
- Cha BC, Lee SB, Rhim TJ, Lee KH. 2000. Constituents of antioxidative activity and free radical scavenging effect from *Galla Rhois* (*Rhus javanica* Linne). *Korean J Pharmacogn* 31: 185-189.
- Kim GS, Han DS. 2000. Studies on the cytotoxicity and antineoplastic activity of methyl gallate. *J Wonkwang Dental Res Inst* 10: 23-39.
- Chujo H, Yamasaki M, Nou S, Koyanagi N, Tachibana H, Yamada K. 2003. Effect of conjugated linoleic acid isomers on growth factor-induced proliferation of human breast cancer cells. *Cancer Lett* 202: 81-87.
- Xu W, Chen J, Wang F, Chen Y, Zhao F. 2004. Arrested proliferation and molecular mechanism of MAPKs' activations in manganese-treated PC12 cell line. *J Hyg Res* 33: 674-677.
- Papazisis KT, Kalemi TG, Zambouli D, Geromichalos GD, Lambropoulos AF, Kotsis A, Boutis LL, Kortsaris AH. 2006. Synergistic effects of protein tyrosine kinase inhibitor genistein with camptothecins against three cell lines *in vitro*. *Cancer Lett* 223: 255-264.
- Wan CK, Wang C, Cheung HY, Yang M, Fong WF. 2006. Triptolide induces Bcl-2 cleavage and mitochondria dependent apoptosis in p53-deficient HL-60 cells. *Cancer Lett* 241: 31-41.
- Chan FL, Choi HL, Chen ZY, Chan PS, Huang Y. 2000. Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by flavonoid, baicalin. *Cancer Lett* 160: 219-228.
- Chae MJ, Shim J, Kim BH, Hwangbo Y, Lee YJ, Ha SH, Jang JY, Dong SH, Kim HJ, Chang YW, Chang R. 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor ligands exert antineoplastic effects in hepatocellular carcinoma cells. *Korean J Med* 75: 288-299.
- Kuo PL, Hsu YL, Chang CH, Lin CC. 2005. The mechanism of ellipticine-induced apoptosis and cell cycle arrest in human breast MCF-7 cancer cells. *Cancer Lett* 223: 293-301.
- Cui Q, Yu JH, Wu JN, Tashiro SI, Onodera S, Minami M, Ikejima T. 2007. P53-mediated cell cycle arrest and apoptosis through a caspase-3-independent, but caspase-9-dependent pathway in oridonin-treated MCF-7 human breast cancer cells. *Acta Pharmacologica Sinica* 28: 1057-1066.
- Han YH, Kim SH, Kim SZ, Park WH. 2009. Pyrogallol inhibits the growth of human pulmonary adenocarcinoma A549 cells by arresting cell cycle and triggering apoptosis. *J Biochem Mol Toxicol* 23: 36-42.
- Saeki K, Sano M, Miyase T, Nakamura Y, Hara Y, Aoyagi Y, Isemura M. 1999. Apoptosis-inducing activity of polyphenol compounds derived from tea catechins in human histiolytic lymphoma U973 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 63: 585-587.
- Kang HI, Kim JY, Cho HD, Park KW, Kang JS, Seo KI. 2010. Resveratrol induces apoptosis in primary human prostate cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1119-1125.
- Kim EJ, Lee YJ, Shin HK, Yoon JH. 2006. A study on the mechanisms by which the aqueous extract of *Inonotus obliquus* induces apoptosis and inhibits proliferation in HT-29 human colon cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 516-523.
- Chen LG, Huang WT, Lee LT, Wang CC. 2009. Ellagitannins from *Terminalia calamansanai* induced apoptosis in HL-60 cells. *Toxicol In Vitro* 23: 603-609.
- Hong EJ, Kim WK. 2008. Effect of epigallocatechin gallate on apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1114-1119.
- Kwon SH, Kwon SJ, Kim JY, Park KW, Shim KH, Seo KI. 2009. Protective effect of *Corni fructus* ethanol extracts against environmental hormones in human prostate cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 663-666.
- Kim JE, Park JH, Kang BW, Seo MJ, Choi YH, Lim HS, Seo KI, Kim JI, Joo WH, Lee BK, Jeong YK. 2008. Anticancer activity of ethanol extract from peel of *Citrus junos* and *Poncirus trifoliata* on MCF-7 breast cancer cells. *J Life Sci* 18: 1435-1441.