

Sagantang-induced Apoptotic Cell Death is Associated with the Activation of Caspases in AGS Human Gastric Carcinoma Cells

Cheol Park¹, Su Hyun Hong², Sung Hyun Choi³, Se-Ra Lee⁴, Sun-Hee Leem⁴ and Yung Hyun Choi^{2,5*}

¹Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences and Human Ecology, Dongeui University, Busan 614-714, Korea

²Department of Biochemistry, Dongeui University College of Korean Medicine, Busan 614-052, Korea

³Department of Safety & System Management, Korea Lift College, Geochang 670-802, Korea

⁴Department of Biological Sciences, Dong-A University, Busan 49315, Korea

⁵Anti-Aging Research Center & Blue-Bio Industry RIC, Dongeui University, Busan 614-714, Korea

Received July 27, 2015 / Revised August 30, 2015 / Accepted September 1, 2015

Sagantang (SGT), a Korean multiterb formula comprising six medicinal herbs, *Paeonia lactiflora* Pall., *Belamcanda chinensis* (L.) DC, *Gardenia jasminoides* Ellis, *Poria cocos* Wolf, *Cimicifuga heracleifolia* Komarov, and *Artractylodes japonica* Koidzumi, was recorded in "Dongeuibogam." The present study investigated the anticancer potential of SGT in AGS human gastric carcinoma cells. The results indicated that SGT treatment significantly inhibited the growth and viability of AGS cells in a dose-dependent manner, which was associated with the induction of apoptotic cell death, as evidenced by the formation of apoptotic bodies, in addition to chromatin condensation and DNA fragmentation, and the accumulation of annexin-V positive cells. The induction of apoptotic cell death by the SGT treatment was associated with up-regulation of Fas protein expression, truncation of Bid, and down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 protein. The SGT treatment also effectively induced the loss of mitochondrial membrane potential, which was associated with the activation of caspases (caspase-3, -8, and -9) and degradation of poly (ADP-ribose) polymerase. However, a pan-caspase inhibitor significantly blocked the SGT-induced apoptosis and growth suppression in AGS cells. This study suggests that SGT induces caspase-dependent apoptosis through an extrinsic pathway by upregulating Fas, as well as through an intrinsic pathway by modulating Bcl-2 family members in AGS cells. The results suggest that SGT may be a potential chemotherapeutic agent for the control of human gastric cancer cells. However, further studies will be needed to confirm the potential of SGT in cancer prevention and therapy in an *in vivo* model and to identify biological active compounds of SGT.

Key words : AGS cells, apoptosis, caspase, mitochondrial membrane potential, Sagantang

서론

항암치료를 위한 약물 개발에서 주요한 전략 중의 하나가 정상세포의 증식과 분열에는 영향을 주지 않으면서 암세포 선택적으로 증식 억제를 통한 체내에서의 제거이다. 비록 프로그램화된 세포 사멸로 알려진 apoptosis가 개체의 발생과 증식 및 항상성 유지에 필수적인 과정이지만, 체내의 비정상적인 세포들을 제거하는 중요한 생리학적 과정이기도하다. 따라서 암세포 선택적인 apoptosis를 유도할 수 있는 약물의 발굴은 항암제 개발을 위한 절대적인 필수요건으로 인식되고 있다[7, 12].

최근 apoptosis의 유도 기전에 대한 다양한 분류가 시도되고 있으나, 일반적으로 세포막에 존재하는 death receptor (DR)와 해당 DR 특이적 death legend와의 결합으로 개시되는 DR-mediated extrinsic apoptosis 경로와 mitochondria를 중심으로 apoptosis가 활성화되는 mitochondria-mediated intrinsic apoptosis 경로로 대별된다[6, 15]. 또한 많은 항암제에 의하여 유발되는 암세포 특이적 apoptosis 유발에 핵심적으로 관여하는 cystein-containing aspartate-specific protease family에 속하는 caspase protease는 initiator caspase와 effector caspase로 분류된다[5, 8]. 그중 caspase-8은 DR과 death legend와의 결합에 따른 extrinsic apoptosis 경로의 시작과 동시에 활성이 증대되며[6, 26], caspase-9는 mitochondria 막전위 변화에 따른 apoptosis 유도 인자들에 의하여 활성화된다[1, 10]. 따라서 caspase-8과 -9의 활성 증가는 extrinsic 및 intrinsic apoptosis 경로의 활성을 대별해 줄 수 있는 효소로 활용될 수 있다. 이러한 initiator caspase의 활성 증가는 caspase-3 및 -7과 같은 effector caspase의 활성을 유도하여 apoptosis의 완결을 위한 다양한 기질 단백질의 분해를 촉진하는 caspase

*Corresponding author

Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.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.

cascade를 형성한다[2].

한편 오랫동안 다양한 질환의 예방과 치료를 위하여 사용되어 온 약용식물들은 신약 개발을 위한 자원으로서의 활용 가치가 매우 높다. 이러한 측면에서 전통 한의학에 기반을 둔 다양한 한약재의 발굴은 천연 항암제 개발에 매우 유용하다고 할 수 있으나, 이에 대한 과학적 근거는 매우 미흡한 실정이다. 이러한 측면에서 최근 우리나라를 포함한 동아시아 지역에서 널리 사용되어 온 전통 처방(traditional multi-herb formulas)들에 대한 약리학적 관심이 증대되고 있다. 특히 한의학에서 사용되어 온 처방들은 각 본초(本草)의 기미(氣味)를 근거로 하여 부작용을 경감시키면서 의학적 효능은 증대시키고 환자 삶의 질적 향상을 증대시키기 위한 목적으로 발전되어 왔다 [13, 19]. 그중 동의보감(東醫寶鑑)·잡병편(雜病編)에 기록된 사간탕(Sagantang, 射干湯)은 위장에 생긴 종기(위완옹, 胃脘癰)를 치료하는 처방으로 알려져 있으며, 적작약(赤芍藥, *Paeonia lactiflora* Pall.), 사간(射干, *Belamcanda chinensis* (L.) DC), 치자(梔子, *Gardenia jasminoides* Ellis), 적복령(赤茯苓, *Poria cocos* Wolf), 승마(升麻, *Cimicifuga heracleifolia* Komarov), 백출(白朮, *Artractylodes japonica* Koidzumi)을 포함하는 6가지 한약재로 구성되어 있다. 이 중 군약(君藥)으로 사용된 적작약은 방광암에서의 apoptosis 유도를 통한 세포증식 억제[18], 류마티오이드 관절염 치료 효과[27] 등에 대한 연구가 발표된 바 있다. 그 외 구성 약물들에 대해서는 사간의 항염증 효과 [21], 치자의 항산화·항균 효과, 위암 세포 증식 억제 효과[16], 적복령의 항염증 효과[22], 승마의 유방암세포에서 에스트로겐 수용체 신호 전달 효과[20], 백출의 항염증 효과[9] 등에 대한 실험적 연구가 알려져 있으나, 사간탕에 자체에 대한 연구는 이루어진 바 없다.

본 연구에서는 사간탕의 항암 효능을 알아보기 위하여, 인체 위암세포의 증식에 미치는 영향을 평가하고 세포 증식 억제효과가 apoptosis 유도와 연관성이 있는지를 조사한 결과, 유의적인 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

시료 준비

Table 1. Herbal components and amounts of Sagantang

Herbal medicine (Scientific plant name)	Raw material amount (g/%)
<i>Paeonia lactiflora</i> Pall.	10(26.3)
<i>Belamcanda chinensis</i> (L.) DC	6(15.8)
<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis	6(15.8)
<i>Poria cocos</i> Wolf	6(15.8)
<i>Cimicifuga heracleifolia</i> Komarov	6(15.8)
<i>Artractylodes japonica</i> Koidzumi	4(10.5)
Total amounts	38(100)

본 연구에 사용된 사간탕(Sagantang, SGT)의 구성 한약재는 Table 1에 나타난 것과 같으며, (주)대한생약(부산, 한국)에서 건조된 상태로 구입하여, 추출에 적합하도록 세절 한 후 약재 무게의 10배에 해당하는 증류수로 100°C에서 3시간 동안 추출하여 사용하였다. 이후 열수 추출액을 Whatsmann No.2 filter paper (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)로 거른 후 동결건조기를 사용하여 분말로 만들어 3차 증류수에 100 mg/ml의 농도로 stock solution을 만든 후 고압증기 멸균기에서 멸균 처리하였다. 이 준비된 사간탕 추출물을 Minisart® Syringe filter (0.2 µm, Sartorius AG Weender Landstr, Germany)를 사용하여 거른 후 적정 농도로 배지에 희석하여 사용하였다.

AGS 위암세포의 배양 조건

본 연구에 사용된 AGS 인체 위암세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양 받았다. 세포 배양은 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Gibco BRL, NY, USA) 및 1%의 penicillin 및 streptomycin이 포함된 RPMI-1640 배지(Gibco BRL)를 사용하여 5% CO₂, 37°C의 조건에서 실시하였다. 아울러 사간탕 추출물 처리에 따른 AGS 위암세포의 형태변화는 도립 현미경(inverted microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 시각적으로 확인하였다.

Hemocytometer를 이용한 세포 생존율의 측정

사간탕 추출물 처리에 의한 AGS 위암세포의 생존율을 측정하기 위하여 세포 배양용 6 well plate에 1X10⁵개/ml의 개수로 well 당 2 ml씩 분주한 다음 사간탕 추출물을 적정농도로 처리하여 배양하였다. 48시간 경과 후 상층액을 제거하고 0.05% trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA, Sigma Chemical Co.)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 phosphate-buffered saline (PBS)와 0.5% trypan blue solution (Sigma Chemical Co.)을 각 well 당 1 ml 씩을 동량으로 첨가하여 2분 간 처리하였다. 처리된 sample을 hemocytometer에 적용한 후 도립 현미경을 이용하여 살아있는 세포를 계수하였다.

MTT assay에 의한 세포 증식억제 조사

사간탕 추출물 처리에 의한 AGS 위암세포의 증식억제 정도를 확인하기 위하여 3-(4,5-dimethyl-2 thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay를 이용하였다. 이를 위하여 AGS 위암세포에 적정농도의 사간탕 추출물을 처리하고 48시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 MTT (Sigma Chemical Co.)를 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 200 µl씩 분주하고 37°C에서 3시간 동안 다시 배양하였다. 배양이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Co.)를 1 ml씩 분주하여 well에 생성된 for-

mazin을 모두 녹인 후 96 well plate에 200 μ l씩 옮겨서 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DAPI staining에 의한 apoptosis 유발의 확인

사간탕 추출물 처리에 따른 AGS 위암세포의 apoptosis 유발 여부의 확인을 위하여 apoptosis가 유발되었을 경우 특이적으로 나타나는 핵의 형태적 변화를 관찰하였다. 이를 위하여 48시간 동안 다양한 농도의 사간탕 추출물이 처리된 조건에서 배양된 세포를 모아 fixing solution (3.7% formaldehyde in PBS)을 상온에서 10분 동안 처리하였다. 고정이 끝난 후 slide glass에 세포를 부착시키고 0.2% Triton X-100 (Amresco, Solon, OH, USA)을 첨가하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 2.5 μ g/ml 농도의 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich Cp.) 용액으로 15분간 염색하였다. 염색이 끝난 후 형광 현미경 (fluorescence microscope, Carl Zeiss)을 이용하여 400배의 배율로 암세포의 핵의 형태 변화를 관찰하였다.

DNA 단편화 분석

Apoptosis 유발의 또 다른 직접적인 증거를 제시하기 위하여 agarose gel 전기영동에 의한 DNA 단편화 여부를 확인하였다. 이를 위해 준비된 세포들에 lysis buffer [5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 0.5% TritonX-100]를 첨가하여 상온에서 1시간 동안 처리한 후 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액에 0.5 mg/ml 농도의 proteinase K solution (Sigma-Aldrich Co.)을 처리하여 50 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 반응시키고 phenol : chloroform : isoamyl alcohol 혼합 용액(25:24:1, Sigma-Aldrich Co.)을 첨가하여 회전교반 시킨 다음 원심분리하여 다시 상층액을 분리하였다. 분리된 상층액에 iso-propanol (Sigma-Aldrich Co.)과 5 M NaCl를 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 반응시킨 후 원심분리하여 DNA pellet을 추출하였다. RNA 제거를 위하여 DNA pellet에 RNase A가 적당량 들어있는 TE buffer를 이용하여 녹인 다음 6X gel loading dye (Bioneer, Daejeon, Korea)를 첨가하고 1.5% agarose gel에 적용시켜 50 V로 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 분리된 DNA를 포함하는 agarose gel을 ethidium bromide (EtBr, Sigma-Aldrich Co.)로 염색하고 ultra violet (UV) 하에서 DNA 단편화 여부를 확인하였다.

Annexin V-Fluorescein Isothiocyanate (FITC) staining에 의한 apoptosis의 정량적 측정

사간탕 추출물 처리에 의한 AGS 위암세포의 apoptosis 유발 정도를 정량적으로 분석하기 위하여 준비된 세포들을 모은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 이들 세포를 PBS를 이용하여 2~3회 정도 세척하고 10 mM

HEPES/NaOH, pH7.4, 140 mM NaCl 및 2.5 mM CaCl₂가 포함된 annexin V binding buffer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 부유시킨 다음 annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) 및 propidium iodide (PI, Becton Dickinson)를 처리하여 암실에서 20분 동안 반응을 시켰다. 반응이 끝난 후 flow cytometer (FACS Calibur, Becton Dickinson)에 적용시켜 apoptosis가 유발된 세포 (V⁺/PI⁻)를 형광반응에 따라 분석하였다.

Mitochondrial membrane potential (MMP, $\Delta\psi$ m)의 분석

사간탕 추출물 처리에 의한 AGS 위암세포의 MMP 값 변화 정도를 측정하기 위하여 준비된 세포들에 10 μ M의 5,5', 6, 6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide (JC-1, Sigma-Aldrich Co.) 용액을 처리하여 20분 동안 상온에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후 상층액을 제거하고 PBS를 첨가하여 세포를 부유시킨 다음 flow cytometer에 적용시켜 MMP의 변화를 측정하였다.

Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

Apoptosis 조절과 관련된 유전자들의 발현을 단백질 수준에서 비교하기 위하여 준비된 세포들에 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Nonidet-P40 (NP-40), 1 mM phenyl-methylsulfonylfluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]를 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시킨 후 단백질을 분리하여 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 정량하였다. 부가적으로 세포질과 미토콘드리아 단백질 분획의 분리는 nuclear/cytosol fractionation kit (Biovision, Milpitas, CA, USA)를 사용하여 분리하였다. 적정 양의 단백질을 동량의 Laemli sample buffer (Bio-Rad)와 혼합하여 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후, nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 전이시켰다. 분리된 단백질이 전이된 membrane을 5% skim milk를 이용하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 해당 단백질에 대한 1차 항체(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)를 처리하여 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 이상 반응 시킨 다음 PBS-T (PBS with Tween 20)로 세척하고 처리된 1차 항체에 맞는 적정 2차 항체(Amersham Life Science Co., Arlington Heights, IL, USA)를 사용하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 enhanced chemiluminescence (ECL) solution (Amersham Life Science Corp.)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 발현 양을 분석하였다.

In vitro caspases activity 측정

사간탕 추출물 처리에 의한 AGS 위암세포의 caspases 활성 정도를 정량적으로 확인하기 위하여 Colorimetric Assay Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하였다 이를 위하여 상기와 동일한 방법으로 단백질을 추출하고 정량한 다음 150 µg의 단백질이 함유된 50 µl의 sample에 기질 100 µM이 함유된 reaction buffer [40 mM HEPES (pH 7.4), 20% glycerol (v/v), 1 mM EDTA, 0.2% NP-40, 10 mM DTT] 50 µl를 혼합하여 각 sample 당 총 volume이 100 µl가 되게 하였다. 여기에 caspases 종류에 따른 기질(caspase-3 : Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-p-nitroaniline (pNA), caspase-8 : Ile-Glu-Thr-Asp (IETD)-pNA, caspase-9 : Leu-Glu-His-Asp (LEHD)-pNA)을 각각 5 µl 씩 첨가하여 37°C, 암실에서 3시간 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm의 흡광도를 이용하여 반응의 정도를 측정하였다.

통계분석

상기의 모든 실험 결과는 SPSS ver. 18.0 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.

결과 및 고찰

사간탕 추출물 처리에 의한 AGS 위암세포의 생존 및 증식 억제에 따른 apoptosis의 유발

사간탕 추출물 처리가 AGS 위암세포의 생존 및 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 다양한 농도의 사간탕 추출물을 48 시간 동안 처리한 후 trypan blue solution에 반응시키고 현미경하에서 살아있는 세포의 수를 개수하였다. Fig. 1A의 결과에서 알 수 있듯이 처리된 사간탕 추출물의 농도가 증가할수록 trypan blue가 침투하지 못한 세포의 수가 점차 감소되었으며, 특히 0.8 mg/ml 처리군 이상의 생존한 세포의 수가 급속하게 감소하였다. 동일 조건에서 MTT assay에 의한 실험에서도 사간탕 추출물의 처리 농도가 증가할수록 처리 농도의존적으로 AGS 세포의 증식이 유의적으로 감소되었다(Fig. 1B). 아울러 이러한 증식 억제는 처리 농도 증가에 따른 세포 밀도의 감소와 더불어 길고 분지를 형성하는 듯한 dendrite-like한 구조의 형성 및 부착력을 상실하고 배지 위로 부유되는 경향성이 현저하게 증가하였으며(Fig. 1C), 이러한 결과는 사간탕 추출물 처리에 따른 생존율 감소 및 증식 억제 정도와 잘 일치함을 알 수 있었다.

사간탕 추출물 처리에 의한 이러한 생존율 감소 및 증식 억제 현상이 apoptosis 유발과 관련성이 있는지의 여부를 3가지의 방법으로 조사하였다. 먼저 AGS 위암세포 핵의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DAPI 염색을 실시한 결과, 사간탕 추출물이 포함되지

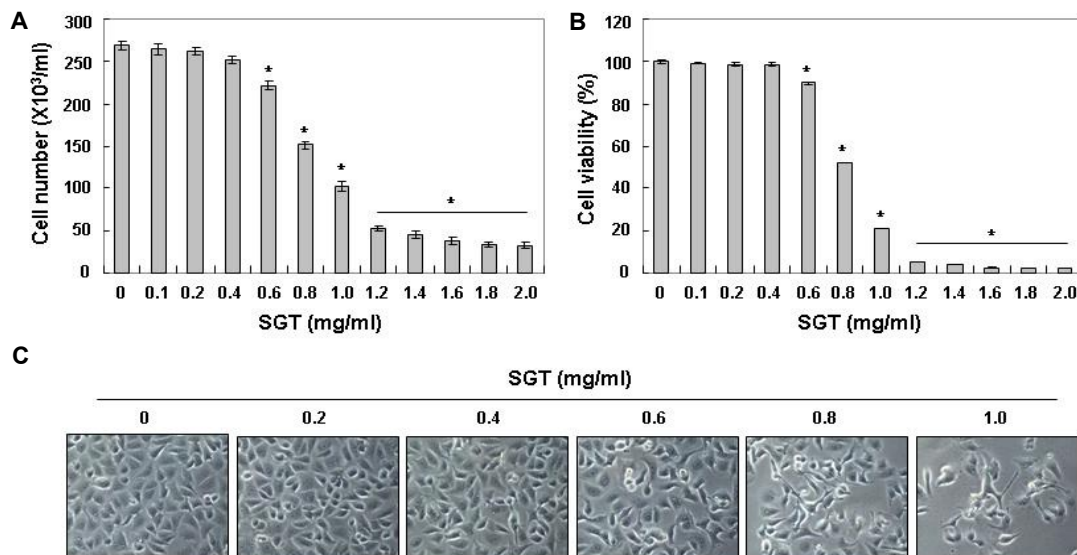


Fig. 1. Inhibition of cell viability and growth of AGS human gastric carcinoma cells after treatment with SGT. Cells were seeded at 1×10^5 /ml in a 6-well plate and treated with variable concentrations of SGT for 48 h. (A) The cells were trypsinized and the viable cells were scored by hemocytometer counts of trypan blue-excluding cells. (B) The growth inhibition was measured by the metabolic-byte-based MTT assay. The data shown are means \pm SD of three independent experiments. Each point represents the mean \pm SD of three independent experimentst (* $p < 0.05$ vs. untreated control). (C) Morphological changes of cells by treatment with SGT were visualized by inverted microscope (Original magnification, 200 \times).

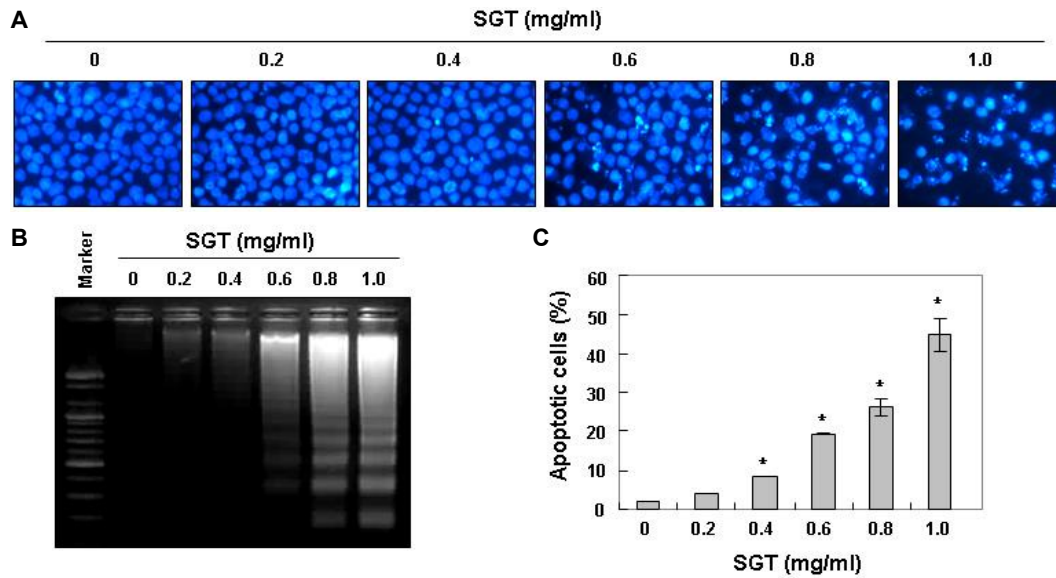


Fig. 2. Induction of apoptosis by SGT treatment in AGS cells. AGS cells were treated with the indicated concentrations of SGT for 48 hr. (A) The cells were fixed and stained with DAPI solution. The stained nuclei were observed under a fluorescent microscope (Original magnification, 400×). (B) The cells grown under the same conditions as (A) were collected and total DNAs were extracted. The DNA fragmentations were separated on 1.5% agarose gel electrophoresis and visualized under UV light after staining with EtBr. (C) To quantify the degree of apoptosis induced by SGT, cells were stained with FITC-conjugated Annexin V and PI for DNA flow cytometry analysis. Apoptotic cells are determined by counting the % of annexin V⁺/PI⁻ cells and the percent of annexin V⁺/PI⁻ cells. Results shown are expressed as the mean of three independent experiments (* *p*<0.05 vs. untreated control).

않은 정상 조건에서 배양된 세포와는 다르게 사간탕 추출물이 처리된 배지에서 배양된 세포에서는 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 염색질의 응축에 의한 apoptotic body의 형성이 사간탕 추출물 처리 농도 의존적으로 증가되었다(Fig. 2A). 이를 바탕으로 apoptosis 유발의 또 다른 증거인 DNA 단편화 현상을 관찰하였다. DNA 단편화 현상은 endonuclease가 활성화되어 chromosomal DNA가 단편화됨으로서 나타나는 현상으로서 apoptosis가 일어난 세포들에서 나타나는 전형적인 현상으로 알려져 있다[3, 14]. 이를 위하여 정상 및 사간탕 추출물이 함유된 배지에서 자란 AGS 위암세포를 대상으로 총 DNA를 추출하여 agarose gel 전기영동으로 조사한 결과는 Fig. 2B에 나타난 바와 같다. 결과에서 볼 수 있듯이 사간탕 추출물 0.4 mg/ml 처리군까지는 DNA 단편화 현상이 나타나지 않았지만 0.6 mg/ml 처리군에서 약간의 DNA 단편화 현상이 관찰되기 시작하여 0.8 mg/ml 처리군에서부터 DNA 단편화 현상이 강하게 나타났다. 이는 핵의 형태적 변화 현상과도 매우 일치되는 현상으로 AGS 위암세포에서 사간탕 추출물 처리에 의한 생존율 감소, 증식 억제 및 형태변화 등과 같은 일련의 변화들은 apoptosis 유발에 의하여 나타나는 현상이라는 것을 알 수 있었다. 따라서 사간탕 추출물 처리에 의한 AGS 위암세포의 apoptosis 유발의 정량적인 비교를 위하여 동일한 조건에서 배양된 세포를 annexin V-FITC/PI로 염색한 후 flow cytometry 분석을 실시하였다. Fig.

2C의 결과에서 알 수 있듯이, 대조군에서의 자연적 apoptosis 유발 빈도는 약 3% 전후로 나타났지만, 사간탕 추출물 처리 농도의 증가에 따라 apoptosis가 유발된 AGS 위암세포의 빈도가 급격하게 증가하여 1.0 mg/ml 처리군에서는 약 45% 정도로 나타났다. 따라서 사간탕 추출물 처리에 의한 AGS 위암세포의 생존율 저하 및 증식 억제는 apoptosis 유도에 의한 현상임을 알 수 있었다.

AGS 위암세포의 DR 연관 및 Bcl-2 family 유전자 단백질 발현에 미치는 사간탕 추출물의 영향

Apoptosis 유도에서 extrinsic pathway는 세포막에 존재하는 DR에 apoptotic ligand가 결합함으로써 시작된다[6, 26]. DR이 활성화되면 initiator caspase인 caspase-8의 활성화에 의한 caspase cascade에 의하여 하위단계 effector caspase의 활성화에 직접적으로 관여하거나 BH3 interacting-domain death agonist인 Bid를 단편화시킴으로서 truncated Bid (tBid)를 형성하여 intrinsic pathway를 활성화하는 것으로 알려져 있다[4, 24]. 또한 intrinsic pathway는 UV, 방사선, DNA 손상 및 많은 chemotherapeutic agent 등과 같은 여러 가지 자극에 의하여 mitochondria의 기능 이상을 초래하면서 시작된다. 특히 apoptosis 조절에 핵심적인 역할을 담당하는 Bcl-2 family는 mitochondria의 기능 보존과 mitochondria에 의해 유도되는 apoptosis를 조절하는 intrinsic pathway의 중요한 조절자

이다[25, 27]. Bcl-2 family는 Bcl-2 및 Bcl-xL과 같은 apoptosis를 억제하는 anti-apoptotic member와 Bax 및 Bad와 같이 apoptosis를 유발하는 pro-apoptotic member로 구성되어 있으며, 이들은 서로 dimer를 형성하고 있다. 하지만 이들 사이의 균형이 깨어지게 되면 mitochondria의 기능 이상을 유발하게 되고 mitochondria로 내막에 존재하고 있는 cytochrome c가 세포질로 방출됨으로서 하위단계에 있는 여러 가지 유전자들을 조절하여 apoptosis가 유발된다[11, 23].

따라서 사간탕 추출물 처리에 따른 AGS 위암세포의 apoptosis 유발에 mitochondria 손상이 연관되어 있는지를 확인하기 위하여 MMP ($\Delta\psi_m$)의 변화를 조사한 결과, 정상 배지에서 배양된 AGS 위암세포의 경우에는 정상적인 MMP 값(Red 파장)을 보이는 세포가 90% 이상이었으나, 사간탕 추출물 처리 농도 증가에 MMP 소실(Green 파장) 정도가 유의적으로 증가

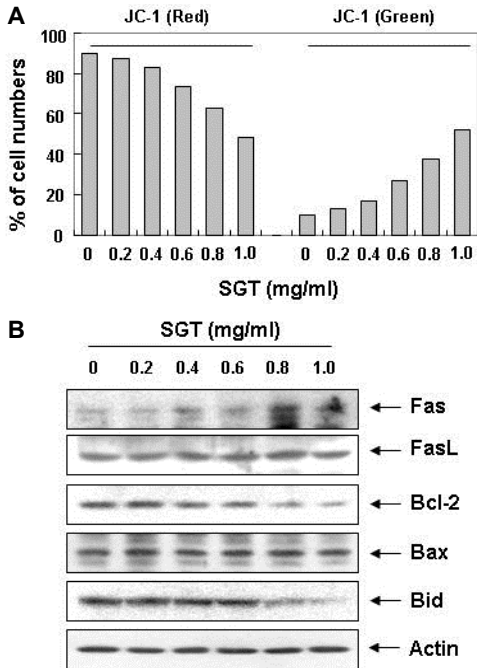


Fig. 3. Effects of SGT treatment on the values of mitochondrial membrane potential (MMP, $\Delta\psi_m$) and levels of several apoptosis regulatory proteins in AGS cells. (A) The cells were incubated with various concentrations of SGT for 48 hr, and stained with 10 μ M JC-1 for 20 min at 37°C. The mean JC-1 fluorescence intensity was then detected using a flow cytometer. Data represent the means of two independent experiments. (B) The cells grown under the same conditions as (A) were lysed and then equal amounts of cell lysates were separated on SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies and the proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

하여, 1.0 mg/ml 처리군에서는 50% 이상의 세포에서 mitochondria 막전위의 교란이 동반되었다(Fig. 3A). 이러한 mi-

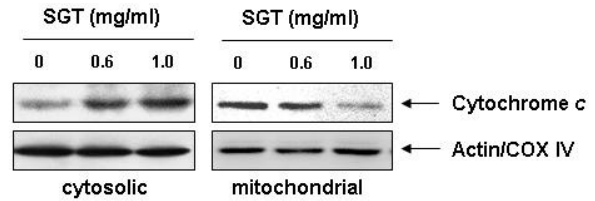


Fig. 4. Release of cytochrome c into cytosol by SGT treatment in AGS cells. Cells were treated with 0.6 and 1.0 mg/ml SGT for 48 hr. The cells were collected cytosolic and mitochondrial proteins were extracted, and separated on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, followed by Western blotting using the indicated antibodies and an ECL detection system. Actin and cytochrome c oxidase IV (COX IV) were used as internal controls for the cytosolic and mitochondrial fractions, respectively.

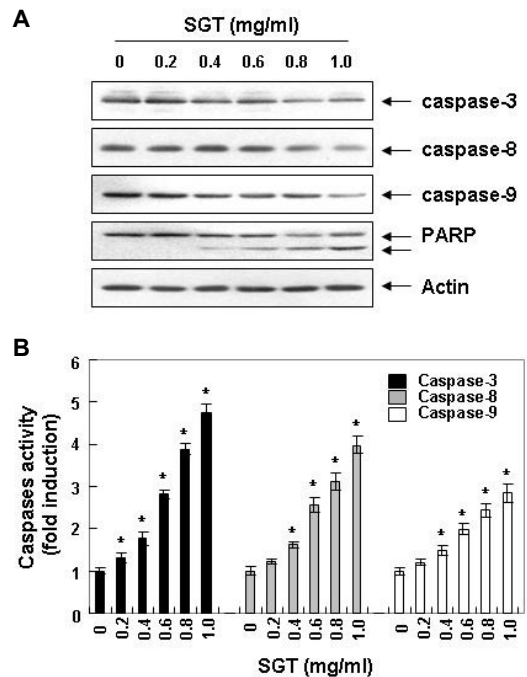


Fig. 5. Activation of caspases by SGT treatment in AGS cells. (A) Cells were treated with SGT for 48 hr, and aliquots containing total proteins were subjected to SDS-polyacrylamide gels followed by immunoblot analysis with specific antibodies and an ECL detection system. Actin was used as an internal control. (B) The cells were lysed, and aliquots (20 μ g protein) were assayed for *in vitro* caspase-3, -8 and -9 activity using DEVD-pNA, IETD-pNA and LEHD-pNA as substrates, respectively, at 37°C for 1 hr. The released fluorescent products were measured. The data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments (* $p < 0.05$ vs. untreated control).

tochondria 막전위의 손실에 extrinsic pathway가 관여하는 지를 확인한 결과, 대표적인 apoptotic ligand인 receptor Fas ligand (FasL)의 발현은 큰 변화가 없었으나 FasL을 인지하는 receptor인 Fas의 발현은 사간탕 추출물 처리에 의하여 처리 농도 의존적으로 증가되었음을 확인하였다(Fig. 3B). 또한 mitochondria 연관 intrinsic pathway 조절에 관여하는 Bcl-2 family 유전자들의 발현 변화를 확인한 결과, pro-apoptotic 유전자인 Bax의 발현은 큰 변화가 없었으나, anti-apoptotic Bcl-2의 발현이 억제되었으며, Bid 단백질의 발현 감소가 동반되었다(Fig. 3B). 비록 본 연구에서 Bid의 활성형인 tBid의 발현은 관찰할 수 없었으나, Bid의 발현 감소는 상대적 tBid의 발현 증가를 의미하는 것으로 사간탕 추출물 처리에 의한 apoptosis 유발은 Fas의 발현 증가와 연관된 extrinsic pathway의 활성화 및 mitochondria 기능 손상과 연계된 intrinsic pathway 활성이 동시에 관여할 가능성이 있을 것으로 유추되며, 특히 Bid의 발현 감소는 사간탕 추출물 처리에 따른 두 경로의 crosstalk에 관여할 것이라 생각한다. 아울러 사간탕 추출물 처리 농도 증가에 따라 미토콘드리아에서 세포질로의 cytochrome c 방출의 증가도 확인하였다(Fig. 4).

사간탕 추출물에 의한 AGS 위암세포의 apoptosis 유발에서 caspase의 역할

Caspase protease는 세포가 정상적으로 생존 및 증식할 경

우, 핵과 mitochondria의 외막에 불활성 상태인 proenzyme 형태로 존재하지만 다양한 세포 내외부 자극에 의하여 활성화 되면 선택적 기질 단백질들의 분해를 유발함으로써 apoptosis를 촉진하는 것으로 알려져 있다[5, 8]. Caspase는 extrinsic pathway와 intrinsic pathway의 initiator caspase인 caspase-8 및 -9와 effector caspase인 caspase-3, -6 및 -7 등으로 나누어지는데, 먼저 initiator caspase가 활성화 되면 하위단계에 있는 effector caspase를 활성화시킴으로서 세포의 apoptosis를 유발한다[5, 8]. Poly (ADP-ribose)-polymerase (PARP)는 활성화된 effector caspase에 의하여 분해되는 대표적인 기질 단백질로서 정상적인 DNA 수복이나 유전자 안정성 유지에 핵심 인자로 작용하지만, 116 kDa의 분자량을 가진 PARP 단백질이 85 및 24 kDa의 단편으로 잘리게 되면 PARP의 기능은 상실하게 되며, PARP의 단편화는 caspase 활성화 의존적 apoptosis 유발의 생화학적 표식자로 사용이 되고 있다[2].

따라서 본 연구에서는 대표적인 apoptosis 유발 두 경로의 initiator caspase (caspase-8 및 -9)와 effector caspase인 caspase-3의 발현에 미치는 사간탕 추출물의 영향을 조사하였다. Western blotting 결과에서 알 수 있듯이, 사간탕 추출물이 처리된 배지에서 배양된 AGS 위암세포에서 caspase-8 및 -9 뿐만 아니라 caspase-3의 불활성형 단백질의 발현이 모두 처리 농도 의존적으로 감소되었다(Fig. 5A). 이는 상대적으로 각각의 활성형 caspase의 발현이 증가될 수 있음을 의미하기에,

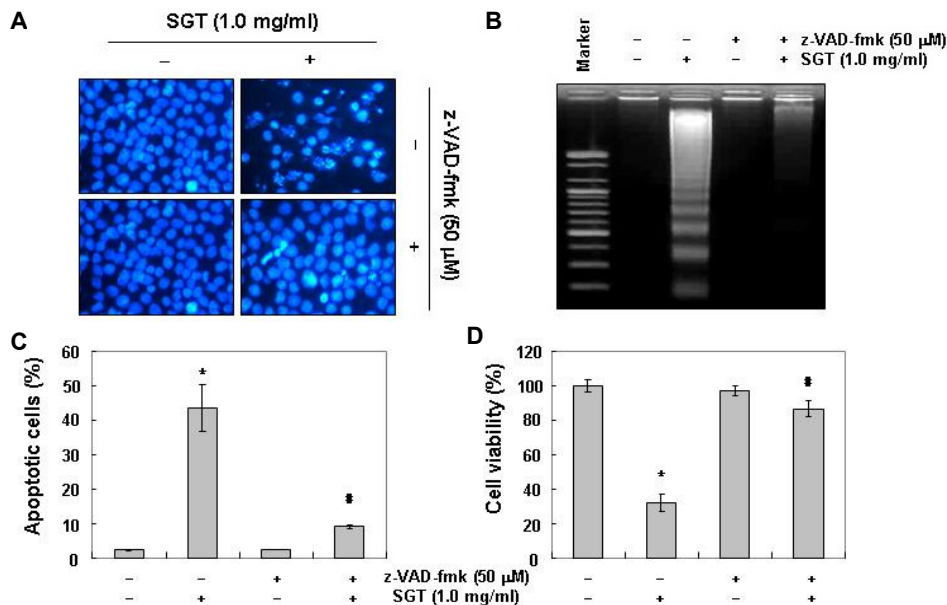


Fig. 6. Effects of a pan-caspase inhibitor, z-VAD-fmk, on the SGT-induced apoptosis and growth suppression in AGS cells. Cells were pretreated with 50 μM z-VAD-fmk for 1 hr, and then treated with SGT for 48 hr. (A) The cells were stained with DAPI for 10 min and photographed with a fluorescence microscope (Original magnification, 400×). (B) DNA fragmentation was analyzed by extracting the fragmented DNAs and separating them by electrophoresis in a 1.5% agarose gel containing EtBr. (C) The cells were stained with FITC-conjugated Annexin V and PI for DNA flow cytometry analysis. (D) Cell viability assay was done using an MTT assay. Each point represents the mean ± SD of three independent experiments (* $p < 0.05$ versus untreated control; # $p < 0.05$ versus SGT-treated cells).

caspase의 활성 여부를 정량적으로 확인하기 위하여 *in vitro* caspase 활성을 분석하였다. 사간탕 추출물 처리에 따라 조사된 3가지 caspase의 활성이 사간탕 추출물 처리 농도 의존적으로 유의적으로 증가되었으며(Fig. 5B), 사간탕 추출물 처리 농도의 증가에 따라 PARP 단백질의 단편화도 증가하였다(Fig. 5A). 다음은 이상의 결과에서 관찰된 사간탕 추출물 처리에 따른 apoptosis 유발이 caspase 의존적인 현상인지의 여부를 조사하기 위하여 pan-caspase inhibitor인 z-VAD-fmk를 선처리한 후 사간탕 추출물을 48 시간 동안 처리한 세포를 대상으로 apoptosis 유발 및 증식 억제의 정도를 비교하였다. 먼저 Fig. 6A에 나타난 바와 같이, 사간탕 추출물 처리군에서 관찰된 apoptotic body의 증가가 z-VAD-fmk 선처리에 의하여 매우 감소되었으며, 이와 유사하게 사간탕 추출물 처리에 의한 DNA 단편화 현상도 z-VAD-fmk 선처리에 의하여 거의 완벽하게 차단되었다(Fig. 6B). 아울러 사간탕 추출물 처리에 의하여 증가된 apoptosis 유발 빈도의 감소 및 증식 억제의 회복 등이 z-VAD-fmk 선처리군에서 관찰되었다(Fig. 6C 및 D).

이상의 결과를 종합해 보면 인체 위암 AGS 세포에서 사간탕 추출물을 처리하였을 경우에 유발되는 apoptosis에는 death receptor 경로 활성을 통한 caspase-8의 활성화에 의한 Bid 단백질의 단편화가 관여하였을 것으로 추측된다. 이와 함께 Bcl-2의 발현 감소에 동반된 mitochondria의 기능 이상으로 세포질로의 cytochrome c의 유리 따른 caspase-9 및 -3의 활성화로 기질 단백질들의 분해가 이루어지는 과정을 거칠 것으로 예상된다. 즉 사간탕 추출물 처리에 의하여 유발되는 apoptosis는 extrinsic 및 intrinsic pathway를 모두 경유하는 multiple apoptotic pathway에 의하여 조절되며, 이러한 연속적인 과정이 caspase 의존적으로 일어남을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2015R1A2A2A01004633).

References

- Asakura, T. and Ohkawa, K. 2004. Chemotherapeutic agents that induce mitochondrial apoptosis. *Curr. Cancer Drug Targets* **4**, 577-590.
- Duriez, P. J. and Shah, G. M. 1997. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. *Biochem. Cell Biol.* **75**, 337-349.
- Eastman, A. 1995. Assays for DNA fragmentation, endonucleases, and intracellular pH and Ca^{2+} associated with apoptosis. *Methods Cell Biol.* **46**, 41-55.
- Fennell, D. A. and Chacko, A. 2008. Exploiting BH3 only protein function for effective cancer therapy. *Front Biosci.* **13**, 6682-6692.
- Fiandalo, M. V. and Kyprianou, N. 2012. Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis. *Exp. Oncol.* **34**, 165-175.
- Fulda, S. and Debatin, K. M. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**, 4798-4811.
- Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y. and Sakuragi, N. 2014. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 150845.
- Hensley, P., Mishra, M. and Kyprianou, N. 2013. Targeting caspases in cancer therapeutics. *Biol. Chem.* **394**, 831-843.
- Hong, M. H., Kim, J. H., Bae, H., Lee, N. Y., Shin, Y. C., Kim, S. H. and Ko, S. G. 2010. *Atractylodes japonica* Koidzumi inhibits the production of proinflammatory cytokines through inhibition of the NF-kappaB/IkappaB signal pathway in HMC-1 human mast cells. *Arch. Pharm. Res.* **33**, 843-851.
- Jourdain, A. and Martinou, J. C. 2009. Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 1884-1889.
- Kadenbach, B., Arnold, S., Lee, I. and Hüttemann, M. 2004. The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1655**, 400-4008.
- Kasibhatla, S. and Tseng, B. 2003. Why target apoptosis in cancer treatment. *Mol. Cancer Ther.* **2**, 573-580.
- Kumar, H., Song, S. Y., More, S. V., Kang, S. M., Kim, B. W., Kim, I. S. and Choi, D. K. 2013. Traditional Korean east asian medicines and herbal formulations for cognitive impairment. *Molecules* **18**, 14670-14693.
- Kyprianou, N., English, H. F. and Isaacs, J. T. 1998. Activation of a Ca^{2+} - Mg^{2+} -dependent endonuclease as an early event in castration-induced prostatic cell death. *Prostate* **13**, 103-117.
- Lavrik, I. N. 2010. Systems biology of apoptosis signaling networks. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**, 551-555.
- Lee, J. H., Lee, D. U. and Jeong, C. S. 2009. *Gardenia jasminoides* Ellis ethanol extract and its constituents reduce the risks of gastritis and reverse gastric lesions in rats. *Food Chem. Toxicol.* **47**, 1127-1131.
- Ola, M. S., Nawaz, M. and Ahsan, H. 2011. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol. Cell. Biochem.* **351**, 41-58.
- Ou, T. T., Wu, C. H., Hsu, J. D., Chyau, C. C., Lee, H. J., and Wang, C. J. 2011. *Paeonia lactiflora* Pall inhibits bladder cancer growth involving phosphorylation of Chk2 *in vitro* and *in vivo*. *J. Ethnopharmacol.* **135**, 162-172.
- Park, H. and Kim, H. S. 2014. Korean traditional natural herbs and plants as immune enhancing, antidiabetic, chemopreventive, and antioxidative agents: a narrative review and perspective. *J. Med. Food* **17**, 21-27.
- Park, J., Shim, M., Rhyu, M. R. and Lee, Y. 2012. Estrogen receptor mediated effects of *Cimicifuga* extracts on human breast cancer cells. *Pharmazie.* **67**, 947-950.
- Park, S. J. and Kim, S. K. 2010. Anti-inflammatory Effects of *Belamcanda chinensis* Water Extract. *Kor. J. Ori. Physiol.*

- Pathol.* **24**, 410-415.
22. Rios, J. L. 2011. Chemical constituents and pharmacological properties of *Poria cocos*. *Planta Med.* **77**, 681-691.
23. Scorrano, L. and Korsmeyer, S. J. 2003. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 437-444.
24. Shamas-Din, A., Brahmabhatt, H., Leber, B. and Andrews, D. W. 2011. BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1813**, 508-520.
25. Tomek, M., Akiyama, T. and Dass, C. R. 2012. Role of Bcl-2 in tumour cell survival and implications for pharmacotherapy. *J. Pharm. Pharmacol.* **64**, 1695-1702.
26. Walczak, H. and Krammer, P. H. 2000. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp. Cell Res.* **256**, 58-66.
27. Zhang, W. and Dai, S. M. 2012. Mechanisms involved in the therapeutic effects of *Paeonia lactiflora* Pallas in rheumatoid arthritis. *Int. Immunopharmacol.* **14**, 27-31.

초록 : 사간탕 처리에 의한 AGS 인체 위암세포의 caspase 활성화 의존적 apoptosis 유발

박 철¹ · 홍수현² · 최성현³ · 이세라⁴ · 임선희⁴ · 최영현^{2,5*}

(¹동의대학교 자연생활과학대학 분자생물학과, ²동의대학교 한의과대학 생화학교실, ³한국승강기대학교 승강기시스템관리과, ⁴동아대학교 자연과학대학 생명과학과, ⁵동의대학교 항노화연구소)

적작약, 사간, 치자, 적복령, 승마 및 백출 등 6가지의 한약재로 구성된 사간탕은 동의보감에서 위완옹(胃腕癰)을 치료하는 처방으로 알려져 있으나, 항암 효능에 대한 구체적인 연구는 전혀 이루어진 바 없다. 본 연구에서는 사간탕의 항암활성 연구의 일환으로 AGS 인체 위암세포의 증식에 미치는 영향을 조사하였다. 본 연구의 결과에 의하면 사간탕 추출물 처리 농도의 증가에 따라 AGS 위암세포의 증식 및 생존율이 억제되었으며, 이는 apoptosis 유발에 의한 것임을 염색질 응축, DNA 단편화 및 annexin-V 염색 등을 통하여 확인하였다. 사간탕 추출물 처리에 의한 apoptosis 유발에는 pro-apoptotic Fas 단백질의 발현 증가 및 anti-apoptotic Bcl-2 발현의 감소와 mitochondrial membrane potential의 소실이 동반되었다. 아울러 사간탕 추출물이 처리된 AGS 위암세포에서 extrinsic 및 intrinsic apoptosis 경로 활성화의 개시에 중요한 caspase-8 및 -9 뿐만 아니라 effector caspase인 caspase-3의 활성화도 증가하였으며, 활성화된 caspase-3의 기질 단백질인 PARP의 단편화도 관찰되었다. 그러나 pan-caspase inhibitor의 선처리에 의한 caspase 활성을 차단하였을 경우, 사간탕 추출물 처리에 의한 염색질 응축 및 DNA 단편화 현상이 관찰되지 않았으며, apoptosis 유발 및 증식억제 효과도 유의적으로 억제되었다. 따라서 사간탕 추출물 처리에 의한 AGS 위암세포의 apoptosis 유발은 extrinsic 및 intrinsic apoptosis 경로가 동시 활성을 통한 caspase 의존적 인 과정을 통하여 이루어지고 있음을 알 수 있었으며, 그 과정은 아마도 pro-apoptotic Bid의 truncation이 관여할 것으로 추정된다. 이상의 결과는 향후 *in vivo* 모델을 이용한 사간탕 추출물의 항암활성 조사 및 사간탕 추출물 내 주요 생리활성 물질의 탐색 등을 위한 유용한 자료로 사용될 것이다.