

Original Article / 원저

杏仁이 전립선 암세포의 Bax, Bcl-2 및 Caspase-3에 미치는 영향

이도경¹ · 김연섭¹ · 김도훈²

¹가천대학교 한의과대학 해부경혈학교실, ²가천대학교 한의과대학 원전외사학교실

Effect of Armeniacae Amarum Semen on Expression of Bax and Bcl-2 mRNA and Caspase-3 Activity of Human DU145 Prostate Cancer Cells

Do-Kyung Lee¹ · Youn-Sub Kim¹ · Do-Hoon Kim²

¹Department of Anatomy-Pointology, College of Korean Medicine, Gachon University

²Department of Korean Medical Classics & History, College of Korean Medicine, Gachon University

Abstract

Prostate cancer is one of the most common non-skin cancers in men. Armeniacae Amarum Semen has traditionally been used for the treatment of inflammation diseases, leprosy, leucoderma, and tumors. Apoptosis, which is also known as programmed cell death, is an important mechanism in cancer treatment.

Objectives : We observed whether an aqueous extract of Armeniacae Amarum Semen induces apoptotic cell death in human DU145 prostate cancer cells.

Methods : We treated DU145 cells with Armeniacae Amarum Semen extract and investigated characteristics of apoptosis. And investigated whether treated with Armeniacae Amarum Semen extract increased Bax mRNA expression, Bcl-2 mRNA expression, caspase-3 enzyme activity and their protein level.

Results : We have shown that Armeniacae Amarum Semen extract can induce apoptotic cell death in human DU145 prostate cancer cells by caspase-3 activation through the down-regulation on Bcl-2 expression and the up-regulation on Bax expression.

Conclusions : It can be expected that an aqueous extract of Armeniacae Amarum Semen may offer a valuable means for the treatment of prostate cancers.

Key words : Armeniacae Amarum Semen; Prostate cancer; Apoptosis; Bcl-2; Bax; Caspase-3

I. 서 론

전립선암은 남성에 있어서 가장 일반적인 비장피성 암종의 하나이다. 방광과 요도 사이에 위치하는 전립선은 남성 생식기 계통의 분비기관이다. 전립선의 주요 기능은 정액을 수송하기 위한 액체를 생성하는 것이다. 전립선암은 전립선의 외부 부속에서 발생하는 악성종양이며 전립선 주위 조직이나 정낭으로 전이한다¹⁾.

杏仁은 Rosaceae로 분류된 *Prunus armeniaca L. var. ansu Maxim*의 씨이다.杏仁은 열을 구제하고, 기침을 멈추게 하고, 수분부족을 가시게 하는 등 많은 치료효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 한의학에서杏仁은 감염성질환, 천식, 기관지염, 폐기종, 나병, 백반증과 종양의 치료에 사용되어 왔다^{2,3)}.

杏仁은 외부 껍질과 배당체, Amygdalin, 전분과 지방산을 포함하는 속 부분으로 나뉘어있다. 그들 중 Amygdalin은 이몬드, 살구 및 장미과초목의 씨에 풍부하다. Vitamin B17로 알려진 Amygdalin은 암 치료에 사용되어 왔고, Vitamin B17은 laetrile로 불려져 왔다⁴⁾. Amygdalin은 암환자의 진통에 효과가 있다고 보고되었다^{5,6)}. 행인을 암세포에 적용한 실험이나 문헌적 고찰은 기존에 별로 제시되지 않았다. 하지만 행인의 성분이 밝혀짐에 따라 해당 유효성분에 의한 효과가 밝혀지면 해당 약물의 주치증을 확대할 수 있는 효과가 있고 현대 한의학이 적용되는 범위가 더 넓어질 것으로 판단하여 빈용되는 본초인 행인으로 암세포에 적용한 실험을 진행하게 되었다.

세포사멸은 다세포 유기체내의 몇몇 병리적 상황에서 발생되며, 그것은 세포교환, 조직보수의 정상 메커니즘과 손상된 세포의 제거부분으로 구성된다. 세포사멸은 세포수축, 크로마틴응축, 핵간 DNA 분열, 그리고 세포사멸체의 형성이 특징이다⁷⁾.

세포사멸에 포함된 단백질의 두 중요 그룹은 Bcl-2 군과 Caspases로 알려진 Cysteine proteases군이다. Bcl-2 군은 anti-apoptotic proteins와 pro-apoptotic proteins로 분류된다. Bcl-2, an anti-apoptotic protein은 세포사멸 경로를 통제하고 세포사멸을 보호하는 것으로 알려졌다. Bax, a pro-apoptotic protein군은 세포사멸과정에서 풍부하고 선택적으로 표현되며 그것은 세포 사멸을 활성화시킨다. Bax에 대한 Bcl-2의 비율증가는 몇몇 조직에서 세포사멸 유도를 측정하는데 일반적으로 사용되어 왔다⁸⁾. Caspases는 aspartate-specific cysteine proteases로 세포사멸의 중심적 집행자로 나타난다. Caspases중 Caspase-3의 활성화는 Apoptosis의 첫 번째 기전으로 간주된다^{9,10)}. Caspase-3는 Bax 단백질에 의한 cytochrom c의 cytosolic release를 통해 활성화된다¹¹⁾.

세포사멸의 유도는 암의 자연적인 퇴화와 항암제의 발전을 위한 가장 중요한 기전이라는 것이 많은 논문에서 증명되어 왔다¹²⁾. 암세포의 세포사멸은 악성종양의 감소와 암의 퇴행을 촉진 하는데 기여하는 것으로 추측된다¹³⁾.

게다가 항암제는 암세포의 세포사멸을 유발하는 것으로 알려져 있는데 DNA를 손상시키고 DNA합성을 억제하고, 세포간 nucleotide pool을 고갈시키며 유사분열 조직의 붕괴를 유발하는 것으로도 알려졌다^{14,15)}.

이에 저자는杏仁이 인간 DU145 전립선 암세포에서 세포사멸 작용을 유도하는 가를 연구하기 위해 DNA 분절 분석, 역전사-폴리머라아제 연쇄반응(RT-PCR), Western blot와 Caspase-3 효소 활성화를 실험한 바 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실 험

1. 약물과 시약

杏仁은 경동시장(서울, 한국)에서 구입했다. 0.1% 구연산에 1분간 담근杏仁을 씻어내고 실온에서 24

Corresponding author : Do-Hoon Kim, College of Korean Medicine, Gachon University, 1342 Seongnamdaero, Sejeong-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, South Korea.
(Tel: +82-31-750-5422, E-mail: chulian71@gmail.com)
• Recieved 2016/7/1 • Revised 2016/8/9 • Accepted 2016/8/16

시간 동안 말렸다. 분쇄기(한일, 서울, 한국)로 분쇄하였고 분말은 타공직경 2mm의 그물망에 의해 미립자로 전환시켰다.杏仁 물추출물을 얻기 위하여 분말을 증류수에서 열추출 하고 난 다음 압력 여과하여 회전식 기화기에서 농축하였다(Eyela, Tokyo, Japan). 500g의杏仁을 건조기(일산, 경기도, 한국)로 24시간 동결 건조를 하여 34.48g의 분말(6.88%의 산출)을 얻었다. 이 분말속의 Amygdalin의 양은 고압액체색층분석(hplc)에서 11.00%로 확정하였다.

Phenol은 AMRESCO Inc(Solon, OH, U.S.A)에서 구입했다. Caspase-3 분석키트는 CLONTECH(Palo Alto, CA, U.S.A)에서 구입했다.

2. 세포 배양

인간 DU145 전립선세포는 Cell Line Bank(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입했다. 세포는 배양기(37°C, 5% CO₂-95% O₂)에서 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS; Gibco BRL)과 1% 항생제를 포함한 Dulbecco's modified Eagle's Medium(DMEM; Gibco BRL, Grand island, NY, USA)로 배양하였으며, 배양액은 매 2일마다 교환하였다. 세포는 배양접시에서 약품처리 24시간 전에 2×10⁴ cell/cm²의 밀도로 평판 배양하였다.

3. DNA 분열

세포사멸성 DNA 분절검출을 위해서 DNA 분절검사는 전 실험¹⁶⁾에 준하여 실험하였다. 간단히 설명하면 DU145 세포는杏仁 물추출물과 함께 처리하였고 세포는 4°C에서 20분간 40mM Tris-HCL(pH 7.5), 20mM EDTA 및 100mM NaCl, 0.5% SDS를 포함한 500μl의 세포용해완충제에 용해시켰다. 용해물은 37°C에서 2시간 동안 200μg/ml의 proteinase K와 배양시켰다. 그리고 나서 56°C에서 2시간 동안 100μg/ml의 RNase와 배양시켰다. 전체 DNA는 phenol/chloroform에서 추출되며 sodium chloride/isopropanol을 사용하여 침전되고 난 뒤 37°C에서 24

시간동안 10mM Tris-HCL(pH 8.0), 100 μM EDTA를 포함한 TE완충제에 용해하였다. 10μg의 수집된 게놈 DNA는 0.1 μg/ml의 ethidium bromide를 포함한 1.5%의 agarose gel 내에서 전기이동에 의해 자외선 조명하에 시각화된다.

4. RNA유리와 RT-PCR

Bcl-2와 Bax mRNA의 발현을 확인하기 위하여 RT-PCR을 시행하였다. 전체 RNA는 RNAzol tm B(TEL-TEST, Friendswod, TX, USA)를 사용한 DU145세포로부터 유리하였다. 2μg의 RNA와 2μl의 무작위 육량체(Promega, Madison, WI, USA) 혼합물은 65°C로 10분간 가열하였다. 1μl의 AMV 역전사 효소(Promega, Madison, WI, USA), 5μl의 10mM dNTP(Promega, Madison, WI, USA), 1μl의 RNasin(Promega, Madison, WI, USA) 그리고 5μl의 10 x AMV RT butter(Promega, Madison, WI, USA)는 혼합물에 첨가하고 최종적인 부피는 dimethyl pyrocarbonate(DEPC)-treated water와 함께 50μl에 달한다. 그리고 나서 반응 혼합물은 42°C에서 1시간 동안 배양시켰다.

PCR증폭은 1μl의 appropriate cDNA, 1μl의 10pM의 농도를 가진 각각의 시발물질 세트, 4μl의 10 x RT buffer, 1μl의 2.5 mM dNTP 그리고 2단위의 Taq DNA polymerase(TaKaRa, Shiga, Japan)를 포함하는 40μl의 반응부피에서 수행하였다. 인간 Bcl-2에서 시발물질 순서는 5'-CGACGACTTCTCCGCCGCTACCGC-3'(a 25-mer sense oligonucleotide starting at position 334)와 5'-CCGCATGCTGGGGCCGTACAG-TTCC-3'(a 25-mer anti-sense oligonucleotide starting at position 628) 이다. 인간 Bax에서 시발물질 순서는 5'-GTGCACCAAGGTGCCGGAAC-3'(a 20-mer sense oligonucleotide starting at position 375)와 5'-TCAGCCATCTTCTTC-CAGA-3'(a 20-mer anti-sense oligonucleotide starting at position 560)이다. 실험에서 내부 제어로 사용한

cyclophilin의 시발물질 순서는 5'-ACCCACCGTGT TCTTCGAC-3'(a 20-mer sense oligonucleotide starting at position 52)와 5'-CATTTGCCATGGA CAAGATG-3'(a 20-mer anti-sense oligonucleotide starting at position 332)이다. PCR 결과의 예상 크기는 Bcl-2에서 318bp, Bax에서 205bp 그리고 cyclophilin에서 299bp였다.

Bcl-2와 Bax에서 PCR처치는 다음과 같은 조건하에서 GeneAmp 9600 PCR system에서 이루어진다. 94°C에서 5분간의 초기변성은 30증폭주기에 따르는데 각각의 증폭주기는 94°C에서 30초간의 변성, 58°C에서 30초간의 소환 그리고 72°C에서 45초간의 신장으로 이루어져 있다. 그리고 추가적 신장과정이 처치 마지막에 72°C에서 10분간 있다. Cyclophilin에 대한 PCR처치는 다음의 조건하에 수행하였다. 94°C에서 5분간의 변성, 뒤따르는 25 증폭주기, 각각의 증폭주기는 94°C에서 30분간의 변성, 55°C에서의 소환, 72°C에서 45초간의 신장으로 이루어져 있다. 그리고 추가적인 신장과정이 처치 마지막에 72°C에서 10분간 이루어진다. 각각의 mRNA종의 RT-PCR의 최종량은 Molecular Analyst™ version 1.4.1(Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A)의 밀도계로 계산하였다.

5. Western blot 분석

인간 DU145 전립선 암세포는 50mM HEPES(pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1.5 mM magnesium chloride hexahydrate, 1mM ethyleneglycol-bis-(β-aminoethyl ether)-N, N'-tetraacetic acid(EGTA), 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 2μg/ml leupeptin, 1μg/ml pepstatin, 1mM sodium ortho vanadate, 그리고 100mM sodium fluoride를 함유한 냉동 전세포 용해물 완충액에 용해되어 있고, 혼합물은 4°C에서 30분간 배양시켰다. 세포 조직과편은 microcentrifugation에 의해서 제거되고 이것은 급속동결 상청액에 뒤따른다. 단백질농도는 Bio-Rad colorimetric protein

assay kit(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 의해 측정하였다. 40μg의 단백질은 SDS-polyacrylamide gel에서 분리되고 난 뒤 nitrocellulose membrane으로 전이된다(Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Germany). Mouse anti-Actin antibody와 anti-Bcl-2 antibody, anti-Bax antibody(1 : 1000 ; Santa Cruz Biotech, CA, USA)는 초기 항체로 사용하였다. Horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse antibody(1 : 2000 ; Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg, Germany)는 이차 항체로 사용하였다. 밴드 검출은 chemiluminescence (ECL) detection system(Amersham Pharmacia Biotech GmbH)로 수행하였다.

6. Caspase-3 효소 활성분석

Caspase 효소 활성은 ApoAlert caspase-3 assay kit로 측정하였다. 간단히 쯔仁 물추출물의 처치 후에 세포는 50μl의 냉동세포용해완충액에 녹여진 것이다. 50μl의 두 반응 완충액(DTT를 함유한)과 5μl의 적합하게 접합된 1mM의 농도를 가진 기질이 각각의 샘플 용해물에 첨가하였다. 혼합물은 37°C에서 1시간 동안 water bath에서 배양시켰고 흡광도는 405nm의 테스트 파장에서 미량역가판독기에 의해 측정하였다.

7. 통계

결과는 평균으로 standard error mean(S.E.M)으로 나타난다. 자료는 SPSS(v.10)를 사용한 Duncan's post-hoc test를 따라 One-way ANOVA에 의해 분석하였다. 차이점은 p < 0.05에서 통계상의 유의성으로 인정하였다.

III. 성 적

1. DNA 분절 실험을 통한 세포사멸에 미치는 영향

쯔仁 물추출물이 세포사멸을 유발하는지 확인하기

위하여 세포사멸의 특징적인 endonuclease활성을 반영하는 DNA 분절을 분석했다. Fig. 1에서 보여지는 것처럼, 썩은이 물추출물 1mg/ml, 5mg/ml 및 10mg/ml 농도에서 24시간 동안의 처치는 특징적인 사다리 패턴으로 전기이동을 통해 발견된 일정한 분절 형태로 나타났다(Fig. 1).

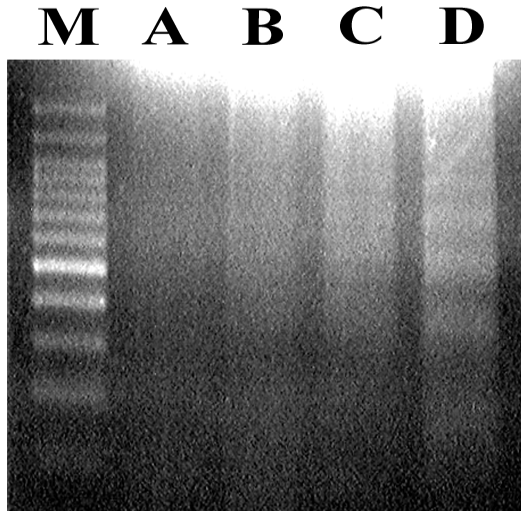


Fig. 1. Electrophoretic analysis of the genomic DNA in DU145 cells.

(M)Marker, (A)Control group, (B)1mg/ml *Armeniacae Amarum Semen*-treated group, (C)5mg/ml *Armeniacae Amarum Semen*-treated group, (D)10mg/ml *Armeniacae Amarum Semen*-treated group

2. Bcl-2와 Bax mRNA의 발현에 미치는 영향

Bcl-2와 Bax에서 mRNA 레벨의 RT-PCR분석은 이들 유전자 발현의 비교수준을 추정하기 위해 시행하였다. 이번 연구에서 대조군의 Bcl-2와 Bax의 mRNA레벨은 1.00으로 셋팅하였다.

24시간 동안 1mg/ml, 5mg/ml 및 10mg/ml의 썩은이 투여군은 Bcl-2 mRNA의 발현을 각각 0.89 ± 0.12 , 0.50 ± 0.04 및 0.38 ± 0.03 으로 유의성 있게 감소시켰다. 24시간 동안 1mg/ml, 5mg/ml 및 10mg/ml의 썩은이 투여군은 Bax mRNA의 발현을 각각 1.48 ± 0.16 ,

1.89 ± 0.13 및 2.72 ± 0.09 로 유의성 있게 증가시켰다. 이 결과는 Bcl-2 mRNA의 발현이 썩은이 물추출물의 농도가 증가함에 따라 유의성있게 감소되었다. 게다가 썩은이 물추출물은 농도 의존적으로 Bax mRNA의 발현을 유의성있게 증가시켰다(Fig. 2).

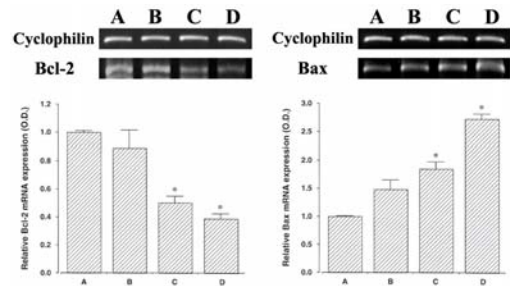


Fig. 2. Results of RT-PCR analysis for the mRNA levels of Bcl-2 and Bax. Cyclophilin mRNA was used as the internal control.

(A)Control group, (B)1mg/ml *Armeniacae Amarum Semen*-treated group, (C)5mg/ml *Armeniacae Amarum Semen*-treated group, (D)10mg/ml *Armeniacae Amarum Semen*-treated group. The results are presented as the mean \pm standard error mean(S.E.M.). * represents $p < 0.05$ compared to the control.

3. Bcl-2와 Bax 단백질에 미치는 영향

Bcl-2와 Bax 단백질에서 썩은이 물추출물의 효과를 조사했다. Actin의 발현수준은 표본의 양이 균등하게 섞여있음을 보여준다. 1mg/ml, 5mg/ml 및 10mg/ml의 농도로 썩은이 물추출물에 노출된 24시간 뒤에 Bcl-2 단백질(25kDa) 발현은 농도 의존적으로 감소되었으나 Bax 단백질(26kDa)의 발현은 농도 의존적으로 증가되었다(Fig. 3).

4. Caspase-3 효소 활성화에 미치는 영향

Caspase-3 효소 활성화는 DEVD-peptide-nitroanilide(pNA)로 측정하였다. 1mg/ml, 5mg/ml 및 10mg/ml 농도의 썩은이 물추출물에 노출된 지 24시간 뒤 DEVD-pNA의 양은 6시간 동안 5.91 ± 0.06 pmol (대조군값)에서 각각 6.05 ± 0.13 pmol, 6.35 ± 0.16 pmol 및 9.287 ± 0.10 pmol로 증가하였다. 10mg/ml의

杏仁과 1 μ g DEVD-fmk의 처리는 DEVD-pNA의 양을 6.49 \pm 0.10 pmol로 억제했다.杏仁 물추출물은 caspase-3 발현을 농도의존적으로 증가시키고, DEVD-fmk는杏仁으로 유도된 caspase의 활성 증대를 억제시킨다. DEVD-fmk는 caspase-3의 반응억제제이다(Fig. 4).

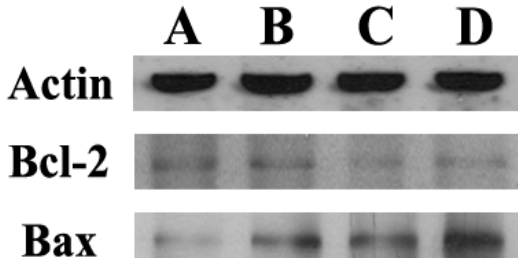


Fig. 3. Western blot analysis of the protein levels of Bcl-2 and Bax. Actin was used as an internal control.

(A)Control group, (B)1mg/ml *Armeniaca Amarum Semen*-treated group, (C)5mg/ml *Armeniaca Amarum Semen*-treated group, (D)10mg/ml *Armeniaca Amarum Semen*-treated group.

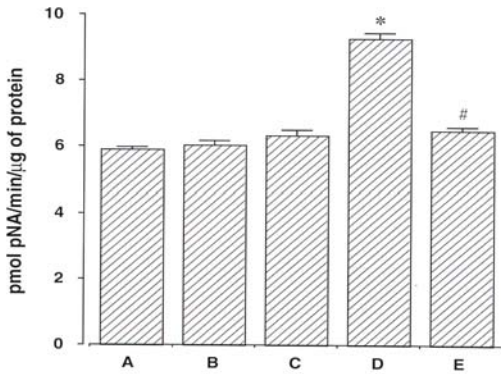


Fig. 4. Caspase-3 enzyme activity. The rate of DEVD-pNA cleavage was measured at a wavelength of 405 nm.

(A)Control group, (B)1mg/ml *Armeniaca Amarum Semen*-treated group, (C)5mg/ml *Armeniaca Amarum Semen*-treated group, (D)10mg/ml *Armeniaca Amarum Semen*-treated group, (E)10mg/ml *Armeniaca Amarum Semen*-treated group with 1 μ g DEVD-fmk. DEVD-fmk is caspase-3 inhibitor. The results are presented as the mean \pm standard error mean(S.E.M.). * represents $p < 0.05$ compared to the control. # represents $p < 0.05$ compared to the 10mg/ml *Armeniaca Amarum Semen*-treated group.

IV. 고찰

갖가지 신호는 암의 발생 동안 세포사멸의 과정을 자극한다. 성장/생존요인고갈, 산소결핍, 방사선, 세포-세포간질의 상호작용 소실, DNA 손상, 그리고 말단 소립 기능부전 등 몇몇 경우에는 세포사멸이 자극된다¹⁶. 대다수의 항암제의 작용은 암세포 사멸을 유발하는 세포간 목표신호에 초점을 맞추고 있다. 항암제의 작용은 암세포 사멸의 원인이 되는 상호작용 동안 세포반응이 있는 것을 암시한다^{17,18}. 암세포에 있어서 세포사멸의 유발은 개시, 진행, 그리고 암세포의 전이를 붕괴시킨다¹⁹.

세포사멸은 endonucleases의 활성화를 포함하며 이 활성화는 게놈 DNA의 분열에서 잘 제한된 파편으로 되어 agarose gel 전기이동상에서 특징적인 사다리 패턴으로 나타난다²⁰.杏仁이 세포사멸에 영향을 미치는가를 관찰하기 위해 DNA분질검사를 시행하였다.杏仁으로 처리된 DU145세포는 세포사멸에서 특유의 사다리 패턴으로 나타났다(Fig. 1). 이번 결과는杏仁 물추출물이 DU145세포에서 DNA합성을 감소시켜 세포 사멸을 증가시킨다는 것을 보여준다.

Bcl-2는 Bcl-2군 가운데 anti-apoptotic protein으로 세포사멸의 억제에 의해 강화된 암세포 생존을 통해서 신생물의 진행에 기여하는 것으로 알려졌다²¹. 대부분의 안드로젠 비의존성 전립선 암에서 Bcl-2의 과도 발현이 관찰된다^{22,23}. 또한 Bcl-2의 발현은 초기 전립선 암에서 유의성있게 증대된다²⁴. 잠복기 전립선 암 모델을 통한 실험에서 Bcl-2의 발현 억제는 전립선 암세포에서 증가된 세포사멸에 의한 화학요법효과를 강력하게 한다^{25,26}.

본 연구에서 5mg/ml와 10mg/ml의杏仁 물추출물은 Bcl-2 mRNA의 발현을 억제하였다. 또한 DU145세포 내에서 Bcl-2 단백질의 발현을 농도의존적으로 감소시켰다.

Bax는 Bcl-2 군 가운데 pro-apoptotic 단백질로 Bax와의 이질이량체의 복잡한 결합으로부터 스스로

동질이량체를 형성하는 능력을 갖고있다. Bax 단백질의 과 발현은 cytochrome c 분비와 caspase 경로 활성화를 야기시켜서 결국 전립선 암세포에서 세포사멸을 유도한다^{27,28)}. 암 치료에 있어서 세포사멸을 유도하기 위해 Bax mRNA 발현을 조절하고 있다. Marcelli 등²⁹⁾은 Bax의 과 발현이 화학적으로 유도된 세포사멸의 몇 형태에 저항하는 세포들인 DU145와 PC-3세포 같은 몇몇 전립선 암세포에서 세포 사멸을 유도할 수 있다고 보고했다. 또한 Lowe 등³⁰⁾은 전립선 특이 촉매사용에 인한 Bax 단백질의 과발현이 인간 전립선 암 세포인 LNCaP에서 세포사멸을 유도하며, Bax 유전자 치료가 전립선 암의 치료에 있어서 희망적인 접근이 될 것이라고 보고했다.

본 연구에서 5mg/ml와 10mg/ml의杏仁 물추출물은 Bax mRNA 발현을 유의성있게 증가시켰으며 또한 농도의존적으로 DU145 세포의 Bax 단백질을 증가시켰다.

Caspases는 cysteine proteases 군으로 세포사멸 경로에 없어서는 안될 부분을 형성하는 것으로 알려졌다. 특히 caspase-3가 활성화될 때 많은 세포적 목표를 갖게 되고 이 목표 단백질이 어려워지거나 활성화될 때 이들은 세포사멸의 형태학적인 특징을 산출하게 된다⁹⁾. 활성화된 caspase-3는 기질을 분열시키고 이것은 DNA 분열의 시작을 표시한다³¹⁾. caspase-3의 활성화는 전립선 암세포에서 세포사멸의 과정에 밀접한 영향을 준다.

본 연구에서 caspase-3 효소의 활성화는 DU145세포에서 10mg/ml杏仁 물 추출물의 처치에 의해 증가되고, 이것은杏仁 물추출물이 DU145 세포에서 세포사멸을 유도하여 항암 효과를 행사하는 것을 보여준다.

이에 저자는杏仁이 인간 DU145 전립선 암세포에서 Bcl-2 mRNA의 발현을 감소시키고 Bax mRNA의 발현을 증가시켜 caspase-3 활성화에 의해 세포사멸 기전을 유도할 수 있다는 것을 보였다. 본 연구에 사용된杏仁 물추출물은 11%의 Amygdalin을 함유하고 있다. 이상의 결과를 토대로 Amygdalin을 함유한

杏仁 물추출물은 전립선 암의 치료에 귀중한 수단을 제공할 것으로 생각된다.

V. 결 론

杏仁이 인간 DU145 전립선 암세포에서 세포사멸을 유도하는 가를 연구하기 위해 DU145 전립선 암세포에 전기 이동분석, Bcl-2와 Bax mRNA의 RT-PCR, Bcl-2와 Bax 단백질의 Western blot, caspase-3 효소 활성분석을 한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1.杏仁 물추출물에 의한 세포사멸 유발여부를 확인하기 위한 DNA 분절실험에서 1mg/ml, 5mg/ml 및 10mg/ml杏仁 투여군 모두 특징적 사다리 패턴으로 일정한 분절 형태로 나타났다.
2. Bcl-2 와 Bax mRNA의 RT-PCR분석에서 대조군에 비해 5mg/ml와 10mg/ml의杏仁 투여군이 Bcl-2 mRNA 발현을 유의성있게 감소 시켰으나, Bax mRNA 발현은 유의성있게 증가시켰다.
3. Bcl-2와 Bax 단백질을 관찰한 결과杏仁 투여군 모두 대조군에 비해 농도의존적으로 Bcl-2 단백질을 감소시켰으나, Bax 단백질은 증가시켰다.
4. Caspase-3 효소 활성을 측정할 바 10mg/ml의杏仁 투여군은 대조군에 비해 caspase-3 효소 활성을 유의성 있게 증가시켰다.

이상의 결과로杏仁은 전립선 암 치료에 효과가 있다고 판단된다.

References

1. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, CA Cancer J Clin, 1999; 49:8-31.

2. Pak JU, Moon SJ, Moon K, Won JH. *J Kor Orient Oncol*, 1999;5:137-50.
3. Hwang DR, Kang YS, Kim SS, Kim DH, Shin MK, Song HJ. Studies on the Allergic asthma effect of Semen Armeniaceae Amarum, *Kor J Herbol*, 2003;18:201-8.
4. Fukuta T, Ito H, Mukainaka T, Tokuda H, Nishino H, Yoshida T. Anti-tumor promoting effect of glycosides from *Prunus persica* seeds, *Biol Pharm Bull*, 2003;26:271-3.
5. Shim BS, Park JK, Choi SH. *J Kor Orient Oncol*, 2000;6:19-28.
6. Ellison NM, Byar DP, Newell GR. Special report on Laetrile: the NCI Laetrile Review. Results of the National Cancer Institute's retrospective Laetrile analysis. *New Engl J Med*, 1978;299:549-52.
7. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 1980;68:251-306.
8. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 1993;74:609-19.
9. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, 1997;326:1-16.
10. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*, 1997;88:355-65.
11. Communal C, Sumandea M, de Tombe P, Narula J, Solaro RJ, Hajjar RJ. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 2002;99:6252-6.
12. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. *Science*, 1995;267:1456-62.
13. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 2000;21:485-95.
14. Fisher DE. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell*, 1994;78:539-42.
15. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, 1995;267:1445-9.
16. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, 1992;356:397-400.
17. Dive C, Hickman JA. Drug-target interactions; only the first step in the commitment to a programmed cell death? *Br J Cancer*, 1991;64:192-6.
18. Eastman A. Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. *Cancer Cells*, 1990;2:275-80.
19. Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*, 1994;124:619-26.
20. Eastman A, Barry MA. The origins of DNA breaks: a consequence of DNA damage, DNA repair or apoptosis? *Cancer Invest*, 1992; 10:229-40.
21. Tsujimoto Y, Croce CM. Analysis and structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83:5314-8.
22. Colombel M, Symmans F, Gil S, O'Toole KM, Chopin D, Benson MM, et al. Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bcl-2 in hormone-refractory human prostate cancers. *Am J Pathol*, 1993;143:390-400.
23. McDonnell TJ, Navone NM, Troncoso P, Pisters LL, Conti C, von Eschenbach AC, et al. Expression of bcl-2 oncoprotein and p53 protein accumulation in bone marrow

- metastases of androgen-independent prostate cancer. *J Urol*. 1997;157:569-74.
24. McDonnell TJ, Troncso P, Brisbay SM, Logothetis C, Chung LW, Hsieh JT, et al. Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res*. 1992;52:6940-4.
25. Gleave ME, Tolcher A, Miyake H, Nelson C, Brown B, Beraldi E, et al. Progression to androgen independence is delayed by adjuvant treatment with antisense Bcl-2 oligodeoxynucleotides after castration in the LNCaP prostate tumor model. *Clin Cancer Res*. 1999;5:2891-8.
26. Miyake H, Monia BP, Gleave ME. Inhibition of progression to androgen-induced by combine adjuvant treatment with antisense BCL-xL and antisense Bcl-2 oligonucleotide plus Taxol after castration in the shionogi tumor model. *Int J Cancer*. 2000;86:855-62.
27. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X, Smac, amitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000;102:33-42.
28. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 2000;102:55-66.
29. Marcelli M, Marani M, Li X, Sturgis L, Haidacher SJ, Trial JA, et al. Heterogeneous apoptotic responses of prostate cancer cell lines identify an association between sensitivity to staurosporine-induced apoptosis expression of Bcl-2 family members, and caspase activation. *Prostate*. 2000;42:260-73.
30. Lowe SL, Rubinchik S, Honda T, McDonnell TJ, Dong JY, Norris JS. Prostate-specific expression of Bax delivered by an adenoviral vector induces apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. *Gene Therapy*. 2001;8:1363-71.
31. Hoshi T, Sasano H, Kato K, Yabuki N, Ohara S, Konno R, et al. Immunohistochemistry of caspase-3/CPP32 in human stomach and its correlation with cell proliferation and apoptosis. *Anticancer Res*. 1998;18:4347-53.