

인체 유방암세포 MDA-MB-231에서 乾漆 추출물이 PI3K/AKT 신호경로를 통한 caspase 의존적 apoptosis 유발에 미치는 영향

홍상훈, 박상은
동의대학교 한의과대학 한방내과

Caspase-dependent and Akt-pathway Regulated *Rhus Verniciflua* Stokes Extract-induced Apoptosis in Human Breast Carcinoma MDA-MB-231 Cells

Sang-hoon Hong, Sang-eun Park
Dept. of Korean Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dong-Eui University

ABSTRACT

In Korea, *Rhus verniciflua* Stokes is used to purge hardness, alleviate blood stasis, and treat cancer. However, the mechanisms of related anti-cancer activity are not fully understood in human cancer cells. This study investigated the anti-cancer effects and mechanisms of *Rhus verniciflua* Stokes on MDA-MB-231 human breast cancer cells and found that treatment with a *Rhus verniciflua* Stokes extract resulted in time- and concentration-responses that indicated growth inhibition of breast cancer cells by induced apoptosis. This was followed by a decrease in mitochondrial membrane potential: the activation of caspase-3, -8, and -9; and the up-regulation of tBid. Caspase-dependent apoptosis was induced through the inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and the Akt signaling pathway. This study provides evidence that *Rhus verniciflua* Stokes might be useful for the treatment of breast cancer.

Key words: *Rhus verniciflua* stokes, breast cancer, MDA-MB-231 cells, Akt-pathway

1. 서론

유방암은 서양에서 가장 많이 발생하는 여성암으로 우리나라에서도 그 발생빈도가 매년 증가하고 있으며, 최근 국내에서도 여성암 발생률에서 갑상선암 다음으로 유방암이 2위를 차지하고 있다¹. 뿐만 아니라, 우리나라의 식습관을 비롯한 생활환경의 전반적인 서구화 추세로 유방암의 발생률은

역시 더욱 증가할 것으로 사료된다. 현재 유방암의 치료법으로 약물, 방사선, 수술들의 치료법이 사용되어 지고 있으나, 미용상의 부재 및 에스트로겐 저항성 증가 등과 같은 여러 가지 부작용으로 환자의 삶의 질이 감소되어 새로운 대체 치료법의 연구가 요구되고 있는 실정이다^{2,3}.

최근 개발된 항암제 신약의 기원을 나누어보면, 천연물 또는 천연물에서 직접적으로 유래한 것이 거의 50% 육박하는 것으로 나타나고 있으며, 천연물에서 발견되어 임상에서 쓰이는 항암제의 3/4는 전통약재에서 발굴되어 나온 것이어서, 최근에 전통약재 및 천연물에서 새로운 항암제를 찾으려는 시도에 관심이 급속히 증가하고 있다⁴⁻⁸.

· 투고일: 2017.09.02, 심사일: 2017.09.19, 게재확정일: 2017.09.25
· 교신저자: 박상은 울산광역시 남구 신정동
동의대학교 울산한방병원
TEL: 052-226-8105
E-mail: pse@deu.ac.kr

乾漆은 human lymphoma cell line에서 apoptosis를 human cancer cell line에서는 anti-proliferative activity 유발하고 hydroxyl radical에 대해 항산화 작용을 가지는 것으로 보고되고 있다⁹⁻¹¹.

본 연구에서는 XE에 의한 유방암 세포의 증식 억제 및 세포자살 유발에 따른 항암효과에 대한 분자생물학적 연구를 진행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료준비

본 실험에 사용된 XE는 충북 옥천군 소재 (주) 참웃들에서 생산된 참웃 분말을 구입하여 사용하였다. 참웃 분말의 생산은 특허 제 10-1228119호, 특허 제 10-0763320호에 의거하여 제조되었다. 준비된 XE는 증류수에 녹여 100 mg/ml의 stock solution으로 만든 다음 이를 0~500 µg/ml 농도로 배지에 희석하여 처리하였다.

2. 세포 배양

본 실험에 사용한 인체 유방암 MDA-MB-231 세포는 American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)에서 분주 받아 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 1%의 penicillin 및 streptomycin이 포함된 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

3. MTT assay를 통한 세포 증식억제 조사

XE 처리에 의한 MDA-MB-231 세포의 증식 미치는 영향을 확인하기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium(MTT) assay를 이용하였다. 이를 위하여 MDA-MB-231 세포에 1.5×10^5 과 3×10^5 cells/well로 6 well plate에 접종 후 24시간 안정화 후에 적정 농도의 XE를 처리하고 24시간 또는 48시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 MTT(Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Paul, MN,

USA)를 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 2 ml씩 분주하고 37 °C에서 2시간 동안 다시 배양하였다. 배양이 끝난 다음 상층액을 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 2 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.

4. Flow cytometry를 이용한 apoptosis의 정량적 분석

대조군 및 XE가 포함된 배지에서 24, 48시간 동안 배양시킨 MDA-MB-231세포들을 PBS로 씻어내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 세포들만 모았다. 여기에 다시 PBS를 첨가하여 충분히 씻은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 상층액만 버리고 남은 세포에 CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 고정 및 염색을 하여 4 °C, 암실에서 30분 동안 반응을 시킨 다음 DNA flow cytometry(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 cell quest-pro (Becton Dickinson) 프로그램으로 분석하였다.

5. Flow cytometry를 이용한 Mitochondrial membrane potential 변화 분석

6 well plate에 1.5×10^5 cells/well 정도로 인체 MDA-MB-231세포들을 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 다음 XE를 처리하였다. 48시간까지 배양한 후, 세포를 PBS로 씻어 내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 원심분리를 하여 세포를 모았다. 이렇게 모인 세포에서 상층액을 제거한 후, 10 uM의 농도로 만들어진 배양액을 1 ml씩 분주하여 pipetting한 후 37 °C 세포 배양기에 20분 동안 JC-1 dye로 염색하였다. 염색된 세포를 nylon mesh로 세포를 하나씩으로 분리시킨 후 DNA flow cytometry(Becton Dickinson)에 적용시켜 형

광반응에 따른 histogram을 cell quest-pro(Becton Dickinson) 프로그램으로 분석하였다.

6. DNA fragmentation의 분석

특정 세포에 apoptosis가 유발되었을 때 관찰될 수 있는 DNA fragmentation의 분석을 위하여 정상 및 XE가 처리된 배지에서 48시간 동안 배양된 세포를 모아 lysis buffer[5 mM Tris-HCl(pH 7.5), 5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100]를 4 °C에서 30분간 처리하였다. 그 후 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하고, 그 상층액에 proteinase K(Sigma)를 0.5 mg/ml의 농도로 처리한 다음 50 °C에서 3시간 동안 반응시켰다. 그 후 phenol:chloroform:isoamyl alcohol 혼합 용액(25:24:1, Sigma)을 첨가하고 30분간 rotate 시킨 다음 14,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 여기서 얻어진 상층액에 적정량의 isopropanol(Sigma)과 5 M NaCl를 첨가하였다. 24시간 정도 냉장 보관한 후, 14,000 rpm, 4 °C에서 30분간 원심 분리 시킨 후 상층액을 버리고, RNase A가 적당량 들어있는 TE buffer를 이용하여 pellet을 녹이고 여기에 6X gel loading dye(Bioneer, Korea)를 섞어 주었다. 1.5% agarose gel을 만들어서 1시간 가량 50 V로 전기영동 시킨 후 ethidium bromide(EtBr, Sigma)로 염색하여 ultra violet(UV) 하에서 사진 촬영하였다.

7. Western blot analysis에 의한 단백질 발현 변화의 분석

대조군 및 XE가 포함된 배지에서 48시간 동안 배양시킨 MDA-MB-231세포들을 PBS로 씻어 내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 원심분리를 하여 세포를 모았다. 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 1시간 동안 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심분

리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 정량 한 다음 동량의 Laemmli sample buffer(Bio-Rad)를 섞어서 sample을 만들었다. 이렇게 만든 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate(SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 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 담구어 상온에서 1시간 정도 incubation하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 PBS-T로 15분 정도 세척하였다. 준비된 membrane에 1차 antibody를 처리하여 상온에서 2시간 이상 또는 4 °C에서 over night 시킨 다음 PBS-T로 세척하고 처리된 1차 antibody에 맞는 2차 antibody를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 다시 PBS-T로 세척하고 Enhanced Chemiluminescence(ECL) 용액(Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 양을 분석하였다.

8. 통계 처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 표시하였고 SigmaPlot(Systat Software Inc., San Jose, CA, USA)을 이용하여 Student *t*-test를 이용하여 통계적 유의성을 얻었다.

III. 결 과

1. MDA-MB-231 유방암세포의 증식에 미치는 XE의 영향

인체 유방암 MDA-MB-231 세포에서 XE 처리에 의한 암세포 증식 억제 현상을 조사하기 위하여 XE를 100~500 µg/ml 농도로 24, 48시간 동안 처리한 후 MTT assay를 실시하였다. Fig. 1A에 보

이는 바와 같이 XE를 200 µg/ml 48시간 처리군에 서부터 증식 억제 현상이 나타나기 시작하여 XE 처리 농도 및 시간이 증가됨에 따라 유방암 세포의 증식억제 효과가 증가되는 것이 확인되었다. 특히 48시간 동안의 400 µg/ml 및 500 µg/ml 처리군에서는 각각 약 69% 및 83% 정도의 현저한 증식 억제 효과를 확인 할 수 있었다.

2. XE에 의한 MDA-MB-231 유방암세포의 apoptosis 유발

XE 처리에 의한 MDA-MB-231 인체 유방암 세포의 증식 억제가 apoptosis 유발과 연관성이 있는 지를 조사하기 위하여 PI 염색을 이용하여 flow cytometry 분석을 실시한 결과, XE 24시간 처리군에서는 apoptosis가 크게 증가 되지 않았지만, 48시간 처리군에서는 XE 농도 증가됨에 따라 유방암 세포의 apoptosis가 현저히 증가되는 것이 확인되었다(Fig. 1B). 이상의 결과의 따라 XE 처리에 의한 MDA-MB-231 인체 유방암 세포의 증식 억제는 apoptosis 유발에 의한 것임을 확인 할 수 있었다.

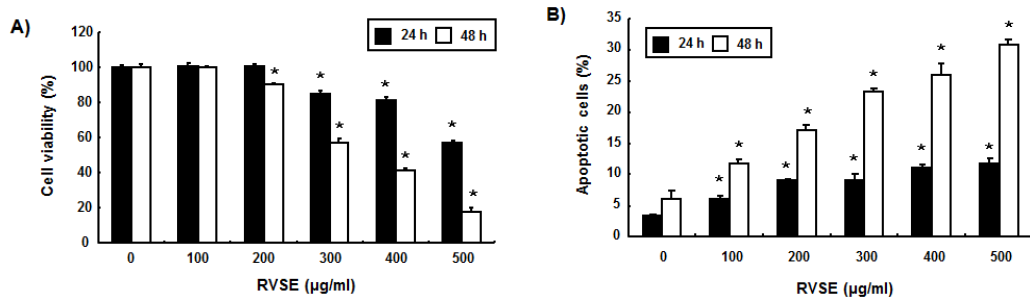


Fig. 1. Effects of RVSE on the cell viability and apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells.

The cells were seeded in 6-well plates at an initial density of 1×10^5 cells per well and treated with the indicated concentrations of RVSE for 24 h and 48 h. (A) The cell viability was measured by the metabolic-bye-based MTT assay. (B) For the quantification of apoptosis level, cells were collected, stained with PI and analyzed by flow cytometry. The data shown are means±SD of three independent experiments. The statistical significance of the results was analyzed by Student's t-test (*, $p < 0.05$ vs. untreated control).

3. Bcl-2 family의 발현 및 mitochondrial membrane potential(MMP)에 미치는 XE의 영향

XE 처리에 의한 MDA-MB-231 인체 유방암 세포의 증식 억제가 apoptosis 유발과 연관성이 있는 것을 확인 하였기에, 이와 연관된 apoptosis의 기전 해석을 위하여 apoptosis의 중요 조절자로 알려진 Bcl-2 family 단백질의 발현에 미치는 XE의 영향을 조사하였다. Fig. 2A에 나타난 바와 같이, anti-apoptotic 단백질로 알려진 Bcl-2와 Bcl-X_L에는 XE의 처리가 크게 영향을 미치지 않았지만, 대표적인 pro-apoptotic 단백질인 Bax는 XE처리에 의해 증가되는 것이 확인되었다. 뿐만 아니라 apoptosis 기

전에서 내인적 기전과 외인적 기전의 연결 고리로 작용하는 단백질인 Bid의 truncated 형태가 XE 500 µg/ml 처리군에서 현저히 증가되는 것이 확인되었다. 이러한 Bcl-2 family 단백질의 발현 변화는 세포 내 에너지 생성기관인 mitochondrial의 membrane potential 영향을 미치게 되는데, 이에 따라 XE 처리에 의한 mitochondrial membrane potential(MMP)의 변화를 flow cytometry 분석해본 결과, Fig. 2B에서 나타난 바와 같이 XE 400 µg/ml 및 500 µg/ml 처리 군에서 MMP가 각각 약 33% 및 81% 정도 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

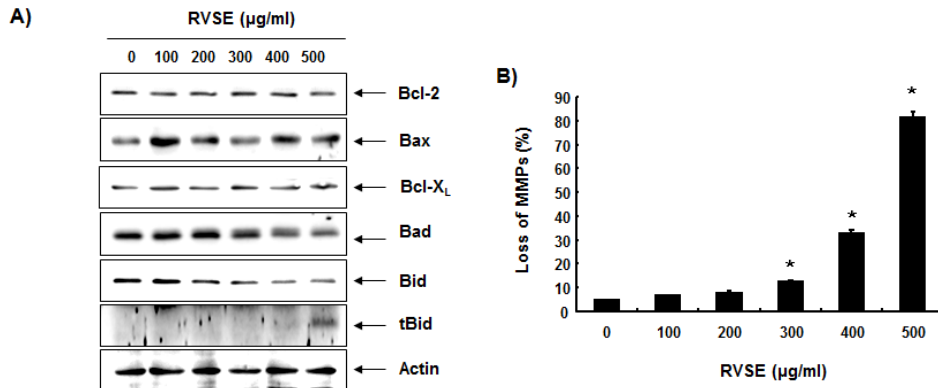


Fig. 2. Effects of RVSE on the levels of Bcl-2 family proteins and MMP values in MDA-MB-231 human breast cancer cells.

(A) Cells were treated with the indicated concentrations of RVSE for 48 h. The cells were lysed and then equal amounts of cell lysates were separated on SDS-polyacrylamide gels and transferred to 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. (B) Cells grown under the same conditions as (A) were stained with JC-1 and incubated at 37 °C for 20 min. Mean JC-1 fluorescence intensity was determined using a flow cytometer. Data are reported as means±SD of three independent experiments. The statistical significance of the results was analyzed by Student's t-test (*, $p < 0.05$ vs. untreated control).

4. PARP, Caspases의 발현 및 활성화에 미치는 XE의 영향

다음으로 apoptosis 유발에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 caspase-3, -8 및 -9의 발현 및 활성화에 미치는 XE의 영향을 조사하였다. Fig. 3A 및 B에 나타난 바와 같이 XE의 처리에 의하여 initiator caspase로 알려진 caspase-9와 effector caspase로 알려진 caspase-3의 활성화형 단백질은 나타나지 않았지만 전체 단백질의 발현이 처리농도 의존적으로 현저히 감소되는 것으로 관찰되었을 뿐만 아니라 효소 활성 역시 증가되는 것이 확인되었다. caspase-3의 기질단백질로서 DNA repair와 genomic stability에 관여하는 poly(ADP-ribose) polymerase

(PARP)단백질의 단편화 현상이 관찰되었다. 뿐만 아니라 또다른 initiator caspase인 caspase-8 역시도 XE 처리에 따라 발현 감소와 효소활성 증가가 확인되었으며, 이는 앞선 결과에서 tBid 증가와 관련성이 있을 것으로 사료된다. 이상의 결과에 따라 XE에 의한 apoptosis 증가는 caspase 의존적이 경로를 통해서 일어난다는 것을 확인 할 수 있었으며, 이를 확인하기 위해 pan-caspase 억제제로 알려진 z-VAD-fmk 50 μg/ml 선 처리해 본 결과, XE 400 μg/ml에 의해 증가된 DNA 단편화와 세포 생존도 감소가 회복되는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 4).

인체 유방암세포 MDA-MB-231에서 靛漆 추출물이 PI3K/AKT 신호경로를 통한 caspase 의존적 apoptosis 유발에 미치는 영향

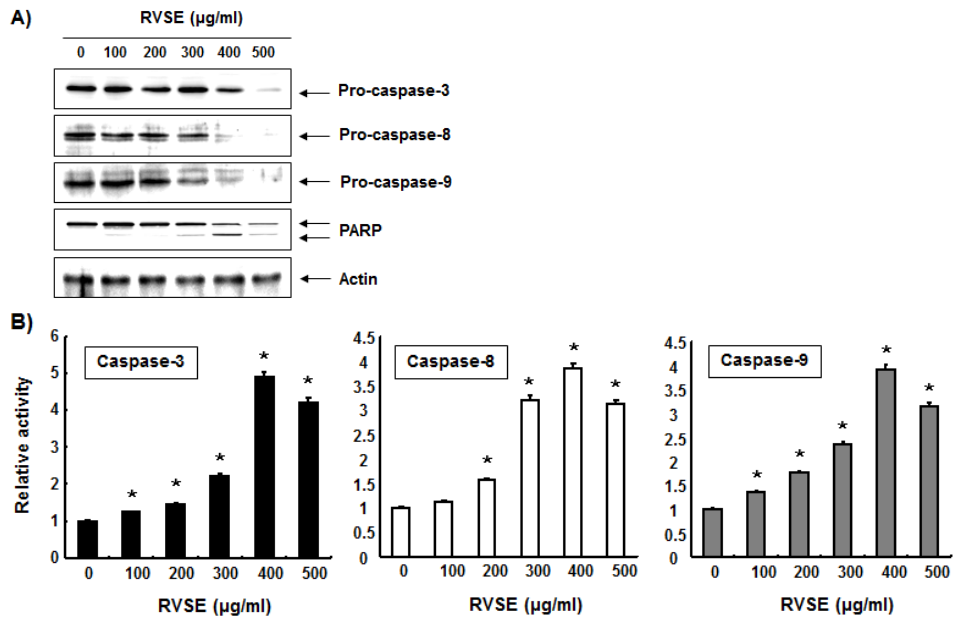


Fig. 3. Activation of caspases and degradation of PARP by RVSE in MDA-MB-231 human breast cancer cells.

(A) Cells were treated with the indicated concentrations of RVSE for 48 h. The cells were lysed and then equal amounts of cell lysates were separated on SDS-polyacrylamide gels and transferred to 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. (B) Cells grown under the same conditions as (A) were collected and lysed. In order to assay *in vitro* caspase activity, aliquots of cell lysate were incubated at 37 for 1 h with DEVD-pNA, IETD-pNA, and LEHD-pNA as substrates for caspase-3, -8, and -9, respectively. Released fluorescence products were measured. Each point represents the mean \pm SD of representative experiments performed at least three times. A Student's *t*-test (*, $p < 0.05$ vs. untreated control) was used for analysis of statistical significance of the results.

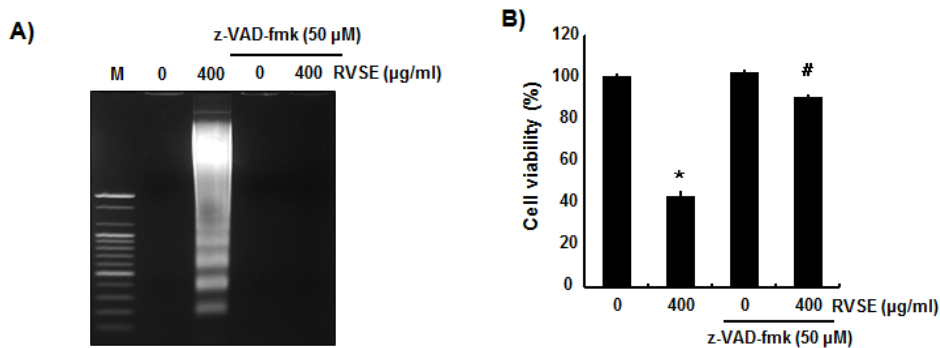


Fig. 4. Inhibition of RVSE-induced apoptosis by pan-caspase inhibitor in MDA-MB-231 human breast cancer cells.

(A) The cells were incubated with or without pan-caspase inhibitor, z-VAD-fmk (50 µM), for 1 h before treatment with RVSE for 48 h. The genomic DNA was extracted from cells and then electrophoresed on a 1.5% agarose gel, and visualized by EtBr staining. (B) The cells grown under the same conditions as (A) were evaluated for cell viability by MTT assay. Data are reported as means \pm SD of three independent experiments. For statistical analysis, *t*-test was performed (*, $p < 0.05$ vs. sanguinarine treatment).

5. PI3K/Akt 경로의 발현에 미치는 XE의 영향

다음으로 세포 성장 및 암 발생에 있어 중요한 신호전달 경로로 알려진 PI3K/Akt 경로의 발현에 미치는 XE에 영향을 대해 조사하였다. Fig. 5A 및 B에 나타난 바와 같이 XE의 처리 농도와 시간이 증가 할수록 Akt와 Akt의 활성화형인 인산화된 Akt의 발현이 억제 되는 것을 확인 할 수 있었다. 이상의 결과에 따라 XE에 의한 apoptosis 증가에는

PI3K/Akt 경로가 관련한다는 것을 확인 할 수 있었으며, 이를 다시 확인하기 위해 PI3K 억제제로 알려진 LY294002를 5~20 μ M을 선 처리하여 본 결과, XE 400 μ g/ml 처리군에서 LY294002 농도 증가에 따라 MMP의 감소와 DNA 단편화가 증가 되는 것이 확인 되었으며, 세포 생존도 역시 더욱 감소되는 것을 확인 하였다(Fig. 6).

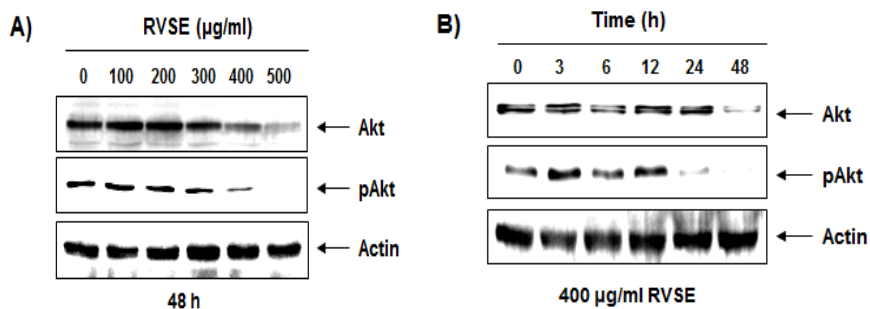


Fig. 5. Inhibition of PI3K/Akt signal pathway by RVSE in MDA-MB-231 human breast cancer cells.

(A and B) Cells were treated with RVSE for the indicated concentrations and times. Cellular proteins were analyzed by Western blotting to investigate the expression and activation of Akt with the indicated antibodies. Actin was used as an internal control.

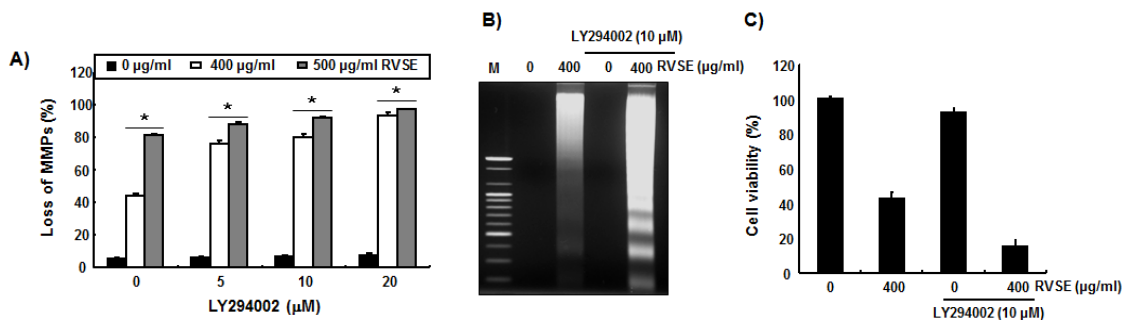


Fig. 6. Involvement of the PI3K/Akt signal pathway in RVSE-induced apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells.

(A) The cells were pre-treated with LY294002 (5~20 μ M) for 1 h and then challenged with RVSE for 48 h. Mean JC-1 fluorescence intensity was determined using a flow cytometer. Data are reported as means \pm SD of three independent experiments. The statistical significance of the results was analyzed by Student's t-test (*, $p < 0.05$ vs. untreated control). (B and C) The cells were incubated with or without LY294002 (10 μ M) for 1 h before challenge with 400 μ g/ml of RVSE for 48 h. (B) For the analysis of DNA fragmentation, genomic DNA was extracted and analyzed on 1.2% agarose gels. (C) Cell viability was assessed by the MTT assay.

IV. 고찰

한의학에서 乾漆은 性味가 辛溫鹹하며 血分에 작용하며 破血, 위장의 積滯를 消散시켜 積聚, 癥瘕, 瘀血 및 冷心痛 등에 활용된다¹².

본 연구에서는 인체 유방암 세포주인 MDA-MB-231세포의 성장에 미치는 XE의 영향과 apoptosis 유발에 따른 항암효과 및 항암기전을 조사하였다. 이를 위하여 정상 및 XE가 함유된 배지에서 24 및 48시간 동안 배양된 암세포들을 대상으로 생존율 및 증식 억제 정도를 조사한 결과, 정상배지에서 자란 세포와 비교해서 XE이 함유된 배지에서 자란 MDA-MB-231 세포의 생존율 감소 현상 및 증식 억제 정도가 처리 농도 및 시간 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1A). 이러한 생존율 감소 및 증식 억제 현상이 apoptosis 유발과 어떠한 연관성이 있는지를 확인하기 위하여 유세포분석기를 이용하여 apoptosis 유발 세포군에 해당하는 sub-G1기에 속하는 세포들의 빈도를 측정 한 결과, XE을 처리하지 않았을 경우에 비하여 XE 처리 농도와 시간이 증가함에 따라 sub-G1기에 해당하는 세포가 현저하게 증가하였다(Fig. 1B). 이상의 결과를 살펴보면 XE에 의한 MDA-MB-231 세포의 생존율 감소와 증식 억제의 의한 항암 활성은 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있는 것으로 사료된다.

Apoptosis는 생물의 발생 단계 조절에서 뿐만 아니라 항상성 유지에 중요한 역할을 수행한다. 인체 내에서 apoptosis의 교란은 암과 같은 여러 가지 질환을 유발하는 것으로 알려져 있으며, 암세포의 성장억제를 통한 암 치료 있어서 apoptosis의 유발이 중요한 표적으로 생각되어 진다¹³. Apoptosis를 유발하는 경로는 크게 외인적인 요소에 의해 활성화 되는 extrinsic pathway와 내인적 요소에 의해 활성화되는 intrinsic pathway로 구분되어지는데, extrinsic pathway는 DR4, DR5 및 Fas 등과 같은 세포표면의 수용체에 TRAIL과 FasL 등과 같은

리간드가 결합하여 caspase-8을 활성화시키게 되고, 활성화된 caspase-8은 직접적으로 caspase-3을 활성화시켜 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있다¹⁴. Intrinsic pathway의 경우에는 화학약품, UV, 방사선들에 의해 세포의 손상을 유발함에 따라 미토콘드리아의 기능 이상이 유발됨으로서 시작된다¹⁵. Intrinsic pathway는 Bcl-2 family 단백질들에 의해 조절되는데, Bcl-2 family는 Bcl-2 및 Bcl-X_L 등의 anti-apoptotic 유전자와 Bax, Bak, Bad, Bim 및 Bid 등의 pro-apoptotic 유전자로 구성되어 있으며, anti-apoptotic 및 pro-apoptotic 유전자들은 구조 및 비율에 따라 mitochondrial membrane potential을 조절하는 것으로 알려져 있다¹⁶. 그리고 Bcl-2 family중 Bid는 extrinsic pathway와 intrinsic pathway의 상호작용을 매개하는 단백질로 활성화된 caspase-8에 의해 잘리어져 tBid의 형태로 미토콘드리아로 이동하여 intrinsic pathway를 활성화시킨다¹⁷. 본 연구에서는 XE 처리에 의해 유발된 apoptosis에 어떠한 apoptosis pathway가 관여하는지 확인해 본 결과, XE 처리농도 증가함에 따라 다른 Bcl-2 family은 크게 변화가 없었지만, Bid는 XE 농도 의존적으로 감소되었으며, XE 500 ug/ml 농도에서 tBid 발현 역시 현저히 증가 되었다(Fig. 2A). 뿐만 아니라 mitochondrial membrane potential 역시도 tBid의 발현 패턴과 비슷하게 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 이상의 결과에 따라서 XE에 의한 MDA-MB-231유방암세포의 세포 사멸은 extrinsic pathway와 intrinsic pathway의 상호 작용에 의해 유발된다고 생각되어진다.

다음으로 apoptosis유발에 결정적인 역할을 수행하는 caspase는 initiator caspases 및 effector caspases로 구분되어지는데 특히 effector caspase인 caspase-3의 경우에는 extrinsic pathway에 의하여 활성화되는 initiator caspases인 caspase-8과 intrinsic pathway에 의하여 활성화되는 initiator caspases인 caspase-9에 의하여 활성화되어 여러 종류의 기질 단백질들은 분해함으로써 apoptosis를 유발하는 중요한 유전자

로 알려져 있다¹⁸. 활성화된 Caspase-3는 세포 항상성 유지에 작용하는 PARP와 같은 기질단백질 cleavage 시키거나 분해시켜 apoptosis 유발하는 것으로 알려져 있다¹⁹. 따라서 본 연구에서는 XE에 의한 apoptosis 유발에서 caspase경로의 관련성을 조사한 결과, XE처리에 의해 각 caspase의 활성화형 단백질 증가는 관찰되지 않았지만 불활성형 단백질의 발현이 감소하는 것으로 확인 할 수 있었으며, 효소 활성화 역시도 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 3). 뿐만 아니라 caspase-3의 기질단백질인 PARP 단편화가 XE농도 의존적으로 유발되는 것으로 확인할 수 있었다(Fig. 3A). XE에 의한 apoptosis 증가가 caspase 의존적이 경로를 통해서 일어난다는 것을 확인하기 위해 pan-caspase 억제제인 z-VAD-fmk를 XE에 선처리해 본 결과, DNA 단편화와 세포생존도 감소가 회복되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 4). 이상의 결과를 통해서 XE에 의한 MDA-MB-231 유방암세포의 세포사멸은 caspase 경로에 의존적으로 유발되는 것으로 사료되어진다.

PI3K/Akt 세포 신호전달계는 세포 생존과 성장을 조절하는 세포 신호전달계로 암 발생과정에서 비정상적으로 발현되어 세포 성장관련 유전자의 발현을 촉진하는 반면에, apoptosis 유발 관련 유전자는 억제하여 암세포의 무한증식을 유도한다고 알려져 있다². 이에 새롭게 개발되고 있는 많은 항암제들의 중요한 목표 유전자로 각광받고 있다²¹. 본 연구에서는 XE에 의한 apoptosis 유발에서 PI3K/Akt 세포신호전달계의 관련성을 조사한 결과, XE를 시간과 농도 의존적으로 처리하였을 때, Akt와 활성화된 Akt인 pAkt의 발현이 감소하는 것으로 확인할 수 있었다(Fig. 5). 뿐만 아니라 PI3K/Akt 세포신호전달계의 억제제인 LY294002를 XE와 같이 처리시 MMP의 감소, DNA 단편화와 세포생존도 감소가 증가되는 것으로 확인되었다(Fig. 6). 이상의 결과를 통해서 XE에 의한 MDA-MB-231 유방암세포의 세포사멸에 PI3K/Akt 세포신호전달계 관련된다는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 보면 인체 유방암세포주인 MDA-MB-231에 XE을 처리하였을 경우에 유발되는 세포 생존을 감소와 증식억제의 항암활성은 apoptosis 유발과 밀접한 연관이 있으며, XE에 의한 apoptosis 유발에는 Bid 단백질 조절을 통한 미토콘드리아의 기능 이상과 caspase의 활성화와 기질단백질들의 분해가 중요한 역할을 하는 것으로 조사되었다. 뿐만 아니라 세포의 생존의 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려진 PI3K/Akt pathway를 통해서 XE에 의한 apoptosis가 조절 받는다는 것을 확인하였다. 본 연구에서는 XE의 암세포 apoptosis 유발을 통한 효과적인 천연물 항암제로의 가능성을 제시하고 있으며, XE의 생화학적 항암기전 해석을 이해하고 향후 지속적인 연구를 위한 귀중한 자료로 사용 될 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Korea Central Cancer Registry, National Cancer Center. Annual report of cancer statistics in Korea in 2012. Ministry of health and Welfare 2014:19-37.
2. Vogel VG. Selective estrogen receptor modulators and aromatase inhibitors for breast cancer chemoprevention. *Curr Drug Targets* 2011;12(13):1874-87.
3. Clarke BL, Khosla S. New selective estrogen and androgen receptor modulators. *Curr Opin Rheumatol* 2009;21(4):374-9.
4. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* 2012;75(3):311-35.
5. Qi F, Li A, Inagaki Y, Gao J, Li J, Kokudo N, Li XK, Tang W. Chinese herbal medicines as adjuvant treatment during chemo-or radio-therapy for cancer. *Biosci Trends* 2010;4(6):297-307.
6. Feng Y, Wang N, Zhu M, Feng Y, Li H, Tsao

- S. Recent progress on anticancer candidates in patents of herbal medicinal products. *Recent Pat Food Nutr Agric* 2011;3(1):30-48.
7. Uezono Y, Miyano K, Sudo Y, Suzuki M, Shiraishi S, Terawaki K. A review of traditional Japanese medicines and their potential mechanism of action. *Curr Pharm Des* 2012;18:4839-53.
 8. Wang Y, Li Y, Liu X, Cho WC. Genetic and epigenetic studies for determining molecular targets of natural product anticancer agents. *Curr Cancer Drug Targets* 2013;13(5):506-18.
 9. Lee JC, Kim J, Lim KT, Yang MS, Jang YS. Ethanol eluted extract of *Rhus verniciflua* Stokes showed both antioxidant and cytotoxic effects on mouse thymocytes depending on the dose and time of the treatment. *Journal of biochemistry and Molecular Biology* 2001;34:250-8.
 10. Kitt DD, Lim KT. Antitumorigenic and cytotoxic properties of an ethanol extract derived from *Rhus verniciflua* Stokes(乾漆). *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 2001;64:357-71.
 11. Lee JC, Kim JJ, Jang YS. Ethanol-eluted Extract of *Rhus verniciflua* Stokes Inhibits Cell Growth and Induces Apoptosis in Human Lymphoma Cells. *Journal Biochem Mol Biol* 2003;4:337-43.
 12. Song MS, KIM YS, Lim EM. The Study of Literature Review on *Lacas Sinicia Exsiccate*. *Journal of Oriental Obstetrics ang Gynecology* 2002;15(1):60-76.
 13. Sun SY, Jr Hail N, Lotan R. Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(9):662-72.
 14. Tibbetts MD, Zheng L, Lenardo M.J. The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nat Immunol* 2003;4(5):404-9.
 15. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000;6(5):513-9.
 16. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 1997;3(6):614-20.
 17. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998;94(4):491-501.
 18. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1-16.
 19. Stennicke HR, Salvesen GS. Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta* 1998;1387(1-2):17-31.
 20. Luo J, Manning BD, Cantley LC. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* 2003;4(4):257-62.
 21. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 2009;9(8):550-62.