

A549 폐암세포주에 대한 蘇木 水抽出物の 세포고사 유도효과

문연자 · 남용재¹ · 이광규¹ · 최두호 · 이성원 · 안성훈 · 최민규² · 우원홍*

원광대학교 한의학전문대학원, 1:우석대학교 한의과대학, 2:원광대학교 의과대학

The Water Extract of *Caesalpinia sappan* Induces Apoptosis on Human Lung Cancer Cell Line, A549 cells

Yeun Ja Mun, Yong Jae Nam¹, Kwang Gyu Lee¹, Doo Ho Choi, Sung Won Lee, Seong Hun Ahn, Min Kyu Choi², Won Hong Woo*

Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University,

1: College of Oriental Medicine, Woosuk University, 2: School of Medicine, Wonkwang University

The *Caesalpinia sappan* is widely used in the traditional oriental herbal medicine for anti-inflammatory, antioxidant effects. The effects of water extract of *C. sappan* on the cell viability and induction of apoptosis were investigated in human lung cancer cell line A549. The water extract of *C. sappan* produced apoptotic cell death and DNA fragmentation and nucleus chromatin condensation in A549 cells. The enzyme activity of caspase-3 and protein level of activated caspase-3 were markedly increased in A549 cells treated with the water extract of *C. sappan*. In addition, the extract of *C. sappan* induced cleavage of Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), a known substrate for caspase-3, and dropped in cellular ATP levels. These results suggest that the extract of *C. sappan* exerts anticancer activity by induction of apoptosis via activation of caspase-3, cleavage of PARP protein, and depletion of cellular ATP levels in A549 cells.

Key words : *Caesalpinia sappan*, apoptosis, caspase-3, PARP

서 론

한의학에서 암의 치료는 益氣養血, 養陰生津, 健脾益氣, 補肝益腎, 健脾益腎 등 인체 抗病능력을 증진시키는 扶正培本法과 清熱解毒, 活血化痰, 化痰消癥, 理氣消腫 등 직접 암세포를 살상하는 祛邪法 및 이 두가지 방법을 적절히 배합시킨 扶正祛邪法을 응용하고 있다^{1,4}). 이 중 암환자의 대부분이 공통적으로 脾胃機能의 저하로 인한 消化器 障礙 및 각종 항암제, 韓方 補陰, 補血劑가 포함된 한약의 흡수력에 있어서도 많은 문제점이 제기되고 있어, 임상에선 扶正祛邪 처방 중에서 益氣健脾方을 기본적으로 이용하고 있다. 암은 조직의 과잉적 성장에 의한 질환으로, 정상조직의 일정한 세포 밀도 유지에 중요한 apoptosis 장애가 종양발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{5,7}). Apoptosis는 細胞死滅의 한 형태로서 計劃되어진 細胞死滅 (programmed

cell death)이라 말할 수 있고 세포질의 농축, DNA의 분절을 특징으로 하며 정상발달, 기관형성, 면역기능, 조직의 성장 등에서 세포를 除去하는 기능을 한다⁸⁻¹³). 과거에는 여러 항암제에 의한 細胞死亡이 단순히 유전자 수준에서의 毒性에 의한 것으로 알려져 왔으나, 최근 여러 연구에 의해서 apoptosis에 의한 것으로 알려져, 항암요법에 의한 apoptosis 유도 및 관련 유전자들을 연구하여 궁극적으로는 선택적이고 효과적인 암세포의 死滅을 통해 암치료를 높이는 것을 목적으로하는 많은 연구가 이루어지고 있다¹⁴⁻¹⁷). 蘇木은 豆科에 속한 落葉灌木이나 小喬木인 蘇方木의 心材를 말하는 것으로 行血祛瘀와 消腫止痛의 效能이 있어 產後腹痛, 經閉, 跌打損傷 등을 치료한다 하였으며¹⁸), 藥理作用으로는 抗菌作用, 中樞抑制作用, 血管收縮作用이 있으며¹⁹) 항산화 효과와 胃癌세포주에 대한 세포독성 효과 및 抗炎 효과 등에 관한 연구보고가 있다²⁰⁻²²). 이에 行血祛瘀와 消腫止痛의 效能을 가지는 蘇木抽出物이 암세포에 미치는 효과를 규명하기 위하여 사람의 폐암세포에서 유래된 A549 세포주를 이용하여 항암효과와 apoptosis 유도효과를 조사하였다.

* 교신저자 : 우원홍, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의학전문대학원
E-mail : whwoo@wonkwang.ac.kr Tel : 063-850-6845
· 접수 : 2002/03/29 · 수정 : 2002/05/16 · 채택 : 2002/05/27

재료 및 방법

1. 藥材 및 檢液의 조제

實驗에 使用된 蘇木(Caesalpinia sappan)은 우석대학교 附屬 한방병원에서 구입한 후 精選하여 使用하였으며, 檢液은 蘇木 100g을 물 1 ℓ와 함께 冷却器를 부착한 환저플라스크에서 3시간 동안 끓인 다음 거즈로 濾過하고 3,200 rpm으로 20분간 遠心分離 후 濃縮器(rotary evaporater)로 濃縮한 다음 -70℃의 deep freezer에서 12시간 이상 凍結시키고 동결건조기로 凍結乾燥시키면, 蘇木抽出物 4.0 g을 얻어 試料로 使用하였다.

2. A549 肺癌細胞柱 배양

A549 세포주(한국세포주은행)의 배양은 CO₂ 배양기(37℃, 5%)에서 10% fetal bovine serum이 포함된 RPMI-1640(Gibco BRL, Life Technologies Inc., U.S.A.)배지에서 배양하였으며, 4일 마다 3 ml의 trypsin-EDTA(Gibco BRL, Life Technologies Inc., U.S.A.) 용액을 사용하여 계대배양을 실시하면서 蘇木抽出物을 처리한 뒤 세포의 apoptosis 현상과 이에 연관된 生化學的 實驗을 수행하였다.

3. 細胞 生存率 측정

세포의 생존율은 MTT assay 방법을 이용하여 측정하였다²³⁾. 세포배양판(24-well plate)에 1x10⁵ 씩 세포를 1 ml의 배양액에 넣어 분주한 후, 실험에 필요한 각 농도별 蘇木抽出物을 처리한 다음, MTT를 최종농도 100 µg/ml가 되도록 넣어주었다. 생존율의 판정은 MTT 처리 후 4시간 후에 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 불용성의 formazan을 100 µl의 10% SDS가 포함된 0.01N HCl 용액으로 24시간 동안 37℃, 5% CO₂ 세포 배양기에서 방치하여 녹인 다음, ELISA reader로 540nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

4. DNA추출 및 전기영동

DNA 분절현상을 관찰하기 위하여 Wizard Genomic DNA purification kit(Promega Co. Madison, U.S.A.)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 蘇木抽出物을 처리하고 일정 시간 후에 nuclear lysis buffer를 첨가하여 세포를 파괴한 후 RNase를 37℃에서 5분간 처리하여 RNA를 제거한 후 단백질 침전용 완충용액으로 단백질을 제거하고 isopropanol 침전에 의하여 응축된 DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 진공건조기로 건조하였다. 여기에 TE 완충용액(10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA, pH8.0)를 첨가하여 DNA pellet을 용해한 후 260nm와 280nm의 spectrophotometer 下에서 OD 값을 측정하여 DNA를 정량하였다. DNA 5 µg을 1.2% agrose gel에서 전기영동(50V, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV燈 아래서 DNA 분절을 관찰하였다.

5. Hoechst 染色

Apoptosis과정에서 일어나는 DNA 분절화와 염색질 농축을

관찰하기 위하여 Hoechst 염색을 시행하였다. 蘇木抽出物이 처리된 세포들을 4% formaldehyde 용액에서 고정시킨 후 PBS로 씻어주고 Hoechst 33342(Sigma Chemical Co., St. Louis, NY., U.S.A.) 염색시약을 PBS에 10 µM이 되게 희석하여 10분간 염색한 후 다시 Phosphate-buffered saline (PBS)로 세척하고 형광현미경으로 관찰하였다.

6. Western blotting

배양된 A549세포에 蘇木抽出物을 처리한 후 세포를 24시간과 48시간 후에 포집하여 차가운 Hank's balanced salt 용액(HBSS)으로 2회 세척하였다. 얻은 세포는 RIPA 용액(50mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1µg/ml aprotinin)으로 얼음에서 용해하였다. 용해 세포 부유액에 2X sample buffer와 섞어 100℃에서 3분간 끓인 후, 10% sodium dodesyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 4℃, 30V에서 16시간 동안 transfer한 후 blocking buffer(10% skim milk)로 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. Caspase-3/CPP32(Santacruz Co.) 나 Poly(ADP-ribose) polymerase(PARP, Santacruz Co.) 등에 대한 항체를 Tris-buffered saline (TBS)에 1:1000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응시켰다. 이차항체인 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxydase(TBS로 1:1,000으로 희석, Amersham, England)와 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 ECL kit(Amersham, Germany)를 사용하여 필름에 노출시켜 관찰하였다.

7. Caspase-3 活性度 측정

蘇木抽出物 100 µg/ml를 처리한 후 A549세포를 모아서 3000 rpm에서 5분간 원심분리한 다음 上淸液을 버리고 PBS로 세척하여 다시 上淸液을 버리고, 4℃에서 10분 동안 lysis buffer[1% Triton X-100, 0.32M sucrose, 5mM EDTA, 1mM PMSF, 1µg/ml aprotinin, 1µg/ml leupeptin, 2mM dithiothreitol(DTT), 10mM Tris/HCl, pH 8.0]에서 용해하고 12,000rpm으로 20분간 원심분리 시켰다. 원심분리하여 얻은 上淸液은 Bradford법으로 정량하여 assay buffer(100mM HEPES, pH7.5, 10% sucrose, 0.1% chaps, 1mM PMSF, 1µg/ml aprotinin, 1µg/ml leupeptin, 2mM DTT)에 희석시킨 후, 형광표지된 기질과 37℃에서 30분간 반응시킨 후 fluorometer로 측정하였다. Caspase-3의 활성 측정을 위한 기질로서는 fluorogenic substrate인 7-amino-4-coumarin(AMC)-YVAD(Calbiochem Co, California, U.S.A) 50 µM을 사용하였으며, 이들의 proteolytic cleavage를 측정하여 caspase 활성을 결정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength(380nm)와 emission wavelength(460nm)의 파장으로 測定하였다.

8. ATP 측정

세포 배양액을 3분간 원심분리(1500rpm)한 후 침전물에 1%

Triton X-100을 가해 세포막을 파괴시키고 이어서 6M HClO₄ 용액을 처리하였다. 여기에 0.2M phosphate buffer(pH8.0)와 1N NaOH 용액을 가해 중성 또는 약산성으로 조절한 후 일정량을 취하여 luciferin-luciferase 분석법에 의해 ATP 양을 측정하였다.

9. 통계 처리

본 실험의 결과는 평균과 표준편차로 표시하였고, 각 군간의 차이는 one-way 후 Scheff's test하여 P<0.05 이하의 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 蘇木抽出物の A549 肺癌細胞에 대한 세포독성효과

肺癌 患者로부터 유래된 A549 細胞에 대한 蘇木抽出物の 항종양효과를 MTT assay 方法으로 관찰하였다. 蘇木抽出物の 경우 100 µg/ml 처리 농도에서 24시간 배양 후 대조군에 비해 58%, 48시간 배양 후에는 33%의 세포 생존율을 나타내었고, 200 µg/ml에서는 48시간 배양 후 10%의 세포생존율을 나타내 蘇木抽出物の 농도와 처리 시간에 의존적으로 생존 세포율은 감소되었다(Fig. 1).

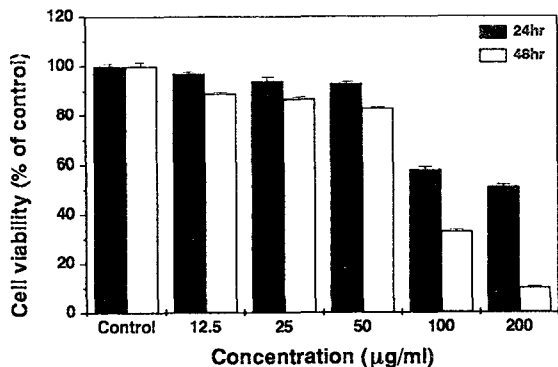


Fig. 1. Effects of *C. sappan* (CS) extract on the viability of A549 cells by MTT assay. Extracts of CS decreased the viability of A549 cells in a dose and time-dependent manner. A549 cells were treated with various concentrations (from 12.5 to 200 µg/ml) of extracts of CS. After 24 hr & 48 hr, the cell viability was measured by MTT assay. The data represented as mean ± S.D. of quadruplicates.

2. 蘇木抽出物에 의한 암세포의 apoptosis 유도효과

蘇木抽出物을 처리한 A549 細胞의 죽음의 기전이 apoptosis에 의한 것인지 혹은 세포고사 과정에 의하여 매개되는지를 확인하기 위해 apoptosis 현상의 특징인 DNA 분절(fragmentation)과 핵 염색질의 농축을 조사하였다. 蘇木抽出物을 100 µg/ml 농도가 되도록 A549 세포주에 24시간 처리하여 DNA를 추출한 후 1.2% agarose gel에 전기영동하여 관찰한 결과, DNA 분절이 확인되었다(Fig. 2). 또한 Hoechst 염색에 의한 세포의 형광현미경에서의 관찰에서도 염색질 농축과 분절화 현상이 관찰되었다(Fig. 3).

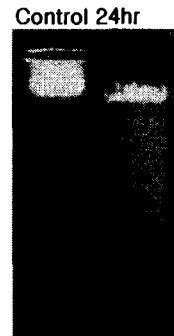


Fig 2. Induction of apoptotic DNA fragmentation by *C. sappan* (CS) extract in A549 cells. Cells were treated with 100 µg/ml of each extract for 24 hr. Then, genomic DNA was isolated and separated on 1.2% agarose gels. The DNA was stained with ethidium bromide and visualized under UV light. Lane 1: DNA obtained from untreated A549 cells. Lane 2: DNA obtained from A549 cells exposed to CS for 24 hr.

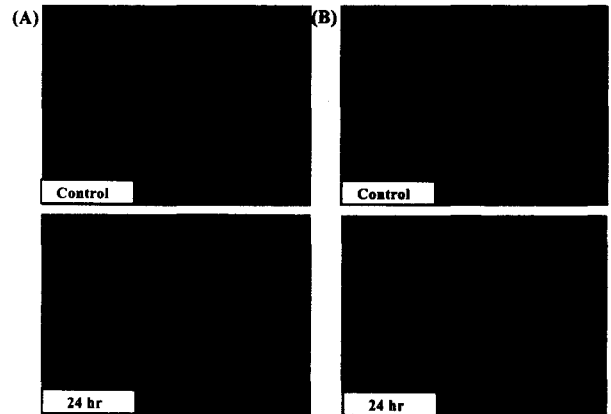


Fig. 3. Effects of *C. sappan* (CS) extract on chromatin condensation and fragmentation in A549 cells. Cells were treated with 100 µg/ml CS extract for 24 hr. (A) Phase-contrast photomicrographs of A549 cells; (B) Fluorescent staining of nuclei in A549 cells by Hoechst 33342. Media control cells were showed normal nuclear morphology with diffused chromatin structure. However, apoptotic cells with fragmented nuclei are seen in the CS extract treated cells for 24 hr.

3. 蘇木抽出物이 Caspase에 미치는 영향

1) 蘇木抽出物에 의한 Caspase 단백질 발현양상

caspase-3(Yama, Apopain)는 cysteine protease로서 세포 내에서 32 kDa인 비활성형의 caspase-3 상태로 존재하는데, 여러 가지 죽음의 신호(death signal)에 의해서 p17(17 kDa)과 p12(12 kDa)의 소단위로 쪼개져 활성을 갖게 된다. 따라서 western blotting을 이용하여 蘇木抽出物 100 µg/ml를 A549 세포주에 처리한 다음, 처리 시간에 따른 활성형 caspase-3과 비활성형 caspase-3 단백질 발현양을 조사하였다. 蘇木抽出物 처리 후 6, 12, 24, 48시간 간격으로 A549 세포로부터 단백질을 추출하여 조사한 결과, 처리 시간에 비례하여 비활성 형태의 caspase-3 (32 kDa) 단백질은 감소하였고, 활성화된 형태의 caspase-3 (17 kDa)의 단백질의 양은 상대적으로 증가하였다(Fig. 4).

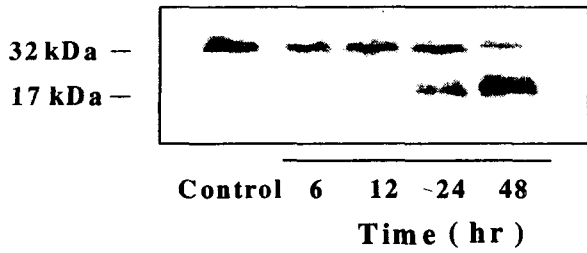


Fig. 4. Effects of *C. sappan* (CS) extract on caspase-3 activation by immunoblotting. Inactive procaspase-3 was detected as a 32 kDa band and activated caspase-3 was detected as a 17 kDa band. The treatment of CS extract (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) increased the amount of activated caspase-3 and decreased the amount of inactivated caspase-3. Activated and inactivated caspase-3 proteases were measured by western blotting with antibody.

2) Caspase 활성화에 미치는 영향

이와 더불어 caspase-3 protease의 형광기질인 Ac-DEVD-7-amino-4-methylcoumarin (AMC)를 이용하여 caspase-3 protease의 효소 활성도를 측정하였다. 蘇木抽出物을 처리한 경우 caspase 활성은 12시간 이후부터 급격히 증가하여, 24시간 후에는 5배정도 증가하였고, 그 이후에는 약간 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 5).

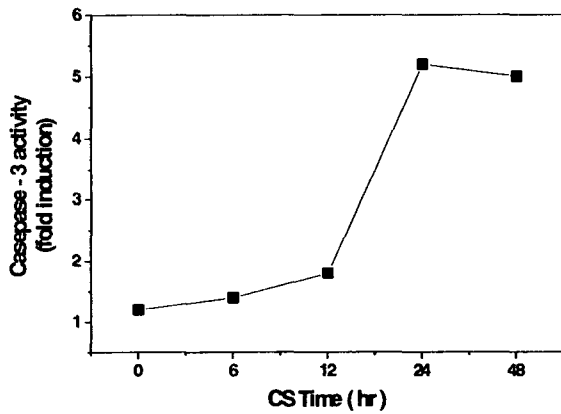


Fig. 5. Effects of *C. sappan* (CS) extract on the enzymatic activity of caspase-3. The treatment of CS extract (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) increased the enzymatic activity of caspase-3 in A549 cells. Lysate from the cells was used to measure the activity of caspase-3 by using fluorogenic peptide acetyl-DEVD-AMC. The data represented as mean \pm S.D. of quadruplicate.

4. Caspase 활성화에 따른 PARP 단백질분해 증가

Caspase-3는 일단 활성화되면 PARP, lamin, MEKK 및 다른 caspase 등 여러 가지 표적 단백질에 작용해서 이들의 기능적 활성화나 비활성화를 유도하고 세포 내의 여러 신호전달활성을 조절한다. 이들 중 PARP는 DNA 수복과정에 관계되는 핵내에 존재하는 효소중의 하나로 최근 116 kDa의 PARP 단백질이 caspase-3에 의해 89 kDa와 24 kDa의 조각들로 쪼개지는 것으로 밝혀졌다. 이에 caspase-3의 활성화에 따른 PARP 단백질 기질의 절단양상을 조사하기 위하여 蘇木抽出物 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 A549 세

포에 0hr, 24hr, 48hr 동안 처리하고 western blotting을 실시하였다. 蘇木抽出物을 처리한 결과 24시간 후 PARP 단백질 절단을 볼 수 있으며, 116 kDa의 PARP 단백질은 시간이 경과함에 따라 감소하였고, 절단된 형태의 89 kDa PARP 단백질은 증가하였다. 이는 蘇木抽出物 처리시 caspase-3 활성화 증가와 유사한 경향으로 절단된 PARP 단백질의 양이 시간에 따라 증가함을 알 수 있었다(Fig. 6A). 한편 세포 내에서 PARP가 과도하게 활성화되는 경우 PARP의 기질인 NAD^+ 가 사용되어 NAD^+ 감소가 초래되고, 이에 따라 세포 내 解糖과정(glycolysis)이 크게 저해되어 ATP생성이 감소하게 된다. 따라서 본 실험에서 소목추출물에 의한 PARP 분해에 따른 ATP 변화양상을 조사하였다. 蘇木抽出物 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 0, 24, 48시간 처리 후 ATP를 측정된 결과 24시간 후 51%의 ATP 감소를 보였으며, 48 시간 후 68%의 ATP감소를 보였다(Fig. 6B).

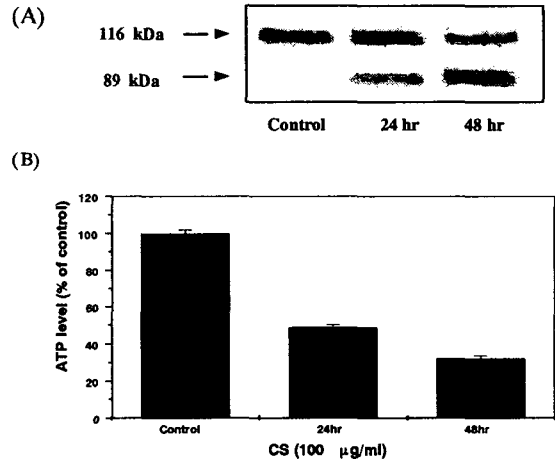


Fig. 6. Induction of PARP cleavage and ATP depletion during apoptosis induced by *C. sappan* (CS) extract. (A) Induction of PARP cleavage. The A549 cells were treated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of CS for 24 hr and 48 hr. Cell lysates were prepared and cleavage of PARP was analyzed by western blot analysis using anti-PARP antibody. (B) Induction of ATP depletion. The amount of ATP was determined as described in Materials and Methods. The data represented as mean \pm S.D. of quadruplicate.

고찰

Apoptosis는 1980년대 후반기부터 중요 관심분야로 세포생물학 영역에 도입되면서 많은 분야에 혁명적인 변화를 가져왔으며 특히 신경계와 면역계 세포의 생성, 분화 및 기능발현 등에 중요하게 작용하고 있음이 밝혀졌다^{24,25}. 그러나 이런 apoptosis의 기전에 장애가 발생하면 암의 발생이나 항암치료에 대한 내성발현, 자가면역질환, 퇴행성질환 및 HIV가 초래된다고 보고되었다^{25,26}. 최근 연구에 의하면 양방에서 흔히 사용되는 많은 항암제들, 특히 cyclophosphamide, adriamycin, etoposide, teniposide, vincristine, taxol 및 bleomycin 등은 다양한 세포주에서 apoptosis를 유도하고 있다고 밝혀졌고, 그 작용기전으로 Fas/Fas ligand system, sphingomyelin/ceramide경로, 즉 발현 초기유전자(early immediate gene)의 발현, apoptosis 관련 단백질 분해효소인 caspase, DNA fragmentation을 일으키는 endonu

-lease 등이 관여하는 것으로 보고되고 있다^{10-14, 24-27}). 따라서 항암제의 효율성은 apoptosis 유도능력과 밀접한 관련성이 있기 때문에 apoptosis의 정확한 생화학적 기전을 밝혀 암치료과정을 도입키 위한 연구가 빠르게 진행되고 있는 실정이다. 蘇木은 豆科에 속한 落葉灌木이나 小喬木인 蘇方木의 心材로서 行血祛瘀와 消腫止痛의 效能이 있어 產後腹痛, 經閉, 跌打損傷 등을 치료한다 하였으며¹⁹) 약리작용으로는 항균작용, 중추억제작용, 심혈관에 대한 작용이 있으며²⁰) 항산화 효과와 위암 세포주에 대한 세포독성 효과, 항염 효과 및 항균 소취가공 등에 관한 보고²⁸)가 있으며, 항암작용으로는 전²⁹) 등이 인체 암세포주에서 세포독성 효과와 topoisomerase I 억제효과를 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 蘇木의 抗癌效果를 규명하고자 사람에서 유래한 폐암세포인 A549 세포주에 蘇木抽出物을 직접투여함으로써 蘇木抽出物의 세포독성 효과와 더불어 apoptosis 유도효과, apoptosis과정에 관여하는 caspase cysteine protease중에서 특히 caspase-3의 활성화와 세포고사에 관련된 단백질의 발현변화 등을 조사하였다. 먼저 蘇木抽出物이 A549 세포주에 직접적인 살상작용을 할 수 있는지에 대하여 조사하기 위하여 蘇木抽出物을 농도별로 각각 24시간과 48시간을 배양한 후 MTT 검색법으로 측정된 결과, 蘇木抽出物 100 μ g/ml 처리 농도에서 24시간 배양 후에는 58%를, 48시간 배양 후에는 33%의 세포 생존율을 나타내었고, 또한 蘇木抽出物 200 μ g/ml 처리의 경우 48시간 배양 후에는 10%의 세포생존율을 나타내어 A549 세포의 고사를 초래하는 세포독성이 있었음을 확인하였다(Fig. 1). Apoptosis는 염색질의 형태학적 변화가 특징적이며 이러한 형태의 염색질 변화는 DNA구조의 생화학적 변화를 동반한다. Apoptosis의 형태적 변화는 우선 세포막 돌출, 세포골격 위축(cytoskeleton collapse), 핵의 염색질 농축(nuclear condensation) 등을 들 수 있으며, 생화학적 변화는 DNA 분절(DNA fragmentation), 세포막지질로부터 ceramide 유리 및 미토콘드리아 막 전하의 손상으로 인한 cytochrome C 유리 현상 후 caspase 단백질분해효소들의 활성화에 의한 세포사 수행 등을 들 수 있다³⁰⁻³³). 화학요법제, 호르몬 및 방사선 등과 같은 여러가지 apoptosis 유발요인에 의해 세포질내 칼슘이온이 증가되고 칼슘 의존성 효소인 endonuclease가 활성화되어 세포내 DNA가 180~200개 염기쌍 이하의 oligonucleosome길이의 DNA fragment로 절단되는데, agarose gel에 전기영동시 oligonucleosomal laddering을 나타내며, 이러한 DNA laddering은 apoptosis의 생화학적 지표로 이용되고 있다^{30,33}). 반면에 괴사로 인한 pyknotic nuclei의 경우는 전기영동시 DNA가 smear형태로 관찰되므로 생화학적으로 괴사(necrosis)와 구분이 가능하다. 본 연구에서도 蘇木抽出物에 의한 DNA 분절 및 염색질 응축을 확인한 결과 24시간부터 ladder형의 DNA분절이 확인되었고(Fig. 2), Hoechst staining을 이용한 형광 현미경관찰결과에서도 24시간부터 chromatin의 condensation 및 fragmentation 현상들이 나타나 蘇木抽出物의 항암효과는 apoptosis의 과정에 의한 세포사멸임을 확인하였다(Fig. 3). 현재까지 알려진 apoptosis 유도 신호전달 기전을 보면, 첫째로 각종 growth factor, hormone, cytokine 등의 결핍 후 caspase의 활성화, 둘째로 TNF, Fas 등 세포막에

존재하는 death receptor 활성화 후 adaptor 분자를 통한 caspase 활성화, 셋째로 DNA 손상 후 p53, ATM kinase 등에 의한 세포사 유도 등이 있다. 이러한 세포사의 세경로에서 세포사를 조절하는 주요 조절인자는 caspase 계열의 단백질분해효소이다^{34,35}). 따라서 본 실험에서 apoptosis를 유발시키는 신호전달기전에서 중요한 기전중 하나인 caspase의 활성화에 대한 蘇木抽出物의 효과를 조사하였다. caspase-3(Yama, Apopain)는 cysteine protease로서 세포 내에서 32 kDa인 비활성형의 caspase-3 상태로 존재하는데, 여러 가지 죽음의 신호(death signal)에 의해서 p17(17 kDa)과 p12(12 kDa)의 소단위로 쪼개져 활성을 갖게 된다^{35,36}). 본 실험에서 蘇木抽出物의 처리시간에 따른 활성화형 caspase-3 단백질 발현양상을 western blotting으로 조사한 결과, 蘇木抽出物 처리 시간에 비례하여 비활성 형태의 caspase-3 (32kDa) 단백질은 감소되었으며, 활성화된 형태의 caspase-3 (17kDa)의 단백질의 양은 상대적으로 증가하였다(Fig. 4A). 또한 caspase-3 protease의 효소 활성을 조사하기 위하여 형광기질인 Ac-DEVD-7-amino-4-methylcoumarin(AMC)를 이용한 caspase-3 활성화도 측정 결과에서도 caspase-3의 활성이 12시간 이후부터 급격히 증가하여 24시간 후에는 5배 정도에 달하였으며, 蘇木抽出物이 caspase-3의 활성을 증가시키는 것을 알 수 있었다 (Fig. 4B). Caspase-3는 PARP, lamin, MEKK 및 다른 caspase 등 여러 가지 표적 단백질에 작용하여 세포내 여러 신호전달활성을 조절하는데 이들 중 PARP는 DNA 수복과정에 관계되는 핵내에 존재하는 효소중의 하나로 최근 116kDa의 PARP 단백질이 caspase-3의 기질로서 활성화된 caspase-3에 의해 89kDa와 24kDa의 조각들로 쪼개지는 것으로 밝혀졌다³⁷). 또한 DNA가 일단 알킬화되면 PARP가 과도하게 활성화되며 이때 NAD⁺가 기질로 사용되어 세포내 NAD⁺가 감소되며, 이에 따라 해당과정(glycolysis)이 크게 저해됨으로써 ATP 감소를 초래하고 아울러 세포내 칼슘이온의 농도 증대와 세포내 가수분해효소들(proteases, phospholipases)의 활성화로 세포가 죽게된다고 보고된 바 있다³⁸⁻⁴⁰). 이에 caspase-3의 활성화에 따른 PARP 단백질 기질의 절단양상을 조사한 결과, 24시간 후에 PARP 단백질 절단을 볼 수 있으며, PARP 단백질(116 kDa)은 시간이 경과함에 따라 caspase-3의 활성화도와 비례하여 PARP 분해단백질(89 kDa)로 나타났다(Fig. 5A). 또한 PARP 단백질의 절단되어진 양이 시간에 따라 증가하였으나 ATP는 감소하여(Fig. 5B), PARP의 절단이 caspase-3에 의해 이루어진다는 apoptosis mechanism과 일치하고 있음을 알 수 있었다.

이상의 연구결과 蘇木抽出物은 암세포에 대한 세포독성이 있으며, 이는 apoptosis에 의한 세포사멸이며, caspase 3-like cysteine protease의 활성화에 의한 PARP 절단과 ATP 감소에 의해 apoptosis가 이루어짐을 알 수 있었다.

결론

蘇木抽出物이 사람의 폐암세포에서 유래된 A549 세포주에 미치는 영향을 조사하기 위하여 MTT 검색법에 의한 세포독성과 apoptosis 유도효과, caspase-3의 활성화도, caspase-3와 PARP 단

백질의 발현 변화 등을 분석하였다. 蘇木抽出物 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리 후 24시간 배양한 A549 세포의 생존율은 50% 정도이었으며, 蘇木抽出物 처리시간과 농도 의존적으로 세포생존율을 감소시켰다. 또한 apoptosis의 특징적인 현상인 DNA 분절화 및 염색질 응축이 관찰되었다. 蘇木抽出物 처리 시간의 경과에 따라 caspase-3 효소의 활성도도 증가되었으며, western blotting 결과 활성화형 caspase-3와 PARP의 절단도 증가하였고, 세포 내의 ATP 는 감소하였다.

이상의 결과, 蘇木抽出物은 A549 폐암 세포주에서 caspase 3-like cysteine protease의 활성화, PARP 단백질의 분해 촉진 및 ATP 감소를 통하여 apoptosis를 유도시킴으로서 항암작용을 나타내는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술 연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (HMP-99-O-01-0003).

참고문헌

1. 郁仁存 : 中醫腫瘤學 上冊. 北京.科學出版社. pp.120-153, 311, 1997.
2. 錢伯文: 運用攻補益治療腫瘤的經驗, 上海中醫藥雜誌, 8: 6-10, 1984
3. 邢雪梅: 抗癌中藥의 生物治療效能研究近況, 한글판 中醫雜誌, 3: 85-90, 1994
4. 문구 외: 암동서의결합치료1 : 원광대학교출판국. pp. 253-303, 383-460. 1999.
5. Allan, D.J., Howell, A., Roberts, S.A., Williams, G.T., Watson, R.J., Coyne, J.D., Clarke, R.B., Laidlaw, I.J., Potten, C.S. Reduction in apoptosis relative to mitosis in histologically normal epithelium accompanies fibrocystic change and carcinoma of the premenopausal human breast. *J. Pathol.*, 167, 25-32, 1992.
6. Wyllie, A.H. Apoptosis (The 1992 Frank Rose Memorial Lecture) *Br. J. Cancer* 67, 205-208, 1993.
7. Williams, G.T. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 65, 1097-1098, 1991.
8. Kerr, J.F., Winterford, C.M., Harmon, V.B. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73, 2013-2026, 1994.
9. Burger, M.M., Harris, C. UICC study group on basic and clinical cancer research: apoptosis in normal and tumor cells. *Int. J. Cancer* 60, 590-592, 1995.
10. Hockenbery, D. Defining apoptosis. *Am J. Pathol.* 146, 16-19, 1995.
11. Stewart, B.W. Mechanisms of apoptosis: intergration of genetic, biochemical, and cellular indicators. *J. Natl Cancer Inst* 86, 1286-1296, 1994.
12. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wid-ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257, 1972.
13. Middleton, G., Reid, L.E., Harmon, B.V. Apoptosis in human thymus in sudden and delayed death. *Pathology* 26, 81-89, 1994.
14. Eastman, A. Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. *Cancer cells* 2, 275-280, 1990
15. Walton, M.I., Whysong, D., O'Connor, P.M., Hockenbery, D., Korsmeyer, S.J., Kohn, K.W. Constitutive expression of human Bcl-2 modulates nitrogen mustard and camptothecin induced apoptosis. *Cancer Res.* 53, 1853-1861, 1993.
16. Barry, M.A., Reynolds, J.E., Eastman, A. Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 cells is associated with intracellular acidification. *Cancer Res.* 53, 2349-2357, 1993.
17. Gorczyca, W., Gong, J., Ardel, B., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z. The cell cycle-related difference in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents. *Cancer Res.* 53, 3186-3192, 1993.
18. 辛民教 : 臨床本草學 서울 永林社 pp. 522,523, 2000.
19. 신문농출판공가. 증약대사전. 일증사. p. 2782, 1995.
20. Namikosi, M., Saitoh, T. Homoisoflavonoids and related compound. IV. Absolute configurations of homoisoflavonoids from caesalpinia sappan L. *Chem. Pharm. Bull.* 35(9), 3579-3602, 1987.
21. Park, K.J., Kim, E.H., Eun, Y.A. Kang, B.J., Sung, H.J. Cytotoxic effect of Korean traditional prescription on the human gastric cancer cell lines, *Kor. J. Pharmacogn.* 28(4), 233-238, 1987.
22. Kim, Y.S., Noh, Y.K., Lee, G.I., Kim, Y.K., Lee, K.S., Min, K.R. Inhibitory effects of herbal medicines on hyaluronidase activity. *Kor. J. Pharmacogn.* 26(3), 265-272, 1995.
23. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; Application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63, 1983.
24. Raff, M.C., Bares, B.A., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishizaki, Y., Jacobson, M.D. Programed cell death and the control of cell survival. *Science*, 262, 695-700, 1993.
25. Thomson, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267, 1456-1462, 1995.
26. Williams, G.T. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell.* 65, 1097-1098, 1991.
27. Mesner, P.W., Budihardjo, I., Kaufmann, S.H. Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv. Pharmacol.* 41, 461-499, 1997.
28. Namikosi, M., Saitoh, T. Homoisoflavonoids and related compound. IV. Absolute configurations of homoisoflavonoids

- from caesalpinia sappan L, Chem. Pharm. Bull. 35(9), 3579-3602, 1987.
29. 전원경, 박갑주, 김수영, 마진열, 성현제. 소목 추출물의 세포 독성 효과와 Topoisomerase I 억제 활성에 관한 연구. 생약 학회지, 30(1), 1-6, 1999
 30. Nagata, S. Apoptotic DNA fragmentation. Exp Cell Res. 256(1), 12-18, 2000.
 31. Wyllie, A.H., Kerr, J.F., Currie, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol. 68, 251-306, 1980
 32. Kerschmann, R.L., Woda, B.A., Majno, G. The fusion of tumor cells with host cells; reflections on an ovarian tumor. Perspect Biol Med. 38(3), 467-475, 1995.
 33. Buja, L.M., Eigenbrodt, M.L., Eigenbrodt, E.H. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. Arch Pathol Lab Med. 117(12), 1208-1214, 1993.
 34. Dragovich, T., Rudin, C.M., Thompson, C.B. Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. Oncogene. 17(25), 3207-3213, 1998.
 35. Klaus, S.O., Davide, F. Apoptosis signal by death receptors. Eur. J. Biochem. 254, 439-459, 1998.
 36. Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. DEF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during Apoptosis. Cell, 89, 175-184, 1997.
 37. Alexander, B. Poly(ADP-ribosyl)ation, a DNA damage-driven protein modification and regulator of genomic instability. Cancer Letters. 163, 1-5, 2001.
 38. Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., Earnshaw, W.C. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. Nature. 371(6495), 346-347, 1994.
 39. Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S., Dixit, V.M. Nucleotide, Protein Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. Cell. 81(5), 801-809, 1995.
 40. Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. Nature. 376(6535), 37-43, 1995.