인체 전립선 암세포에서 참나무 목초액에 의한 세포주기 S기 arrest 유발에 관한 연구

박 철 · 이원호[1] · 최병태[2] · 김경철[3] · 이용태[3] · 최영현*

동의대학교 한의과대학 생화학교실, 1 : 부산대학교 자연과학대학 생물학과, 2 : 동의대학교 해부학교실, 3 : 생리학교실 및 한의학연구소,

Induction of S phase Arrest of the Cell Cycle by Oak Smoke Flavoring (Holyessing) in Human Prostate Carcinoma Cells

Cheol Park, Won Ho Lee[1], Byung Tae Choi[2], Kyoung Chul Kim[3], Yong Tae Lee[3], Yung Hyun Choi*

Department of Biochemistry, College of Oriental Medicine, Dongeui University,
1 : Department of Biology, College of Natural Sciences, Busan National University,
2 : Department of Anatomy, 3 : Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Dongeui University and Research Institute of Oriental Medicine

We examined the effects of Oak Smoke Flavoring (OSF, Holyessing) on the cell proliferation of DU145 and PC3 human prostate carcinoma cell line. OSF treatment resulted in a concentration-dependent inhibition of the cell viability in both DU145 and PC3 cell lines. The anti-proliferative effects by OSF treatment in DU145 and PC3 cells were associated with morphological changes such as membrane shrinking and cell rounding up. DNA flow cytometric histograms showed that population of S phase of the cell cycle was increased by OSF treatment in a dose-dependent manner. Western blot analysis revealed that cyclin B1 and cdc2 proteins were reduced by OSF treatment in DU145 cells, whereas cyclin A was markedly inhibited in PC3 cells. Furthermore, we observed an increase of Cdk inhibitor p16 and p27 protein, and an inhibition of phosphorylation of pRB by OSF treatment in a dose-dependent manner. The present results indicated that OSF-induced inhibition of human prostate carcinoma cell proliferation is associated with the blockage of S phase progression.

Key words : Oak Smoke Flavoring, prostate cancer cells, S arrest, cyclin, cdk

서 론

목초액(smoke flavoring or wood vinegar)은 목탄의 제조 시 발생하는 증기를 냉각 응축시킨 액체로서 약 200여종의 유기화합물이 10-20% 정도를 차지하며, 나머지 대부분은 물로 구성되어있다[1-4]. 목초액은 살균 효과가 뛰어나 오래 전부터 농업에서 잡초 방제, 토양 개량, 종자 발아 촉진, 병충해 방지, 식물생장 촉진, 낙과 방지, 결실증가, 당도향상 등을 위하여 천연농약으로 사용되어져 왔다[5,6]. 또한 목초액은 민간요법으로 항균, 살균, 식품의 보존성 향상, 항산화 효과, 향취개선 등의 목적으로 사용되어지고 있다[7-10]. 최근 목초액은 부분적 유해성의 확인에도 불구하고[11,12] 식품첨가물로서 사용이 허가되어 이를 정제하여 민간요법으로도 다양하게 사용되어지고 있다. 그러나 이러한 목초액 효능의 과학적 검증은 제대로 이루어진 바 없기 때문에 아직 보편적으로는 사용되지 못하고 있으며, 특히 어떤 성분들에 의한 부분적 생물학적 작용을 가지는지에 관하여서는 거의 조사된 바 없다. 최근의 연구결과에 의하면 목초액은 혈액의 림파구 및 혈소판의 증가에 의한 면역증강작용 가능성과 위암 및 대장암세포의 증식 억제 효과가 있는 것으로 보고된 바 있으며[13], 또한 강력한 세포 부착 저지 작용, 부분적 암세포 전이 억제 및 항종양 효과 등이 있는 것으로 보고되어 항암 작용 가능성이 제기되어[4], 이에 관한 분자생물학적 기전 해석의 필요성이 대두되었다. 따라서 본 연구실에서는 목초액의 항암작용의 가능성에 기초를 두고 인체 암세포의

* 교신저자 : 최영현, 부산광역시 부산진구 양정동, 동의대학교 한의과대학
· E-mail : choiyh@dongeui.ac.kr · Tel : 051-850-8649
· 접수 : 2003/08/02 · 수정 : 2003/08/30 · 채택 : 2003/10/08

성장에 미치는 목초액의 영향을 조사하였으며 그에 관여하는 기전해석을 시도하였다. 선행 연구에 의하면 인체 전립선 암세포에서 참나무 목초액의 처리에 따라 나타난 암세포의 성장억제는 Bax의 발현 증가 및 Bcl-2의 발현 감소에 의한 apoptosis의 유발과 관련이 있었다[14]. 대다수의 항암제 처리에 의한 암세포의 apoptosis 유발은 세포주기 선택적 교란 현상과 밀접한 상관성을 지니므로, 본 연구에서는 암세포의 증식 억제와 연관된 세포주기 인자들의 발현에 미치는 참나무 목초액의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 암세포주 및 목초액의 처리

실험에 사용한 DU145 및 PC-3 전립선 암세포(prostate carcinoma cell)는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 분주 받았으며, 선행연구 방법에 준하여 배양하였으며[14], 참나무 목초액의 처리를 위하여 세포를 0.05% trypsin-EDTA를 이용하여 세포배양용 페트리 접시로부터 부유시킨 다음 새로운 세포배양용 페트리 접시에 6×10^5 개/㎖ 정도로 분주하여 24시간동안 안정화시킨 후 목초액을 배지에 적정농도로 희석하여 처리하였다.

2. Hematocytometer를 이용한 세포 생존률의 측정

세포배양용 6 well plate에 폐암세포를 2×10^4 개/㎖ 정도를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 목초액을 배지에 희석하여 처리한 후 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 0.05% trypsin-EDTA 0.5 ㎖를 처리하여 세포를 부유시킨 후 phosphate-buffered saline (PBS) 0.5 ㎖을 가하여 세포를 모은 다음 세포 부유액과 0.5% trypan blue (Gibco BRL)를 동량으로 섞어 2분간 처리하였다. Pasteur pippette의 모세관 현상을 이용하여 세포를 hematocytometer에 옮긴 후 위상차 현미경을 이용하여 살아있는 세포의 수를 측정하였다. 이에 따른 결과는 Sigma Plot 4.0 프로그램(SPSS Ins.)을 사용하여 분석하였다.

3. DNA flow cytometry에 의한 세포주기 분석

정상 및 참나무 목초액이 들어 있는 배지에서 자란 암세포를 PBS를 첨가하여 충분히 씻은 다음 원심분리를 한 후 상층액을 버리고 남은 세포에 0.5 ㎖의 PBS로 잘 부유시키고, 차가운 ethanol 0.5 ㎖을 첨가하여 4℃에서 한시간 동안 고정시킨 후 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DNA intercalating dye인 *propidium iodide* (PI, concentration, 50 ㎍/㎖; Sigma)와 10 kunit의 RNase (Sigma)를 처리하여 암실에서 1시간 동안 4℃에서 염색하였다. PBS로 두 번 씻어낸 후, nylon mesh를 이용하여 세포덩어리를 하나씩으로 떼어내고 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 ModiFit LT (Becton Dickinson) 프로그램을 사용하여 분석하였다[15,16].

4. SDS-polyacrylamide 전기영동 및 Western blot analysis

선행방법[17]에 준하여 정상 및 참나무 목초액이 처리된 배지에서 배양한 세포들을 lysis buffer로 용해한 후, 고속원심분리로 세포 내 잔사물을 분리시킨 다음 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)를 이용하여 상온에서 2시간 정도 incubation하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하였다. 1차 항체(PBS-T로 1:500 또는 1:1000으로 희석하여 사용)를 처리하여 항원 항체 반응을 일으킨 후, PBS-T로 세척하고 처리된 1차 항체에 맞는 2차 항체(PBS-T로 1:1500으로 희석하여 사용)를 처리한 다음 Enhanced ChemiLuminoesence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시켜 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 발현 양상을 분석하였다. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며, 이차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-mouse immunoglobulin 및 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin은 Amersham Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다.

5. RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction) 분석

정상 및 목초액이 희석된 배지에서 자란 암세포를 대상으로 RNAzol B (TEL-TEST, INC., Texas, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다.

Table 1. Gene-specific primers for RT-PCR

Gene name		Sequence
cyclin A	Sence	5'-TCC-AAG-AGG-ACC-AGG-AGA-ATA-TCA-3'
	Antisence	5'-TCC-TCA-TGG-TAG-TCT-GGT-ACT-TCA-3'
cyclin B1	Sence	5'-AAG-AGC-TTT-AAA-CTT-TGG-TCT-GGG-3'
	Antisence	5'-CTT-TGT-AAG-TCC-TTG-ATT-TAC-CAT-G-3'
cyclin D1	Sence	5'-TGG-ATG-CTG-GAG-GTC-TGC-GAG-GAA-3'
	Antisence	5'-GGC-TTC-GAT-CTG-CTC-CTG-GCA-GGC-3'
cyclin E	Sence	5'-AGT-TCT-CGG-CTC-GCT-CCA-GGA-AGA-3'
	Antisence	5'-TCT-TGT-GTC-GCC-ATA-TAC-CGG-TCA-3'
cdc2	Sence	5'-GGG-GAT-TCA-GAA-ATT-GAT-CA-3'
	Antisence	5'-TGT-CAG-AAA-GCT-ACA-TCT-TC-3'
cdk2	Sence	5'-GCT-TTC-TGC-CAT-TCT-CAT-CG-3'
	Antisence	5'-GTC-CCC-AGA-GTC-CGA-AAG-AT-3'
cdk6	Sence	5'-CGA-ATG-CGT-GGC-GGA-GAT-C-3'
	Antisence	5'-CCA-CTG-AGG-TTA-GAG-CCA-TC-3'
p53	Sence	5'-GCT-CTG-ACT-GTA-CCA-CCA-TCC-3'
	Antisence	5'-CTC-TCG-GAA-CAT-CTC-GAA-GCG-3'
p27	Sence	5'-AAG-CAC-TGC-CGG-GAT-ATG-GA-3'
	Antisence	5'-AAC-CCA-GCC-TGA-TTG-TCT-GAC-3'
p21	Sence	5'-CTC-AGA-GGA-GGC-GCC-ATG-3'
	Antisence	5'-GGG-CGG-ATT-AGG-GCT-TCC-3'
p16	Sence	5'-CGG-AAG-GTC-CCT-CAG-ACA-TC-3'
	Antisence	5'-TCA-TGA-AGT-CGA-CAG-CTT-CCG-3'
GAPDH	Sence	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	Antisence	5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

분리된 RNA를 정량 후, Choi[15]의 방법에 준하여 oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase를 이용하여 2 ㎍의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 사용하여

Table 1에 나열된 유전자를 중심으로 PCR 방법으로 증폭하였다. 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 포함하여 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)을 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 암세포의 증식에 미치는 목초액의 영향

준비된 목초액 시료 (OSF)를 실험재료 및 방법에서 서술한 것처럼 48시간 동안 처리한 후, 살아있는 세포의 수를 계수하여 목초액이 처리되지 않은 대조군의 세포 수와 비교한 결과는 Fig. 1과 같다. Fig. 1에 나타낸 바와 같이 목초액 처리농도의 증가에 따라 실험에 사용된 두 가지 인체 전립선 암세포의 생존율은 처리된 목초액의 농도 의존적으로 감소하는 것을 알 수 있었다. 즉 0.2% 농도의 목초액 처리 48시간 후 생존율은 대조군에 비하여 약 70% 전후였으며, 0.4% 처리군의 경우 35% 이하로 감소되어 0.6% 처리군에서는 20%를 넘지 못하였다. 결과에서 알 수 있듯이 두 세포 모두에서 목초액 처리에 따른 생존율의 경향성은 거의 유사하였으며, 본 실험에 사용된 DU145 세포주는 종양억제 유전자 p53이 돌연변이형이며, PC-3는 p53이 null type인 점을 미루어 p53의 유전자 형 차이에 따른[18] 목초액의 감수성 차이는 크게 없는 것으로 사료된다. 또한 이러한 결과는 선행 연구에서 보고한 MTT assay에 의한 결과와도 매우 유사하였으며, 이러한 목초액 처리에 따른 전립선 암세포의 증식억제는 apoptosis 유발과 연관성이 있음을 알 수 있었다[14].

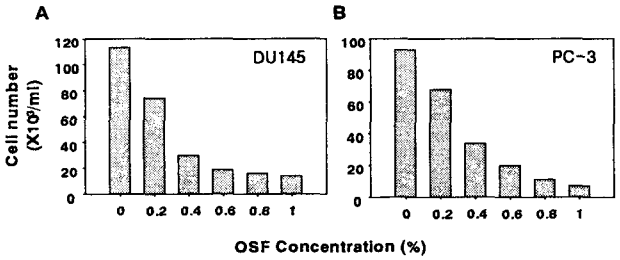

Fig. 1. Inhibition of the cell viability by Oak Smoke Flavoring (OSF, Holyessing) treatment in DU145 and PC-3 human prostate carcinoma cells. DU145 (A) and PC-3 (B) cells were seeded at an initial density of 6×10^5/ml, incubated for 24 h, and treated with OSF at different concentrations. The viable cells were counted after 48 h OSF treatment. Results are expressed as percentage of the untreated control +/- SD obtained from three separate experiments.

2. 목초액 처리가 암세포의 세포주기 분포에 미치는 영향

다음은 목초액의 처리에 의한 전립선 암세포의 증식 억제와 연관된 세포주기 조절인자의 발현 변화를 조사하여 목초액에 의한 암세포 증식 억제기전을 검토하기 위하여 목초액에 의한 암세포의 증식억제가 세포주기의 특정시기와 연관성을 가지는지를 조사하였다. 이를 위하여 목초액이 함유된 배지에서 48시간 동안 배양된 세포를 대상으로 핵 내 DNA의 양을 상대적으로 비교하여 세포주기 각각에 분포된 세포의 수를 DNA flow cytometry를 이용하여 분석하였다. Table 2에 나타낸 바와 같이 목초액이 함유되지 않은 정상 배지에서 자란 DU145 세포의 경우 G1기가 약 50.9%를 차지하고 있었으며, S기와 G2/M기에 속하는 세포가 각각 37.4% 및 11.7% 정도였다. 그리고 PC-3 세포의 경우는 각각 42.8%, 39.9% 및 17.3%였다. 그러나 0.4%의 목초액이 함유된 배지에서 48시간 배양된 DU145 세포의 경우 G1기가 44.3%로 감소되었으며, S기와 G2/M기가 약 43.0% 및 12.7%로 나타났다. 또한 0.6% 농도에서 자란 DU145 세포의 경우는 G1기에 해당하는 세포의 분포가 17.9%로 매우 감소되었으며 상대적으로 S기에 속하는 세포의 수가 74.2%로 증가하였으며, G2/M기에 해당되는 세포의 빈도는 8.0% 정도로 나타났다. 이러한 목초액 처리에 따른 G1기 세포군의 감소와 S기 세포의 빈도 증가 현상은 Table 2에서 알 수 있듯이 PC-3 세포주에서도 유사하게 관찰되었음을 알 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 보면 목초액의 처리에 의한 암세포의 성장억제 및 apoptosis의 유발은 세포주기의 S기에서 G2/M기로 전이가 억제되는 S arrest 현상과 연관성이 있는 것으로 사료된다.

Table 2. Fractions of each cell cycle phase of DU145 and PC-3 human prostate carcinoma cell lines cultured in the presence or absence of various concentration of OSF for 48 h

Cell line	OSF (%)	% of cells		
		G1	S	G2/M
DU145	0	50.9	37.4	11.7
	0.1	53.8	34.7	11.5
	0.2	56.1	35.4	8.6
	0.4	44.3	43.0	12.7
	0.6	17.9	74.2	8.0
PC3	0	42.8	39.9	17.3
	0.1	42.1	39.5	18.5
	0.2	42.1	37.2	20.6
	0.4	34.8	35.6	29.6
	0.6	26.6	51.3	22.1

3. Cyclins의 발현에 미치는 목초액의 영향

목초액의 처리에 의한 S기 특이적인 세포주기 교란과 연관된 세포주기 조절인자들의 작용을 조사하기 위하여 목초액이 희석된 배지에서 배양된 전립선 암세포들을 대상으로 현재까지 밝혀진 cyclins 중에서 특히 세포주기 checkpoint 관점에서 중요한 cyclin들의 단백질 및 mRNA의 발현 정도를 Western blotting 및 RT-PCR법으로 조사하였다(Fig. 2).

본 연구에서 조사된 cyclion 중, cyclin D는 세포가 G1기로 접어들면서 발현이 증가되어지기 시작하여 Cdk4 및 Cdk6와 복합체를 형성하면서 G1기 조절에 관여하며[19,20], cyclin E는 Cdk2와 복합체를 형성하면서 세포주기상 G1기에서 S기로의 전이에 중요한 역할을 담당한다[20,21]. 그리고 cyclin A는 세포주기의 G1 후기에 발현을 시작하여 S기와 G2기를 거치는 발현이 증가되며 cyclin B1은 G2기에서 M기로의 전이를 Cdk2 및 Cdc2의 kinase 활성 변화를 통하여 조절한다[22-24]. Fig. 2에 나타낸 바와 같이 cyclin D1 단백질의 발현은 두 세포주 모두에서 큰 변화가 없었으나, PC-3 세포에서 전사 수준이 강하게 억제되었다. 그리고

cyclin A의 경우 PC-3에서 단백질 수준이 다소 감소되었으며, cyclin E는 단백질 및 mRNA 수준에서의 변화를 두 세포주 모두에서 관찰할 수 없었다 그러나 cyclin B1의 경우 DU145 세포주에서 mRNA 수준의 발현 변화 없이 단백질의 발현이 목초액 처리 농도 의존적으로 감소되었다. 즉 동일한 조건에서 유사한 세포증식 억제 효과를 보인 두 전립선 암세포였지만 목초액 처리에 의한 세포주기 양성 조절인자의 발현 조절에는 세포주 특이적인 흥미로운 결과를 보였음을 알 수 있었다.

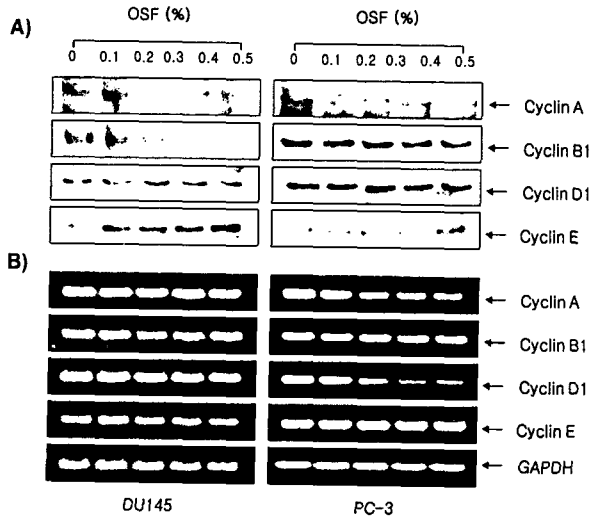

Fig. 2. Effects of OSF treatment on the levels of cyclins in DU145 and PC-3 human prostate carcinoma cells. (A) Cells were incubated with OSF for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. (B) Cells were incubated with MNNG for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using specific primers described in Materials and Methods. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

4. Cdks의 발현에 미치는 목초액의 영향

다양한 cyclins와의 결합을 통해 세포의 증식을 활성화할 수 있으면서 그의 inhibitor에 의해 활성화가 억제되는 세포주기 순환에서 중요한 역할을 수행하는 Cdks의 발현에 미치는 목초액의 영향을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 결과에서 알 수 있듯이 목초액 처리에 의하여 조사된 4가지 종류의 Cdks의 mRNA 수준은 DU145 및 PC-3 세포주 모두에서 변함이 없었다. 그리고 단백질 발현의 경우 거의 모두에서 목초액의 처리에 따른 차이점을 발견할 수 없었으나 DU145 세포주에서 Cdc2 발현만이 최고 농도의 목초액 처리군에서 다소 감소되는 경향을 관찰할 수 있었다. 이러한 현상은 DU145 세포에서 목초액의 처리에 의하여cyclin B1의 발현이 유의적으로 감소되었다는 점과 상관성이 있는 것으로 사료된다.

이상의 결과에서 DU145 세포주의 경우 목초액의 처리에 의하여 G2/M기의 전이에 중요한 역할을 하는 cyclin B1 및 Cdc2의 발현이 감소되었으므로, DU145 세포주에서 목초액 처리에 의한 세포주기 S기 특이적인 성장억제 효과는 cyclin B1/Cdc2 kinase 활성의 직접적인 감소와 연관성이 있었음을 알 수 있었다.

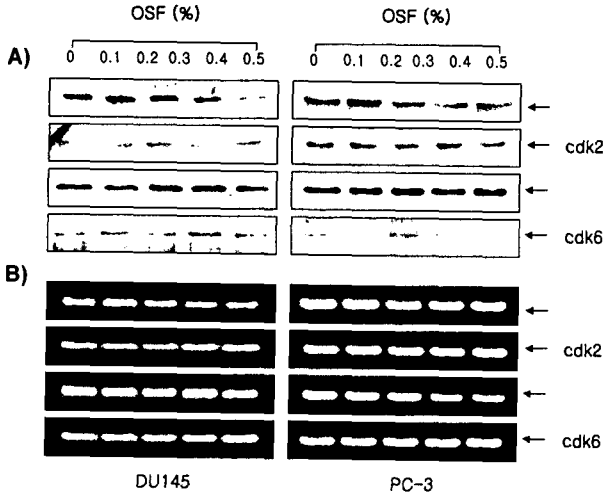

Fig. 3. Effects of OSF treatment on the levels of Cdks in DU145 and PC-3 human prostate carcinoma cells. (A) Cells were incubated with OSF for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. (B) Cells were incubated with MNNG for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using specific primers described in Materials and Methods.

5. Cdk inhibitors 및 pRB의 발현에 미치는 목초액의 영향

다음은 목초액의 처리에 의한 암세포의 증식억제가 세포주기의 음성 조절인자인 Cdk inhibitor의 발현과 상관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 현재까지 알려진 Cdk inhibitor 중 가장 많은 연구가 이루어졌으며, G1기에서 S기로 전이에 중요한 역할을 하는[22-24] p16, p21 및 p27의 발현을 Western blotting 및 RT-PCR법으로 조사하였다. Fig. 4의 결과에서 알 수 있듯이 DU145 세포주에 조사된 3가지의 Cdk inhibitor 중 p16 및 p27의 발현이 mRNA 및 단백질 수준 모두에서 목초액 처리 농도 의존적으로 발현이 증가되었으나 p21의 경우 mRNA 및 단백질 수준 모두에서 큰 변화를 관찰할 수는 없었다.

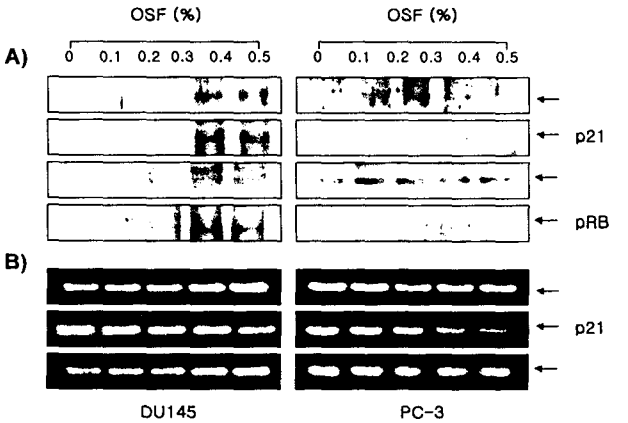

Fig. 4. Effects of OSF treatment on the levels of Cdk inhibitor and pRB expression in DU145 and PC-3 human prostate carcinoma cells. (A) Cells were incubated with OSF for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 12 or 8% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. (B) Cells were incubated with MNNG for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using specific primers described in Materials and Methods.

그러나 PC-3 세포주의 경우 조사된 3가지 Cdk inhibitor 모두에서 뚜렷한 발현의 증가 없이 오히려 p21의 경우 mRNA 수준이 감소되는 경향성을 보여 주었다. 한편 pRB는 D-type cyclins에 의하여 인산화가 조절되며 이로 인한 G1/S 전이 및 DNA 합성 기전을 조절하는 유전자의 중요한 조절인자인 E2Fs의 활성을 조절한다[19,25,26]. pRB 단백질의 인산화 변화에 미치는 목초액의 영향을 조사해 본 결과 DU145 및 PC-3 세포주 모두에서 목초액 처리 농도의 증가에 따라 목초액이 처리되지 않은 정상배지에서 배양된 세포군에 비하여 인산화가 되지 않은 아래쪽의 band 발현이 상대적으로 점차 많아짐을 알 수 있다. 즉 목초액 처리에 의한 pRB의 인산화가 억제되었음을 의미하고 이는 결국 전사조절인자의 작용을 억제하였을 것으로 생각된다.

결 론

인체 전립선 암세포주인 DU145 및 PC-3 세포의 증식에 미치는 참나무 목초액의 영향을 조사하였다. 참나무 목초액이 함유된 배지에서 자란 두 종류의 암세포들은 목초액 농도 의존적으로 증식이 억제되었으며, 이러한 세포증식 억제현상은 membrane shrinking 및 rounding up 현상과도 상관성이 있었다. DNA flow cytometry에 의한 세포주기 분포도 분석에서 목초액 처리농도가 증가할수록 세포주기 G1기에 해당되는 세포의 수가 감소되었으며, 상대적으로 S기에 속하는 세포의 분포도가 두 세포주 모두에서 증가되었다. Western blot analysis 결과 DU145 세포에서 cyclin B1 및 cdc2 단백질 발현이 감소된 반면, PC-3 세포에서는 cyclin A 단백질 발현이 다소 감소되었다. 또한 Cdk inhibitor인 p16 및 p27 protein 단백질의 증가와 pRB 단백질의 인산화 억제 현상을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과에서 목초액 처리에 의한 인체 전립선 암세포의 증식억제는 세포주기 S기 진행의 교란에 의한 apoptosis 유발과 연관성이 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2003년 동의대학교 교내연구비 지원에 의하여 이루어졌음.

참고문헌

1. Yatagai, M., Unrinine, G. By-products of wood carbonization V. Germination and growth regulation effects of wood vinegar components and their homologs on plant seeds. Acids and neutrals. Mokuzai Gakkaishi 35, 564-571, 1989.
2. Guillen, M.D., Manzanos, M.J., Ibargoitia, M.L. Carbohydrate and nitrogenated compounds in liquid smoke flavorings. J. Agric. Food Chem. 49, 2395-2403, 2000.
3. Guillen, M.D., Sopelana, P., Partearroyo, M.A. Polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavorings obtained from different types of wood. Effect of storage in polyethylene flasks on their concentrations. J. Agric. Food Chem. 48, 5083-5087, 2000.
4. Kim, D.H., Choi, J.S., Choo, J.H., Song, H.C., Lee, E.O., Kang, I.C., Choi, J.W., Kim, S.H. Study on immunomodulatory and antitumor activity of holyessing, Kor. J. Oriental Med. Physiol. Pathol. 15, 881-886, 2001.
5. Pszczola, D.E. Tour highlights production and uses of smoke-based flavors, Food Technol. 49, 70-74, 1995.
6. Kim, Y.H., Kim, S.K., Kim, K.S., Lee, Y.H. Composition of constituents of commercial wood vinegar liquor in Korea, J. Kor. Sco. Agar. Chem. Biotechnol. 44, 262-268, 2001.
7. Chang, H.Y., Kang, A.S., Cha, D.Y., Sung, J.M., Morinaga, T. Effects of wood vinegar on the mycelial growth promotion of some edible mushrooms and Trichoderma pathogen inhibition. RDA J. Agri. Sci. 37, 766-771, 1995.
8. Park, W.M., Choi, W.H., Yoo, I.J., Ji, J.R., Chung, D.H. Effects of pyroligeous liquor and preservativess on the quality of fermented sausages, Kor. J. Food Sci. Ani. Resour. 18, 75-80, 1998.
9. Seo, K.L., Ha, K.J., Bae, Y.I., Jang, J.K., Shim, K.H. Antimicrobial activities of Oak Smoke Flavoring, Kor. J. Postharvest. Sci. Technol. 7, 337-341, 2000.
10. Seong, K.S., Rho, J.H., Han, C.K., Kim, Y.B., Lee, H.B., Jeong, J.H., Maeng, W.J. Effect of addition of activated carbon absorbing pyroligneous acid to layer feed on the physiocochemical properties of egg yolk, Kor. J. Food Sci. Ani. Resour. 17, 162-170. 1997.
11. Gaworski, C.L., Heck, J.D., Bennett, M.B., Wenk, M.L. Toxicologic evaluation of flavor ingredients added to cigarette tobacco: skin painting bioassay of cigarette smoke condensate in SENCAR mice. Toxicology 139, 1-17, 1999.
12. Putnam, K.P., Bombick, D.W., Avalos, J.T., Doolittle, D.J. Comparison of the cytotoxic and mutagenic potential of liquid smoke food flavourings, cigarette smoke condensate and wood smoke condensate. Food Chem. Toxicol. 37, 1113-1118, 1999.
13. Kim, H.S., Kim, S.H. Pharmaceutical and clinical effects of holyessing and its research strategy, Thesis Collection, Res. Institute Korean Medicine, 7, 831-835, 1998.
14. Park, C., Choi, Y.H., Lee, W.H., Choi, B.T., Lee, Y.T., Kim, K.C. Up-regulation of bax and down-regulation of Bcl-2 in Oak Smoke Flavoring (Holyessing)-induced apoptosis of human prostate carcinoma cells. Korean J. Oriental Physiol. & Pathol. 17, 85-90, 2003.
15. Choi, Y.H. Research technics for the cell cycle study. Exp. Mol. Med. 33, S15-36, 2001.
16. Choi, Y.H., Lee, W.H., Park, K.Y., Zhang, L.

p53-independent induction of p21 (WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells. Jpn. J. Cancer Res. 91, 164-173, 2000.

17. Choi, Y.H., Lee, S.J., Nguyen, P., Jang, J.S., Lee, J., Wu, M.L., Takano, E., Maki, M., Henkart, P.A., Trepel, J.B. Regulation of cyclin D1 by calpain protease. J. Biol. Chem. 272, 28479-28484, 1997.
18. van Bokhoven, A., Varella-Garcia, M., Korch, C., Hessels, D., Miller, G.J. Widely used prostate carcinoma cell lines share common origins. Prostate 47, 36-51, 2001.
19. Meyerson, M., Harlow, E. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. Mol. Cell. Biol. 14, 2077-2086, 1994.
20. Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J.W., Elledge, S., Nishimoto, T., Morgan, D.O., Franza, B.R., Roberts, J.M. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. Science 257, 1689-1694, 1992.
21. Ohtsubo, M., Roberts, J.M. Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. Science 259, 1908-1912, 1993.
22. Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A., Lamb, N.J. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. Cell 67, 1169-1179, 1991.
23. Guadagno, T.M., Ohtsubo, M., Roberts, J.M., Assoian, R.K. A link between cyclin A expression and adhesion-dependent cell cycle progression. Science 262, 1572-1575, 1993.
24. Walker, D.H., Maller, J.L. Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication. Nature 354, 314-317, 1991.
25. Weinberg, R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell 81, 323-330, 1995.
26. Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C.J., Kato, J.Y. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. Mol. Cell. Biol. 14, 2066-2076, 1994.