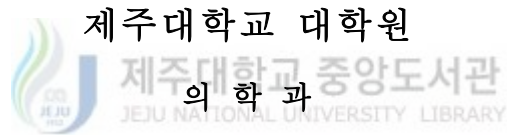


석사학위논문

고리매(*Scytosiphon lomentaria*)의
혈액 종양세포 Apoptosis 유도 효과



김 상 철

2003년 12월

고리매 (*Scytosiphon lomentaria*)의 혈액 종양세포 Apoptosis 유도 효과

지도교수 : 강 희 경

김 상 철

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함

2003년 12월

김상철의 의학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장

유 은 숙



위 원

이 영 재



위 원

강 희 경



제주대학교 대학원

2003년 12월

Induction of The Apoptosis of The
Leukemia Cells by *Scytosiphon*
lomentaria

Sang-Cheol Kim

(Supervised by Professor Hee-Kyoung Kang)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF MEDICINE

DEPARTMENT OF MEDICINE
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2003. 12

ABSTRACT

The present study examined the cytotoxicity of *Scytosiphon lomentaria* using various cancer cell lines. The ethyl acetate (EtOAc) fraction of this alga showed the cytotoxicity to leukemia cells including HL-60. When HL-60 cells were treated with its EtOAc fraction, several apoptotic characteristics as DNA fragmentation, chromatin condensation and increase of the population of sub-G1 hypodiploid cells were observed. Moreover, the EtOAc fraction decreased c-Myc expression in a dose-dependent manner. In order to understand the mechanism of apoptosis induction by *S. lomentaria*, we examined the changes of Bcl-2 and Bax protein expression levels. The EtOAc fraction reduced Bcl-2, an anti-apoptotic protein, but increased Bax, a pro-apoptotic protein in a dose-dependent manner. When we examined the activation of caspase-3, an effector of apoptosis, the expression of active form (19-kDa) of caspase-3 increased and the increase of their activities was demonstrated by the cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase, a substrate of caspase-3, to 85-kDa. The results suggest that the inhibitory effect of *S. lomentaria* on the growth of HL-60 appears to arise from the induction of apoptosis via the down-regulation of Bcl-2 and the activation of caspase.

Keywords: *Scytosiphon lomentaria*, HL-60, apoptosis, c-Myc, Bcl-2, Bax, caspase-3

목 차

A B S T R A C T	I
목 차	II
LIST OF TABLES	IV
LIST OF SCHEME	V
LIST OF FIGURES	VI
I. 서 론	1
1. 연구 배경		
2. 연구 목적		
II. 재료 및 방법	6
1. 시료의 준비		
2. 시료의 추출		
3. 세포배양		
4. Cytotoxicity tests		
5. Analysis for DNA fragmentation		
6. Morphological changes (DAPI stain)		
7. Cell cycle analysis		
8. Western blot analysis		
9. 통계처리		
III. 결 과	10
1. 세포증식저해		
(1) 세포 증식 저해 효과		
(2) 고리매 추출물에 의한 c-Myc 발현 양상의 변화		
2. 고리매의 HL-60 세포 Apoptosis 유도 작용		



- (1) DNA fragmentation 확인
- (2) 핵의 형태학적 변화
- (3) Cell cycle analysis
- (4) Bcl-2/Bax 발현 양상의 변화
- (5) caspase-3 및 caspase-9의 활성화

IV. 교	찰	22
V. 인	용 문 헌	25
VI. 국	문 초 록	30



LIST OF TABLES

Table 1. Inhibitory effect of MeOH extract or solvent fractions of <i>S. lomentaria</i> on the growth of HL-60 cells	13
--	----



LIST OF SCHEME

Scheme 1. Systematic purification by using solvent partitioning from <i>Scytosiphon lomentaria</i>	7
--	---



LIST OF FIGURES

Figure 1. Effect of <i>S. lomentaria</i> on the growth of cancer cells	14
Figure 2. Western blot analysis of c-Myc expression	15
Figure 3. DNA fragmentation by MeOH extract or solvent fractions from <i>S. lomentaria</i> in HL-60 cells	16
Figure 4. The photographs showing cells with highly condensed nuclei stained with DAPI	17
Figure 5. The degree of apoptosis represented as the DNA content measured by flow cytometric analysis	18
Figure 6. Western blot analysis of Bcl-2 and Bax proteins	19
Figure 7. Western blot analysis of caspase-9, caspase-3 and cleavage of PARP	20
Figure 8. Western blot analysis of caspase-3 and cleavage of PARP . . .	21

I 서 론

1. 연구 배경

최근 암 발생률은 산업의 급격한 발달, 지구 생태계 및 식생활의 변화 등으로 과거에 비해 급격히 증가하고 있으나, 아직도 암의 발생기전이 불명확하여 난치성 질병으로 알려져 있다. 현재 사용되고 있는 항암제들은 효소제제나 백신 등의 생물학적 제제, 순수합성 의약품 및 천연물 유래의 의약품 등으로 크게 구분할 수 있는데, 이 중 유전자, 효소, 백신 등을 이용한 항암제는 실용단계에 있는 상태는 아니며 화학요법에 의해 개발된 많은 항암제는 암의 종류에 따라 약리작용과 (Gillman *et al.*, 1986), 독성을 다양하게 나타냈기 때문에 암 치료시 문제점으로 지적되고 있다 (Chung *et al.*, 1987). 또한 항암제는 암세포의 성장을 효과적으로 억제하기도 하지만, 정상 세포에 대하여 독성을 나타내기도 한다. 따라서 많은 학자들은 이 같은 독성의 작용기전을 밝히기 위하여 많은 연구를 수행하고 있다 (Yamazaki *et al.*, 1992; Tompson *et al.*, 1966; Ellem *et al.*, 1968). 특히 근래에는 세포 배양 기술이 급격히 발달함에 따라 각종 세포를 배양한 후 여러 독성물질을 투여함으로써 이들의 세포독성에 대한 기전을 세포 수준에서 규명하려는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 항암제의 부작용을 최소화하고 치료효과를 높이기 위하여 생약 및 천연물을 이용한 항암제의 개발이 지속적으로 시도되고 있다 (John, 1996; Kelloff *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1993; Kast *et al.*, 1990).

지금까지 해조류를 비롯한 해양생물에 대한 연구는 주로 영양학적인 측면에서 수행되었으나, 최근에는 해조류의 생체 기능성 효과에 대한 연구가 이루어지고 있다. 해양생물 유래의 항암물질에 관한 연구로는 이끼벌레류 추출물인 bryostatin 1 (Pettit *et al.*, 1982), 해면 추출물인 halichondrin B (Pettit *et al.*, 1991), 균소 추출물인 dolastatin 10 (Schwartzmann, 2001), 갈조류의 성분인 fucoidin 및 녹조류의 성분인 Ulvan이 보고되고 있다. 제주에는 많은 해양생물이 있으나, 그 성분 및 생리활성에 대한 연구는 미진한 실정이며, 그 항암효과에 대한 연구는 전무하다. 그래서 본 연구에서는 제주 연안 해조류에서의 항암효과를 나타내는 새로운 성분을 찾기 위한 새로운 근거를 마련하고자 하였다.

1-1. Cell death

정상적인 세포는 세포분열에 의하여 세포증식이 이루어지고 일정기간동안 자신에게 주어진 기능을 수행한 후 세포사 (cell death) (Trump *et al.*, 1997)를 일으키는데 이러한 세포사에는 apoptosis (Williams, 1991)와 necrosis(Blagosklony, 2000)의 2가지 형태가 존재하게 된다. Apoptosis는 예정사 (“programmed cell death”)로 요약되는 세포의 자살이며 능동적 세포사로서 세포는 생길 때부터 기능과 생존기간이 정해지고 이 기간동안 기능을 수행하고 계획된 시기에 세포사를 일으킨다. Necrosis는 외상, 영양소결핍 등에 의해 일어나는 수동적 세포사이며 세포의 타살이다.

1-1-1. Apoptosis(“programmed cell death”)

Apoptosis는 불필요해진 세포 또는 원하지 않는 세포를 제거하는 정상적인 생리 과정으로 제거구에 의해 프로그램된 능동적 과정이라고 할 수 있다. 그리고 necrosis와는 형태학적, 생화학적으로 많은 차이점을 나타낸다. Apoptosis의 형태학적 특징으로는 세포의 축소, 세포막으로부터 세포막 융기가 돌출 하는 현상, 세포내용물이 세포막으로 쌓여져 세포로부터 떨어져나온 아포토시스 소포체 형성, 핵 응축과 절편 등이 있으며 apoptotic cell의 제거 과정으로 인하여 많은 염증반응을 동반하는 necrosis와는 달리 염증반응은 나타나지 않는다 (Wyllie, 1980). 생화학적 특징으로는 GTPase 등의 endonuclease, caspase와 같은 protease의 활성화가 나타난다 (Hale *et al.*, 1996; Arends *et al.*, 1990). Apoptosis는 necrosis와는 달리 ATP형태의 에너지를 필요로 하는 에너지 의존형 능동적 과정이다 (Obeid *et al.*, 1998).

1-1-2. Necrosis(“accidental” cell death)

Necrosis는 apoptosis와는 다르게 영양소결핍, 독성이 있는 화학물질에 노출, 기계적인 충격 같은 상황에서 유발되는 수동적 세포사라고 할 수 있다. Necrosis 발생 시에는 세포내로 extracellular ion과 water가 유입되어 세포의 주요한 homeostasis를 깨트려 세포의 능력을 손상시킨다. 또, 세포의 plasma membrane이 붕괴되어 세포질이 포함하고 있는 lysosomal enzyme이 세포외부의 조직으로 분비된다. 그 결과 necrosis가 일어난 cell의 외부 조직은 극심한 염증반응을 받게 된다 (Luster, 1998).

1-2. Apoptosis의 기전

Apoptosis가 진행되는 여러 단계에서 다양한 인자들이 복합적으로 상호 작용하면서 death signal이 활성화된다.

선충 (*C. elegans*)의 연구를 통하여 apoptosis를 일으키는 관련 유전자 *ced-3*, *ced-4* 등이 발견되었고 이들 두 유전자의 작용을 억제하는 *ced-9*도 발견되었다. 사람에서는 *ced-3*과 상동성이 있는 IL-1 β 변환효소 (IL-1 converting enzyme : ICE)가 발견되었으며 이 ICE protease family는 apoptosis의 유도에 필수적으로 관여한다. 또한 *ced-9*와 상동성을 갖는 암 유전자 Bcl-2가 apoptosis 억제 유전자로 작용하고 있다는 사실이 보고되었다 (Metzstein *et al.*, 1998). Glucocorticoid는 세포내 수용체를 매개로 형성된 glucocorticoid 수용체 복합체에 의해 핵속으로 이송되어 응답성 엘리먼트와 결합하여 apoptosis에 관여하는 'Death domain'의 발현을 유도한다 (Nazareth *et al.*, 1991). 이와는 달리 방사선, 활성산소, 항암제 등은 ICE family protease를 활성화하는 것으로 apoptosis를 유도한다 (Schmitt *et al.*, 1997). 또한 TNF리간드가 Fas 항원분자와 결합하여 3량체를 형성하면 Fas분자의 세포내 영역의 'Death domain'을 매개로 ICE family cascade에 apoptosis 유도신호가 전달된다. 성장인자는 수용체를 매개로 신호를 전달하며 Bcl-2, Bcl-xL를 발현시켜 apoptosis의 발현을 억제한다.

1-2-1. Bcl-2 family

Bcl-2 family는 apoptosis에 공통적으로 관여 (Korsmeyer *et al.*, 1995)하며 그 종류에 따라 apoptosis를 억제하는 것과 유도하는 것으로 나누어진다. Apoptosis를 유도하는 것은 Bax, Bak, Bad 등이 있고 억제하는 것은 Bcl-2나 Bcl-xL 등이 있다. Bcl-2는 처음 알려진 apoptosis 억제인자로서 cytochrome C가 미토콘드리아에서 세포질로 이동하는 것을 막아 결국 caspase-3 활성화를 억제한다 (Kluck *et al.*, 1997). 그리고 Bax는 미토콘드리아로부터 cytosol로 cytochrome C의 유리를 촉진하여 caspase-3을 활성화하는 작용이 있으며 결과적으로 apoptosis를 촉진하는 작용을 한다.

1-2-2. p53

p53은 대표적인 tumor suppressor gene으로 알려져 있으며 c-Myc의 발현을 G1/S 단계에서 억제하여 결과적으로 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있다.

(Yonish-Rouach *et al.*, 1991). 또한, Bax의 발현을 촉진시키며 Bcl-2의 발현을 억제시킨다. 일반적으로 p53이 불활성화되거나 손상되어 있으며 암으로 진행되는 경우가 많이 발생한다. p53의존적인 apoptosis 유도 과정에 있어 p53의 target protein이며 p53이 매개하는 세포 성장 저해의 주된 작용물질인 p21^{warf/cipl}의 유도가 필요하지 않다 (Wagner *et al.*, 1994). 게다가 세포 성장 저해가 없이도 apoptosis를 유도하기도 한다. 이는 p53은 세포의 성장저해와 apoptosis 유도에 있어 스위치 같은 역할을 하고 있으며 p53이 매개하는 세포의 성장 저해와 apoptosis 유도는 서로 구별된 기전으로 진행된다는 사실을 뒷받침한다.

1-2-3. ICE-like protease

Interleukin-1 beta-converting enzyme (ICE) family protease는 apoptosis의 진행 과정에 있어 매우 중요하게 작용한다 (Zhivotovsky *et al.*, 1996). 하지만 apoptosis의 과정에 있어서의 모든 작용기전은 아직 명확하게 밝혀지지 않는 것이다. 여러 종류의 ICE-like protease cascade를 이루고 서로 상호 작용하게 된다. caspase-3 protease는 *C. elegans*의 cell death gene product 인 ced-3과 서로 비슷한 sequence와 기질특이성을 가지고 있다. 여러 인자에 의하여 활성화가 되면 다양한 cell death signal을 자극하게 되고 그 기질인 poly-(ADP-ribose) polymerase(PARP, 116-kDa)를 85-kDa의 카르복실말단 fragment와 28-kDa의 아미노 말단 fragment로 자르게 된다 (Kaufmann *et al.*, 1993). 기질인 PARP의 변화를 통하여 caspase-3 protease의 활성 변화를 확인할 수 있다. caspase-3 protease는 세포내의 특정 단백질을 쪼개어 불활성화 시키고 결국 세포를 죽음으로 이끌며 PARP는 다른 기질에 의해 polyribosylation이 일어나 DNA damage를 일으킨다.

1-3. *S. lomentaria*

고리매는 고리매과에 속하며, 조간대(潮間帶) 부근의 바위에 붙어산다. 길이 15~60cm, 지름 약 15 mm로 뭉쳐나고 원기둥 모양이다. 어릴 때는 가는 실 모양이며 다 자라면 군데군데 잘룩한 주름이 뚜렷하게 나타난다. 어릴 때는 몸 전체에 무색의 털이 나지만 나중에 없어진다. 빛깔은 녹색을 띤 갈색, 노란빛을 띤 갈색, 짙은 갈색 등이고 혁질(革質)가죽 같은 질감이다. 무리를 이루어 살며 특히 겨울철에 잘 자란다. 한국을 비롯한 전 세계의 바다에 분포한다.

2. 연구 목적

백혈병은 조혈장기인 골수에서 존재하는 각종 혈구 조상세포들(적혈구, 백혈구, 과립구성 백혈구, 혈소판, 단구 및 임파구)의 하나가 암성 변화를 일으켜서 증식만을 함으로서 골수기능 부진과 간, 비장 및 임파선의 비대를 일으키는 혈구암을 총칭하는 것으로 본 실험은 human leukemia cell인 HL-60 세포를 대상으로 고리매과에 속하는 해조류 중 고리매 추출물에 대해서 실험하였다.

본 실험에서 고리매 추출물 처리에 의한 세포의 증식억제는 3-(4,5-dimethylthiazyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 이용하여 검색하였으며, 세포 증식에 관여하는 proto-oncogene c-Myc의 발현 정도를 확인하였다. 이와 같은 고리매의 HL-60 세포의 대한 증식 억제 효과가 apoptosis 유도에 의한 것인지, 핵의 형태학적 변화, DNA 단편화 현상, DNA content를 알아보았다. 또한 apoptosis를 유도하는 세포내 신호전달 기전인 Bcl-2의 저해, Bax의 증가와 이에 따른 caspase-3, -9 protease의 활성화를 조사하여 apoptosis의 유도과 이에 관여하는 기전을 밝히고, 고리매가 암 치료제로 이용할 수 있는 새로운 근거를 제시하고자 하였다.



II 재료 및 방법

1. 시료의 준비

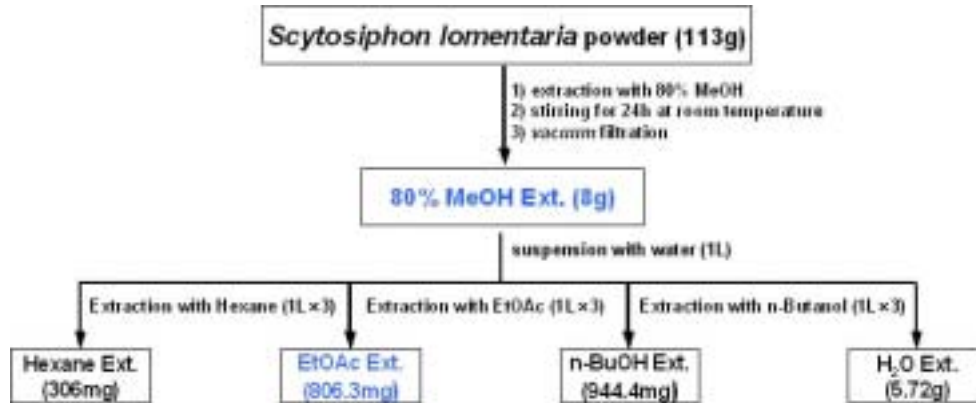
실험에 사용된 고리매를 2003년 2월에 북제주군의 행원 지역에서 썰물 때, 조간대를 중심으로 채취하였다. 채집된 시료는 수돗물로 2-3번 씻어서 염분을 제거하고, 바람이 잘 통하는 그늘진 곳에서 완전히 건조한 후, 파쇄기로 미세하게 파쇄시켜 냉동실 (-20℃)에 보관하면서 사용하였다.

2. 시료의 추출

고리매 113 g 미세말 시료에 80% 메탄올을 시료무게의 3배에 해당하는 양을 가한 후 상온에서 24시간 동안 교반하였으며, 진공여과에 의해 상층액을 회수하였다. 이 과정을 3회 반복하여 상층액을 모은 후, 감압농축하여 고리매 메탄올 추출물 8g를 수득하였다. 그리고 고리매 메탄올 추출물 8 g를 증류수 1ℓ에 현탁시킨 후에, 각각 헥산 (1ℓ×3), 에틸아세테이트 (1ℓ×3), 부탄올 (1ℓ×3), 물 순으로 극성이 낮은 용매부터 극성이 높은 용매 순으로 순차적으로 용매 분획 하였다. 각각의 분획물을 진공 건조하여, 고리매 용매 분획물로 사용하였다 (Scheme 1). 검정시료는 phosphate-buffered saline (PBS) 또는 에탄올 용매에 녹여 실험에 사용하였다.

3. 세포배양

HL-60 (human promyelocytic leukemia), KG-1 (human myeloid cells), SNU-16 (human stomach cancer), HCT-15 (human colon cancer), MCF-7 (human-breast cancer), A549 (human lung cancer), A498 (human kidney cancer), SK-OV-3 (human ovary cancer) 그리고 정상 세포주인 HEL 299의 9종을 한국 세포주 은행 (Korean Cell Line Bank)으로부터 분양 받아 실험에 사용하였다. 배지는 100 units/ml의 penicillin-streptomycin (GIBCO Inc, NY, USA)과 10%의 fetal bovine serum (FBS; GIBCO Inc, NY, USA)이 함유된 RPMI 1640 배지와 DMEM (GIBCO Inc, NY, USA)를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 계대 배양은 3~4일에 한번씩 시행하였다.



Scheme 1. Systematic purification by using solvent partitioning from *Scytosiphon lomentaria*

4. Cytotoxicity tests

고리매 추출물 처리에 의한 세포의 증식억제는 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay를 이용하였다 (Carmichael *et al.*, 1987). 여러 세포주 ($1.0 - 2.5 \times 10^5/ml$)를 48 well plate 또는 96 well plate의 각 well에 넣고, 고리매 메탄올 추출물 및 용매 분획물을 농도별로 첨가하였다. 이를 4일간 배양한 다음, MTT(Sigma, MO, USA) $100 \mu g$ (2 mg/ml)을 첨가하고 4시간 동안 더 배양하였다. Plate를 1000 rpm에서 5분간 원심분리하고 조심스럽게 배지를 제거한 다음, dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma, MO, USA) $150 \mu l$ 를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후 microplate reader (Amersham Pharmacia Biotech, NY, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 증식 억제 정도를 조사하였다.

5. Analysis for DNA fragmentation

HL-60 세포 ($2.5 \times 10^5/ml$)에 고리매 메탄올 추출물 및 용매 분획물을 처리한 다음 24 시간 동안 배양하였다. 세포를 수집한 후 Promega Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, WI, USA)를 사용하여 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA를 1.2% agarose gel에서 30분 (100 V)동안 전기영동을 한 다음 ethidium bromide로 염색하고 UV transilluminator (Spectronics Corporation Westbury, NY, USA)하에서

DNA단편화 현상을 관찰하였다 (Purohit *et al.*, 2000).

6. Morphological changes (DAPI stain)

HL-60 세포 ($2.5 \times 10^5/ml$)에 50, 75 및 100 $\mu g/ml$ 의 농도로 고리매 에틸아세테이트 분획물을 가한 다음 24시간 동안 배양하였다. 세포를 수확하고 phosphate-buffered saline (PBS; Sigma, MO, USA)용액으로 2회 세척한 후에, 2.0×10^5 개의 세포에 2% paraformaldehyde 1 ml를 가하여 실온에서 1시간 동안 고정하였다. 세포를 고정시킨 다음, PBS로 2회 세척하고 2.5 $\mu g/ml$ 의 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma, MO, USA)용액을 가하여 상온 암하에서 30분간 염색하였다. 이를 다시 PBS로 2회 세척한 후 형광현미경 (BX-50, Olympus, Japan)하에서 핵의 형태학적 변화를 관찰하였다.

7. Cell cycle analysis

HL-60 세포 ($2.5 \times 10^5/ml$)에 50, 75 및 100 $\mu g/ml$ 의 농도로 고리매 에틸아세테이트 분획물을 처리한 다음 24시간 동안 배양한 후, HL-60 세포를 수확하여 PBS로 세척하였다. HL-60 세포를 $-20^\circ C$ 에서 70% 에탄올로 30분 동안 고정 시킨 후, PBS로 세척하고, RNase A (1 mg/ml)를 처리한 다음에 propidium iodide(PI; Sigma, MO, USA)로 염색하고, COULTER[®]EPICS[®]XL[™] Flow Cytometer(Coulter, Miami, FL, USA)로 세포주기를 분석하였다 (Nicoletti *et al.*, 1991).

8. Western blot analysis

HL-60 세포 ($2.5 \times 10^5/ml$)에 고리매 에틸아세테이트 분획물을 25, 50, 75 및 100 $\mu g/ml$ 의 농도로 처리한 다음 24시간 동안 배양하였다. 또한 에틸아세테이트 분획물 75 $\mu g/ml$ 의 농도를 처리한 후 3시간, 6시간, 9시간, 12시간 및 24시간 동안 배양한 후 세포를 수확하여 PBS로 2~3회 세척 후, 500 μl 의 lysis buffer를 첨가하여 1시간동안 lysis 시켰으며, 14,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 Bradford 방법을 이용하여 정량 하였다 (Bradford *et al.*, 1976). 40 μg 의 lysate를 10% 및 12% mini gel SDS-PAGE(Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)로 변성 분리하여, 이를 PVDF membrane(BIO-RAD, USA)에 200

mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 Membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS (TBS + 0.1% Tween 20) 용액에서 상온에서 2시간 동안 실시하였다. c-Myc의 발현 양을 검토했기 위한 항체로는 mouse monoclonal anti-human c-Myc Ab (1:1000) (Santa-Cruz, USA), Bcl-2의 발현 양을 검토했기 위한 항체로는 mouse monoclonal anti-human Bcl-2 Ab (1:1000) (Santa-Cruz, USA), Bax의 발현 양을 검토했기 위한 항체로는 rabbit polyclonal anti-human Bax Ab (1:1000) (SantaCruz, USA), PARP의 발현 양을 검토했기 위한 항체로 rabbit polyclonal anti-human PARP Ab (1:1000) (Santa-Cruz, USA), caspase-9의 발현 양을 검토했기 위한 항체로 rabbit polyclonal anti-human caspase-9 Ab (1:1000) (Cell Signaling, USA) 와 caspase-3의 발현 양을 검토했기 위한 항체로 rabbit polyclonal anti-human caspase-3 Ab (1:1000) (Cell Signaling, USA)을 TTBS 용액에서 희석하여 사용하였으며 반응 상온에서 2시간 동안 진행하였다. 2차 항체로는 HRP (HorseRadish Peroxidase)가 결합된 anti-rabbit IgG (Amersham Pharmacia Biotech, NY, USA)과 anti-mouse IgG (Amersham Pharmacia Biotech, NY, USA)를 1: 5000으로 희석하여 이용하였으며, 반응은 상온에서 30분 동안 진행하였다. 그 후 membrane을 TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질 (Amersham Pharmacia Biotech, UK, USA)과 1~3분간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

9. 통계처리

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며 이들의 평균 (mean)과 표준편차 (standard deviation, SD)를 산출하여 통계적 유의성을 검증하였다.

III 결 과

1. 세포 증식 저해

(1) 세포 증식 저해 효과

고리매 메탄을 추출물 및 용매 분획물의 세포 증식에 대한 효과는 tetrazolium salt의 하나인 MTT를 사용하여 MTT의 환원에 의해 생성되는 formazan의 흡광도로 측정하였다. 여러 세포주에 고리매 80% 메탄을 추출물을 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도를 처리한 결과, human leukemia cell line인 HL-60, KG-1에서는 각각 43.7%, 42%, human stomach cancer인 SNU-16에서는 5%, human colon cancer인 HCT-15에서는 19.76%, human breast cancer인 MCF-7에서는 21.4%, human lung cancer인 A549에서는 13.3%, human ovary cancer인 SK-OV-3에서는 13.3%로 세포 증식이 억제됨을 확인하였다 (Figure 1). 그래서 가장 증식 억제 효과가 좋은 HL-60 세포주를 본 연구에 사용하였다. 또한 HL-60 세포에 고리매 80% 메탄을 추출물, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 처리시 약 43.7%의 세포증식 억제효과를 보였으며, 희산 분획물에 의하여 74.8%, 에틸아세테이트 분획물에 의하여 92.0%, 부탄올 분획물에 의하여 32.5%의 HL-60 세포 증식 억제 효과를 확인하였다. 그 중 억제 효과가 좋은 에틸아세테이트 분획물을 여러 농도로 처리하였을 때, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 46.5%, 75 $\mu\text{g/ml}$ 과 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 약 90% 이상의 세포 증식 억제 효과를 보였다 (Table 1).

(2) 고리매 추출물에 의한 c-Myc 발현 양상의 변화

c-Myc 암유전자는 세포증식과 세포분화조절에 관여한다고 알려져 있다 (Henriksson *et al.*, 1996). 이 유전자의 발현의 이상은 세포증식의 이상 및 미분화를 초래한다. 고리매 에틸아세테이트 분획물을 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 75 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 별로 24 시간 처리하여 c-Myc의 발현을 조사한 결과, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도부터 농도 의존적으로 그 발현 정도가 현저히 감소됨을 확인할 수 있었다 (Figure 2).

2. 고리매의 HL-60 세포 Apoptosis 유도 작용

(1) DNA fragmentation 확인

고리매 메탄올 추출물 및 용매 분획물에 의한 HL-60 세포 증식억제 작용이 apoptosis 유도에 의한 것인지 그 기전을 알아보기 위하여, apoptosis 유도에 의하여 나타나는 DNA 단편화 현상을 전기영동으로 관찰하였다. 고리매 메탄올 추출물 및 용매 분획물을 HL-60 세포에 각각 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 24 시간 동안 처리하였을 때, 80% 메탄올 추출물, 헥산 분획물 및 에틸 아세테이트 분획물에서 DNA 단편화 현상을 관찰하였다. 그 중 에틸아세테이트 분획물을 처리한 HL-60 세포에서 DNA 단편화 현상을 가장 뚜렷하게 확인할 수 있었다. 또한 에틸아세테이트 분획물을 HL-60 세포에 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 75 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도별로 24 시간 처리하였을 때, 50 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도부터 DNA 단편화 현상을 관찰할 수 있었다 (Figure 3).

(2) 핵의 형태학적 변화

Apoptosis의 형태학적 특징중의 하나인 핵의 변화를 관찰하기 위해 DNA에 특이적으로 결합하는 형광 염색액인 DAPI를 사용하여 DNA를 염색하고 형광현미경으로 관찰하였다. 정상 대조군에 비해, 고리매 에틸아세테이트 분획물을 50 $\mu\text{g/ml}$, 75 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24시간 처리 후 HL-60 세포에서는 농도 의존적으로 세포의 크기가 축소되며, 핵의 모양의 불규칙하고 부분적인 핵의 응집현상을 관찰할 수 있었다 (Figure 4).

(3) Cell cycle analysis

고리매 추출물에 의한 apoptosis 유도에 의하여 sub-G1 hypodiploid 세포가 증가하는지 DNA에 결합하여 형광을 나타내는 물질인 PI를 처리하여 유세포분석기로 분석하였다. 고리매 에틸아세테이트 분획물을 50 $\mu\text{g/ml}$, 75 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24 시간 동안 처리하였을 때, sub-G1 hypodiploid 세포가 농도 의존적으로 증가하는 것을 관찰되었다 (Figure 5).

(4) Bcl-2/Bax 발현 양상의 변화

Apoptosis를 조절하는데 관여하는 여러 가지 유전자 산물 중에서 제일 먼저 알려진 암유발 유전자 산물의 하나인 Bcl-2는 다른 암 유전자 단백질과는 달리 세포증식

에는 관여하지 않고 세포생존 조절, 즉 apoptosis를 억제하는 기능이 있다. 한편 Bcl-2 계에 속하는 Bax protein은 apoptosis를 촉진시키는 protein으로 밝혀졌으며 Bcl-2와의 hetero- 혹은 homodimer를 형성함으로써 apoptosis의 조절에 깊이 관여하고 있다 (Korsmeyer *et al.*, 1995). 따라서 본 실험에서 고리매 추출물 처리시에 Bcl-2 및 Bax의 발현양상의 변화를 조사한 결과, Bcl-2의 발현은 고리매 에틸아세테이트 분획물 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도 이후부터 점차 농도 의존적으로 감소하였고 (Figure 6), 이와는 달리 apoptosis를 촉진시키는 기능을 수행하는 Bax protein의 발현은 75 $\mu\text{g/ml}$ 농도부터 농도 의존적으로 증가되어 나타났다 (Figure 6).

(5) caspase-3 및 caspase-9의 활성화

고리매 추출물에 의한 급성 전골수성 백혈병 환자에서 유래한 HL-60 세포의 apoptosis 신호전달과정에서 caspase의 활성을 통한 PARP 분절로 apoptosis를 일으키는지를 조사하였다. PARP 분절의 상부 경로에 있는 caspase-3, 9는 apoptosis가 일어날 때 활성화되어 apoptosis의 집행자로서 역할을 수행하고 있다 (Widmann *et al.*, 1998). 고리매 에틸아세테이트 분획물을 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 75 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도별로 24 시간 처리하여 caspase-3, 9의 활성변화를 조사한 결과, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도부터 농도 의존적으로 활성이 증가되어 나타났다 (Figure 7). 그리고 75 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리 후 처리 시간에 따른 caspase-3의 활성변화를 조사한 결과, caspase-3은 6시간 이후부터 시간 경과에 따른 활성 변화를 나타냈다 (Figure 8). Western blot으로 확인한 caspase-3 기질의 하나인 poly(ADP-ribose)polymerase (PARP, 116-kDa)은 농도 및 시간 의존적으로 caspase-3, 9의 활성도와 비례하여 PARP 분해 단백질 (85-kDa)로 나타나는 것을 확인하였다 (Figure 7, 8).

Table 1. Inhibitory effect of MeOH extract or solvent fractions of *S. lomentaria* on the growth of HL-60 cells.

Concentrations ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Inhibition (%)				
	80% MeOH	Hexane	EtOAc	n-Butanol	H ₂ O
50	23.3 \pm 4.7*	32.6 \pm 3.3*	46.5 \pm 5.9*	10.4 \pm 5.2	-1.6 \pm 3.0
75	27.9 \pm 7.0*	43.1 \pm 4.0*	90.1 \pm 0.9*	24.1 \pm 4.5*	1.1 \pm 1.2
100	43.7 \pm 2.5*	74.8 \pm 4.9*	92.0 \pm 0.5*	32.5 \pm 4.1*	1.6 \pm 1.7

HL-60 cells ($2.5 \times 10^5/\text{ml}$) were treated with various concentrations of MeOH extract or solvent fractions from *S. lomentaria* and measured for viability by MTT assay for 4 days. All experiments were performed in triplicate. Data were presented as means \pm SD. * $p < 0.05$ compared with the control.

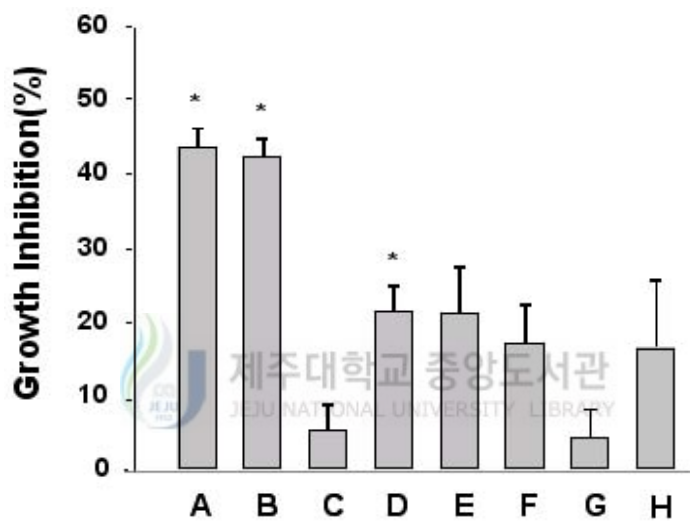


Figure 1. Effect of *S. lomentaria* on the growth of cancer cells.

Cancer cells were treated with 100 $\mu\text{g/ml}$ of 80% MeOH extract from *S. lomentaria* and measured for viability by MTT assay for 4 days. A: HL-60 (leukemia), B: KG-1 (leukemia), C: SNU-16 (stomach cancer), D: HCT-15 (colon cancer), E: MCF-7 (breast cancer), F: A549 (lung cancer), G: A498 (kidney cancer), H: SK-OV-3 (ovary cancer). All experiments were performed in triplicate. Data were presented as means \pm SD. * $p < 0.05$ compared with the control.

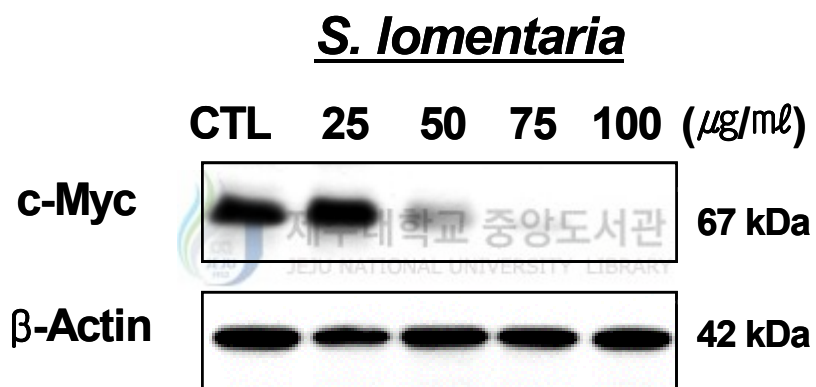


Figure 2. Western blot analysis of c-Myc expression.

HL-60 cells ($2.5 \times 10^5/\text{ml}$) were treated with various concentrations of EtOAc fraction from *S. lomentaria* for 24 hours. Western blots were performed as described in Materials and methods.

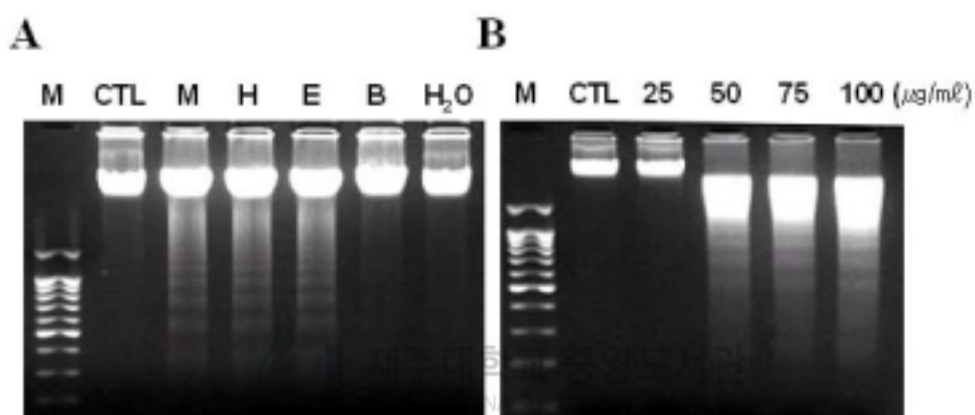


Figure 3. DNA fragmentation by MeOH extract or solvent fractions from *S. lomentaria* in HL-60 cells.

A. HL-60 cell ($2.5 \times 10^5/ml$) were treated with $100 \mu g/ml$ of MeOH extract or solvent fractions from *S. lomentaria* for 24 hours. Lane M: 100 bp DNA ladder size marker, Lane 1: control, Lane 2: 80% MeOH extract, Lane 3: Hexane fraction, Lane 4: EtOAc fraction, Lane 5: n-Butanol fraction, Lane 6: H₂O fraction. B. HL-60 cell ($2.5 \times 10^5/ml$) were treated with various concentrations of EtOAc fraction from *S. lomentaria* for 24 hours. Lane M: 100 bp DNA ladder size marker, Lane 1: control, Lane 2: $25 \mu g/ml$, Lane 3: $50 \mu g/ml$, Lane 4: $75 \mu g/ml$, Lane 5: $100 \mu g/ml$.

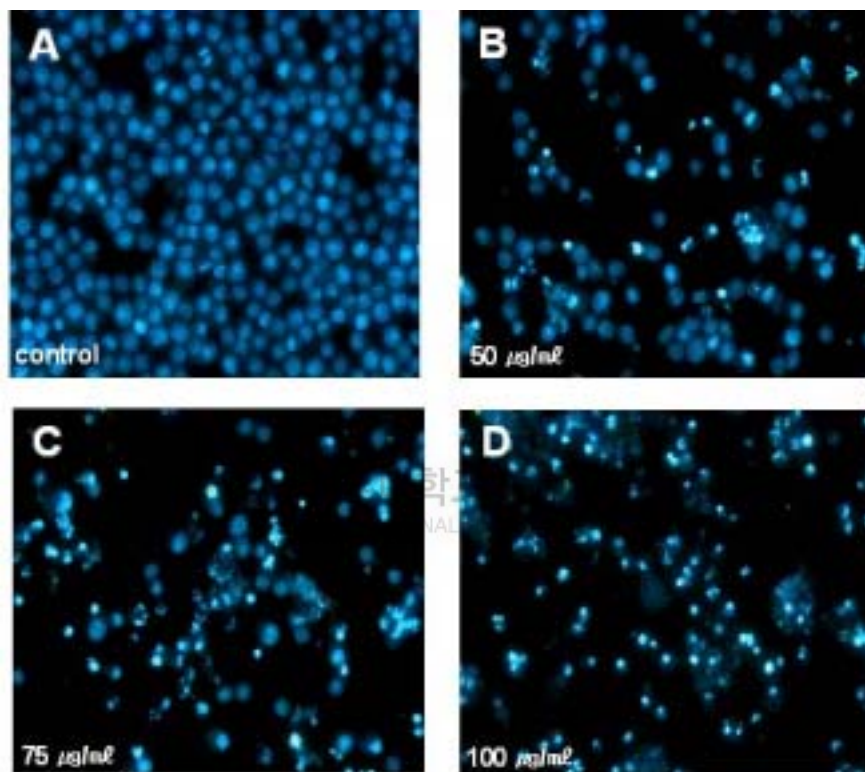


Figure 4. The photographs showing cells with highly condensed nuclei stained with DAPI.

HL-60 cells ($2.5 \times 10^5/\text{ml}$) were treated with various concentrations (50, 75 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of EtOAc fraction from *S. lomentaria* for 24 hours.

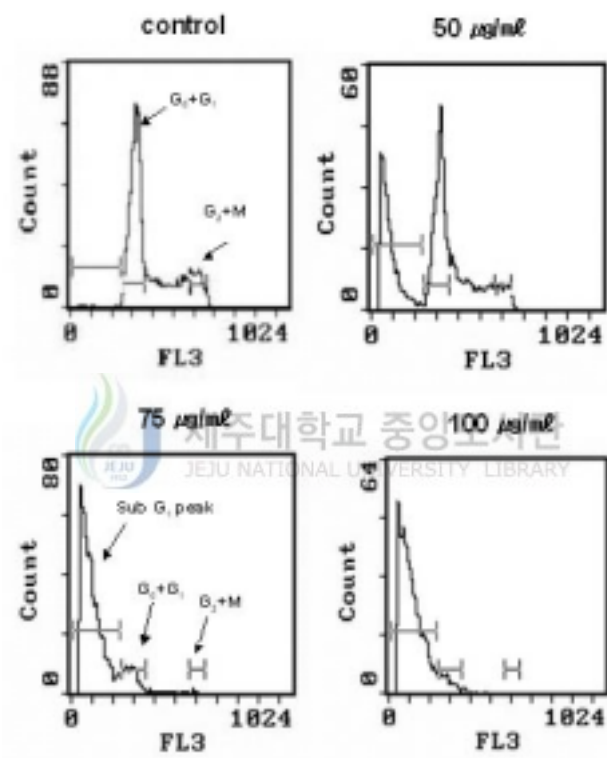


Figure 5. The degree of apoptosis represented as the DNA content measured by flow cytometric analysis.

HL-60 cells ($2.5 \times 10^5/\text{ml}$) were treated with various concentrations (50, 75 and 100 $\mu\text{g/ml}$) of EtOAc fraction from *S. lomentaria* for 24 hours.

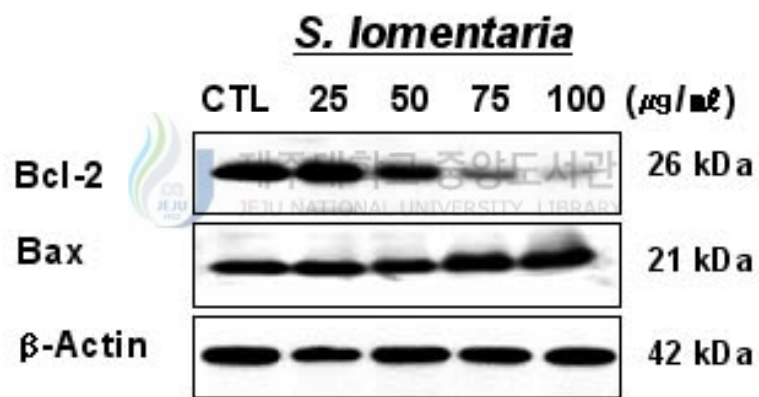


Figure 6. Western blot analysis of Bcl-2 and Bax proteins.

HL-60 cells ($2.5 \times 10^5/\text{ml}$) were treated with various concentrations of EtOAc fraction from *S. lomentaria* for 24 hours. Western blots were performed as described in Materials and methods.

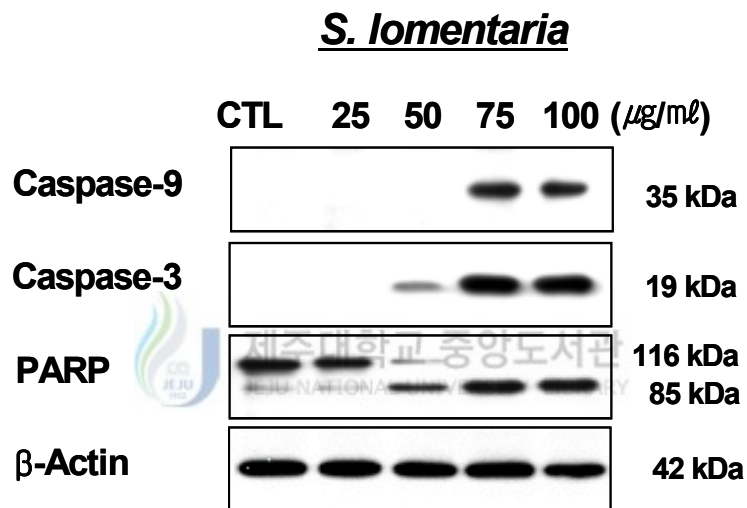


Figure 7. Western blot analysis of caspase-9, caspase-3 and cleavage of PARP.

Dose-dependent induction of caspase-9, caspase 3 activation and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in EtOAc fraction of *S. lomentaria* treated HL-60 cells. HL-60 cells ($2.5 \times 10^5/\text{ml}$) were treated with various concentrations (25, 50, 75 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of EtOAc fraction from *S. lomentaria* for 24 hours, and caspase-3, 9 and PARP cleavage were analyzed by western blotting using specific antibodies.

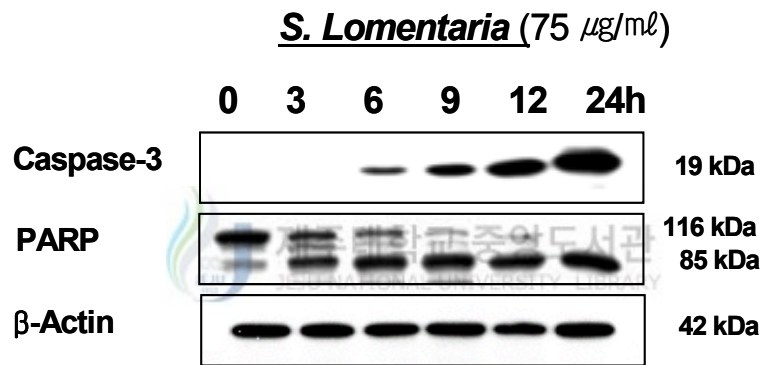


Figure 8. Western blot analysis of caspase-3 and cleavage of PARP.

Time-dependent induction of caspase-3 activation and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in EtOAc fraction of *S. lomentaria* treated HL-60 cells. HL-60 cells ($2.5 \times 10^5/\text{m}\ell$) were treated with EtOAc fraction of *S. lomentaria* (each at $75 \mu\text{g}/\text{m}\ell$) for different times (3, 6, 9, 12 and 24 h), and caspase-3 and PARP cleavage were analyzed by Western blotting using specific anti bodies

IV 고 찰

본 연구에서는 급성 전골수성 백혈병 세포주인 HL-60 세포를 이용하여 고리매 추출물이 HL-60 세포의 증식을 억제하는지 조사하고, 세포 증식 억제 작용이 apoptosis 유도에 의한 것인지 알아보았다. 고리매 추출물에 의한 HL-60 백혈병 세포의 증식 억제 효과는 tetrazolium salt의 하나인 MTT를 사용하여 MTT의 환원에 의해 생성되는 formazan의 흡광도로 측정하였다. 고리매 메탄을 추출물 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 여러 암세포주에 처리한 결과 HL-60 세포에서 세포 증식 억제 효과가 가장 높게 나타났다 (Figure 1). 그리고 고리매 메탄을 추출물과 용매 분획물을 농도별로 HL-60세포에 처리한 결과 헥산 분획물과 에틸아세테이트 분획물에서 세포 증식 억제 효과가 가장 높게 나타났으며, 농도에 의존적으로 증가함을 확인 할 수 있었다 (Table 1). c-Myc은 proto-oncogene의 하나로 많은 악성종양에서 발현이 증가되어 있는 것으로 알려져 있다 (Henriksson *et al.*, 1996). HL-60 세포주에는 정상 백혈구 세포에 비해 c-Myc 암유전자가 15-30배 정도 증폭되어 있어 mRNA의 발현 또한 증가되어 있다 (Collin, 1987). Figure 2에서 보는 바와 같이 고리매 에틸아세테이트 분획물 농도별 처리시 그 발현 정도가 현저히 감소됨을 확인할 수 있었다. 이와 같은 고리매의 HL-60 세포의 대한 증식 억제 효과가 apoptosis 유도에 의한 것인지 알아보았다. Apoptosis는 칼슘의존성 endonuclease가 활성화되어 핵내 DNA 분절이 일어난다. 또한 transglutaminase가 활성화되어 세포질내 단백질의 cross-linking이 일어난다. 그리고 세포질 농축이 일어나고 수액이 세포 밖으로 빠져나가면서 apoptotic bodies를 형성하는 것으로 알려져 있다 (Wyllie, 1992; Fesus *et al.*, 1991). 그래서, apoptosis 유도에 의하여 나타나는 현상의 하나인 DNA 단편화 현상을 관찰하였다. Figure 3에서 보는 바와 같이 고리매 메탄을 추출물, 헥산 분획물 및 에틸아세테이트 분획물에서 DNA 단편화 현상을 볼 수 있었다. 그리고 세포 증식 억제 효과가 가장 높았던 고리매의 에틸아세테이트 분획물 농도별 처리시 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 이상부터 DNA 단편화 현상을 관찰할 수 있었다. Apoptosis의 형태학적 특징중의 하나인 핵의 변화를 관찰하기 위해 DNA에 특이적으로 결합하는 형광 염색액인 DAPI를 사용하여 DNA를 염색하고 형광현미경으로 관찰하였다. 정상 대조군에 비해 고리매 에틸아세테이트 분획물을 농도별로 처리한 HL-60 세포에서는 핵들의 chromatin이 응축되면

서 작아지고, nuclear fragmentation이 일어나는 현상을 관찰할 수 있었다 (Figure 4). 또한 DNA에 결합하여 형광을 나타내는 물질인 PI를 이용하여 고리매 추출물의 처리에 의한 apoptotic 세포 즉 sub-G1 hypodiploid 세포의 증가를 유세포분석기로 확인하였다. 그 결과 고리매 에틸아세테이트 분획물의 처리에 의하여 농도 의존적으로 apoptotic 세포가 증가되는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 5). Apoptosis의 분자적 기전을 밝히기 위해 anti-apoptosis protein으로 알려진 Bcl-2와 pro-apoptosis protein인 Bax의 발현을 보았다. Apoptosis가 일어나는 경우에 Bcl-2 단백질의 감소 및 Bax 단백질의 증가가 관찰되는 경우가 많다. Bcl-2는 분자량 26-kDa의 단백질로서 chemoresistance에 중요한 역할을 담당하여 여러 종류의 자극에 대해 apoptosis를 억제하는 특이기능을 가지고 있다고 알려져 있다. Bax는 이와는 반대로 apoptosis를 유발하여 cell death를 촉진하는 기능이 있다. Bax는 Bcl-2와 heterodimer를 형성함으로써 Bcl-2의 anti-apoptotic effects를 방해한다 (Kroemer, 1997). Figure 6에서 보는 바와 같이 고리매 에틸아세테이트 분획물을 농도별로 처리시 농도 의존적으로 Bcl-2 발현의 감소하였다. 이와 반대로 Bax 단백질 발현은 점차 증가됨을 확인 할 수가 있었다. 현재까지 수많은 apoptosis관련 유전자가 알려져 있는데, 그 중에서도 공통적인 경로는 단백질 분해 효소의 활성화와 관련이 깊음이 알려졌다. 특히 시스테인계의 단백질 분해 효소인 caspase가 발견되면서 apoptosis 기전의 중심적인 요소로 여겨지고 있다 (Alnemri *et al.*, 1996). Caspase는 terapeptide motif를 인식하여 기질을 절단하는 cystein protease이며, 그 인식 peptide의 특이성은 caspase isoform에 따라 차이를 나타낸다. 현재까지 14종류의 caspase isoform들이 보고되었는데, 이들 중 caspase-3이 세포사멸 분야에서 가장 보편적인 관심을 받아왔다. caspase-3은 다양한 apoptosis 자극에 의해서 공통적으로 활성화될 수 있으며, 활성화된 caspase-3은 여러 종류의 세포내 단백질들을 절단할 수 있다 (Lazenik *et al.*, 1994). caspase-3이 활성화되기 위해서는 procaspase-3을 절단하는 caspase-9가 있어야하며, procaspase-9가 활성화되기 위해서는 미토콘드리아로부터 세포질내로 cytochrome C가 유리되어야 한다. PARP는 핵내에 존재하는 효소 중의 하나로서, 그 촉매부위는 apoptosis를 거치는 여러 세포에서 효과적으로 caspase-3을 포함한 여러 caspase에 의해 DNA-결합 부위로부터 절단되어 분리된다 (Hideki *et al.*, 1998). Figure 7에서 보는 바와 같이 고리매 에틸아세테이트 분획물처리에 의하여 caspase-9 활성화형 (35-kDa)와 caspase-3 활성화형 (19-kDa)의 밴드를 확인할 수 있었으며, 또한 caspase-3의 활성화

되는 농도에서 PARP의 분절을 관찰할 수 있었다. 그리고 고리매 에틸아세테이트 분획물 75 $\mu\text{g/ml}$ 농도를 시간별로 처리한 결과 6시간부터 caspase-3 활성화형의 밴드를 확인할 수 있었으며, 마찬가지로 PARP의 분절도 관찰할 수가 있었다. 고리매 추출물이 HL-60 세포의 apoptosis를 유도하여 백혈병 세포의 성장을 저해한다는 본 연구 결과는 고리매를 암 치료제로 이용할 수 있는 새로운 근거를 제시하며, 항암 치료제 또는 예방제의 유효 성분 분리 및 그 작용기전 연구에 중요한 기초자료가 될 것이라 사료된다.



V 인 용 문 헌

Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. and Yuan, J. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*. **87**(2), 171-176.

Arends, M.J., Morris, R.G. and Wyllie, A.H. 1990. Apoptosis. The role of the endonuclease. *American J Pathology*. **136**(3), 593-608.

Blagosklonny, M.V. 2000. Cell death beyond apoptosis. *Leukemia*. **14**(8), 1502-1508.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. **72**, 248-254.

Carmichael, J., DeGraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D. and Mitchell, J.B. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemisensitivity testing. *Cancer Research*. **47**(4), 936-942.

Chung, Y.T., Park, S.T., Mun, J.Y., Kim, J.M., Choi, M.K., Han, D.S. and Kim, B. 1987. Cytotoxic effects of actinomycin D, adriamycin and puromycin in the development stage of early mouse embryos. *J Wonkwang Medical Sci*. **3**, 13-34.

Collins, S.J. 1987. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood*. **70**(5), 1233-1244.

Ellem, K.A. and Gwatkin, R.B. 1968. Patterns of nucleic acid synthesis in the early mouse embryo. *Devel Biol*. **18**(4), 311-330.

Fesus, L., Davies, P.J. and Piacentini, M. 1991. Apoptosis: Molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur J Cell Biol*. **56**(2), 170-177.

Gillman, A.G., Rall, T.W., Nies, A and Talyor, P. 1991. Goodman Gillman's. The pharmacological Basis of therapeutics. *Maxwell Macmillan*. **18**, 1202.

Hale, A.J., Smith, C.A., Sutherland, L.C., Stoneman, V.E., Longthore, V.L., Culhane, A.C. and Williams, G.T. 1996. Apoptosis : molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem.* **236**(1), 1-26.

Hersh, E.M. and Ereish, E.T. 1986. In methods in cancer reseach. New York, *Academic Press.* 355.

Henriksson, M. and Luscher, B. 1996. Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res.* **68**, 109-182.

Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E. and Poirier, G.G. 1993. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* **53**(17), 3976-3985.

Sakahira, H., Enari, M. and Nagata, S. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* **391**(6662), 96-99.

Korsmeyer, S.J., Yin, X.M., Oltvai, Z.N., Veis-Nonack, D.J. and Linette, G.P 1995. Reactive oxygen species and the regulation of cell death by the Bcl-2 gene family. *Biochem Biophys Acta.* **1271**(1), 63-66.

Kroemer, G. 1997. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med.* **3**(6), 614-620.

Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R. and Newmeyer, D.D. 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science,* **275**(5303), 1132-1136.

Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., Earnshaw, W.C., 1994. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature.* **371**(6495), 346-347.

Luster, M.I. 1998. Inflammation, tumor necrosis factor and toxicology. *Environ Health Perspect.* **106**(9), 418-419.

Mayer, A.M. and Lehmann, V.K. 2001. Marine pharmacology in 1999 : antitumor and cytotoxic compounds. *Anticancer Res.* **21**(4A), 2489-500.

Metzstein, M.M., Stanfield, G.M. and Horvitz, H.R. 1998. Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trens Genet.* **14**(10), 410-416.

Nazareth, L.V., Harbour, D.V. and Thompson, E.B. 1991. Mapping the humanglucocorticoid receptor for leukemic cell death. *J Biol Chem.* **266**(20), 12976-12980.

Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F. and Riccardi, C. 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods.* **139**(2), 271-279.

Obeid, L.M., Linardic, C.M., Karolak, L.A. and Hannun, Y.A. 1993. Programmed cell death induced by ceramide. *Science.* **259**(5102), 1769-1771.

Pettit, G.R., Herald, C.L., Doubek, D.L. and Herald, D.L. 1982. Isolation and structure of bryostatin 1. *J Am Chem Soc.* **104**, 6846

Pettit, G.R., Herald, C.L., Boyd, M.R., Leet, J.E., Dufresne, D.L., Schmidt, J.M., Cerny, R.L., Hooper, J.N. and Rutzler, J. 1991. Isolation and structure of the cell growth inhibitory constituents from the western Pacific marine sponge *Axinella* sp. *J Med Chem.* **34**(11), 3339-3340.

Purohit, A., Hejaz, H.A., Walden, L., MacCarthy-Morrogh, L., Packham, G., Potter, B.V. and Reed, M.J. 2000. The effect of 2-methoxyoestrone-3-O-sulphamate on

the growth of breast cancer cells and induced mammary tumors. *Int J Cancer*. **85**(4), 584-589.

Schwartzmann, G., Brondani da Rocha. A., Berlinck, R.G. and Jimeno, J. 2001. Marine organisms as a source of new anti cancer agents. *Lancet Onco*. **2**(4), 221-225.

Schmitt, E., Sane, A.T., Steyaert, A., Cimoli, G. and Bertrand, R. 1997. The Bcl-xL and Bax-alpha control points: modulation of apoptosis induced by cancer chemotherapy and relation to TPCK-sensitive protease and caspase activation. *Biochem Cell Biol*. **75**(4), 301-314.

Tompson, J.L. and Biggers, J.D. 1966. Effects of inhibitors of proteinsynthesis on the development of preimplantation mouse embryos. *Exp Cell Res*. **41**(2), 411-427.

Trump, B.F., Berezsky, I.K., Chang, S.H. and Phelps, P.C. 1997. The pathways of cell death : oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol*. **25**(1), 82-88.

Wagner, A.J., Kokontis, J.M. and Hay, N. 1994. Myc-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and ability of p53 to induce p21^{waf1/cip1}. *Gene Dev*. **8**(23), 2817-2830.

Williams, G.T. 1991. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell*. **65**(7), 1097-1098.

Widmann, C., Gibson, S. and Johnson, G.L. 1998. Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J Biol Chem*. **273**(12), 7141-7147.

Wyllie, A.H. 1992. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and

neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev.* **11**(2), 95-103.

Wyllie A.H., Kerr, J.F. and Currie, A.R. 1980. Cell death : the significance of apoptosis. *Int Rew Cytol.* **68**, 251-603.

Yamazaki, M., Ueda, H., Fukada, K., Okamoto, M. and Yui, S. 1992. Priming effects of vegetable juice on endogenous products of tumor necrosis factor. *Biosci Biotechnol Biochem.* **56**(1), 149.

Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A. and Oren M. 1991. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukemia cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature.* **352**(6333), 345-347.

Zhivotovsky, B., Burgess, D.H. and Orrenius, S. 1996. Proteases in apoptosis. *Experientia.* **52**(10-11), 968-978.



VI 국문초록

천연물에는 항종양 효과를 비롯하여 다양한 생리활성을 나타내는 물질들이 포함되어 있으며, 이들 생리활성 물질의 작용기전에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 연구에서는 고리매의 항종양 효과를 조사하여, 고리매 성분을 암 치료제로 이용할 수 있는 근거를 마련하고자 수행하였다. 세포 증식 억제 효과는 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 이용하여 검색하였다. 그 결과, 특히 제주연안의 조간대를 중심으로 자라는 고리매 추출물이 HL-60과 같은 혈액 종양 세포의 증식을 현저히 억제하였다. 고리매의 HL-60 세포 증식 억제 효과가 apoptosis에 의한 것인지 DNA fragmentation, morphologic changes, sub-G1 hypodiploid cells를 관찰한 결과 고리매에 의해 apoptosis가 유도됨을 확인할 수 있었다. Apoptosis의 분자적 기전을 알아보기 위해서 Bcl-2 및 Bax의 발현양상의 변화를 조사한 결과, Bcl-2의 발현은 농도 의존적으로 감소하였고 이와는 달리 apoptosis를 촉진시키는 기능을 수행하는 Bax protein의 발현은 농도 의존적으로 증가되어 나타났다. 그리고 caspase-3, 9의 활성변화를 조사한 결과, 농도 의존적으로 활성이 증가되어 나타났다. 또한 시간에 따른 caspase-3의 활성변화를 조사한 결과, caspase-3은 6시간 이후부터 시간 경과에 따른 활성 변화를 나타냈다. caspase-3 기질의 하나인 poly(ADP-ribose)polymerase (PARP, 116-kDa)은 농도 및 시간 의존적으로 caspase-3, 9의 활성도와 비례하여 PARP 분해 단백질 (85-kDa)로 나타나는 것을 확인하였다.

고리매 추출물이 HL-60 세포의 apoptosis를 유도하여 백혈병 세포의 성장을 저해한다는 본 연구 결과는 고리매를 암 치료제로 이용할 수 있는 새로운 근거를 제시하며, 항암 치료제 또는 예방제의 유효 성분 분리 및 그 작용기전 연구에 중요한 기초 자료가 될 것이라 사료된다.

Key word: 고리매, HL-60, Apoptosis, c-Myc, Bcl-2, Bax, caspase-3

감사의 글

2년의 대학원 생활동안 좋은 일들도 많았던 반면 무척이나 힘든 일들도 많았습니다. 그러나 지금 생각해 보면 더 크게 성장하기 위한 하나의 과정이었다는 생각이 듭니다. 그리고 아직도 배움이 부족하다는 것을 새삼 느낍니다.

본 논문이 완성되기까지 항상 사랑으로 옆에서 지켜 봐 주신 많은 분들께 이 지면을 빌어 감사의 말씀을 드립니다.

학위연구를 수행함에 있어 부족하기만 했던 저를 제자로 받아주시고 학문에 임하는 자세를 일깨워 주신 강희경 교수님께 우선 감사의 말씀을 드립니다. 그리고 본 논문에 대한 연구의 수행과 논문의 완성이 있기까지 끊임없는 사랑과 애정을 보여주신 유은숙 교수님, 이영재 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 아울러 대학원 과정동안 늘 관심과 조언으로 학문의 길을 이끌어주신 이봉희 교수님, 이영기 교수님, 박덕배 교수님, 조문제 교수님, 현진원 교수님, 염재범 교수님, 강현욱 교수님, 고영상 교수님께도 감사의 말씀을 드립니다. 또한 대학원 과정동안 연구를 수행함에 있어 관심과 조언을 통해 늘 옆에서 도움을 주신 박수영 선생님, 한상현 선생님, 강신해 선생님, 박지권 선생님께도 감사 드립니다. 특히, 오랜 시간동안 많은 실험을 하면서 함께 고생한 의학과 약리학교실 이해자, 윤원중, 현재희 대학원생, 생명과학과 정형복, 현은아, 송지훈, 최진영, 진영준, 해부학 교실 김재우 대학원생에게 감사의 말을 전합니다. 그리고 김영미, 임희경, 강윤석, 윤지현, 변경희, 김은희, 오근희, 이정희 선생에게도 감사의 뜻을 전합니다. 마지막으로 추운 날 고생하며 어렵게 실험재료를 제공해 주신 김병석 선배님에게 감사 드립니다.

지난 일들을 되돌아보면 그토록 힘들고 어려웠던 순간 속에 저 혼자만 있었던 것은 아닌 것 같습니다. 많은 분들의 도움과 그들의 염려하는 마음이 항상 존재하였기에 지금의 위치까지 온 것이라 생각합니다. 그리고 앞으로도 이 모든 것들을 언제나 감사하고 기억하며 살아가겠습니다.

끝으로 지금까지 저를 낳아 길러 주시고 끊임없는 사랑을 보내주신 어머님과 어려울 때 힘이 되어준 형님과 누님 그리고 가족들에게 감사하다는 말과 함께 이 논문을 작으나마 보답으로 드리고 싶습니다.