

백혈병 세포주에서 Silibinin의 세포자멸사 유도 효과

계명대학교 의과대학 미생물학교실

정희정 · 백원기

Silibinin induces apoptosis in HL-60 and K562 leukemia cells

Hui Jung Jung, Won-Ki Baek, M.D.

*Department of Microbiology, Keimyung University School of Medicine,
Daegu, Korea*

Abstract : Silibinin is a polyphenolic flavonoid antioxidant isolated from the milk thistle and is used clinically to treat certain liver diseases. Recently it has been reported that silibinin has anticancer properties. However, the cellular and molecular mechanisms underlying silibinin induced growth inhibition in cancer cells are not clearly understood. In this study, we have investigated whether silibinin exerts anti-proliferative and apoptotic effects on HL-60 and K562 human leukemia cells. It was found that silibinin inhibits cell proliferation in a dose-dependent manner inducing apoptotic cell death. These findings suggest that silibinin could be a candidate for anti-leukemic drug.

Key Words : Apoptosis, HL-60, K562, Leukemia, Silibinin.

서론

플라보노이드는 과일, 야채, 약초 등의 식물에 존재하는 것으로 암을 예방하는 항암기능이 있는

물질로 알려져 있다[1, 2]. Silibinin은 milk thistle의 열매로부터 추출한 폴리페놀 플라보노이드 항산화제로서 유럽과 아시아에서 간염, 간경화 등 다양한 간질환에서 치료제로 사용되고 있으며, 이러한

교신저자: 백원기, 700-712 대구광역시 중구 달성로 216, 계명대학교 의과대학 미생물학교실

Won-Ki Baek, M.D., Department of Microbiology, Keimyung University School of Medicine
216, Dalseongno, Jung-gu, Daegu, 700-712 KOREA

Tel: +82-53-250-7521 E-mail: wonki@dsmc.or.kr

효능은 silibinin의 항산화, 항염증, 면역조절 등의 기전과 관련이 있는 것으로 생각되고 있다[3]. 최근 silibinin은 대장암, 전립선암, 유방암을 포함한 다양한 암세포를 이용한 시험관 내 및 생체 내 실험에서 세포 주기 조절을 통한 암세포의 성장 억제 및 세포자멸사(Apoptosis) 유도 효과를 보여 항암제 또는 암 예방제로서의 가능성이 연구되고 있다[4-10]. 이 연구에서는 silibinin이 백혈병의 치료 및 예방효과를 가질 수 있는지 알아보기로 백혈병 세포주인 HL-60, K562를 사용하여 silibinin의 항암효과와 그 기전을 조사해 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양 및 시약

HL-60와 K562 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC) 회사(Manassas, VA, USA)에서 구입하고, WelGENE 회사(Daegu, Korea)에서 구입한 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% antibiotics (penicillin-streptomycin)를 첨가한 Rosewell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640) 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C 세포 배양기에서 배양하면서 실험에 사용하였다. Silibinin은 Sigma-Aldrich 회사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 정상 림프구 세포는 정상인의 혈액을 채취하여 다음과 같은 방법으로 림프구를 분리하여 배양하였다. 채취한 혈액에서 림프구를 분리하기 위해 10 mL의 Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare 회사, Little Chalfont, UK)을 넣은 후 20°C, 45분간, 1850 rpm으로 원심하여 상층액을 제거하고 분리된 lymphocyte 층을 취하였다. 분리된 lymphocyte 층을 PBS로 3번 세척한 후 RPMI 1640 배지에 세포를 재 부유시킨 다음 5% CO₂, 37°C 세포 배양기에서 배양하면서 실험에 사용하였다.

2. Western blot 분석

세포를 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)로 세척한 후 회수하고 세포용해완충액과 단백질분해효소 억제제 및 인산가수분해효소 억제제 혼합액(20 mM Tris-Cl (pH 8.0), 137 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 2 mM EDTA, 200 nM aprotinin, 20 μM leupeptin, 50 mM phenanthroline, 280 mM benzamidine-HCl)을 넣고 얼음에서 30분간 둔 다음 원심 분리하여 상층액을 취하였다. Bidrad 회사(Mississauga, ON, USA)의 단백질량 kit (BioRad protein assay kit)를 이용하여 분리한 단백질의 농도를 측정 후 100 mg의 단백질을 sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기영동한 후 nitrocellulose paper (Millipore 회사, Bedford, MA, USA)로 전기이동을 실시하였다. Nitrocellulose paper를 5%의 skim milk가 함유된 TBS-T 용액(20 mM Tris (pH 7.5), 137 mM NaCl, 0.05% Triton X-100)에 1시간 이상 두어 blocking한 다음 일차항체 및 이차항체와 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence kit (Pierce 회사, Appleton, WI, USA)를 이용하여 특정 단백질의 발현을 검출하였다. 일차항체는 pro-caspase 3, X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP), HIAP-1, Bax, Bcl-2, β-tubulin 대한 특이 항체를 Santa cruz 회사(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하여 1:2000으로 희석하여 사용하였다.

3. 생존 세포 수 산정

회수한 세포에 trypan blue를 0.2% 첨가한 다음 hemocytometer를 이용하여 trypan blue에 염색되지 않은 생존 세포수를 계수하였다. 각 측정 때마다 3회 반복 실시하여 생존세포수의 평균치 및 표준편차를 구하였다.

4. Flow cytometry

세포를 PBS로 세척 후 trypsin을 이용하여 세

포를 회수 하였다. 2000 rpm으로 원심하여 세포를 모은 후 상층액은 제거하고 다시 한번 PBS로 세척 하였다. 300 mL의 PBS에 재 부유 후 700 mL의 차가운 에탄올을 점적한 후 4°C, 30분 세포를 고정 하였다. PI(propidium Iodide) 염색을 위하여 2000 rpm으로 원심하여 세포를 회수하고 PBS로 2번 세척하고 상층액을 제거한 후 PI용액(2.5 mg/mL propidium iodide, 5 mg/mL RNase A, 0.1% NP40 및 0.1% trisodium citrate)으로 세포를 재 부유시킨 다음 호일에 싸서 4°C에 20분 방치 하였다. 그런 후 FACScan plus 세포유분석기를 이용하여 DNA함량에 따른 histogram을 측정하고 동시에 FSC(forward scattering)과 SSC(side scattering)을 측정하였다.

성 적

1. Silibinin에 의한 백혈병 세포주 성장 억제 효과

Silibinin에 의한 세포 성장억제 효과를 알아보기 위해 백혈병 세포주인 HL-60, K562와 정상 림프구 세포를 배양하고 각각 25-100 μ M 농도의 silibinin을 48시간 처리한 후 생존 세포수 계수를 통하여 세포 성장 억제 정도를 조사하였다(Fig. 1). HL-60, K562 세포 모두 silibinin 처리 시 농도 의존적으로 세포 수 감소 효과가 나타났으며, silibinin 100 μ M 농도로 48시간 처리 시 HL-60 세포는 약 80%의 세포 성장 억제를 보였으며, K562에서는 약 60%의 세포 성장 억제를 관찰할 수 있었다. 이에 반해 정상 세포에서는 silibinin 100 μ M로 72시간까지 처리하여도 세포 수 감소 효과는 나타나지 않았다. 이 결과로 보아 silibinin은 정상 림프구에 미치는 독성이 없이 백혈병 세포주 HL-60 및 K562 세포에만 농도 의존적으로 성장 억제 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

2. Silibinin에 의한 세포자멸사 유도 효과

Silibinin에 의해 유도된 HL-60 및 K562 세포

의 성장 억제가 세포자멸사 유도와 관련이 있는지 조사하기 위하여 flow cytometry를 이용한 세포주기 분석을 시행하였다(Fig. 2). HL-60 및 K562 세포에 silibinin을 농도별로 48시간 처리하여 세포 주기를 분석한 결과 silibinin 처리에 따라 subG1기가 증가하여 세포자멸사가 유도됨을 보였다. 이러한 subG1기의 증가는 처리한 silibinin의 농도가 높아짐에 따라 증가하였다. 정상 림프구 세포에서는 silibinin을 100 μ M 농도로 72시간까지 처리하여도 세포 주기의 유의한 변화를 보이지 않았다. 이러한 결과들로 보아 silibinin에 의한 HL-60 및 K562 세포의 생존세포 수 감소는 세포자멸사 유도에 의한 것임을 알 수 있었다.

세포자멸사는 caspase의 활성화에 의해 일어나는 것으로 알려져 있어 silibinin에 의한 세포자멸사 유도를 확인하기 위하여 caspase-3의 단백질 발현을 Western blot 조사하였다. 먼저 HL-60, K562 및 정상 림프구 세포에 100 μ M 농도의 silibinin을 처리하고 24시간 후 단백질을 분리하여 Western blot으로 pro-caspase 3의 단백질 발현 수준을 조사하였다(Fig 3A). HL-60, K562 두 세포에서 pro-caspase 3 단백질의 발현이 silibinin에 의해 감소되어 활성화된 caspase-3로 전환됨을 보였으나, 정상 림프구 세포에서는 감소되지 않아 caspase-3의 활성화가 일어나지 않음을 확인할 수 있었다. Silibinin 농도별 효과를 조사하기 위하여 25-100 μ M 농도의 silibinin을 처리하고 Western blot으로 조사한 결과 (Fig. 3B) caspase-3의 활성화가 silibinin 농도 의존적으로 이루어짐을 보였다. 세포자멸사의 발생에 중요한 역할을 하는 caspase의 활성화는 다양한 세포내 단백질들에 의해 조절되는 것으로 알려져 있어 caspase의 활성화에 영향을 미친다고 알려진 Bcl-2, Bax, XIAP, HIAP 단백질의 발현이 silibinin에 의해 변화가 오는지를 Western blot으로 조사하였다(Fig. 3B). 실험결과 HL-60, K562 세포에 silibinin을 농도별로 처리 시 Bax, Bcl-2, HIAP1의 단백질 발현 변화는 일어나지 않았다. 그러나, XIAP 단백질은 HL-60 세포에서는 변화가 관찰되지 않았으나, K562 세포에서 silibinin 농도

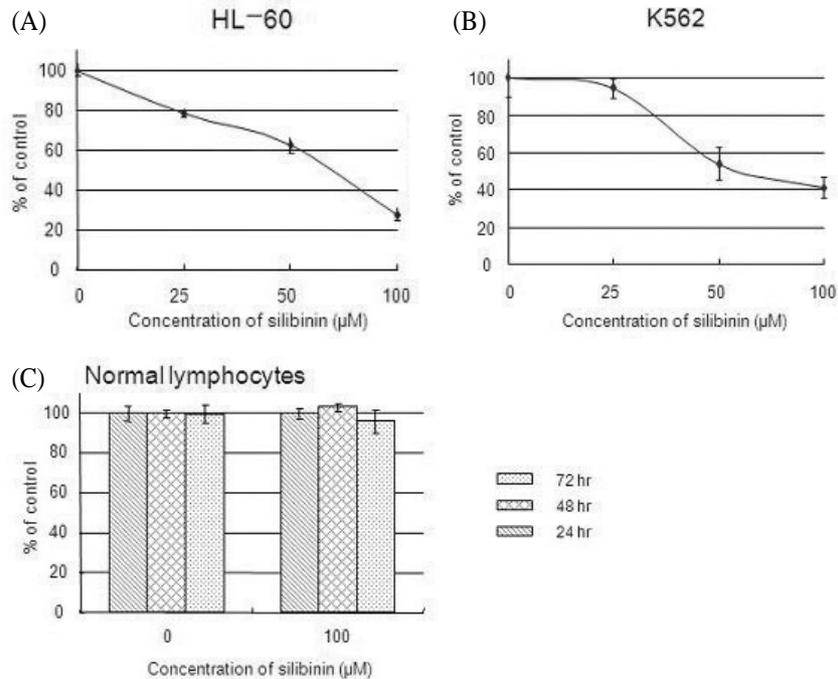


Fig. 1. Silibinin induces growth inhibition in human leukemia HL-60 and K562 cells, but does not in normal lymphocytes. HL-60 and K562 cells were treated with the indicated concentrations of silibinin for 48hr (A). Normal lymphocytes were treated with the indicated concentration of silibinin for 24, 48, and 72 hours (B). At the end of each treatment time, cells were collected and processed for determination of viable cell number as mentioned in Materials and Methods. The data shown are mean \pm standard error of mean of three independent experiments.

의존적으로 감소함을 보였다. XIAP 단백질은 caspase 단백질의 활성화를 억제하여 세포자멸사를 억제한다고 알려져 있어 K562 세포에서의 silibinin의 XIAP 감소효과는 silibinin에 의한 세포자멸사 유도과 관련이 있는 것으로 생각된다.

고 찰

Silibinin은 폴리페놀계 플라보노이드 항산화제로서 글루타티온의 결핍을 예방하여 간세포 재생 및 보호 효과를 가지는 것으로 알려져 있었으나 [3], 최근 보고들에서 silibinin이 세포자멸사 유도, 세포 주기 조절 등을 통하여 다양한 암세포의 성장과 증식을 억제하는 효능이 있음이 보고되고 있어 [4,5], 이 연구에서는 백혈병 세포주에서 silibinin

의 암세포 성장억제 효과에 대하여 조사하였다.

이 연구에서 silibinin은 HL-60 및 K562 백혈병 세포주에서 세포 성장 억제 및 세포자멸사 유도 효과를 보였으며, 그 효과는 48시간 처리 시에 HL-60에서는 25 μ M부터, K562세포에서는 50 μ M부터 관찰되었다. 이러한 농도는 인체에서 도달할 수 있는 농도로서 [11,12] silibinin을 이용하여 백혈병의 치료에 사용할 수 있을 가능성이 있음을 시사한다. 또한 정상림프구세포에서는 실험한 silibinin농도에서 유의한 생존세포 수 감소 또는 세포자멸사 유도가 관찰되지 않아 silibinin이 백혈병 세포에 선택적으로 작용할 가능성이 있음을 알 수 있다.

세포자멸사의 억제는 세포의 암화, 세포증식, 악재내성에 관여한다고 알려져 있으며, 암세포에서

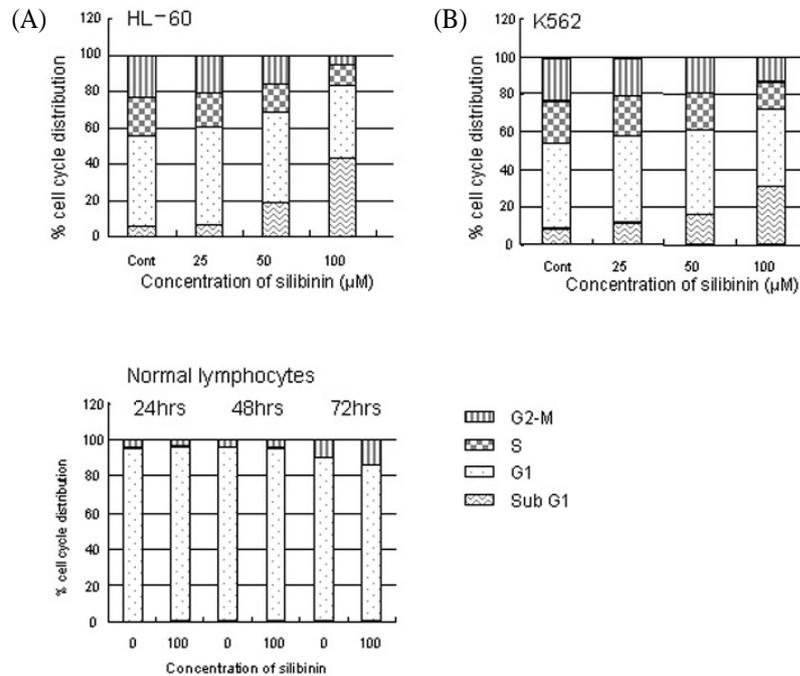


Fig. 2. Effects of Silibinin on cell cycle progression. Exponentially growing HL-60 and K562 cells were treated with silibinin for 48 hrs at the indicated concentrations (A). Normal lymphocytes were treated with silibinin with the indicated concentration of silibinin for 24, 48, and 72 hrs (B). The cell cycle distribution was determined by flow cytometric analysis of the DNA content after staining with propidium iodide as described in Materials and Methods.

세포자멸사를 유발하는 것이 암 치료제의 중요한 작용기전이다[13]. 이 실험에서 HL-60 및 K562 세포에 대한 silibinin 처리는 flow cytometer 분석에서 subG1기 세포를 증가시키고, 또한 Western blot에서 Pro-caspase-3가 감소함을 보여 caspase-3가 활성화되었음을 확인함으로써 silibinin이 이들 세포의 세포자멸사를 유도할 수 있음을 보였는데 이는 silibinin이 백혈병에서 항암제 또는 화학암예방제로서 사용될 수 있을 가능성이 있음을 시사한다.

세포자멸사에서 caspase의 활성화는 매우 중요한 역할을 하는데 caspase를 활성화 시키는 신호는 크게 막단백질을 통한 신호, mitochondria를 통한 신호로 이루어진다[14]. 이러한 신호들에서 중요한 역할을 하는 단백질들은 Bcl family 단백질과 IAP family 단백질 등이 있다[15-20]. 이 실험

에서 silibinin은 HL-60 및 K562 세포에서 Bcl-2, Bax, HIAP-1 등의 단백질의 발현에는 영향이 없었으나, K562 세포에서는 XIAP 단백질의 발현량을 silibinin 농도 의존적으로 감소시켰다. XIAP 단백질은 IAP family에 속하는 단백질로 IAP family 단백질 중에서 세포자멸사를 억제하는 기능이 가장 강한 것으로 알려져 있으며[21], 그 단백질 구조 중 BIR1, BIR2, BIR3 domain을 통하여 caspase3, caspase-7, caspase-9와 직접 결합함으로써 caspase의 기능을 억제하여 세포자멸사를 억제한다고 알려져 있다[22]. 한 연구에서는 acute myeloid leukemia 환자에서 XIAP 단백질의 발현이 낮은 것이 예후가 좋다는 보고한 바 있으며[23], XIAP antisense oligonucleotide를 단독 또는 cytarabine, doxorubicine 등의 항암제와 병용으로 사용하였을 때 백혈병 세포주의 성장을 억

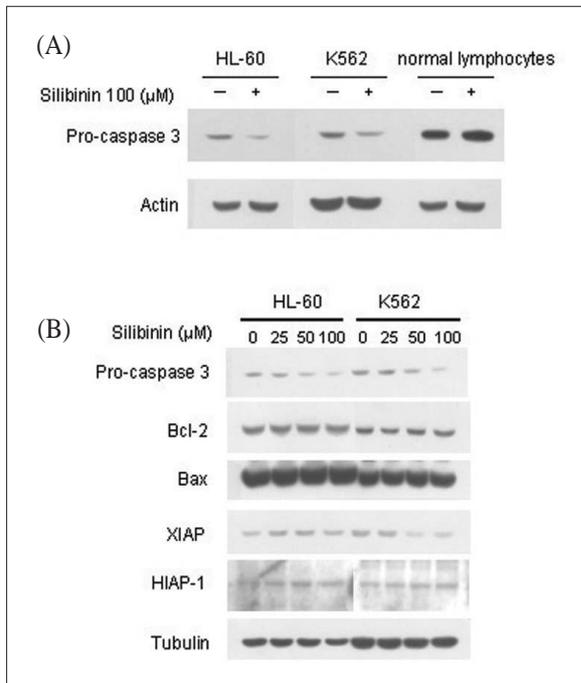


Fig. 3. Expression levels of apoptosis-related proteins by silibinin treatment in HL-60 and K562 cells. (A) HL-60 and K562 cells were treated with silibinin (100 μ M) for 24 hrs. Cells were lysed and prepared for Western blot analysis. β -actin is shown as a loading control. (B) HL-60 and K562 cells were treated with the indicated concentrations of silibinin. The cells were lysed and prepared for Western blot analysis. Tubulin is shown as a loading control.

제한 연구 보고가 있고 [24,25], 또한 제1상 임상연구에서 XIAP antisense oligonucleotide인 AEG35156의 사용으로 non-Hodgkin's lymphoma 환자에서 말초혈액의 lymphoblast 감소가 이루어졌다는 보고도 있다 [26]. 이러한 연구 결과들은 XIAP의 발현이 백혈병에서 중요한 역할을 하며, XIAP의 발현을 억제함으로써 치료효과를 거둘 수 있음을 시사한다. 이러한 점에서 볼 때, silibinin에 의한 XIAP의 발현억제는 silibinin의 항암작용에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다. 이 실험에서 silibinin에 의해 HL-60 세포주에서는 XIAP 단백질의 발현억제 효과가 관찰되지 않

았는데 이는 각 세포들의 특성에 따라서 silibinin의 효과가 다를 수 있음을 의미한다. 또한 XIAP 발현억제 없이 HL-60 세포에서 세포자멸사가 유도되었는데 이로 보아 silibinin은 XIAP 발현억제 이외의 다양한 생물학적 활성을 통하여 암세포의 세포자멸사를 유도할 수 있을 것으로 생각된다. 이 점에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 앞으로 silibinin이 어떤 기전을 통하여 XIAP 단백질의 발현양을 감소시키는지에 대한 기전 연구도 진행되어야 할 것이다.

결론적으로 silibinin은 세포자멸사 유도를 통하여 HL-60, K562 백혈병 세포주의 성장을 억제할 수 있으며, 이러한 효능으로 보아 silibinin은 향후 백혈병 치료에 사용될 가능성이 있는 후보 약물로 생각된다.

요 약

Silibinin은 milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn)의 열매로부터 얻어진 플라보노이드로서, 간세포 재생 및 보호 효과를 가진다고 알려져 있다. Silibinin은 최근 여러 종류의 암세포에서 항암작용이 보고되었으며, 이는 세포자멸사 유도 및 세포 주기 정지 유도 등의 효능과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 백혈병 세포주에서 silibinin에 의한 세포자멸사 유도 및 세포 성장 억제 기전은 명확히 알려져 있지 않다. 이에 이 연구에서는 HL-60, K562 백혈병 세포주에서 silibinin에 의한 세포자멸사 유도 및 그 기전을 조사하였다. 백혈병 세포주인 HL-60, K562 세포는 silibinin 처리에 의해 생존 세포 수가 감소하였으나, 정상 말초혈액 림프구에서는 silibinin에 의한 세포 수 감소 효과가 관찰되지 않았다. Silibinin 처리에 의한 HL-60, K562 세포주의 생존 세포 수 감소는 caspase-3 활성화 및 세포자멸사 유도와 관련이 있었다. K562 세포주에서 silibinin 처리에 의해 XIAP 단백질 발현이 감소하여 K562세포에서는 XIAP의 발현감소가 세포자멸사 유도와 관련이 있는 것으로 생각된다. 결론적으로 silibinin은

세포자멸사 유도를 통하여 HL-60, K562 백혈병 세포주의 성장을 억제할 수 있으며, 이러한 효능으로 보아 silibinin이 백혈병 치료에 사용될 수 있는 후보 약물로 생각된다.

참 고 문 헌

- Moon YJ, Wang X, Morris ME. Dietary flavonoid effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol In Vitro* 2006;**20**:187-210.
- Perchellet JP, Perchellet EM. Antioxidants and multistage carcinogenesis in mouse skin. *Free Radic Biol Med* 1989;**7**:377-408.
- Vogel G, Trost W, Braatz R. Studies on the pharmacodynamics, including site and mode of action, of silymarin: The antihepatotoxic principle from *Silybum mar (L) Gaertn. Arzneimittelforsch* 1975;**25**:2-9.
- Ramasamy K, Agarwal R. Multitargeted therapy of cancer by silymarin. *Cancer Lett* 2008;**269**:352-62.
- Post-White J, Ladas EJ, Kelly KM. Advances in the use of milk thistle (*Silybum marianum*). *Integr Cancer Ther* 2007;**6**:104-9.
- Hogan FS, Krishnegowda NK, Mikhailova M, Kahlenberg MS. Flavonoid, silibinin, inhibits proliferation and promotes cell-cycle arrest of human colon cancer. *J Surg Res* 2007;**143**:58-65.
- Singh RP, Raina K, Sharma G, Agarwal R. Silibinin inhibits established prostate tumor growth, progression, invasion, and metastasis and suppresses tumor angiogenesis and epithelial-mesenchymal transition in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model mice. *Clin Cancer Res* 2008;**14**:7773-80.
- Deep G, Oberlies NH, Kroll DJ, Agarwal R. Identifying the differential effects of silymarin constituents on cell growth and cell cycle regulatory molecules in human prostate cancer cells. *Int J Cancer* 2008;**123**:41-50.
- Tyagi AK, Agarwal C, Chan DC, Agarwal R. Synergistic anti-cancer effects of silibinin with conventional cytotoxic agents doxorubicin, cisplatin and carboplatin against human breast carcinoma MCF-7 and MDA-MB468 cells. *Oncol Rep* 2004;**11**:493-9.
- Singh RP, Agarwal R. Mechanisms and preclinical efficacy of silibinin in preventing skin cancer. *Eur J Cancer* 2005;**41**:1969-79.
- Roy S, Kaur M, Agarwal C, Tecklenburg M, Sclafani RA, Agarwal R. p21 and p27 induction by silibinin is essential for its cell cycle arrest effect in prostate carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2007;**6**:2696-707.
- Flaig TW, Gustafson DL, Su LJ, Zirrollo JA. A phase I and pharmacokinetic study of silybin-phytosome in prostate cancer patients. *Invest New Drugs* 2007;**25**:139-46.
- Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000;**21**:485-95.
- Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006;**25**:4798-811.
- Coultas L, Strasser A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol* 2003;**13**:115-23.
- LaCasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, Plenchette S, Baird S, Korneluk RG. IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene* 2008;**27**:6252-75.
- Holcik M, Gibson H, Korneluk RG. Korneluk. XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis* 2001;**6**:253-61.
- Wang H, Takemoto C, Akasaka R, Uchikubo-Kamo T, Kishishita S. Novel dimerization mode of the human Bcl-2 family protein Bak, a mitochondrial apoptosis regulator. *J Struct Biol* 2009;**166**:32-7.
- Wang B, Feng Y, Song X, Liu Q. Involvement of ERK, Bcl-2 family and caspase 3 in recombinant human activin A-induced apoptosis in A549. *Toxicology* 2009;**258**:176-83.

20. Letai, A. Pharmacological manipulation of Bcl-2 family members to control cell death. *J. Clin. Invest* 2005;**115**:2648-55.
21. Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep* 2006;**7**:988-94.
22. Shiozaki EN, Shi Y. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends Biochem Sci* 2004;**29**:486-94.
23. Tamm I, Kornblau SM, Segall H, Krajewski S, Welsh K. Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin Cancer Res* 2000;**6**:1796-803.
24. Carter BZ, Milella M, Tsao T, McQueen T, Schober WD. Regulation and targeting of antiapoptotic XIAP in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2003;**17**:2081-9.
25. Lima RT, Martins LM, Guimar?es JE, Sambade C, Vasconcelos MH. Chemosensitization effects of XIAP downregulation in K562 leukemia cells. *J Chemother* 2006;**18**:98-102.
26. Dean E, Jodrell D, Connolly K, Danson S, Jolivet J, Durkin J. Phase I trial of AEG35156 administered as a 7-day and 3-day continuous intravenous infusion in patients with advanced refractory cancer. *J Clin Oncol* 2009;**27**:1660-6.