



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2011년 2월

교육학석사 (영양교육전공) 학위논문

6-Gingerol이 소포체 스트레스에 의한
인간 전립선암 세포사멸에 미치는 효과

조선대학교 교육대학원

영양 교육전공

조 희 영

6-Gingerol이 소포체 스트레스에 의한 인간 전립선암 세포사멸에 미치는 효과

6-Gingerol induces Apoptosis through increase of
Endoplasmic Reticulum Stress in the Prostate cancer cells

2011년 2월

조선대학교 교육대학원

영양 교육전공

조 희 영

6-Gingerol이 소포체 스트레스에 의한
인간 전립선암 세포사멸에 미치는 효과

지도교수 이 명 렬

이 논문을 교육학석사 (영양전공)학위
청구논문으로 제출함.

2010년 10월

조선대학교 교육대학원

영양 교육전공

조 희 영

목 차

목 차	1
도목차	3
ABSTRACT	5
I. 서 론	7
II. 재료 및 방법	11
1. 재료	11
2. 방법	12
1) 세포배양	12
2) 세포독성 실험	12
3) 세포사멸과 관련된 단백질 발현 검증	12
4) Caspase-3 활성 측정	13
5) Hoechst 33342 및 Immunofluorescent 염색	13
6) 소포체만 선택적 염색	14
7) 프로모터 활성 측정	14
8) mRNA 분리 및 RT-PCR	14
9) 통계처리	15
III. 결 과	16
1. 세포사멸 측정	16
1-1. 전립선암 세포의 생존율 측정	16
1-2. 세포사멸에 관련된 단백질 발현 측정	17
1-3. 세포사멸에 관련된 Caspase-3 활성 측정	18

1-4. 세포사멸에 관련된 Hoechst 33342 염색.....	19
2. 소포체 스트레스 측정.....	20
2-1. 소포체 스트레스에 관련된 단백질과 mRNA 발현 측정.....	20
2-2. 소포체만 선택적 염색.....	21
2-3. XBP-1 mRNA 분할 측정.....	22
3. 소포체 스트레스 경로 차단 후 6-gingerol 효과 측정.....	23
3-1. 소포체 스트레스 차단 후 세포사멸에 관련된 단백질 발현 측정.....	23
3-2. 소포체 스트레스 차단 후 Caspase-3 활성화 측정.....	24
3-3. 소포체 스트레스 차단 후 전립선암 세포의 생존율.....	25
4. NF- κ B 신호전달 측정.....	26
4-1. NF- κ B 프로모터 측정.....	26
4-2. 소포체 스트레스에 의한 NF- κ B 프로모터 측정.....	27
IV. 고찰.....	28
V. 결론.....	31
VI. 참고문헌.....	32

도 목 차도 목 차

Figure 1. Chemical structure of 6-gingerol.....	11
Figure 2. Effect of 6-gingerol on the cell viability in human prostate cancer cells. The cell viability was measured by clonogenic assay.	16
Figure 3. Time-dependent effect of 6-gingerol on caspase-3, caspase-4 and PARP cleavage in DU145 cells. Western blot analysis for the evaluation of proteins involved in apoptotic cell death the expression levels of caspase-3, caspase-4, PARP.	17
Figure 4. Effect of 6-gingerol on caspase-3 activities in DU145 cells.	18
Figure 5. The nuclei of the cells with 6-gingerol showing the typical apoptotic morphology of fragmentation and condensation after staining with Hoechst 33342.	19
Figure 6. Effect of 6-gingerol on the ER stress in DU145 cells. The protein expression of cells was measured by Western blot and RT-PCR.	20
Figure 7. Immunofluorescent analysis of tubular cells with 6-gingerol for 48 h using the fluorescent dye ER Tracker Blue-White DPX, which specifically localizes inside the ER lumen.....	21
Figure 8. Effect of 6-gingerol on the ER stress in DU145 cells and RT-PCR analysis of XBP-1 mRNA splicing.	22
Figure 9. The combination treatment of PBA and 6-gingerol induced	

the cleavage of caspase-3, caspase-4, PARP, GRP78, p-eIF2 α , and CHOP in DU145 cells and Western blot analysis for the evaluation of proteins involved in apoptotic cell death. 23

Figure 10. Effect of 6-gingerol on caspase-3 activities in DU145 cells to combination PBA. 24

Figure 11. Effect of 6-gingerol on the cell viability in human prostate cancer cells to combination PBA. The cell viability was measured by clonogenic assay. 25

Figure 12. DU145 cells were transiently transfected with NF- κ B promoter/luciferase construct together with an increasing amount of 6-gingerol. 26

Figure 13. Effect of 6-gingerol on NF- κ B promoter/luciferase construct in DU145 cells to combination PBA. 27

ABSTRACT

6-Gingerol induces Apoptosis through increase of Endoplasmic Reticulum Stress in the Prostate cancer cells

Cho, Hee-Young

Advisor : Prof. Myung-yul Lee Ph.D.

Major in Nutrition Education

Graduate School of Education, Chosun University

Six-gingerol, one of the ginger (*Zingiber officinale*) compounds, has been shown to cause anti-tumor effects in a variety cancer cells including non-small cell lung cancer cells. Also, it previously reported that 6-gingerol inhibits cell proliferation in human breast cancer cells. Apoptosis is a major mechanism to eliminate cancer cells. The activation of caspase family and endoplasmic reticulum (ER) stress-mediated apoptotic pathway in the key step in apoptosis. The accumulation of unfolded or misfolded protein in ER can induce ER stress. To combat the deleterious effects of ER stress, cells have evolved various protective strategies, activate signal transduction pathways that trigger a complex transcriptional and translational response known as the unfolded protein response (UPR).

In this study, cells were treated with the doses of 6-gingerol for a variety time. 6-gingerol induced time-dependent reduced of cell viability in DU145 cells. Expression of cleaved caspase-3, capspase-4, and PARP protein involved in apoptotic cell death were increased in cell treated with 10 μ M 6-gingerol and shown to the typical apoptotic morphology of fragmentation and condensation after staining with Hoechst 33342.

Also, GRP78, p-eIF2 α , and CHOP expression were increased in DU145 cells. caspase-3 and NF- κ B activity was significantly increased time-dependent in cell treated with 6-gingerol. Apoptosis-related protein, ER stress-related protein, caspase-3, and NF- κ B activity were decreased expression in cell treated with PBA.

In conclusion, cells have shown that 6-gingerol induces apoptosis through ER stress in DU145 prostate cancer cells.

I. 서 론

최근 노년인구의 증가와 환경의 급격한 악화 등으로 세계적인 암 발생률이 매년 5% 이상 증가하고 있으며, 매년 암으로 인한 사망률이 증가되는 추세이다. 우리나라에서 현재 사망원인 1위는 암이 차지하고 있으며, 최근에는 대장암, 전립선암, 유방암, 자궁암의 발병이 증가하고 있다. 암의 발병에는 환경적인 요인이 80~90% 작용하며, 그 중에서도 식생활이 중요한 요인으로 보고되고 있다(1, 2). 현재 암 치료는 외과적 수술, 방사선요법, 광요법, 화학요법, 천연물을 포함한 생물요법 등의 단독 혹은 병용치료로써 이루어지고 있으나, 아직까지는 부작용이나 내성 또는 재발이 없는 이상적이고 완벽한 항암제가 없는 실정이다. 음식문화가 다른 지역에 따라 암 발생률이 각기 차이가 있는 것도 암과 음식과의 관련성을 뒷받침해 주며, 최근 연구에 따르면 과일 및 채소 등의 섭취가 특정 암의 발생률과 반비례한다는 증거들이 발표되고 있다(3).

생강 (*Zingiber officinale* Roscoe)은 생강과에 속하는 다년생 식물의 근경으로 아열대와 열대지역에서 자라며(4, 5), 한의학에서는 건위제, 구토, 복통, 설사 등의 치료제 및 살균제로 이용되고 있다(6). 생강의 약리효능에 관한 연구로는 생강추출물인 gingerol의 DNA 손상 억제 작용(7), 종양억제 및 소염 작용(8, 9), 체내 지질저하 효과(6), 항산화제로서의 작용 및 항균작용(10) 등이 보고되어 있다.

생강의 성분에는 비휘발성의 매운맛 성분인 oleoresin인 gingerol, shogaol, dehydrogingerone 등을 함유하고 있다. 이 중에 gingerol은 o-methoxy phenolic 추출물 유도체로 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol 등이 존재한다(11). 지금까지 6-gingerol이 암에 미치는 효과에 대하여 보고된 것들을 살펴보면, 변형 P53이 발현된 췌장암 세포의 증식을 억제한다고 보고되었다(12). 그 밖에도 위암 세포의 6-gingerol에 의한 생존율 감소(13)와 6-gingerol이 결장암 세포의 증식을 억제하고 세포 사멸을 유도한다고 알려졌다(14).

세포 죽음(cell death)의 과정은 형태적, 생화학적으로 세포사멸(apoptosis)과 세포괴사(necrosis)로 나눌 수 있다(15). 세포사멸은 세

포가 계획된 순서에 따라 죽는다는 의미로(programmed cell death), 이는 세포의 다양한 신호전달 경로에 의해 전달된다(16). 이러한 세포사멸의 신호 전달 과정의 마지막 단계가 Caspase (cystein-aspartyl-specific-protease)의 활성화단계이다. 핵단백질이나 세포질 내 단백질을 분해하는 caspase는 실제 세포사멸을 수행하는 중요 단백질 분해효소로서, 단백질 내 특정한 곳을 인지하여 바로 다음의 아미노산 결합을 방해, 단절하는 효소이다(17, 18). 또한 NF- κ B는 전사인자(transcription factor)로 작용하여 여러 가지 세포사멸에 관련된 유전자에 영향을 미친다고 보고되고 있다(19).

Caspase와 상호 작용을 하는 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)는 핵에서 손상된 DNA를 인지하여 활성화된 후, 여러 단백질을 poly(ADP-ribose)ation 이라는 post-translation 과정을 통해 손상을 복구하려고 하는 인자로 알려져 있다(20, 21). 그러나 DNA 손상이 너무 심하여 PARP의 활성이 과다하게 높아지면서 급격한 에너지의 소모로 세포사멸을 유도한다. Caspase-3가 PARP의 DNA의 결합 부위와 활성 부위를 분리하여 PARP의 활성을 막고 세포사멸을 일으키는 것으로 알려져 있다(22).

소포체(endoplasmic reticulum, ER)는 핵막으로부터 뻗어 나와 가지를 친 것 같은 막성분의 구조로서, 세포 내 단백질의 약 1/3이 전령 RNA(mRNA)에서 단백질로 번역 후 수정(posttranslational modification) 즉, 폴딩(folding)과 조립(assembly), 당화(glycosylation) 및 이황화결합(disulfide bond) 등의 과정을 통해 활성형 단백질 구조가 된다(23). 또한 지질과 스테롤의 합성장소이며, 칼슘저장소로 세포 내 칼슘 농도를 조절하는데 중요한 역할을 한다(24, 25). 그러나 생리적 혹은 병리적 환경에 의해 소포체가 처리할 수 있는 능력 이상의 미성숙 단백질이 소포체 내로 유입이 되거나 소포체 내 칼슘이 고갈되면 소포체 기능에 장애가 발생하는데 이러한 상태를 소포체 스트레스(ER stress)라고 한다(25~27). 또한 소포체는 소포체 내 칼슘이온 저장소로서 sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA)를 통해 소포체 내로 칼슘이온을 펌핑하거나, inositol 1,4,5-triphosphate receptor와 ryanodine receptor에 의해 소포체에서부터 칼슘이온을 배출함으로써 칼슘이온 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다(28, 29). 소포체 내의 높은 칼슘이온의 농도는 신생 단백질의 폴딩과 이황화결합 형성과 같은 소포체 기

능에 필수적이다. 왜냐하면 calreticulin, calnexine와 단백질 이황화 이성화 효소와 같은 몇 가지 소포체 샤페론 (ER chaperones)의 기능이 고농도의 칼슘이온에 의존적이기 때문이다. 그러므로 소포체에서 칼슘이온 항상성이 파괴되면 소포체 기능이 저하된다(29).

소포체 스트레스가 발생할 경우 세포는 소포체 스트레스를 극복하기 위해 다음과 같은 네 가지의 반응이 일어난다. 첫 번째로 리보솜에서 mRNA로부터 단백질로 번역되는 것을 억제(translational attenuation)하여 소포체 내로 새로운 단백질이 유입되는 것을 감소시킨다(30). 두 번째로 단백질을 폴딩 시키는데 필요한 GRP78/Bip과 같은 소포체 샤페론(chaperon)의 발현을 유도하여 소포체의 폴딩 능력을 향상시킨다(31, 32). 세 번째 반응은 소포체 스트레스 관련 분해(ER stress-associated degradation, ERAD)로 소포체에서 폴딩되지 않거나 잘못 폴딩된 단백질을 세포질 내 ubiquitin-proteasome 시스템을 통해 분해하여 제거하는 과정이다(33). 마지막으로 소포체 스트레스가 위의 세 가지 반응으로 극복이 되지 못할 정도로 심각하게 되고 소포체가 제 기능을 회복할 수 없을 때는 세포사멸 경로가 활성화되어 손상된 세포를 제거한다(25, 34).

여러 다양한 암 세포들에서 6-gingerol의 항암효과에 대한 연구는 많이 보고되어 있지만, 전립선암 세포에서는 그 연구가 매우 미흡한 실정이다. 전립선이란 남성의 생식기관 중 하나로 정액을 구성하는 액체 성분을 만든다. 그러나 전립선암의 원인이 명확하게 밝혀진 것은 아니지만, 연령, 인종, 가족력이 가장 중요하다. 유전적 소인 외에도 호르몬, 식이습관, 제초제와 같은 화학약품 등도 발병에 중요한 요인으로 작용한다. 서양의 경우 전립선암은 남성암 중 가장 흔한 암으로 높은 발생 빈도를 보인다. 우리나라의 경우도 최근 전립선암의 빈도가 급격히 증가하고 있다. 따라서 본 연구에서는 식생활에서 또는 약용으로 널리 쓰이고 있는 생강의 성분 중에서 항산화력과 항염증 효과가 뛰어난 6-gingerol이 이들 암 세포에서의 증식 및 사멸 조절에 미치는 효과를 관찰하고자 하였고, 소포체 스트레스에 의한 세포죽음 경로를 통한 과정에서 중요한 역할을 하는 단백질의 mRNA 수준에도 6-gingerol이 영향을 미치는지 실험하였으며, 세포사멸의 마지막 단계인 caspase-3의 활성도를 측정하였다. 이러한 연구를 통하여 종전의 항암 화학요법제와는 다른 천연물을 이용한 항암제로 암을 예방하고

치료할 수 있는 새로운 약물을 개발하는데 유용한 기초 자료를 제공하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

생강 추출물인 분자량 294.39g의 6-gingerol (순도: 95%)을 Biomol (Plymouth, USA)에서 구입하여 사용하였다.(Figure 1.) 6-gingerol은 ethanol에 10 mM로 stock을 만들어 -20℃ 냉동고에 보관하여 사용하였다. 실험에 필요한 RPMI-1640, 항생제 (antibiotics), trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 및 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)은 GIBCO BRL사(Grand Island, USA)에서 구입하였다. Crystal violet 용액, ER Tracker Blue-White DPX 용액, 4-phenyl butyric acid (PBA) 및 Hoechst 33342는 Sigma사(St. Louis, USA) 제품을 사용하였고, caspase-3 protease의 기질인 DEVD-pNA는 Calbiochem사(San Diego, USA)로부터 구입하였고, caspase-4, PARP, glucose-regulated protein (GRP78/Bip), beta-actin에 대한 항체는 Santa Cruz사(San Diego, USA) 및 caspase-3, phosphorylated eukaryotic initiation factor 2 (eIF2), 및 C/EBP homologous protein (CHOP)는 Cell signaling사 (Beverly, USA)로부터 구입하였다. 또한 anti-IgG conjugated horse-radish peroxidase와 enhanced chemiluminescence kit(ECL kit)는 Amersham사(Buckinghamshire, England)에서 구입하여 사용하였다.

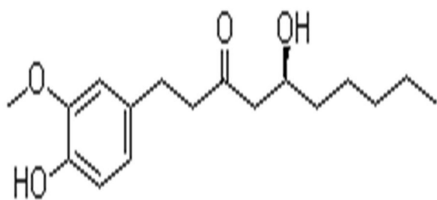


Figure 1. Chemical structure of 6-gingerol.

2. 방법

1) 세포배양

인간 전립선암 세포주 DU145는 America Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA)에서 구입하였다. DU145 세포는 37°C, 5% CO₂, 배양기에서 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 포함된 RPMI-1640 (Gibco/BRL, USA) 배양액으로 배양하였다. 세포가 80~90% 정도 증식하면, phosphate buffered saline solution (PBS)으로 2번 씻어내고 trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 모은 후 계대배양하고 배지는 2~3일마다 교환하였다.

2) 세포독성실험 (Clonogenic assay)

DU145 세포를 각각 1×10^3 cells/ml이 되도록 60-well plate에 분주하여 48시간 배양 후 6-gingerol을 시간별로 처리한 배양액에서 12, 24, 및 48시간 동안 각각 배양하고 난 후, 새 배양액으로 교환한 후 2주 동안 배양기에서 배양을 하였다. 그 후 PBS로 두 번 세척한 후, 100% methanol 용액에서 20분간 고정시켰다. 1% crystal violet 용액으로 염색한 후 PBS로 여러번 세척하여 상온에서 건조한 후, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) 용액으로 crystal violet을 세포에서 용해하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 세포사멸과 관련된 단백질 발현 검증 (Western blot analysis)

100 mm culture dish에 DU145 세포를 배양하여 6-gingerol을 10 µM의 농도로 12, 24 및 48시간 처리한 후에 PBS로 세척하여 스크래퍼를 이용해 세포를 모았다. 300 µl의 lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% Igepal, 2 mM EDTA, 10 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, and 0.01% protease inhibitor cocktail)를

이용하여 4℃에서 30분 동안 용해시켰다. 14,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후, 상층액을 모아 시료로 사용하였다. 단백질 정량 후, 10~15% gradient sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel에서 단백질을 분리한 후, nitrocellulose membrane에 transfer 하였다. Membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 tris-buffered saline tween-20 (TBST) buffer (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4)로 실온에서 1시간 반응한 후 알아보기 위하여 하는 단백질의 항체를 4℃에서 18~20시간 동안 반응시켰다. 다시 세척 후 2차 항체가 포함된 TBST buffer에 넣어 2차 항체와 결합하도록 실온에서 1시간 반응시켰다. ECL kit를 처리한 후 필름에 노출하여 현상하였다.

4) Caspase-3 활성 측정

세포사멸을 유도하는 Caspase-3는 cystein proteinase family로써 활성화되어 기질 결합체인 DEVD-pNA를 분해하므로 이러한 성질을 이용하여 pNA의 푸른빛으로 활성 정도를 측정할 수 있다. 6-gingerol을 처리하여 배양한 DU145 세포를 2×10^6 cell/ml로 맞추어 1,500 rpm으로 원심분리하여 얻은 세포에 차가운 lysis buffer 50 μ l씩 첨가하여 10분간 얼음 위에 방치시킨 후 4℃, 1,500 rpm으로 원심분리하여 상층액을 취한 후 50 μ l씩 96 well plate에 담아 2×reaction buffer/dithiothreitol (DTT) 용액을 첨가하여 37℃, CO₂ 배양기에서 30분간 배양하였다. 30분 후에 caspase-3 기질을 첨가하여 1시간 동안 다시 배양기에서 배양한 후, ELISA기에서 파장 405 nm로 흡광도를 측정하여 실험군의 활성을 대조군에 대한 상대적인 활성 정도로 표시하였다.

5) Hoechst 33342 및 Immunofluorescent 염색

세포핵의 형태학적 변화를 조사하기 위해 시약 처리한 세포를 4% 포름알데히드 용액 (formaldehyde)에서 20분간 고정시킨 후 PBS로 2회 세척하고 0.2% triton X-100을 10분간 처리하여 세포막을 변화시킨 후, 1% bovine serum albumin (BSA)로 상온에서 1시간 동안

blocking 하였다. RelA 항체를 2시간 동안 반응시킨 후, TBST buffer로 3번 세척한 후, fluorescence-conjugated secondary 항체를 1시간 동안 반응하였다. Hoechst 33342 염색약을 생리식염수에 희석하여 10분 염색한 후 다시 생리식염수에 희석하여 형광현미경 (Zeiss axiovert LSM510 microscope, Germany)으로 관찰하였다.

6) 소포체만 선택적 염색 (ER Tracker Blue-White DPX staining)

ER Tracker Blue-White DPX를 이용하여 살아있는 소포체만 선택적으로 염색하는 시약을 이용하였다. 전립선암 세포에 48시간 동안 6-gingerol에 방치한 후, 배지를 제거하여 새로운 배지에 ER Tracker Blue-White DPX 1 μ M을 첨가하여 37°C에서 30분간 배양하였다. PBS로 2회 씻어준 후 4% 포름알데히드 용액으로 상온에서 고정시킨 후 형광현미경을 이용하여 측정하였다.

7) 프로모터 활성 측정 (Luciferase assay)

NF- κ B 프로모터를 pGL-vector (Invitrogen, USA)에 클로닝을 하였다(<http://www.genomatix.de>). DU145 세포에 0.8 μ g DNA를 lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA)으로 transfection한 후, 6-gingerol을 24시간 동안 처리한 후, 100 μ l lysis buffer (1% triton X-100, glycyglycine, MgSO₄, EGTA) 첨가하여 1,500 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 취한 후 20 μ l씩 96 well plate에 넣어 프로모터 활성을 측정하였다.

8) mRNA 분리 및 Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

TRIZOL 시약 (Invitrogen, USA)을 이용해서 세포를 수확한 다음 전체 RNA 분리하였다. TRIZOL 1 ml에 chloroform 200 μ l를 추가하여 혼합하였다. 시료를 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 새로운 시험관으로 옮겼다. 상층액만 취한 후, 500 μ l isopropanol을 섞어서

4℃에서 1시간 보관하였다. 14,000 rpm에서 30분간 원심분리한 다음 상층액을 제거하고 70% ethanol/diethylenePyrocarbonate (DEPC) 용액으로 세척한 후 건조시켰다. cDNA kit (Fermentas, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 Ex Taq polymerase (TaKaRa, Japan)를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. Primer 구성은 다음과 같다.

Primer	Forward sequence	Reverse sequence
GRP78	5'-GCTCGACTCGAATTCCA AAG-3'	5'-TTTGTCAGGGGTCTTTC ACC-3'
CHOP	5'-CAACTGCAGAGAATTCA GCT-3'	5'-ACTGATGCTCTAGATTG TTC-3'
XBP1	5'-CCTTGTTAGTTGAGAACC AGG-3'	5'-GGGGCTTGGTATATATG TGG-3'
β-actin	5'-GTTTGAGACCTTCAACA CCC-3'	5'-GTGGCCATCTCCTGCTC GAA-3'

9) 통계처리

본 연구의 실험은 독립적으로 3번 이상 실시하였으며, 얻어진 결과는 SAS 프로그램을 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차로 기술하였다. 실험군 간의 유의성 차이는 ANOVA 분석 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하여 검증하였다.

III. 결 과

1. 세포사멸 측정

1-1. 전립선암 세포의 생존율 측정

Fig. 2 에서와 같이 6-gingerol이 전립선암 생존율에 어떠한 영향을 미치는지 실험하였다. 6-gingerol을 0, 5, 10, 및 20 μM 를 처리하였을 때 10 μM 에서 세포 생존율이 50%를 유지하여 모든 실험에는 10 μM 를 사용한다 (not shown data). DU145 세포에 6-gingerol 10 μM 을 12, 24, 및 48시간을 처리하여 세포 생존율을 clonogenic 분석을 통하여 측정하였다. 대조군은 DMSO만 사용하였다. 전립선암 세포에서 6-gingerol 투여에 의하여 시간 의존적으로 세포 생존율이 감소함을 볼 수 있었다.

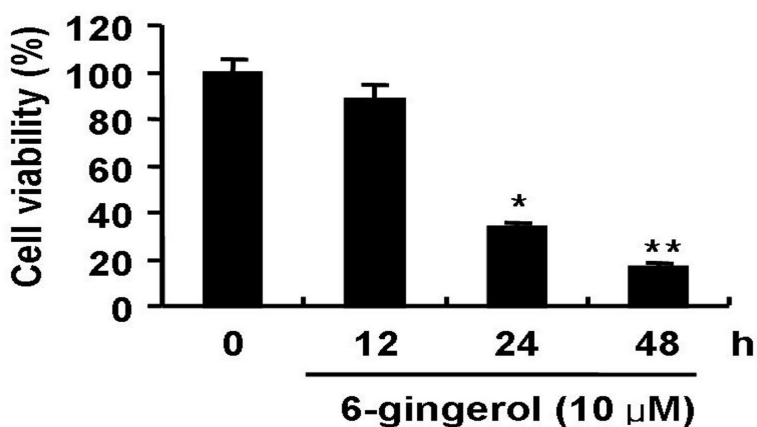


Figure 2. Effect of 6-gingerol on the cell viability in DU145 cells. The cell viability was measured by clonogenic assay.

1-2. 세포사멸에 관련된 단백질 발현 측정

세포사멸에 관련된 단백질 발현에 양을 측정하기 위해서 Western blot 분석을 실시하였다. DU145 세포에 6-gingerol을 12, 24, 및 48 시간 처리하였을 때, cleaved caspase-3, caspase-4, 그리고 PARP 단백질 발현이 시간 의존적으로 현저하게 증가하였다(Figure 3). Caspase-4는 소포체 스트레스에 의해 유도되어진 세포사멸에 관련된 caspase family로서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 6-gingerol 처리시 소포체 스트레스가 발생되어지고 이때 caspase-4가 발현이 되어 세포사멸을 유도되어진다. β -actin은 loading control로 이용하였다.

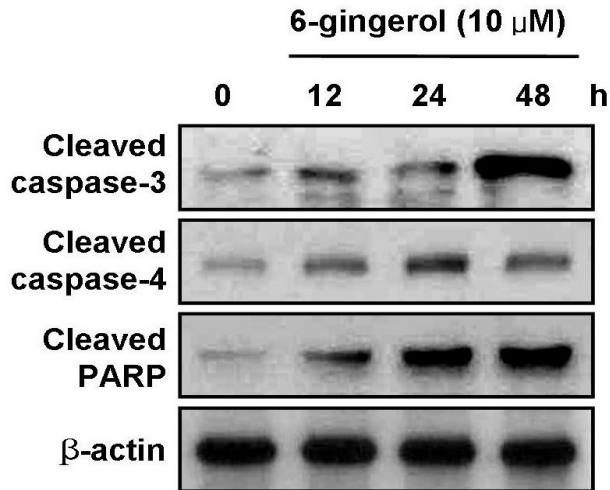


Figure 3. Time-dependent effect of 6-gingerol on caspase-3, caspase-4 and PARP cleavage in DU145 cells. Western blot analysis for the evaluation of proteins involved in apoptotic cell death the expression levels of caspase-3, caspase-4, and PARP cleavage.

1-3. 세포사멸에 관련된 Caspase-3 활성 측정

세포사멸의 마지막 단계인 Caspase-3은 cystein kinase의 일종으로 세포사멸에 관여하는 caspase family 14종 중의 하나이며 세포사멸의 중요한 역할을 한다. 이에 caspase-3의 활성을 측정한 결과 6-gingerol을 처리해주었을 때 유의적인 증가를 보여, 이 농도에서 세포사멸을 유도하는 것으로 나타났다(Figure 4).

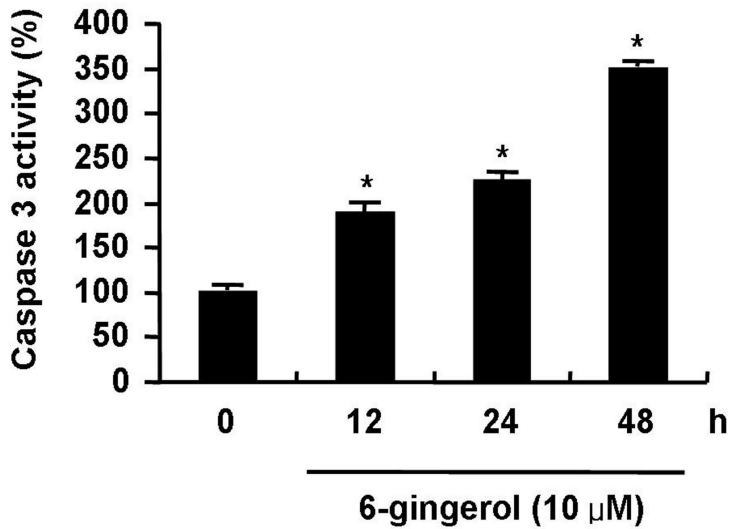


Figure 4. Effect of 6-gingerol on caspase-3 activities in DU145 cells.

1-4. 세포사멸에 관련된 Hoechst 33342 염색

세포사멸의 형태학적 관찰을 위해서, 세포의 핵을 Hoechst 33342로 염색을 하였다. 6-gingerol을 처리한 군에서 핵이 여러 조각으로 분절된 형광절편이 관찰되었다(Figure 5).

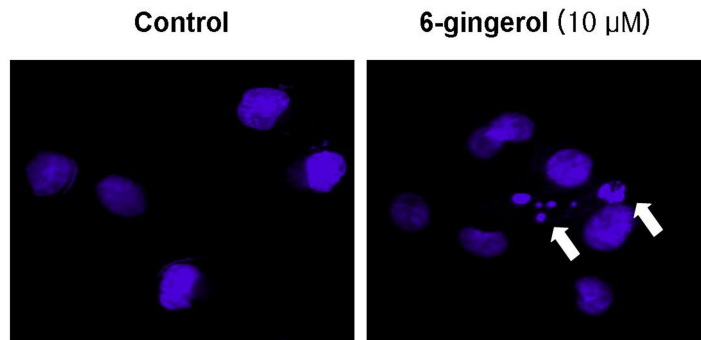


Figure 5. The nuclei of the cells with 6-gingerol showing the typical apoptotic morphology of fragmentation and condensation after staining with Hoechst 33342.

2. 소포체 스트레스 측정

2-1. 소포체 스트레스에 관련된 단백질과 mRNA 발현 측정

6-gingerol이 전립선암에 소포체 스트레스를 유도하는지 실험하였다. DU145 세포에 6-gingerol 10 μ M을 12, 24, 및 48시간을 처리하여 소포체 스트레스에 관련된 단백질과 mRNA 발현을 Western blot과 RT-PCR를 통하여 측정하였다. 전립선암 세포에서 6-gingerol 투여에 의하여 GRP78과 CHOP 단백질 및 mRNA 유전자 발현이 시간 의존적으로 증가됨을 볼 수 있었다(Figure 6).

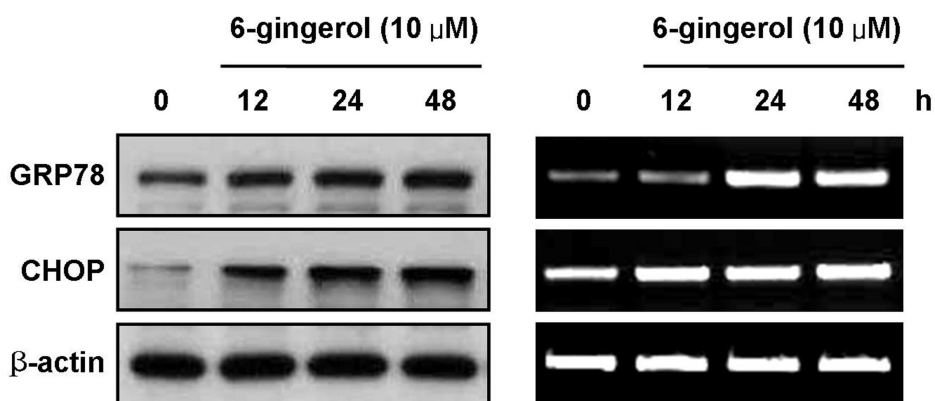


Figure 6. Effect of 6-gingerol on the ER stress in DU145 cells. The protein expression of cells was measured by Western blot and RT-PCR.

2-2. 소포체만 선택적 염색

ER Tracker Blue-White DPX를 이용하여 살아있는 소포체만 선택적으로 염색하는 시약을 사용하였다. DU145 세포에 6-gingerol을 48시간 처리하였을 때, 대조군에 비해서 6-gingerol을 처리한 군에서 ER Tracker Blue-White DPX 염색이 현저하게 증가하는 것을 볼 수 있었다 (Figure 7).

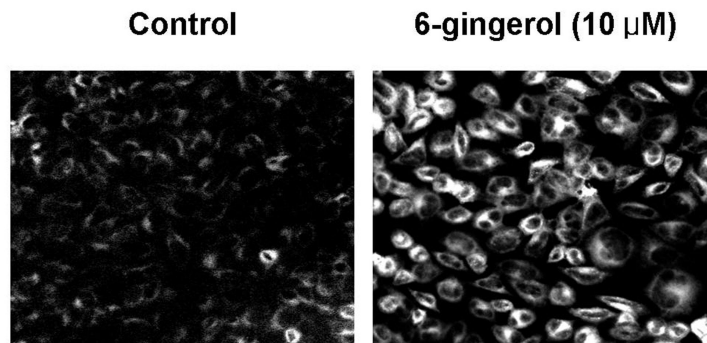


Figure 7. Immunofluorescent analysis of tubular cells with 6-gingerol for 48 h using the fluorescent dye ER Tracker Blue-White DPX, which specifically localizes inside the ER lumen.

2-3. XBP-1 mRNA 분할 측정

Inositol-requiring enzyme 1 (IRE1)은 X box-binding protein-1 (XBP-1) mRNA를 분할(splicing)시켜 활성이 있는 XBP-1 단백질로 발현될 수 있도록 한다(25~27). XBP-1은 bZIP 단백질에 속하는 전사인자로 소포체 스트레스에 의해 발현이 증가하는 유전자의 전사촉진자(promoter) 부위인 ER stress response element (ERSE)와 결합하여 전사활성을 유발한다(25). DU145 세포에 6-gingerol 10 μ M을 12, 24, 및 48시간 처리하였을 때, XBP-1 mRNA를 분할(splicing)이 시간 의존적으로 증가함을 확인하였다(Figure 8).

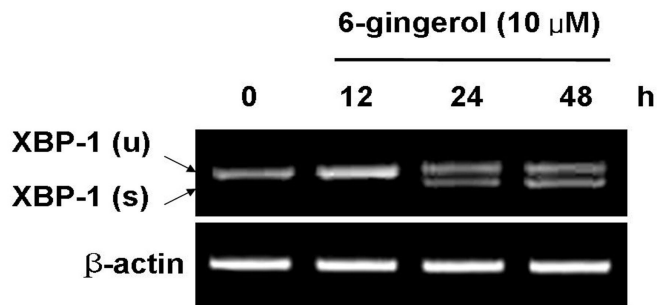


Figure 8. Effect of 6-gingerol on the ER stress in DU145 cells and RT-PCR analysis of XBP-1 mRNA splicing.

3. 소포체 스트레스 경로 차단 후 6-gingerol 효과 측정

3-1. 소포체 스트레스 차단 후 세포사멸에 관련된 단백질 발현 측정

병합요법에 의한 세포사가 세포사멸 기전에 의해 매개되었는지 여부와 이러한 세포사멸에 소포체 스트레스가 관여하였는지 여부를 알아보기 위해 세포사멸의 특징에 관련된 단백질 발현을 확인하였다. 4-phenyl butyric acid (PBA)는 화학적 샤페론으로써 소포체 폴딩을 향상시켜주고 단백질 형태를 안정화시켜 준다고 알려져 있다(35). DU145 세포에 PBA 20 mM을 1시간 전에 전처리한 후, 6-gingerol을 48시간 동안 처리하여 세포사멸에 관련된 단백질 발현을 Western blot으로 측정하였다(Figure 9A와 9B). 6-gingerol을 단독처리한 군에서는 caspase-3, caspase-4, PARP, GRP78, p-eIF2 α , 그리고 CHOP 단백질 모두 증가하였으나, 병합요법시에는 세포사멸에 관련된 단백질 발현이 모두 감소함을 확인하였다.

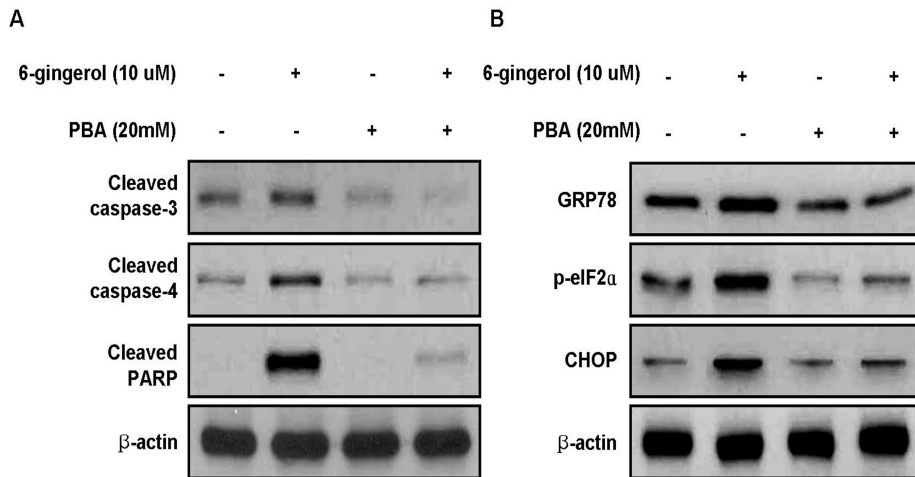


Figure 9. The combination treatment of PBA and 6-gingerol induced the cleavage of caspase-3, caspase-4, PARP, GRP78, p-eIF2 α , and CHOP in DU145 cells and Western blot analysis for the evaluation of proteins involved in apoptotic cell death.

3-2. 소포체 스트레스 차단 후 Caspase-3 활성 측정

세포사멸의 마지막 단계인 caspase-3 활성도를 측정하였다. 이에 caspase-3의 활성을 측정한 결과 6-gingerol을 처리해 주었을 때 유의적인 증가를 보였으나, 병합요법시에는 6-gingerol 단독요법시보다 감소함을 확인하였다(Figure 10).

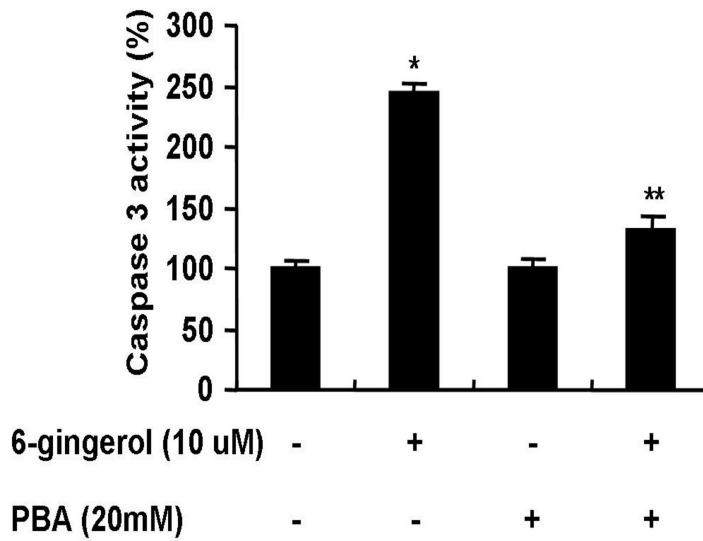


Figure 10. Effect of 6-gingerol on caspase-3 activities in DU145 cells to combination PBA.

3-3. 소포체 스트레스 차단 후 전립선암 세포의 생존율 측정

PBA와 6-gingerol이 전립선암 생존율에 어떠한 영향을 미치는지 실험하였다. DU145 세포에 PBA 20 mM을 1시간 전에 전처리한 후, 6-gingerol 10 μ M을 48시간 처리하여 세포 생존율을 clonogenic 분석을 통하여 측정하였다. 전립선암 세포에서 6-gingerol 투여에 의하여 시간 의존적인 세포 생존율이 감소함을 볼 수 있었으나 병합요법 시에는 증가함을 확인하였다(Figure 11).

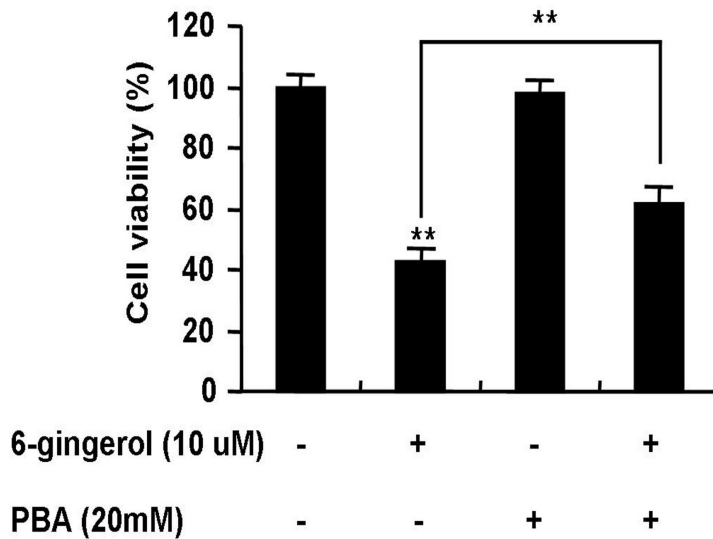


Figure 11. Effect of 6-gingerol on the cell viability in human prostate cancer cells to combination PBA. The cell viability was measured by clonogenic assay.

4. NF- κ B 신호전달 측정

4-1. NF- κ B 프로모터 측정

세포사멸 과정에서 NF- κ B가 중요한 지표가 된다고 보고가 되어 6-gingerol이 NF- κ B와 매개되었는지 여부를 확인하기 위해서 NF- κ B 프로모터 측정을 하였다(Figure 12). DU145 세포에 6-gingerol을 5, 10 μ M을 48시간 동안 처리하였다. 농도 의존적으로 NF- κ B 프로모터 측정이 증가함을 확인하였다.

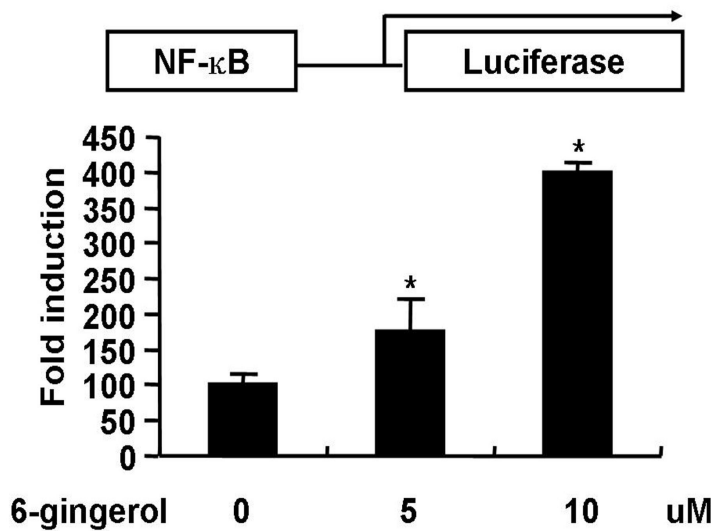


Figure 12. DU145 cells were transiently transfected with NF- κ B promoter/luciferase construct together with an increasing amount of 6-gingerol.

4-2. 소포체 스트레스에 의한 NF- κ B 프로모터 측정

소포체 스트레스에 의한 NF- κ B 프로모터 측정에 관련성을 확인하기 위해서 PBA 20 mM를 1시간 전에 전처리한 후, 6-gingerol을 48시간 동안 처리하였다. 병합요법에 의해 단독요법을 처리한 군보다 감소함을 확인하였다(Figure 13).

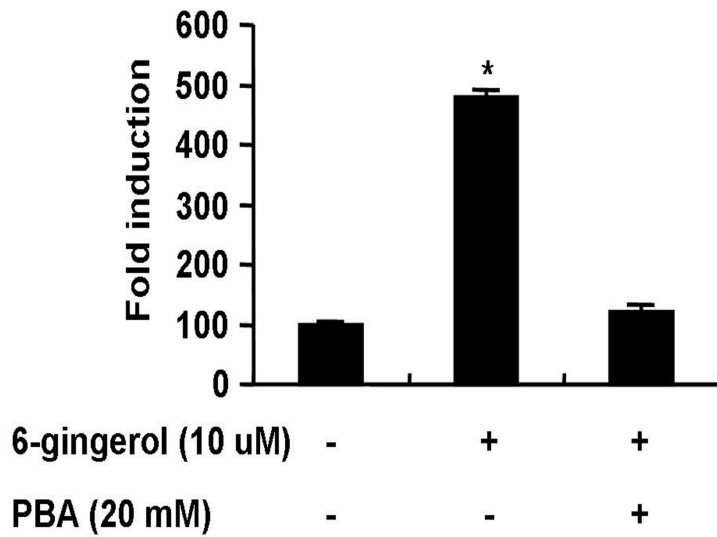


Figure 13. Effect of 6-gingerol on NF- κ B promoter/luciferase construct in DU145 cells to combination PBA.

IV. 고 찰

항암제에 의한 암세포의 사멸이 일부는 세포사멸에 의하여 매개됨이 밝혀지면서, 이에 대한 생화학적 그리고 분자생물학적인 접근이 활발히 이루어지고 있다. 한편 식생활과 암발생률 등의 관계와 관련하여, 전 세계적으로 식용이나 약용 및 향신료 등으로 널리 이용되고 있는 생강의 역할을 암과 관련하여 추정해 볼 수 있다. 실제로 암은 우리가 섭취하는 음식과 관련이 있으며 암 발생률이 음식문화가 다른 지역에 따라 각기 차이가 있는 것도 음식과 관련성을 뒷받침한다. 음식에는 암 발생을 억제하는 물질들이 많이 들어 있으며 최근 연구들을 통해 특히, 과일 및 채소 등의 섭취가 특정 암의 발생률과 반비례한다는 증거들이 밝혀지고 있다(3, 36).

생강(*Zingiber officinale* Roscoe)은 생강과에 속하는 다년생 식물의 근경으로 아열대와 열대지역에서 자라며(4, 5), 한의학에서는 건위제, 구토, 복통, 설사 등의 치료제 및 살균제로 이용되고 있다(6). 생강의 약리효능에 관한 연구로는 생강추출물인 gingerol의 DNA 손상 억제 작용(7), 종양억제 및 소염 작용(8, 9), 체내 지질저하 효과(6), 항산화제로서의 작용 및 항균작용(10) 등이 보고되어 있다. Gingerol은 플라보노이드를 함유한 흰색 채소에 속하므로 폐경을 앞둔 갱년기 여성에게 도움이 되며, 여성들의 건강을 지키는데 큰 도움을 줄 수 있다고 보고되었으며(35, 36), phorbol ester로 유도된 마우스 피부의 COX-2 발현에 대한 6-gingerol의 억제 기전 연구가 이루어져 COX-2 발현억제에 6-gingerol이 영향을 미치는 것이 알려졌다(37). 생강의 성분에는 비휘발성의 매운맛 성분인 oleoresin인 gingerol, shogaol, dehydrogingerone 등을 함유하고 있다. 이 중에 gingerol은 o-methoxy phenolic 추출물 유도체로 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol 등이 존재한다(11). 지금까지 6-gingerol이 암에 미치는 효과에 대하여 보고된 것들을 살펴보면, 변형 P53이 발현된 췌장암 세포의 증식을 억제한다고 보고되었다(12). 그 밖에도 위암 세포의 6-gingerol에 의한 생존율 감소(13)와 6-gingerol이 결장암 세포의 증식을 억제하고 세포 사멸을 유도한다고 알려졌다(14). 이와 같은 보고를 바탕으로 전립선암 세포에서 6-gingerol의 항암효과를 실험한

결과, 6-gingerol이 인간 전립선암 세포에서 시간에 의존적인 세포사멸을 유도하여 항암효과를 일으킨다는 것을 본 연구에서 밝혀냈다(Figure 2).

세포사멸 조절기전에 중요한 미토콘드리아에 대한 최근 보고에 의하면 Bcl-2 family 단백질에 의해 조절되는 cytochrome c는 미토콘드리아에서 세포질로 방출되고, 이어서 caspase-8 protease와의 결합을 통해 그 활성이 조절되어 하부 caspase-3 protease를 활성화시켜 세포사멸 현상을 유도한다(40, 41). Bcl-2 family 단백질 중 세포사멸을 억제하는 Bcl-2 나 Bcl-xL 단백질 등은 세포사멸 촉진 단백질과 heterodimer를 형성하거나 암세포에서 항암제 처리시 인산화되어 그 기능을 상실하게 된다. 그러나 Bax, Bak, Bid 등의 세포사멸 촉진 단백질은 미토콘드리아로 이동하여 cytochrome c를 방출할 수 있는 세공(pore)을 형성하기도 한다. Caspase-3에 의해서 발현과 활성이 조절되는 PARP는 DNA 손상이 적을 경우, 핵에서 손상된 부위 주위에 있는 단백질을 PARP 폴리머로 표지하여 손상을 복구하도록 도와 세포의 생존에 관여한다. 그러나 손상이 너무 심한 경우에는 PARP의 활성이 과다하게 높아져 기질을 급격히 소비하여 세포사멸을 유도한다. PARP의 활성은 많은 에너지를 소모하는 반응으로 세포 내의 생화학적 반응의 주요 원인 NAD의 고갈은 해당 작용과 미토콘드리아의 산화적 인산화 과정을 저해하여 세포 내의 에너지 고갈을 불러와 에너지를 필요로 하는 많은 세포 내 기능이 정지되고, PARP가 cleavage 되어 세포사멸이 유도된다고 알려져 있다(42).

본 연구에서, 전립선암 세포에 6-gingerol (10 μ M)을 12, 24, 및 48시간을 처리하였을 때, cleaved caspase-3, cleaved caspase-4, 그리고 cleaved PARP 단백질 발현이 시간에 의존적으로 현저하게 증가하였다(Figure 2). 세포사멸의 마지막 단계인 caspase-3은 cystein kinase의 일종으로 세포사멸에 관여하는 caspase family 14종 중의 하나이며 세포사멸의 중요한 역할을 한다. 이에 caspase-3의 활성을 측정된 결과 6-gingerol을 처리해 주었을 때 유의적인 증가를 보여, 이 농도에서 세포사멸을 유도하는 것으로 나타났다(Figure 4).

소포체 스트레스 반응으로 세포가 소포체 스트레스를 극복하지 못하면 세포사멸 과정이 작동한다. 소포체 스트레스가 발생하는 동안 여러 가지 세포사멸 경로가 활성화되는데 C/EBP 가족에 속하는 C/EBP homologous protein (CHOP) 유전자의 활성화에 의한 세포사멸이 대표적인 예이다. CHOP 유전자의 전사활성은 소포체 스트레스 반응 시 나타나는 상위의 신호전달체

계인 PERK, ATF6 및 Ire1의 조절을 받는다. CHOP 유전자가 결손(CHOP knock out)된 세포는 소포체 스트레스에 의한 세포사멸에 저항적(43, 44)이며 반대로 CHOP 유전자를 과발현시키면 세포사멸이 촉진된다(45). CHOP 이외에도 소포체 막에 존재하는 시스테인 단백질 분해효소(ER-membrane proapoptotic cysteine protease)인 caspase-12와 c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) 경로가 소포체 스트레스에 의한 세포사멸을 유도하기도 한다. 전립선암에서 6-gingerol을 처리하였을 때, 대조군에 비해서 6-gingerol을 처리한 군에서 ER Tracker Blue-White DPX 염색이 현저하게 증가하는 것을 볼 수 있다(Figure 7). IRE1은 XBP-1 mRNA를 분할(splicing)시켜 활성이 있는 XBP-1 단백질로 발현될 수 있도록 한다(25~27). XBP-1은 bZIP 단백질에 속하는 전사인자로 소포체 스트레스에 의해 발현이 증가하는 유전자의 전사촉진자(promoter) 부위인 ER stress response element (ERSE)와 결합하여 전사활성을 유발한다(25). 전립선암 세포에 6-gingerol 처리하였을 때, XBP-1 mRNA 분할(splicing)이 시간 의존적으로 증가함을 확인하였다(Figure 8). 또한, 세포사멸 과정에서 NF- κ B가 중요한 지표가 된다고 보고가 되어 6-gingerol이 NF- κ B와 매개되었는지 여부를 확인하기 위해서 NF- κ B 프로모터 측정을 하였다(Figure 11). 전립선암 세포에 6-gingerol을 처리하였을 때, 농도 의존적으로 NF- κ B 프로모터 발현이 증가됨을 확인하였다.

본 연구에서는 6-gingerol이 인간 전립선암 세포에서 모두 정상상피 세포보다 암 세포에서 6-gingerol의 처리 농도와 시간이 증가할수록 세포사멸이 증가하는 것을 관찰하였으며, 세포사멸을 유도하는 caspase-3 역시 6-gingerol에 의해서 발현이 증가하였다. Caspase-3의 활성이 증가함에 따라 세포사멸이 더욱 진행되면서 PARP의 분절을 확인하였다. 이러한 결과들로 미루어 볼 때, 인간 전립선암 세포에서 6-gingerol이 암세포의 사멸을 명확히 유도하는 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 기존의 알려진 항암치료제가 많은 부작용을 지니고 있어 효능이 탁월한 물질을 개발하고 그 기전을 확인하기 위해 새로운 식물추출물인 6-gingerol을 전립선암 세포에서 연구하였다. Cell viability를 확인하기 위해서 clonogenic assay 결과 전립선암 세포에서 세포사멸을 유도하였고, 그 기전을 확인하기 위해서 Western blot으로 cleaved-caspase 3/4, PARP 단백질이 발현됨을 확인하였다. 또한 소포체 스트레스 확인을 위해 소포체 스트레스 마커인 ER Blue-White DPX 염색을 통해 소포체가 발현이 되었음을 확인하였고 GRP78, CHOP, p-eIF2 α , splicing XBP-1이 발현되었다. 또한 소포체 스트레스를 개선시켜주는 PBA 처리시 소포체 스트레스 마커들이 모두 줄어들음을 확인하였고, 6-gingerol 처리시 NF- κ B 또한 증가하였으나 PBA를 복합처리하였을 때, 감소됨을 확인하였다.

식물추출물은 많은 장점을 가진 의약품 재료이다. 개발에 있어서 적은 시간을 투자하여 엄청난 경제적 부가가치를 창출해낼 수 있으며, 안전성이나 부작용면에서도 우수하다. 또한 이용할 수 있는 식물 자원이 풍부하고 다양하다는 것도 장점이 될 수 있다. 식물추출물을 이용한 의약품의 특허출원은 증가 추세에 있으며, 암과 같은 난치병 치료제와 같은 분야에서 개발이 활발하게 이루어질 것으로 전망되고 있다. 이러한 경향으로 보아 6-gingerol 등의 생강과 같은 천연물을 이용한 항암제 개발이나 항암제의 치료 보조제의 개발도 가능할 것이라 사료되며, 6-gingerol과 같은 식물추출물들의 여러 효능에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것이다.

VI. 참고문헌

1. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst.* 66: 1191-1308, 1981.
2. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Rev Cancer.* 3: 768-780, 2003.
3. 이정희. 천연물 특허의 출원 및 기술동향. *YOUME NEWS.* 38호, 2001.
4. Shadmani A, Azhar I, Mazhar F, Hassan MM, Ahmed SW, Ahmad I, Usmanghani K, Shamim S. Kinetic studies on *Zingiber officinale*. *Pak J Pharm Sci.* 17: 47-54, 2004.
5. Jiang H, Xie Z, Koo HJ, McLaughlin SP, Timmermann BN, Gang DR. Metabolic profiling and phylogenetic analysis of medicinal *Zingiber* species: Tools for authentication of ginger (*Zingiber officinale* Rosc). *Phytochemistry.* 67: 1673-1685, 2006.
6. Cooksley VG. *Aromatherapy.* Silver Press, Englewood Cliffs, NJ. p 349-350, 1996.
7. Kang JH, Ahn BW, Lee DH, Byun HS, Kim SB, Park YH. Inhibitory effect of ginger and galic extracts on the DNA damage. *Korean J Food Sci Technol.* 20: 287-292, 1988.
8. Katiyar SK. Inhibition of tumor promotion in SENCAR mouse skin by *Zingiber officinale* Rhizoma. *Planta Med.* 56: 1023-1030, 1996.
9. Ji WD, Jeong HC, Lee SJ, Chun YG. Antimicrobial activity and

- distilled components of galic and ginger. *J Agric Chem Biotechnol.* 40: 514-518, 1997.
10. Kim EJ, Ahn MS. Antioxidative effect of ginger extracts. *Korean J Food Cookery Sci.* 9: 37-42, 1993.
 11. Connell DW. The chemistry of the essential oil and oleoresin of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Flavour Ind.* 1: 677-693, 1970.
 12. Park YJ, Wen J, Bang S, Park SW, Song SY. [6]-Gingerol induces cell cycle arrest and cell death of mutant p53-expressing pancreatic cancer cells. *Yonsei Med J.* 47: 688-697, 2006.
 13. Ishiguro K, Ando T, Maeda O, Ohmiya N, Niwa Y, Kadomatsu K, Goto H. Gingerol ingredients reduce viability of gastric cancer cells via distinct mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun.* 362: 218-223, 2007.
 14. Lee SH, Cekanova M, Baek SJ. Multiple mechanisms are involved in [6]-gingerol-induced cell growth arrest and apoptosis in human colorectal cancer cells. *Mol Carcinog.* 47: 197-208, 2008.
 15. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 68: 251-306, 1990.
 16. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell.* 116: 205-219, 2004.
 17. Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 14: 32-43, 2007.
 18. LeeK RD, Kaklamanis L, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL. Bcl-2 in normal human breast and carcinoma, association with oestrogen

- receptor-positive, epidermal growth factor receptor-negative tumours and in situ cancer. *Br J Cancer*. 69: 135-139, 1994.
19. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8: 49-62, 2007.
 20. de Murcia G, Menissier de Murcia J. Poly (ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem Sci*. 19: 172-176, 1994.
 21. Pacher P, Szabo C. Role of the peroxynitrite poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human disease. *Am J Pathol*. 173: 2-13, 2008.
 22. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poiries GG, Earnshaw WC. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Science*. 371: 346-347, 1994.
 23. Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev*. 13: 1211-1233, 1991.
 24. Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*. 74: 739-789, 2005.
 25. Oyadomari S, Araki E, Mori M. Endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis in pancreatic β -cell. *Apoptosis*. 7: 335-345, 2002.
 26. Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*. 101: 451-454, 2000.
 27. Kaufman RJ, Scheuner D, Schroder M, Shen X, Lee K, Liu CY,

- Arnold SM. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3: 411-421, 2002.
28. Oyadomari S, Araki E, Mori M. Endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis.* 7: 335-345, 2002.
 29. Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *74:* 739-789, 2005.
 30. Harding HP, Calton M, Urano F, Novoa I, Ron D. Transcriptional and translational control in the mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 18: 575-599, 2002.
 31. Kozutsumi MY, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J. The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature.* 332: 462-464, 1988.
 32. Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem.* 273: 33741-33749, 1998.
 33. Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell.* 101: 249-258, 2000.
 34. Araki E, Oyadomari S, Mori M. Impact of endoplasmic reticulum stress pathway on pancreatic β -cells and diabetes mellitus. *Exp Biol Med.* 228: 1213-1217, 2003.

35. Welch WJ, Brown CR. Cell Stress Chaperones. *Cell*. 1: 109-112, 1996.
36. Kadnur SV, Goyal RK. Beneficial effects of *Zingiber officinale* Roscoe on fructose induced hyperlipidemia and hyperinsulinemia in rats. *Indian J Exp Biol*. 43: 1161-1164, 2005.
37. Yamahara J, Mochizuki M, Rong HQ, Matsuda H, Fujimura H. The anti-ulcer effect in rats of ginger constituents. *J Ethnopharmacol*. 23: 299-304, 1988.
38. Surh Y. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat Res*. 428: 305-327, 1999.
39. Kim SO, Kundu JK, Shin YK, Park JH, Cho MH, Kim TY, Surh YJ. [6]-Gingerol inhibits COX-2 expression by blocking the activation of p38 MAP kinase and NF-kappa B in phorbol ester-stimulated mouse skin. *Oncogene*. 24: 2558-2567, 2005.
40. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Sciences*. 91: 1501-1504, 1999.
41. Antonsson B, Martinou JC. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res*. 256: 50-57, 2000.
42. Ha HC, Snyder SH. Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 13978-13982, 1999.
43. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic

reticulum. *Genes Dev.* 12: 982-995, 1998.

44. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol.* 21:1249-1259, 2001.
45. Oydomari S, Takeda K, Takiguchi M, Gotoh T, Matsumoto M, Wada I, Akira S, Araki E, Mori M. Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic β cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:10845-10850, 2001.

저작물 이용 허락서

학 과	영양교육전공	학 번	20088151	과 정	석 사
성 명	한글: 조 희 영 한문: 趙 熙 榮 영문: Hee-young Cho				
주 소	광주시 서구 화정 4동 920-4번지(3층)				
연락처	E-MAIL : chy5581@naver.com				
논문제목	한글 : 6-Gingerol이 소포체 스트레스에 의한 인간 전립선암 세포사멸에 미치는 효과 영어 : 6-Gingerol induces Apoptosis through increase of Endoplasmic Reticulum Stress in the Prostate cancer cells				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의() 반대()

2010년 12월

저 작 자 : 조 희 영 (인)

조선대학교 총장 귀하

