

Apoptosis 유발에 의한 β -lapachone의 인체폐암세포 증식 억제에 관한 연구

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

이재훈¹ · 박 철¹ · 최병태² · 이원호³ · 최영현¹

Growth Inhibition of Human Lung Carcinoma Cells by β -lapachone through Induction of Apoptosis

Jae Hun Lee¹, Cheol Park¹, Byung Tae Choi², Won Ho Lee³ and Yung Hyun Choi¹

Departments of ¹Biochemistry and ²Anatomy, Dong-Eui University College of Oriental Medicine, Busan 614-052, Korea, ³Department of Biology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

The DNA topoisomerase I inhibitor β -lapachone, the product of a lapacho tree (*Tabebuia avellanae*) from South America, activates a novel apoptotic response in a number of cell lines. In the present report, we investigated the effects of β -lapachone on the growth of human lung in human non-small-cell-lung-cancer A549 cells. Upon treatment with β -lapachone, a concentration-dependent inhibition of cell viability and cell proliferation was observed as measured by hemocytometer counts and MTT assay. The β -lapachone-treated cells developed many of the hallmark features of apoptosis, including membrane shrinking, condensation of chromatin and DNA fragmentation. These apoptotic effects of β -lapachone in A549 cells were associated with a marked induction of pro-apoptotic Bax expression, however the levels of anti-apoptotic Bcl-2 expression were decreased in a dose-dependent manner. Accordingly, elevated amount of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 expression accompanied by up-regulation of tumor suppressor p53 was observed. By RT-PCR analyses, decrease in gene expression level of telomerase reverse transcriptase and telomeric repeat binding factor were also observed. Thus, these findings suggest that β -lapachone may be a potential anti-cancer therapeutics for the control of human lung cancer cell model.

Key Words: β -lapachone, Lung carcinoma, Apoptosis, Bax, Bcl-2

서 론

Apoptosis는 개체의 발생단계나 DNA 손상, 마이

리스 감염 등에 의한 유전적 조절 하에서 일어나는 정교한 개체의 방어기전이란 점에서 necrosis와 구별된다.¹⁾ 또한 apoptosis는 개체보존수준에서 손상된 세포들의 제거를 위한 중요한 수단이며, 세

포주기 의존적 또는 비의존적으로 동시에 일어날 수 있으나, 정상적인 세포주기의 이탈이나 세포주기 조절에 중요한 cyclin-dependent kinases (Cdks) 활성의 변화가 apoptotic cell death의 주원인이 될 수 있다.²⁾ Apoptosis의 유발에 p53이나, Bcl-2 및 Bax와 같은 유전자가 관여한다는 사실이 알려지면서 apoptosis와 연관된 분자적 기전이 최근 많이 밝혀지고 있다.^{3,4)} 그중 대표적인 것으로 Bcl-2는 apoptosis를 억제하는 반면, Bax는 과발현되었을 때 apoptosis를 유도하는데, 두 단백질은 서로 dimer를 형성하면서 cytochrome c와 같은 apoptosis 유발에 관여하는 인자들의 조절에 관여한다.^{5,6)} 또한 caspases라고 이름 붙여진 ICE/CED-like protease family 역시 apoptosis 유발에 중요한 역할을 하는데, 이들은 proenzyme 형태로 존재하다가 Bax를 포함한 apoptosis 유도를 활성화시키는 신호에 의해 활성화된 cysteine-related proteases로 되어 직접 또는 간접적으로 세포 내 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다.^{7,8)} 따라서 항암제 개발을 위한 후보물질의 암세포 apoptosis 조절관련 기전해석은 필수적으로 선행되어야 할 분야로 인식되어지고 있다.

DNA topoisomerase 활성의 억제제로 알려진 β -lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol [1,2-b]pyran-5,6-dione)은 남미지역에 서식하는 lapacho (*Tabebuia avellanedae*)라는 나무의 수피에서 처음 동정된 천연 quinone계 물질의 하나이다.⁹⁾ 이미 잘 알려진 DNA topoisomerase I 억제제인 camptothecin과는 달리, 이 물질은 topoisomerase I-cleavable complex의 유도 없이 DNA topoisomerase I의 촉매 활성을 억제하는 것으로 알려져 있다.^{10,11)} β -lapachone은 anti-carcinogenic, anti-bacterial, anti-fungal, anti-trypanocidal 및 cytotoxic activities를 포함한 많은 약리학적 작용을 가지는데,^{12~16)} 이는 reactive oxygen species (ROS)의 생성과 연관성이 있는 것으로 알려져 있다.^{11,17,18)} 이를 바탕으로 한 인체암세포 증식억제 가능성과 연관된 β -lapachone을 이용한 최근 연구보고들에서 다양한 종류의 표적 세포에서 암세포의 성장을 억제시키고 apoptosis를 일으키는 것으로 보고되어져 오고 있다.^{16,18~31)} 그러나 현재까지 몇몇 보고가 꾸준히 있어 왔음에도 불구하고 세포증식에서 β -lapa-

chone에 의한 성장억제의 분자생물학적 기전은 여전히 많은 부분이 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 이러한 β -lapachone의 항암기전 해석의 일환으로 인체 폐암세포의 성장에 미치는 β -lapachone의 영향을 조사하였다. 본 연구의 결과에 의하면 β -lapachone의 처리 농도 의존적으로 A549 폐암세포의 증식은 억제되었으며, 핵 내 apoptotic body의 형성과 DNA fragmentation 증가 현상이 뚜렷하여 apoptosis의 과정에 의하여 암세포의 사멸이 유도되는 것임을 알 수 있었다. 아울러 Bax의 발현 증가에 따른 Bcl-2의 발현 감소 및 종양억제 유전자 p53의 발현 증가와 연관된 Cdk inhibitor p21의 발현 증가 현상이 β -lapachone에 의한 증식억제 및 apoptosis 유발에 주요한 요인으로 작용함을 알 수 있었다.

재료 및 방법

1) 암세포의 배양 및 β -lapachone의 처리

본 실험에 사용한 A549 인체 폐암세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며 RPMI-1640 배지를 이용하여 5% CO₂, 37°C의 조건하에서 배양하였다. β -lapachone은 Biomol (Plymouth Meeting, PA, USA)에서 구입하였으며 이를 순수 alcohol에 녹여 10 mM의 stock 용액으로 제조한 뒤 -20°C에 보관하여 적정 농도로 배지에 희석하여 처리하였다.

2) 암세포의 성장억제 및 형태적 변화 관찰

준비된 암세포를 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 후, β -lapachone을 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 48시간 처리 후, trypsin을 처리하고 phosphate-buffered saline (PBS)로 수세하였다. 이를 trypan blue로 염색한 뒤 hemacytometer를 이용하여 살아 있는 세포의 수를 정상 배지에서 자란 암세포와 비교하였다. 또는 β -lapachone이 처리된 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 시약을 0.5 mg/ml 농도가 되도록 성장배지로 희석하여 2 ml씩 분주하여 3시간 동안 배양한 다음, MTT 시약을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)를 첨가하여 well에 생성된 formazin을 녹인

후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) DAPI 염색을 통한 핵의 관찰

β -lapachone에 의한 암세포의 apoptosis 유발 여부를 확인하기 위한 핵의 형태변화 관찰을 위하여 β -lapachone이 처리된 세포들을 PBS로 수세하고 3.7% paraformaldehyde로 상온에서 10분간 고정시킨 후 형광 염색물질인 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) 용액을 이용하여 10분간 염색하였다. 이들 세포를 다시 PBS로 2회 수세한 후 fluorescence microscope를 이용하여 핵의 형태변화를 정상군과 비교하였다.

4) DNA fragmentation 분석

준비된 세포를 PBS로 수세한 후 apoptotic DNA Ladder Kit (Roche Molecular Biochemical, Mannheim, Germany)를 사용하여 DNA fragmentation 현상 여부를 조사하였다. 즉 binding/lysis buffer를 이용하여 세포 내의 단백질을 지질을 녹여낸 다음, ethanol이 함유된 washing buffer를 이용하여 수차례 씻어내고, elution buffer로 DNA fragments를 얻어내었다. 얻어낸 DNA는 적당량의 DNA loading buffer와 섞어 1% agarose (Sigma) gel을 이용하여 120 V 조건하에서 전이시킨 후, gel을 ethidium bromide (EtBr, Sigma) 용액으로 염색하여 UV-transilluminator로 DNA fragment의 여부를 관찰하였다.

5) Reverse transcription-PCR 분석

동일한 조건에서 준비된 암세포를 대상으로 RNAzol B (TEL-TEST, Inc., Texas, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase를 이용하여 2 μ g의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 사용하여 관찰 대상 유전자를 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였다(Table 1). 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 EtBr로 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

6) 전기영동 및 Western blotting

정상 및 β -lapachone이 처리된 배지에서 자란 세포들을 lysis buffer로 용해한 후, 고속원심분리로 세포 내 잔사물을 분리시킨 후 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 10% skin milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 4°C에서 1시간 이상 incubation하면서 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하였다. 그리고 특정 단백질에 대한 항체를 membrane에 적용시켜 항원 항체 반응을 일으킨 후, PBS-T로 씻어내고 특정 항체에 대한 이차 항체 반응을 실시한 후 enhanced chemiluminescent (ECL) 용액(Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 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-rabbit immunoglobulin 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다.

결과 및 고찰

1) 암세포의 성장에 미치는 β -lapachone의 영향

A549 인체 폐암세포의 성장에 미치는 β -lapachone의 영향을 알아보기 위하여 48시간동안 β -lapachone을 처리한 후 살아있는 세포를 hemacytometer를 이용하여 조사해본 결과, Fig. 1A에서처럼 β -lapachone의 처리농도 의존적으로 암세포의 증식이 억제되었다. 이는 Fig. 1B에 나타낸 파와 같은 MTT assay에 의한 결과와도 유사한 경향성이었음을 알 수 있었다. 특히 3 μ M 이상의 β -lapachone 처리군에서는 50% 이상의 세포증식 억제 효과가 있었으며, 이는 다른 종류의 전립선 암세포,^{16,19~22)} 신경교종,²³⁾ 간암세포,²⁴⁾ 백혈병세

Table 1. Gene-specific primers for RT-PCR

Gene name		Sequence
Bax	Sence	5'-ATG-GAC-GGG-TCC-GGG-GAG-3'
	Antisence	5'-TGG-AAG-AAG-ATG-GGC-TGA-3'
Bcl-X _{S/L}	Sence	5'-CAG-CTG-CAC-CTG-ACG-3'
	Antisence	5'-GCT-GGG-TAG-GTG-CAT-3'
Bcl-2	Sence	5'-CAG-CTG-CAC-CTG-ACG-3'
	Antisence	5'-GCT-GGG-TAG-GTG-CAT-3'
p53	Sence	5'-GCT-CTG-ACT-GTA-CCA-CCA-TCC-3'
	Antisence	5'-CTC-TCG-GAA-CAT-CTC-GAA-GCG-3'
p21	Sence	5'-CTC-AGA-GGA-GGC-GCC-ATG-3'
	Antisence	5'-GGG-CGG-ATT-AGG-GCT-TCC-3'
hTERT ^a	Sence	5'-AGC-CAG-TCT-CAC-CTT-CAA-CC-3'
	Antisence	5'-GTT-CTT-CCA-AAC-TTG-CTG-ATG-3'
hTEP-1 ^b	Sence	5'-TCA-AGC-CAA-ACC-TGA-ATC-TGA-G-3'
	Antisence	5'-CCC-CGA-GTG-AAT-CTT-TCT-ACG-C-3'
hTR ^c	Sence	5'-TCT-AAC-CCT-AAC-TGA-GAA-GGG-CGT-AG-3'
	Antisence	5'-GTT-TGC-TCT-AGA-ATG-AAC-GGT-GGA-AG-3'
c-myc	Sence	5'-AAG-ACT-CCA-GCG-CCT-TCT-CTC-3'
	Antisence	5'-GTT-TTC-CAA-CTC-CGG-GAT-CTG-3'
GAPDH ^d	Sence	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	Antisence	5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

^atelomerase reverse transcriptase

^btelomerase-associated protein

^ctelomeric repeat binding factor

^dglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

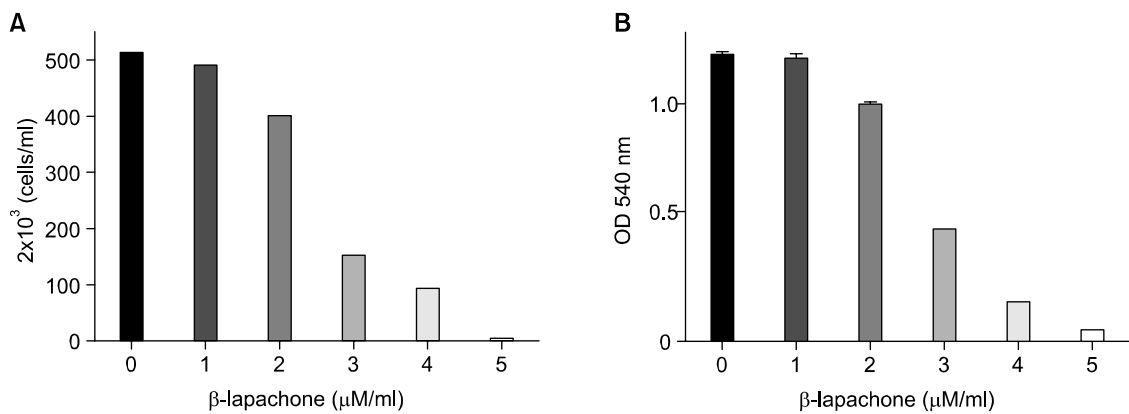


Fig. 1. Anti-proliferative effects of β -lapachone treatment in A549 human lung carcinoma cells. A549 cells were seeded and treated with β -lapachone at different concentrations for 48 h. (A) The viable cells were counted after β -lapachone treatment by hemacytometer counts of trypan blue-excluding cells. Results are expressed as average from two separate experiments. (B) After 48 h incubation with β -lapachone, MTT assay was performed. Results are expressed as average from two separate experiments.

포,^{18,25,26} 대장암세포^{27,28} 및 유방암세포^{29~31} 등 대부분의 암세포에서 나타난 결과들과 유사하였다.

2) β -lapachone에 의한 암세포의 형태변화 및 apoptosis의 유발

β -lapachone의 처리에 따른 A549 폐암세포의 증식억제과정에서 암세포의 전체적인 형태변화를 관찰하기 위하여 48시간 동안 β -lapachone을 처리한 후 위상차 현미경을 이용하여 조사한 결과는 Fig. 2A에 나타낸 바와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 β -lapachone이 함유된 배지에서 자란 세포는 β -lapachone 처리 농도 의존적으로 전체적으로 세

포질이 응축되면서 배양접시의 바닥에 낮게 부착되는 듯한 모습을 보였다. 또한 세포의 모양이 길어지면서 돌기와 같은 형태가 분지를 이루기 시작하면서 membrane shrinking 및 세포의 rounding up 현상 등 매우 심한 세포의 형태적 변형을 초래하였으며 3 μ M 농도에서 거의 모든 세포들이 부착력을 상실하여 배지 위로 부유되는 현상을 관찰할 수 있었다. 이는 정상 전립선 상피세포에서 관찰된 dendrite 형태와 비슷한 구조를 형성하는 것과는 매우 대조적인 양상이었으나,¹⁵ 선행 연구의 결과들^{21,22,24,28}과는 유사하여 암세포의 종류에 따라 β -lapachone에 의한 세포의 형태 변형은 다소 차이가 있었음을 알 수 있었다.

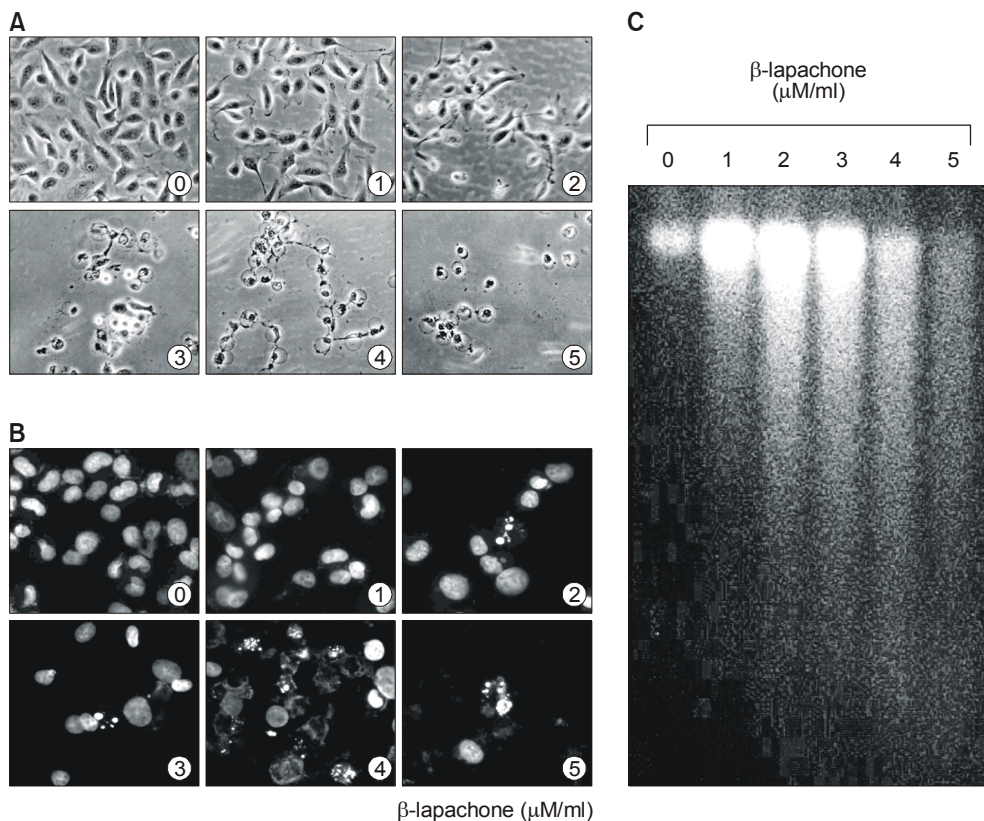


Fig. 2. Morphological changes, chromatin condensation and DNA fragmentation by β -lapachone treatment in A549 human lung carcinoma cells. (A) Cells were untreated or treated with β -lapachone for 48 h, stained and then photographed by microscope (Magnification, $\times 200$). (B) The untreated cells and β -lapachone treated cells for 48 h were harvested, and spun down. After fixing, the cells were stained with DAPI solution. Stained nuclei were then observed under fluorescent microscope using blue filter (Magnification, $\times 400$). (C) Genomic DNA was extracted and analyzed by 1% agarose gel electrophoresis in the presence of EtBr.

β -lapachone에 의한 이상의 암세포 세포성장 억제에 따른 심한 형태적 변형이 apoptosis 유발과 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 먼저 DAPI 염색에 의한 암세포의 핵 형태를 조사하였다. Fig. 2B에 나타낸 바와 같이 정상 배지에서 자란 암세포에서는 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나 β -lapachone이 함유된 배지에서 자란 암세포에서는 apoptosis의 전형적인 특징인 chromatin condensation 현상에 의한 apoptotic body를 쉽게 관찰할 수 있었다.^{32,33)} 한편 apoptotic body 형성과 함께 apoptosis 유발의 직접적인 증거에 해당하는 DNA fragmentation 여부를 agarose gel 전기영동으로 조사하였다. 이를 위하여 정상 및 β -lapachone이 함유된 배지에서 자란 세포를 대상으로 총 DNA를 추출하여 조사한 결과는 Fig. 2C에 나타낸 바와 같다. 즉 β -lapachone이 처리된 암세포에서는 apoptosis가 일어난 세포들에서 볼 수 있는 전형적인 DNA laddering을 관찰할 수 있었다. 이는 결국 β -lapachone의 처리에 의하여 endonuclease가 활성화되어 chromosomal DNA가 단편화되었음을 의미하는 것이며,^{32,33)} β -lapachone 처리에 의한 이상의 두 가지 현상은 간암세포,²⁴⁾ 백혈병세포,^{18,25)} 유방암세포²⁹⁾ 및 대장암세포²⁸⁾ 등에서 관찰된 결과들과 일치하였다. 따라서 이상의 결과에서 β -lapachone 처리에 의한 A549 폐암세포의 증식 억제가 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다.

3) Bcl-2 family의 발현에 미치는 β -lapachone의 영향

Bcl-2 family에 속하는 몇 가지 중요한 인자들은 apoptosis 유발 조절에 가장 대표적인 유전자로 알려져 있는데, 그중 Bcl-2는 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax는 pro-apoptotic 분자로 Bax 단백질 발현의 증가는 apoptosis의 유발과 관계가 있다. 이들 두 유전자는 세포 내 소기관 중 mitochondria로부터의 cytochrome c를 유리시켜 종양억제 유전자인 p53, caspases, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절한다.^{34,35)} 이들은 서로 dimer의 형태로 존재하며 그들의 발현 수준에 변화가 초래되면 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다.^{5,6)}

따라서 인체 폐암세포 A549에서 β -lapachone에 의한 apoptosis 유발에 이들 유전자가 관련되어 있는지의 여부를 RT-PCR 및 Western blotting으로 조사한 결과는 Fig. 3에 나타낸 바와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 apoptosis를 유발하는 것과 관련이 있는 Bax 유전자의 발현은 전사 및 번역 수준에서 β -lapachone 처리 농도 의존적으로 매우 증가된 반면, Bcl-2의 발현은 특히 단백질 수준에서 β -lapachone 처리 농도 의존적으로 매우 감소되었다. 그리고 Bcl-2와 함께 apoptosis 유발 억제에 관여하는 Bcl-xL의 경우 β -lapachone 처리에 따른

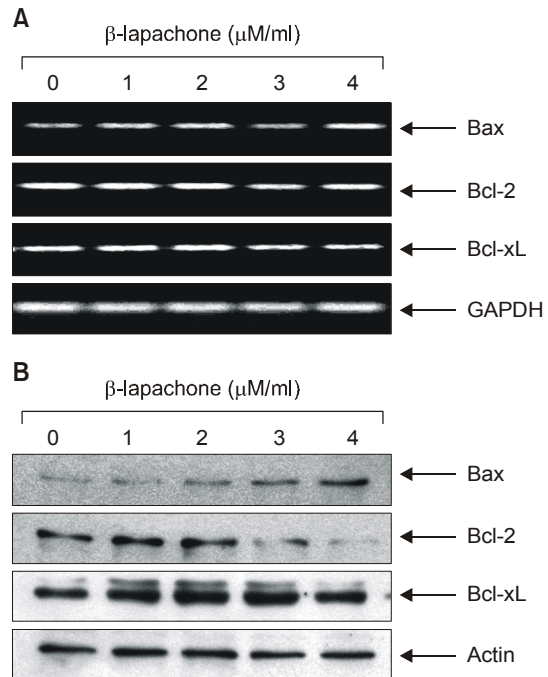


Fig. 3. Up-regulation of Bax and down-regulation of Bcl-2 by β -lapachone treatment in A549 human lung carcinoma cells. A549 cells were treated with indicated concentrations of β -lapachone. (A) After 48 h incubation, total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using Bax, Bcl-2 and Bcl-xL primers described in materials and methods. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) After 48 h incubation, cells were lysed and equal proteins were resolved on 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. Western blots were detected with antibodies against Bax, Bcl-2 and Bcl-xL, and ECL detection.

발현의 큰 변화는 관찰할 수 없었으나, 저농도 처리군에서부터 인산화의 정도가 매우 높게 나타남을 알 수 있었다. 이는 결국 β -lapachone 처리에 의한 apoptosis이 유발에는 최소한 Bcl-2 family가 중요한 역할을 하고 있음을 의미하는 것이며, Bax의 상대적 발현 증가로 인한 apoptosis 유발 관련 효소들의 활성화가 이루어지고 있음을 시사하여 주는 것이다. 본 연구의 결과는 Choi 등^{22,28)}에 의한 대장암세포와 전립선암세포, Wuerzberger 등²⁹⁾에 의한 유방암세포, Weller 등²³⁾에 의한 신경교종 등에서 관찰된 β -lapachone에 의한 apoptosis 유발에서 나타난 현상과 유사한 현상임을 알 수 있었다. 또한 Bcl-2 유전자가 인위적인 과발현된 백혈병세포에서 β -lapachone에 의한 apoptosis가 억제되었음²⁵⁾은 β -lapachone에 의한 apoptosis 유발에 Bcl-2의 발현감소에 따른 Bax의 발현증가가 중요한 역할을 하고 있음을 뒷받침하여 주는 결과이다.

4) p53 및 p21WAF1/CIP1의 발현에 미치는 β -lapachone의 영향

다음은 β -lapachone의 처리에 의한 폐암세포의 증식억제 현상이 종양억제 유전자 또는 세포주기 조절 억제인자들의 발현 변화와 상관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 현재까지 알려진 종양억제 유전자 중 가장 중요한 p53 및 전체적인 세포주기의 진행에 중요한 역할을 하는 Cdk inhibitor p21의 발현에 미치는 β -lapachone의 영향을 조사하였다. Fig. 4의 결과에서 볼 수 있듯이 p53 및 p21 두 유전자의 발현은 β -lapachone의 처리에 따라 전사 및 번역 수준에서 모두 증가하였음을 알 수 있었다. Cdk inhibitor인 p21은 p53의 발현 증가에 의하여 전사 수준이 조절될 수 있으며,^{36~38)} 암세포의 증식 억제, apoptosis 및 분화 유도에 중요한 역할을 하는 세포주기 전반에 걸친 가장 중요한 조절인자란 점에서 β -lapachone의 처리에 의하여 두 유전자가 동시에 발현이 증가되었다는 점은 매우 흥미로운 결과라고 사료된다. 그러나 Hueber 등³⁹⁾의 결과에 의하면 인체 망막 상피세포에서는 β -lapachone의 처리에 의한 apoptosis 유발에서는 p53 및 p21의 유전자 발현이 관찰되지 않았다고 보고한 바 있고, 인체 유방암세포에서도

이와 유사한 결과가 보고된 바 있다.²⁹⁾ 또한 Weller 등²³⁾의 결과에 의하면, 정상 p53 유전자를 가진 신경교종세포에서는 β -lapachone의 처리에 의하여 p21의 발현이 p53과 동시에 증가하였으나, 동일조건에서 p53 유전자가 결여된 세포에서는 p21의 발현에 아무런 영향이 없었다. 그러나 최근 본 연구실의 결과에 의하면 p53 유전자가 결여된 인체 전립선암세포에서는 β -lapachone의 처리에 의하여 p53 비의존적으로 p21의 단백질 발현이 증가되었으며, p21 promoter 활성 또한 β -lapachone의 처리 농도 및 시간 의존적으로 증가되었던 점²²⁾등을 고려해 볼 때 p53 비의존적인 p21 활성 조절 가능성은 여전히 높을 것으로 예상되며, 세포주에 따른 세포주기 조절 관련 유전자들에 관한

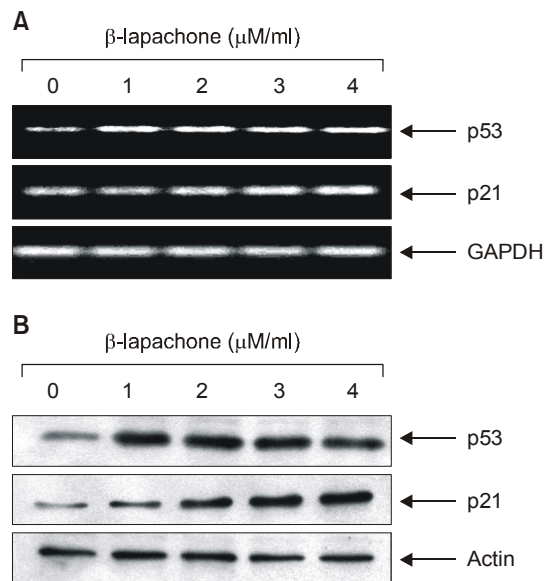


Fig. 4. Up-regulation of tumor suppressor p53 and Cdk inhibitor p21 by β -lapachone treatment in A549 human lung carcinoma cells. A549 cells were treated with indicated concentrations of β -lapachone. (A) After 48 h incubation, total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using p53 and p21 primers described in materials and methods. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) After 48 h incubation, cells were lysed and equal proteins were resolved on 10% or 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. Western blots were detected with antibodies against p53 and p21, and ECL detection.

연구가 더 필요할 것으로 예상된다.

5) Telomere 조절관련 인자들의 발현에 미치는 β -lapachone의 영향

한편 telomere는 염색체의 말단 부위에 repeat sequences [(TTAGGG)_n]로 이루어져 있으며, 이런 반복구조의 형성 및 유지에 관여하는 효소가 telomerase이다.^{40~42)} 정상 체세포에서는 telomerase의 활성이 없기 때문에 세포가 분열할수록 telomere의 길이는 짧아지게 되지만, 암세포의 90% 이상에서는 telomerase의 catalytic subunit 단백질을 coding하는 hTERT가 과발현되어 있고 이로 인한 높은 telomerase의 활성을 나타내고 있다. 따라서 노화, 혈관신생 및 면역계질환 등에서 뿐만 아니라 암의 발생과 진행도 이들과 밀접한 연관성이 있으며, 암의 진단과 진행의 정도를 나타내는 지표로 사용될 수 있음을 시사하여 준다.^{40~42)} 노화의 개념에서 결국 telomere의 소실은 염색체의 안정성이 상실되는 것이며 이는 DNA damaging agent에 의한 p53 및 p21의 발현증가로 인한 세포주기 교란 유발로 설명되어지고 있다.^{43,44)} 특히 암과 연관된 부분에서 telomerase의 활성은 hTERT 유전자의 발현 조절에 의한 것이고, hTERT 유전자의 promoter 부위에는 다른 유전자의 promoter 보다 훨씬 더 많은 전사조절인자의 결합부위를 보유하고 있어 activator 또는 repressor로 작용할 수 있다.^{40,42)} 이러한 중요성을 고려하여 β -lapachone의 처리에 의한 A549 폐암세포의 증식 억제가 염색체 말단에 존재하는 telomere의 조절과 어떤 관계가 있는지를 조사하였다. Fig. 5의 결과에서 알 수 있듯이 β -lapachone의 처리에 의하여 hTERT 및 hTR 유전자의 전사수준이 다소 감소되었으나, 또 다른 조절인자인 TEP-1 및 hTERT의 발현 조절에 중요한 인자에 해당하는 c-myc의 발현은 β -lapachone의 처리에 의하여 큰 변화가 관찰되지 않았다. 그러나 β -lapachone 처리에 의한 암세포의 증식억제 효과와 telomere 관련 분야에 관한 기존의 연구가 전혀 이루어져 있지 않았기 때문에 이에 관한 보다 구체적인 후속 연구가 연관된 뒤 따라야 할 것으로 생각된다.

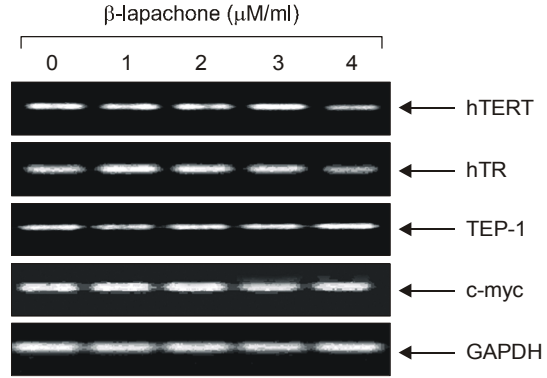


Fig. 5. Effects of β -lapachone on the levels of telomere-regulatory genes expression in A549 human lung carcinoma cells. Cells were treated with various concentrations of β -lapachone. After 48 h incubation, total RNAs were isolated, and RT-PCR was performed using indicated primers. The amplified PCR products were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

결 론

DNA topoisomerase 활성 억제제로 알려진 β -lapachone은 남미지역에 서식하는 *Tabebuia avellanedae*의 수피에서 동정된 천연 quinone계 물질로서 다양한 종류의 암세포에서 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 왔다. 본 연구에서는 β -lapachone의 항암활성 기전 해석의 일환으로 인체 폐암세포 A549의 증식에 미치는 β -lapachone의 영향을 조사하였다. Hemocytometer count 및 MTT assay에 의한 결과에서, β -lapachone의 처리에 따라 A549 폐암세포들은 β -lapachone 처리 농도 의존적으로 증식이 억제되었음을 확인하였으며, β -lapachone이 처리된 세포에서 apoptosis가 유발된 세포에서 특징적으로 관찰되는 chromatin condensation 및 DNA fragmentation 현상을 관찰하였다. 이러한 β -lapachone의 apoptosis 유발에는 pro-apoptotic 인자인 Bax의 발현증가에 따른 anti-apoptotic 인자인 Bcl-2 발현의 감소와 직접적인 연관성이 있음을 관찰할 수 있었다. 그리고 세포의 성장 조절에 중요한 역할을 하는 p53 및 p21의 발현 증가 및 telomere의 길이 조절과 관련이 있는 유전자의

발현 교란 역시 β -lapachone에 의한 암세포의 성장억제와 어느 정도 관련이 있는 것으로 추정되어진다. 그러나 본 연구의 결과만으로 β -lapachone의 항암작용 여부를 직접적으로 논하기에는 어렵기 때문에 다양한 추가적인 실험이 필수적으로 수행되어야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Evans VG. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol Int* 1993; 17: 461-476.
- 2) Shi L, Nishioka WK, Th'ng J, Bradbury EM, Litchfield DW, Greenberg AH. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science* 1994; 263: 1143-1145.
- 3) Chiarugi V, Magnelli L, Turchetti A, Cinelli M, Cavari S, Ruggiero M. Cell survival and death programmes. *Pharmacol Res* 1994; 29: 101-110.
- 4) Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-365.
- 5) Lenaz G, Bovina C, Formiggini G, Castelli GP. Mitochondria, oxidative stress, and antioxidant defences. *Acta Biochim Pol* 1999; 46: 1-21.
- 6) Antonsson B, Martinou JC. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 2000; 256: 50-57.
- 7) Martin SJ, Finucane DM, Amarante-Mendes GP, O'Brien GA, Green DR. Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. *J Biol Chem* 1996; 271: 28753-28756.
- 8) Steinhusen U, Badock V, Bauer A, Behrens J, Wittman-Liebold B, Dorken B, Bommert K. Apoptosis-induced cleavage of β -catenin by caspase-3 results in proteolytic fragments with reduced transactivation potential. *J Biol Chem* 2000; 275: 16345-16353.
- 9) Schaffner-Sabba K, Schmidt-Ruppin KH, Wehrli W, Schuerch AR, Wasley JW. β -lapachone: synthesis of derivatives and activities in tumor models. *J Med Chem* 1984; 27: 990-994.
- 10) Li CJ, Averboukh L, Pardee AB. β -Lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. *J Biol Chem* 1993; 268: 22463-22468.
- 11) Pardee AB, Li YZ, Li CJ. Cancer therapy with β -lapachone. *Curr Cancer Drug Targets* 2002; 2: 227-242.
- 12) Lopes JN, Cruz FS, Docampo R, Vasconcellos ME, Sampaio MC, Pinto AV, Gilbert B. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the toxicity of 1,4-naphthoquinone and 1,2-naphthoquinone derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol* 1978; 72: 523-531.
- 13) Gojzman SG, Stoppani AO. Effects of β -lapachone, a peroxide-generating quinone, on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. *Arch Biochem Biophys* 1985; 240: 273-280.
- 14) Boothman DA, Schlegel R, Pardee AB. Anticarcinogenic potential of DNA-repair modulators. *Mutat Res* 1988; 202: 393-411.
- 15) Guiraud P, Steiman R, Campos-Takaki GM, Seigle-Murandi F, Simeon de Buochberg M. Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and β -lapachone. *Planta Med* 1994; 60: 373-374.
- 16) Li CJ, Wang C, Pardee AB. Induction of apoptosis by β -lapachone in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 1995; 55: 3712-3715.
- 17) Docampo R, Cruz FS, Boveris A, Muniz RP, Esquivel DM. β -lapachone enhancement of lipid peroxidation and superoxide anion and hydrogen peroxide formation by sarcoma 180 ascites tumor cells. *Biochem Pharmacol* 1979; 28: 723-728.
- 18) Shiah SG, Chuang SE, Chau YP, Shen SC, Kuo ML. Activation of c-Jun NH2-terminal kinase and subsequent CPP32/Yama during topoisomerase inhibitor β -lapachone-induced apoptosis through an oxidation-dependent pathway. *Cancer Res* 1999; 59: 391-398.
- 19) Planchon SM, Pink JJ, Tagliarino C, Bornmann WG, Varnes ME, Boothman DA. β -lapachone-induced apoptosis in human prostate cancer cells: involvement of NQO1/xip3. *Exp Cell Res* 2001; 267: 95-106.
- 20) Planchon SM, Wuerzberger S, Frydman B, Witiak DT, Hutson P, Church DR, Wilding G, Boothman DA. β -lapachone-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) and human prostate cancer cells: a p53-independent response. *Cancer Res* 1995; 55: 3706-3711.
- 21) Don MJ, Chang YH, Chen KK, Ho LK, Chau YP. Induction of CDK inhibitors (p21 (WAF1) and p27 (Kip1)) and Bak in the β -lapachone-induced apoptosis of human prostate cancer cells. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 784-794.
- 22) Choi YH, Kang HS, Yoo MA. Suppression of human prostate cancer cell growth by β -lapachone via down-regulation of pRB phosphorylation and induction of Cdk inhibitor p21 (WAF1/CIP1). *J*

- Biochem Mol Biol* 2003; 36: 223-229.
- 23) Weller M, Winter S, Schmidt C, Esser P, Fontana A, Dichgans J, Groscurth P. Topoisomerase-I inhibitors for human malignant glioma: differential modulation of p53, p21, bax and bcl-2 expression and of CD95-mediated apoptosis by camptothecin and β -lapachone. *Int J Cancer* 1997; 73: 707-714.
 - 24) Lai CC, Liu TJ, Ho LK, Don MJ, Chau YP. β -lapachone induced cell death in human hepatoma (HepA2) cells. *Histol Histopathol* 1998; 13: 89-97.
 - 25) Planchon SM, Wuerzberger-Davis SM, Pink JJ, Robertson KA, Bornmann WG, Boothman DA. Bcl-2 protects against β -lapachone-mediated caspase 3 activation and apoptosis in human myeloid leukemia (HL-60) cells. *Oncol Rep* 1999; 6: 485-492.
 - 26) Gupta D, Podar K, Tai YT, Lin B, Hideshima T, Akiyama M, LeBlanc R, Catley L, Mitsiades N, Mitsiades C, Chauhan D, Munshi NC, Anderson KC. β -lapachone, a novel plant product, overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Exp Hematol* 2002; 30: 711-720.
 - 27) Huang L, Pardee AB. β -lapachone induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Mol Med* 1999; 5: 711-720.
 - 28) Choi BT, Cheong J, Choi YH. β -lapachone-induced apoptosis is associated with activation of caspase-3 and inactivation of NF-kappaB in human colon cancer HCT-116 cells. *Anticancer Drugs* 2003; 14: 845-850.
 - 29) Wuerzberger SM, Pink JJ, Planchon SM, Byers KL, Bornmann WG, Boothman DA. Induction of apoptosis in MCF-7:WS8 breast cancer cells by β -lapachone. *Cancer Res* 1998; 58: 1876-1885.
 - 30) Pink JJ, Wuerzberger-Davis S, Tagliarino C, Planchon SM, Yang X, Froelich CJ, Boothman DA. Activation of a cysteine protease in MCF-7 and T47D breast cancer cells during β -lapachone-mediated apoptosis. *Exp Cell Res* 2000; 255: 144-155.
 - 31) Tagliarino C, Pink JJ, Dubyak GR, Nieminen AL, Boothman DA. Calcium is a key signaling molecule in β -lapachone-mediated cell death. *J Biol Chem* 2001; 276: 19150-19159.
 - 32) Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990; 136: 593-608.
 - 33) Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 267-293.
 - 34) Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993; 362: 847-849.
 - 35) Rosse T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B, Borner C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 1998; 391: 496-499.
 - 36) Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995; 80: 293-299.
 - 37) Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75: 805-816.
 - 38) El-Deiry WS, Tokino T, Velculesco VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer EW, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75: 817-825.
 - 39) Hueber A, Esser P, Heimann K, Kociok N, Winter S, Weller M. The topoisomerase I inhibitors, camptothecin and β -lapachone, induce apoptosis of human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 1998; 67: 525-530.
 - 40) Kyo S, Inoue M. Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: How can we apply them for cancer therapy. *Oncogene* 2002; 21: 688-697.
 - 41) Poole JC, Andrews LG, Tollefsbol TO. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene* 2001; 269: 1-12.
 - 42) Cerni C. Telomeres, telomerase, and myc. An update. *Mutat Res* 2000; 462: 31-47.
 - 43) Narayan S, Jaiswal AS, Multani AS, Pathak S. DNA damage-induced cell cycle checkpoints involve both p53-dependent and -independent pathways: role of telomere repeat binding factor 2. *Br J Cancer* 2001; 85: 898-901.
 - 44) Vaziri H, West MD, Allsopp RC, Davison TS, Wu YS, Arrowsmith CH, Poirier GG, Benchimol S. ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly (ADP-ribose) polymerase. *EMBO J* 1997; 16: 6018-6033.