

# 桔梗이 人體 肺癌細胞에 미치는 영향에 대한 실험적 연구

이성열 · 김원일 · 박동일\*

동의대학교 한의과대학 내과학교실

## Apoptotic Cell Death of Human Lung Carcinoma A549 Cells by an Aqueous Extract from the Roots of *Platycodon grandiflorum*

Sung Yeoul Lee, Won Ill Kim, Dong Il Park\*

*Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine Dongeui University*

*Platycodi Radix*, the root of *Platycodon grandiflorum*, commonly known as Doraji, is used as a traditional oriental medicine. Extracts from the roots of *P. grandiflorum* have been reported to have wide ranging health benefits. In the present study, we investigated the effects of an aqueous extract from the roots of *P. grandiflorum* (AEPG) on the growth of human lung carcinoma A549 cells. Results obtained are as follow; AEPG treatment resulted in the inhibition of the cell viability of A549 cells in a concentration-dependent manner. Upon treatment with AEPG, A549 cells developed many of the hallmark features of apoptosis, including condensation of chromatin. Flow cytometry analysis confirmed that AEPG increased populations of apoptotic-sub G1 phase. Western blot and RT-PCR analyses indicated that the expressions of Bcl-2 was down-regulated but Bax was up-regulated in AEPG-treated A549 cells. AEPG-induced apoptosis of A549 cells was associated with proteolytic cleavage and activation of caspase-3, release of cytochrome c from mitochondria into cytosol and down-regulation of Akt and phospho-Akt proteins in a dose-dependent manner. Induction of apoptosis by AEPG treatment was associated with inhibition and/or degradation of apoptotic target proteins such as poly(ADP-ribose) polymerase,  $\beta$ -catenin and phospholipase C- $\gamma$ 1. AEPG treatment inhibited the levels of cyclooxygenases protein of A549 cells, which was associated with the inhibition of prostaglandin E2 accumulation in a concentration-dependent fashion. Taken together, these findings suggest that *P. grandiflorum* has strong potential for development as an agent for prevention against human lung cancer.

Key words : *Platycodi Radix*(桔梗), Lung Carcinoma, A549 Cell

### 서 론

길경(*Platycodi radix*)은 한국을 위시하여 중국 및 일본 등지에 널리 자생하는 다년생 초본인 초롱꽃목 초롱꽃과(*Campanulaceae*)에 속하는 도라지(*Platycodon grandiflorum* A. DC)의 뿌리 껍질을 벗기거나 또는 그대로 말린 것을 말하며, 거담, 해수, 기관지염, 호흡곤란, 편도선염 등 염증성 호흡기 질환에 전통적으로 많이 사용되어져 오고 있다<sup>1-3)</sup>. 길경에 함유된 약리 성분의 분석에 관한 보고는 이미 다수의 연구자들에 의해 수행되었으며<sup>4,5)</sup>, 각종 생리활성의 기능 향상에 관한 연구가 꾸준히

진행되어져 오고 있다. 다양한 선행연구 중 항염증 작용<sup>2,6)</sup> 및 면역계 활성화와 연관된 연구<sup>6-11)</sup>는 생체 내 항암작용 효과가 있을 것으로 기대되어지면서 최근 이와 연관된 연구가 활발히 수행 중이다<sup>12-17)</sup>. 그러나 암세포의 성장억제와 연관된 대부분의 기존 연구 보고들에서 길경 추출물의 분자생물학적인 기전 해석을 시도한 예는 거의 이루어진 바 없다. 한편 세포의 증식과 암의 발생 측면에서 세포주기 조절의 교란에 의한 비정상적인 증식이 계속되는 것이 암세포라고 할 수 있다. 따라서 세포주기와 연관된 특정 유전자의 발현 조절을 통한 apoptosis 유발 기전의 해석은 암을 포함한 특정 약제의 개발에 매우 중요한 의의를 가질 수 있다. 특히 apoptosis는 개체의 발생단계나 DNA 손상, 바이러스 감염 등에 의한 유전적 조절 하에서 일어나는 정교한 인체방어 기전이란 점에서 necrosis와 구별된다<sup>18-20)</sup>. 또한 apoptosis는 개

\* 교신저자 : 박동일, 부산광역시 부산진구 양정2동, 동의대학교 부속한방병원  
· E-mail : dipark@demc.or.kr · Tel : 051-850-8650  
· 접수 : 2003/04/22 · 수정 : 2003/06/13 · 채택 : 2003/07/23

체보존수준에서 손상된 세포들의 제거를 위한 중요한 수단이며, 정상적인 세포주기의 이탈이나 cyclin-dependent kinases (Cdks) 활성의 변화가 apoptosis 유발의 주원인이 될 수 있다<sup>21)</sup>. Apoptosis의 유발에는 세포증식에 중요한 역할을 하는 종양억제 유전자 p53이나 Cdk inhibitor p21WAF1/CIP1 뿐만 아니라, apoptosis를 직접 조절하는 Bcl-2 및 Bax와 같은 유전자가 관여한다는 사실이 알려지면서 apoptosis와 연관된 분자적 기전이 최근 많이 밝혀지고 있다<sup>22,25)</sup>. 잘 알려진 바와 같이 Bcl-2는 apoptosis를 억제하는 반면, Bax는 과발현되었을 때 apoptosis를 유도하며<sup>22,25)</sup>, 두 단백질은 서로 dimer를 형성하면서 mitochondria에서 cytochrome c와 같은 apoptosis 유발에 관여하는 인자들의 조절에 관여한다. 특히 DNA 손상에 의한 p53의 발현 증가는 p21과 연관되어 세포주기 상 G1기에서의 세포증식 억제뿐만 아니라 Bax 유전자를 활성화시키고 Bcl-2의 발현을 억제하면서 apoptosis에도 관여하는 것으로 알려지고 있다<sup>22,24,25)</sup>. 또한 caspase 역시 apoptosis 유발에 중요한 역할을 하는데, 이들은 proenzyme 형태로 존재하다가 apoptosis 유도를 활성화시키는 신호에 의해 활성화된 형태로 전환되어 직접 또는 간접으로 세포 내 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다<sup>19,26)</sup>. 또한 세포의 증식에 직·간접적으로 관여하는 것 중의 하나가 cyclooxygenases (COXs)에 의한 prostaglandin 합성의 경로로서, arachidonic acid의 COX 분해 산물인 prostaglandin은 세포분열이나 증식을 촉진함으로써 암을 포함한 각종 인체 질병의 유발과 진행을 조절한다<sup>27,28)</sup>. 특히 COXs 중 COX-2의 역할이 더욱 중요하며, 암 조직에서 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 함께 높은 수준으로 발현되고 있다<sup>29,30)</sup>. 따라서 COX-2의 발현을 특이적으로 저해하는 인자는 염증질환 뿐만 아니라 항암제로서의 개발 가능성이 매우 높기 때문에 COX-2 유전자의 선택적 조절에 의한 암 예방전략이 최근 높은 관심을 모으고 있다<sup>29,31)</sup>. 따라서 본 연구에서는 길경의 항암작용 해석의 일환으로 인체 폐암세포의 성장에 미치는 길경 추출물의 영향을 조사하였다.

본 연구의 결과에 의하면 Bax의 발현 증가 및 이와 연관된 Bcl-2의 발현 감소에 의한 caspase-3의 활성화 과정이 길경 수용액 추출물에 의한 apoptosis 유발에 주요한 요인으로 작용함을 알 수 있었다.

## 실험방법

### 1. 시료준비

길경은 동의대학교 한의과대학 부속 한방병원에서 공급받았으며 100 g을 1,000 ml의 증류수에 3시간 이상 끓인 후, 3,000 rpm으로 20분간 원심 분리시켜 침전물을 제거하였다. 이를 다시 0.45  $\mu$ m의 여과지를 이용하여 부유 성분을 걸러낸 후 수용성분을 동결 건조하여 사용하였다<sup>32)</sup>.

### 2. 암세포주 및 배양조건

본 실험에 사용한 A549 인체 폐암세포(human lung carcinoma cells)는 생명공학연구소 (KRIBB, Teajeon, Korea)에서

구입하였으며 Lee et al. (2002b)의 방법에 준하여 암세포의 배양을 위해 90%의 DMEM 배지<sup>33)</sup>, 10%의 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS) 및 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA) 가 포함된 성장배지를 사용하여 배양하였다. 세포는 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였으며, 성장배지의 교환은 매 48시간마다 해주었고, 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-EDTA (Gibco BRL)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 세포배양용 페트리 접시로 옮겨 배양하였다.

### 3. 길경 추출물의 처리

길경 수용액 추출물의 처리를 위하여 세포를 0.05% trypsin-EDTA를 이용하여 세포배양용 페트리 접시로부터 부유시킨 다음 새로운 세포배양용 페트리 접시에  $6 \times 10^5$  개/ml 정도로 분주하여 24시간 동안 안정화 시켰다. 길경 추출물을 세포에 처리하기 직전 적정 농도로 성장배지에 첨가하여 녹인 다음, 0.22  $\mu$ m의 pore size를 가진 주사기용 필터유닛을 사용하거나 1회용 펌프 필터 유닛을 사용하여 미생물 및 불순물을 걸러낸 다음, 세포의 성장배지를 갈아주면서 직접 처리하였다<sup>32,33)</sup>.

### 4. MTT assay를 이용한 암세포 성장 억제율의 측정

세포배양용 96 well plate에 폐암세포  $2 \times 10^4$  개/ml로 희석한 세포액을 100  $\mu$ l/well로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨, 다양한 농도로 희석된 길경 추출물이 함유된 배지로 교체하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 시약을 0.5 mg/ml 농도가 되게 희석하여 200  $\mu$ l씩 분주하고 3시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)를 100  $\mu$ l씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 세 번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 Sigma Plot 4.0 프로그램 (SPSS Ins.)으로 구하였다<sup>34)</sup>.

### 5. DAPI staining을 통한 암세포 핵의 형태 관찰

세포배양용 6 well plate에 A549 폐암세포를  $2 \times 10^4$  개/ml 정도를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 길경 추출물을 성장배지에 희석하여 처리한 후 배양하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 부유시킨 후 phosphate-buffered saline (PBS)를 가하여 세포를 모은 다음 1,000 rpm으로 10분간 원심분리를 하였다. 상층액은 버리고 세포만 남긴 다음 formaldehyde solution (Sigma)과 PBS를 1 : 9 비율로 섞은 fixing solution을 500  $\mu$ l 첨가하여 충분히 섞은 후, 상온에서 10분 동안 고정하였다. 다시 1,000 rpm으로 5분간 원심분리를 하고 상층액을 버린 다음 PBS 200  $\mu$ l를 넣어서 충분히 섞은 후, 슬라이드글라스 위에 세포부유액을 80  $\mu$ l정도를 떨어뜨린 다음 900 rpm에서 5분간 cytospin하였다. Cytospin이 끝난 후 PBS로 2 ~ 3회 세척하고 PBS가 마르기 전에 0.2%의 Triton

X-100 (Amresco, Solon, Ohio, USA)을 떨어뜨린 후 상온에서 10분간 두었다. 다시 PBS로 2 ~ 3회 세척하고 PBS를 사용하여 2500 : 1로 희석된 4',6-diamidino- 2-phenylindole (DAPI, Sigma)를 슬라이드 글라스 위에 적당량 떨어뜨린 다음 빛을 차단하여 15분간 상온에서 염색시켰다. PBS로 DAPI solution을 충분히 씻어내고 증류수로 재빨리 세척한 다음 100% ethanol을 이용하여 탈수과정을 거친 슬라이드 글라스 위에 mounting solution 처리를 한 다음 형광 현미경 (Carl Zeiss)을 이용하여 400배의 배율로 각 농도에 따른 핵의 형태변화를 관찰한 다음 AxioVision 프로그램 이용하여 사진을 촬영하였다<sup>35,36</sup>.

6. DNA flow cytometry 분석

정상 및 길경 수용액 추출물이 함유된 배지에서 자란 세포들을 PBS로 두세 번 씻어내고, 고정액 (70% ethyl alcohol, 0.5% Tween<sup>20</sup>)을 첨가하여 4℃에서 고정시킨 후, 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DNA intercalating dye propidium iodide (PI, concentration, 50 µg/ml; Sigma)와 10 kunit의 RNase (Sigma)를 처리하고 4℃에서 1시간동안 염색하였다. 이를 다시 PBS로 두 번 씻어낸 후, nylon mesh로 세포를 하나씩으로 분리시킨 후 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 Modifit LT (Becton Dickinson) 프로그램으로 분석하였다<sup>35,36</sup>.

7. SDS-polyacrylamide gel 전기영동 및 Western blot analysis

세포배양용 패트리 접시에 6 × 10<sup>5</sup> 개/ml 정도로 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 다음 길경 수용액 추출물을 처리하였다. 48시간까지 배양한 후, 세포를 PBS로 씻어 내고 0.05% trypsin- EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 원심분리를 하여 세포를 모았다. 이렇게 모아진 세포에 적당량의 lysis buffer (250 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid : EDTA pH 8.0, 1% NP-40, 0.1 M phenylmethylsulfonyl fluoride ; PMSF, 1 M 1,4-dithio-DL-threitol ; DTT, protease inhibitor cocktail, DW)를 첨가하여 4℃에서 30분간 반응시킨 후, 13,500 rpm으로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 동량으로 맞춘 다음 동량의 Laemmli sample buffer (β-melcaptomethanol 5%, Laemmli sample buffer 95%, Bio-Rad)을 섞어서 sample을 만들었다. 이렇게 만든 sample 동량을 sodium dodesyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다<sup>37</sup>. Western blot analysis를 위하여 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 담구어 상온에서 2시간 정도 incubation하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 PBS-T로 15분 (5분간 3번) 정도 세척하였다. 세척 후 1차 항체 (PBS-T로 1:500 또는 1:1000으로 희석하여 사용)를 처리하여 상온에서 1시

간 이상 또는 4℃에서 over night 시킨 다음 PBS-T로 세척 (15분간 1번, 5분간 5번)하고 처리된 1차 항체에 맞는 2차 항체 (PBS-T로 1:1500으로 희석하여 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 다시 PBS-T로 세척 (10분간 3번, 5분간 3번)하고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 발현 양상을 비교 분석하였다<sup>36,37</sup>. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며 (Table 1), 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Corp.에서 구입하였다.

Table 1. Antibodies used in the present study

Antibody	Origin	Company
Bax	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
Bcl-2	mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology
Actin	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
caspase-3	mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology
cytochrome c	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
PARP1	rabbit polyclonal	Upstate
β -Catenin	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
PLC-γ 12	mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology
Akt	rabbit polyclonal	Cell Signaling
p-Akt	rabbit polyclonal	Cell Signaling
NF-κ B	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
COX-1	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
COX-2	rabbit polyclonal	Cayman

1. poly(ADP-ribose) polymerase, 2. phospholipase C-γ, 3. nuclear factor kappa B

8. RT-PCR을 이용한 mRNA 발현의 분석

정상 및 길경 수용액 추출물이 들어 있는 배지에서 48시간 동안 자란 암세포를 PBS로 씻어 내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 1,000 rpm으로 10분간 원심분리를 하여 상층액을 버리고 세포만 모았다. 24시간 후 세포를 Disposable cell lifter (Fisher scientific)로 긁어서 50 ml tube에 옮긴 후 1,000 rpm에서 5분 동안 원심분리를 하였다. Pellet에 PBS를 첨가하여 현탁한 다음 1,000 rpm에서 5분간 원심분리를 한 후 pellet에 RNazol B 1ml을 첨가하여 약하게 현탁을 하고 e-tube에 옮겨서 4℃에서 1시간 동안 세포를 용해시켰다. 여기에 chloroform 200 µl를 넣고 inverting을 반복하여 고르게 섞은 다음 4℃에서 5분 동안 방치시키고 14,000 rpm에서 15분 동안 원심분리(4℃)하여 부색의 상층액만을 400 µl 취한 뒤 동량의 isopropanol을 넣고 inverting을 반복하여 고르게 섞은 다음 4℃에서 15분 동안 방치시키고 14,000 rpm에서 15분 동안 원심분리(4℃)하여 얻은 pellet (RNA)에 75% ethanol (25% DEPC treated water, Nalgene) 500 µl를 넣어 15,000 rpm에서 15분 동안 원심분리(4℃)하고 ethanol을 완전히 날린 후에 DEPC water 50 µl를 넣어서 RNA를 용해하여 A260 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA 함량을 계산하였다. 분리한 RNA에 oligo dT primer와 DEPC water를 넣고 65℃에서 10분 동안 반응시킨 후 실온에서 3분 동안 방치한 다음 10x

buffer, 10 mM dNTP, RNasin, AMV Reverse transcriptase, 50 mM MgCl<sub>2</sub> 및 DEPC treated water를 넣고 42°C에서 1시간 동안 반응시켜서 reverse transcription (RT) product를 만들었다(반응에 필요한 각각의 시약은 Table 2 참조). 만들어진 RT product (template cDNA)에 2.5 mM dNTP, 10x buffer, DEPC water, premixed primer (GenoTech, Korea) 및 Taq DNA polymerase를 넣고 polymerase chain reaction (PCR)을 행하였다(반응에 필요한 각각의 시약 사용 및 PCR의 조건은 Table 3 및 4 참조). 또 One-step RT-PCR PreMix (iNtRON Biotechnology, Korea)를 사용하여 실험하였을 경우에는 분리한 RNA에 iNtRON ONE-STEP RT-PCR PreMix, premixed primer 및 DEPC treated water를 넣고 RT-PCR을 행하였다(반응에 필요한 각각의 시약의 조성 및 사용 및 RT-PCR의 조건은 Table 5 및 6 참조). PCR을 행하여 만들어진 DNA의 양을 확인하기 위하여 1x TAE buffer으로 1% agarose gel을 만들고 well에 각각의 primer에 해당하는 PCR 산물에 DNA gel loading solution (5x, QUALITY BIOLOGICAL, INC.)을 섞어서 loading 한 후 100V에서 전기영동을 하여 Picture works' photo enhancer를 이용하여 사진 촬영을 하였다(Choi, 2001).

Table 2. Reaction components for RT

Separated RNA	2 $\mu$ g (x $\mu$ l)
Oligo dT primer	2 $\mu$ l
DEPC treated water	8 $\mu$ l-x $\mu$ l
total 10 $\mu$ l	
65°C 10 min reaction	
10x buffer	5 $\mu$ l
10 mM dNTP	5 $\mu$ l
RNasin	1 $\mu$ l
AMV Reverse transcriptase	1 $\mu$ l
50 mM MgCl <sub>2</sub>	5 $\mu$ l
DEPC treated water	23 $\mu$ l
Total 50 $\mu$ l	
42°C, 1 h reaction (RT product)	

Table 3. Reaction components for PCR

Template cDNA	8 $\mu$ l
10x buffer	4 $\mu$ l
10 mM dNTP	0.25 $\mu$ l
Taq DNA polymerase	0.2 $\mu$ l
Premixed primer	1 $\mu$ l
DEPC treated water	26.55 $\mu$ l
Total 40 $\mu$ l	

Table 4. Condition for PCR

Temperature (°C)	Time	No. of cycle
45	30 min	1
94	15 min	1
94	5 min	1
94	30 sec	50
58	30 sec	
72	30 sec	
72	5 min	1
22	hold	-

Table 5. Components of ONE-STEP RT-PCR PreMix

Components of ONE-STEP RT-PCR PreMix	
AMV Reverse transcriptase	
RT-PCR duffer (10x)	
dNTPs	
Taq DNA polymerase	
Stabilizing buffer	

Table 6. Reaction components for RT-PCR

iNtRON ONE-STEP RT-PCR PreMix	8 $\mu$ l
Separated RNA	2 $\mu$ g (x $\mu$ l)
premixed primer	1 $\mu$ l
DEPC treated water	20-x $\mu$ l
Total 20 $\mu$ l	

### 9. In vitro caspase-3 활성의 측정

Fluorometric assay에 의한 caspase-3의 in vitro 활성 측정을 위하여 사용된 kit는 CLONTECH Lab. (Palo Alto, CA, USA)에서 각각 구입하였다. 이를 위하여 정상 배지 및 길경 추출물이 처리된 배지에서 48시간 배양된 폐암세포를 모아서, ice-cold PBS로 2회 수세하고 준비된 buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1% Nonidet P-40, 0.25% sodium deoxycholate, 5 g/ml leupeptin, 5 g/ml aprotinin, 10 g/ml soybean trypsin inhibitor 및 0.2 mM PMSF)를 이용하여 lysis를 시켜 10,000 rpm으로 30분간 원심분리시켰다. 상층액을 모아 단백질의 양을 정량하고 각각 대조군 및 길경이 처리된 실험군에서 각각 20  $\mu$ g의 총 단백질을 취하여 fluorogenic peptide 기질 100  $\mu$ M이 함유된 extraction buffer (40 mM HEPES (pH 7.4), 20% glycerol (v/v), 1 mM EDTA, 0.2% NP-40 and 10 mM DTT) 50  $\mu$ l에 혼합하였으며, microtiter plate에 다시 extraction buffer에 희석하여 각 sample 당 총 volume이 100  $\mu$ l 되게 하였다. 이때 사용된 기질은 Asp-Glu-Val-Asp(DEVD)-p-nitroaniline (pNA)이며, 준비된 plate를 37°C에서 2시간동안 incubation 시킨 후 VERSAmax tunable microplate reader를 이용하여 405 nm의 흡광도를 이용하여 반응의 정도를 측정하였다.

### 10. Prostaglandin E2 생성물의 측정

Prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>)의 생성에 미치는 길경 추출물의 영향을 측정하기 위하여 enzyme immunoassay (EIA) kit는 Amersham Corp.에서 구입하여 사용하였다. 먼저 준비된 폐암세포를 96-well plate에 well 당 160  $\mu$ l의 배지에 10<sup>4</sup> cell/well 정도로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 길경 추출물을 농도별로 배지에 희석하여 처리하였다. 이때 마지막 배지의 양을 모두 180  $\mu$ l로 통일시켰다. 48시간 후 배지에 2.5%의 dodecyltrimethylammonium bromide가 함유된 buffer를 20  $\mu$ l 첨가하여 총 배지의 양이 200  $\mu$ l 되게 한 후 lysis가 잘 일어나도록 pipetting을 수회 실시하였다. 상온에 약 10분간 incubation 한 후 Trypan blue를 이용하여 암세포의 수를 계수하였다. 약 50  $\mu$ l의 lysate를 취하여 kit에 준한 protocol에 따라 EIA를 실시한 후 450 nm의 파장에서 얻어진 값을 기준으로 PGE<sub>2</sub>의 양을 추정하였다.

Table 7. Gene-specific Primers for RT or One-step RT-PCR

Gene name		Sequence
COX-1	Sence	5'-TGC-CCA-GCT-CCT-GGC-CCG-CCG-CTT-3'
	Antisence	5'-GTG-CAT-CAA-CAC-AGG-CGC-CTC-TTC-3'
COX-2	Sence	5'-TTC-AAA-TGA-GAT-TGT-GGG-AAA-AT-3'
	Antisence	5'-AGA-TCA-TCT-CTG-CCT-GAG-TAT-CTT-3'
Caspase-3	Sence	5'-ATG-GAG-AAC-ACT-GAA-AAC-TCA-3'
	Antisence	5'-GAA-CTC-TAT-TTT-TAT-CAC-TAA-3'
Bax	Sence	5'-ATG-GAC-GGG-TCC-GGG-GAG-3'
	Antisence	5'-TGG-AAG-AAG-ATG-GGC-TGA-3'
Bcl-2	Sence	5'-CAG-CTG-CAC-CTG-ACG-3'
	Antisence	5'-GCT-GGG-TAG-GTG-CAT-3'
GAPDH1	Sence	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	Antisence	5'-AGC-CIT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

1. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

## 결과 및 고찰

### 1. 길경 추출물 처리에 의한 암세포증식의 억제

A549 인체 폐암세포의 성장에 미치는 길경 수용액 추출물의 영향을 알아보기 위하여 48시간동안 다양한 농도의 길경 추출물을 처리한 후 MTT assay를 이용하여 암세포의 성장억제 효과를 살펴보았다. 길경 추출물이 함유된 배지에서 자란 암세포는 Fig. 1에서 볼 수 있듯이 처리 농도 의존적으로 성장억제의 효과가 뚜렷하게 관찰되었다. 특히 1.0 mg/ml 이상의 처리 농도군에서는 대조군에 비하여 50% 이상의 성장억제 현상을 관찰할 수 있었으며, 2.0 mg/ml 처리군에서는 70% 정도의 성장억제 효과가 있었다. 이러한 암세포의 성장 억제 효과는 길경 추출물의 농도 증가에 따른 암세포의 심한 형태적 변형과도 연관성이 있었는데, 저농도 처리군에서는 전체적으로 세포질이 응축되면서 짧고 많은 가지를 친 듯한 모양으로 바뀌었으며, 이러한 dendrite-like한 형태가 더욱 신장되면서 고농도 처리군에서는 암세포들의 부착력이 상실되었음을 알 수 있었다.

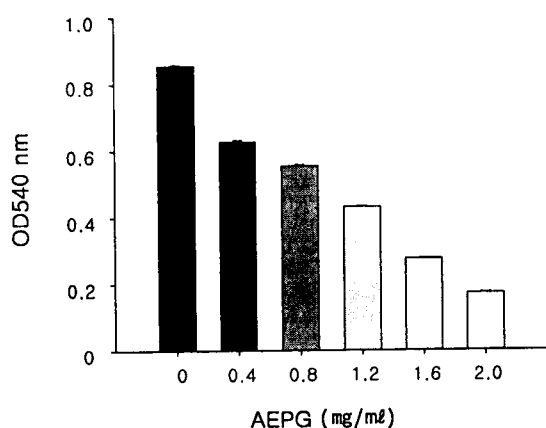


Fig. 1. Effect of an aqueous extract from the roots of *Platycodon grandiflorum* (AEPG) on A549 human lung carcinoma cell growth. A549 human lung carcinoma cells were seeded as described in Materials and Methods and MTT assay was performed after AEPG treatment for 48 h. Results are expressed as percentage of the untreated control obtained from two separate experiments.

### 2. 길경 추출물의 처리에 의한 암세포의 apoptosis 유도

#### 1) 길경 추출물 처리에 의한 sub-G1기의 증가

이상의 길경 추출물에 의한 폐암세포의 성장 억제 효과가 암세포의 apoptosis 유발과 연관성이 있을 것으로 기대되어 DNA flow cytometry를 이용하여 apoptosis 유발의 정도를 정량적으로 분석하였다. 이를 위하여 실험 방법에 서술한 것처럼 정상 및 길경 추출물이 함유된 배지에서 자란 세포들을 고정한 후, 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 PI로 염색하여 DNA flow cytometry로 분석한 결과는 Fig. 2와 같다. 즉 정상 배지에서 자란 암세포의 자연적 apoptosis 유발 현상은 2.5% 전후였으나, 길경 추출물의 처리 48시간 후 sub-G1기에 속하는 세포의 빈도가 급격히 증가되어 1.2 mg/ml 및 1.6 mg/ml 처리군에서는 각각 약 16.2% 및 23.5%의 암세포가 apoptosis의 과정을 통하여 사멸되었음을 알 수 있었다.

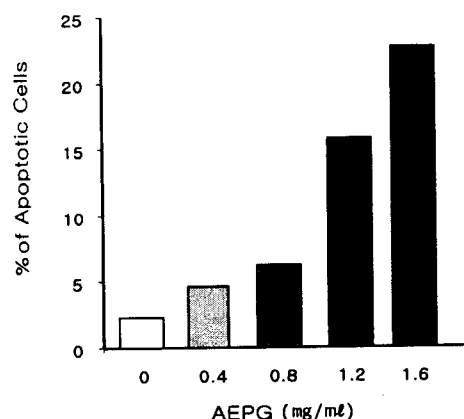


Fig. 2. Induction of apoptotic cell death by AEPG treatment in A549 human lung carcinoma cells. A549 cells were treated with AEPG for indicated concentrations for 48 h. Cells were then fixed and stained with PI. Apoptotic sub-G1 cells were determined by a DNA flow cytometry. Data are means average of two separate experiments.

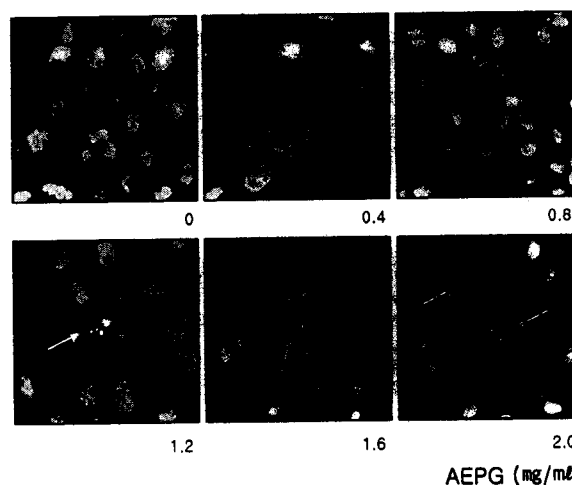


Fig. 3. Formation of apoptotic bodies by AEPG treatment in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with AEPG for 48 h, and then stained with DAPI. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescence microscope using blue filter. Magnification, X400.

3. Bcl-2 family의 발현에 미치는 길경 추출물의 영향

상기의 결과들에서 알 수 있듯이 길경 추출물이 함유된 배지에서 자란 폐암세포의 성장 억제는 apoptosis 유발과 밀접한 연관성이 있음을 알 수 있었다. 따라서 길경 추출물 처리에 의한 apoptosis 유발에 관여하는 유전자의 탐색을 위하여 apoptosis와 연관성을 가지는 대표적인 유전자 산물들의 발현 변화여부를 조사하였다. 그중 Bcl-2/Bax family의 대표적 유전자인 Bcl-2는 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax는 pro-apoptotic 분자로 apoptosis의 유발과 관계가 있다<sup>22,25</sup>. 이들 두 유전자 산물은 세포 내 소기관 중 mitochondria로 부터의 cytochrome c를 유리시켜 cysteine-related protease인 caspases 및 DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 효소 활성을 조절한다<sup>18,36</sup>. 이들은 서로 dimer의 형태로 존재하며 그들의 발현 수준에 변화가 초래되면 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다<sup>24,25,36</sup>. Fig. 4는 Western blotting법에 의한 Bax 및 Bcl-2 단백질의 발현에 미치는 길경 추출물의 영향을 조사한 것으로, 결과에서 알 수 있듯이 길경 추출물의 처리 농도가 증가할수록 A549 폐암세포의 Bax 단백질 발현이 증가됨을 알 수 있었으나 Bcl-2 단백질의 경우는 처리 농도 의존적으로 발현이 감소되었다. 이들 단백질의 발현 변화는 Fig. 5에 나타난 RT-PCR법에 의한 결과에서 알 수 있듯이 길경 추출물의 처리에 의한 Bax 유전자의 전사 수준 증가 및 Bcl-2 유전자의 전사 수준 억제에 의한 결과로 사료된다.

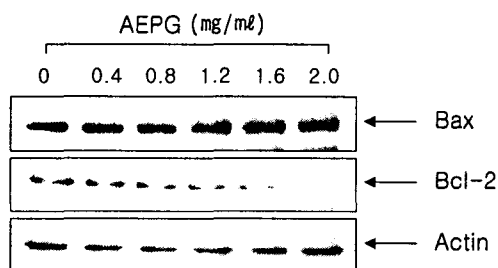


Fig. 4. Inhibition of Bcl-2 protein by AEPG treatment in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with AEPG for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-Bax and anti-Bcl-2 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

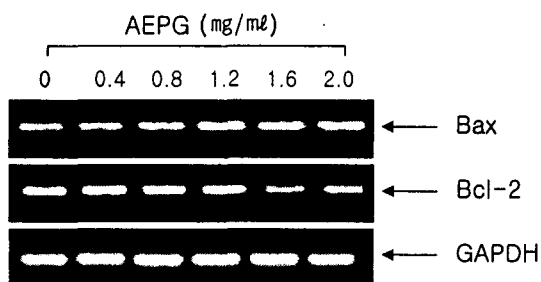


Fig. 5. Induction of Bax and inhibition of Bcl-2 mRNA by AEPG treatment in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with AEPG for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using Bax and Bcl-2 primers described in Materials and Methods. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

4. Caspase-3의 발현 및 활성에 미치는 길경 추출물의 영향

한편 ICE/CED-like protease family인 caspase는 apoptosis 유발 경로에 중요한 조절인자로서 작용하는데<sup>22,25,36</sup>, 이들 family에 속하는 많은 단백질들은 세포에서 핵과 mitochondria의 외막에 존재하며, Bcl-2/Bax family 발현의 변화에 따라 이들의 활성화가 조절되는 것으로 알려져 있다<sup>22,24,25</sup>. 따라서 지금까지 알려진 caspase 중 대부분의 apoptosis가 유발된 세포에서 높은 활성도를 보여주는 caspase-3 (CPP32)의 발현 정도를 서로 다른 농도의 길경 추출물이 처리된 폐암세포를 대상으로 조사하였다. Caspase-3가 활성화된 형태로 관찰되려면 불활성 형태인 32 kDa의 상대적 발현이 줄어들거나 그들의 활성형인 17 또는 19 kDa 분자량을 가지는 활성형의 단백질 발현이 증가되어야 한다. Fig. 6의 결과에서 볼 수 있듯이 길경 추출물의 처리에 의하여 caspase-3의 mRNA의 발현에는 큰 영향 없이 불활성형인 pro-caspase-3 단백질의 발현은 길경 추출물 처리 농도 의존적으로 감소되었으나 active-caspase-3의 발현은 상대적으로 증가되어 길경 추출물의 처리에 의한 폐암세포의 apoptosis 유발은 Bcl-2/Bax family의 발현 변화에 의한 caspase-3의 활성화와 관련이 있었음을 알 수 있었다. 이상의 Western blot analysis에 의한 결과에서 caspase-3 발현의 변화를 확인과 길경 추출물에 의한 apoptosis의 유발이 caspase-3 특이적인 경로에 의한 것인지를 확인하기 위하여 in vitro 분석에 의한 실험을 실시하였다. 이를 위하여 이를 위하여 정상 배지 및 길경 추출물이 처리된 배지에서 48시간 배양된 폐암세포에서 농도별 동량의 단백질을 취하여 fluorogenic peptide 기질과 반응을 시켰다. Fig. 7A의 결과에서 알 수 있듯이 길경이 처리된 폐암세포에서는 처리 농도 의존적으로 caspase-3의 활성이 증가되었음을 알 수 있었다. 아울러 caspase-3 specific inhibitor인 DEVD-fmk를 동시에 처리한 경우는 대조군과 매우 유사한 정도의 caspase-3 활성을 보여 길경 추출물 처리에 의한 apoptosis의 유발에 caspase-3가 중심적인 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다.

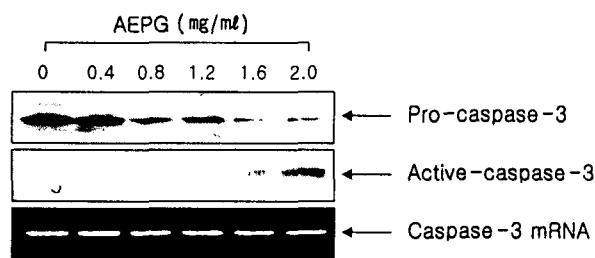


Fig. 6. Proteolytic degradation of caspase-3 by AEPG treatment in A549 human lung carcinoma cells. (A) Cells were incubated with AEPG for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-caspase-3 antibody. Proteins were visualized using ECL detection system. (B) After 48 h incubation with AEPG, total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using caspase-3 primers described in Materials and Methods.

5. Cytochrome c의 발현에 미치는 길경 추출물의 영향

다음은 이상의 결과들이 미토콘드리아에서 세포질로의 cytochrome c 유리 현상과 직접적인 연관성이 있는지의 여부를

조사하기 위하여, 정상 및 길경 추출물이 희석된 배지에서 배양된 A549 폐암세포의 세포질 단백질을 분리하여 cytochrome c 특이적인 항체를 이용하여 Western blot analysis 한 결과는 Fig. 7B와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 세포질에서의 cytochrome c 발현이 길경 추출물 처리 농도 의존적으로 증가되어 Bcl-2 family 단백질 발현의 교란과 연관된 caspase-3의 활성화 직접적으로 관여한 것으로 추정된다.

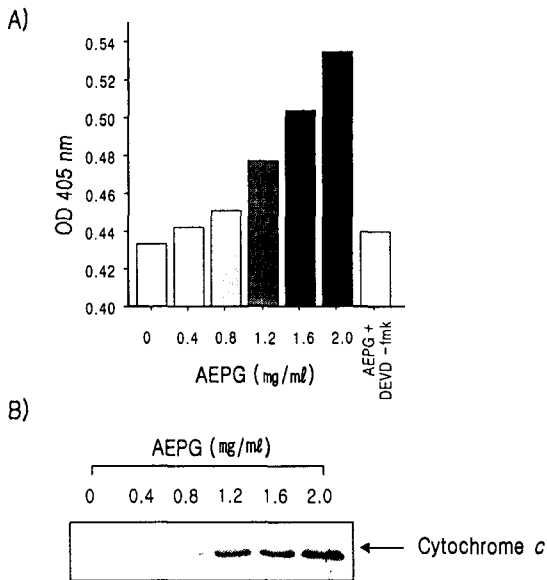


Fig. 7. Activation of caspase-3 and release cytochrome c from mitochondria into cytosol by AEPG treatment in A549 human lung carcinoma cells. (A) Cells were treated with indicated concentrations of AEPG 48 h, collected and then lysed. Aliquots (20  $\mu$ g protein) were incubated with DEVD-pNA for caspase-3 activity at 37°C for 1 h. The released fluorescent products were measured. Data represent the relative values  $\pm$  S.E. of three independent experiments. (B) Cells were incubated with AEPG for 48 h, lysed and cytosol proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membrane. The membrane was probed with the anti-cytochrome c antibody. Proteins were visualized using ECL detection system.

6. PARP,  $\beta$ -catenin 및 PLC- $\gamma$ 1의 발현에 미치는 길경 추출물의 영향

이상의 결과들에서 길경 추출물에 의한 인체 폐암세포의 억 장역제는 apoptosis의 유발과 관련이 있음이 확인되었으며, Bcl-2 family의 발현 교란과 연관된 cytochrome c의 유리에 의한 caspase-3의 활성화가 주 요인으로 추정되므로 apoptosis 유발시 caspase-3의 활성화에 의하여 특이하게 분해가 일어나는 몇 가지 표적 단백질의 발현에 미치는 길경 추출물의 영향을 Western blot analysis 방법으로 조사하였다.

1) PARP의 발현에 미치는 길경의 영향

PARP 단백질은 DNA repair나 genomic stability의 유지에 매우 중요한 역할을 하며<sup>39)</sup>, apoptosis 유발과정 중 활성화된 caspase에 의하여 단백질의 분해가 일어나면 PARP의 효소적 기능의 상실로 인하여 정상적인 DNA repair 과정이 억제되어진다<sup>24,39)</sup>. 정상적인 세포의 경우 PARP 단백질은 116 kDa의 분자량을

가지지만 apoptosis가 일어난 경우 85 kDa 크기의 단편이 관찰되거나 주 band의 발현이 감소된다<sup>38,40)</sup>. 따라서 길경 추출물의 처리에 의한 apoptosis 유발과정에서도 이러한 현상이 관찰되는지의 여부를 조사하기 위하여 다양한 농도의 길경 추출물이 함유된 배지에서 48시간 배양된 세포들을 모아 동량의 단백질을 8% SDS-polyacrylamide gel로 전기영동하여 분리시킨 후 nitrocellulose membrane으로 전이 시켜 PARP 항체를 이용하여 Western blotting을 실시하였다. Fig. 8에서 볼 수 있는 바와 같이 정상 배지에서 배양된 세포들의 경우 116 kDa 위치에 강한 주 band를 볼 수 있었다. 길경 추출물이 처리된 세포에서 85 kDa의 band가 관찰되지는 않았으나 처리 농도가 증가될수록 주 band의 발현이 매우 감소되었음을 알 수 있었다. 즉 길경 추출물의 처리에 의한 apoptosis 과정에 PARP 단백질의 분해가 유발되었음을 알 수 있었다.

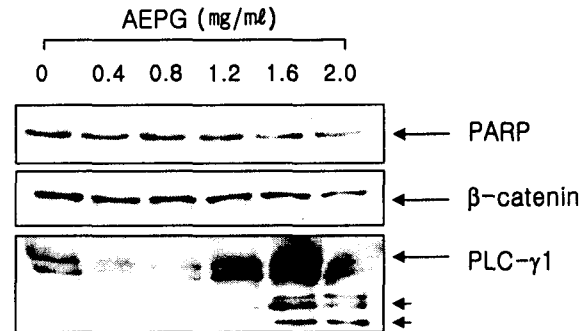


Fig. 8. Degradation of PARP,  $\beta$ -catenin and PLC- $\gamma$ 1 by AEPG treatment in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with AEPG for 48 h, lysed and total cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-PARP, anti- $\beta$ -catenin and anti-PLC- $\gamma$ 1 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system.

2)  $\beta$ -catenin의 발현에 미치는 길경 추출물의 영향

Catenin family에 속하는 단백질( $\alpha$ ,  $\beta$  및  $\gamma$ )은 모든 세포에서 발현되는 세포질 단백질로서 E-cadherin과 결합하여 세포 연결기능에 중요한 역할을 한다<sup>9,41)</sup>. 특히  $\beta$ -catenin은 세포내 골격의 유지와 다양한 부착성 세포의 전사 조절에 중요하며 세포 유착과 관계된 apoptosis 조절과 연관성을 가지고 있다<sup>35,41,42)</sup>. 정상 세포의 경우  $\beta$ -catenin은 92 kDa의 분자량을 가지나 세포 유착성 apoptosis (adherent cell apoptosis)가 일어나면 62-72 kDa로 단편화가 일어난다<sup>35,43,44)</sup>. 따라서 길경 추출물의 처리에 의한 apoptosis가 이러한 세포 유착과 밀접한 관계를 지니는지의 여부를 조사하기 위해서 길경 추출물이 함유된 배지에서 자란 세포들의  $\beta$ -catenin 발현을 조사하였으나 Fig. 8에서 보는 바와 같이 시간 경과에 따른  $\beta$ -catenin의 발현이 다소 감소되었으나, 큰 변화를 관찰할 수 있는 없었다. 따라서 길경 추출물 처리에 의한 A549 폐암세포의 apoptosis 유발시  $\beta$ -catenin 단백질의 발현 변화에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다

3) PLC- $\gamma$ 1의 발현에 미치는 길경 추출물의 영향

최근 연구에 의하면 epidermal growth factor, transforming

growth factor, insulin-like growth factor-1 및 cytokine 등과 같은 세포 성장을 촉진하는 인자들이 apoptosis를 억제할 수 있는 것으로 보고되어지고 있다<sup>45)</sup>. 이들 성장인자의 수용체들은 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), G-protein 및 PLC- $\gamma$ 1 등과 같은 주요 신호전달 분자들을 활성화시킬 수 있다. PI3K에 의해 생산되는 phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate (PIP3)는 protein kinase B (PKB)/Akt 및 PLC- $\gamma$ 1을 활성화시킨다<sup>46,47)</sup>. 특히 PLC- $\gamma$ 1은 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate를 hydrolyze시켜 protein kinase C (PKC) activator인 diacylglycerol 및 세포 내  $Ca^{2+}$  조절에 중요한 역할을 하는 inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3)를 생산한다<sup>48)</sup>. 따라서 PI3K나 Ras와 같은 세포성장 신호분자와 같이 PLC- $\gamma$ 1 역시 세포의 증식에 중심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>49)</sup>. 그러나 apoptosis가 유발될 경우 활성화된 caspase 효소에 의하여 PLC- $\gamma$ 1 단백질은 분해될 수 있기 때문에 상기 두 종류의 단백질과 함께 apoptosis 유발의 생화학적 표식자로 사용이 가능하다<sup>50,51)</sup>. 따라서 길경 추출물의 처리에 의한 apoptosis 유발과정에서 PLC- $\gamma$ 1 단백질의 분해가 관여하는지의 여부를 조사하였다. Fig. 8에 나타내었듯이 길경 추출물의 처리 농도가 증가될수록 PLC- $\gamma$ 1 단백질의 단편화에 의한 저분자 단백질 band의 발현이 매우 증가되어 길경 추출물 처리에 의한 caspase-3의 활성화에 의하여 PLC- $\gamma$ 1 단백질의 분해가 이루어졌음을 알 수 있었다.

7. Akt 및 NF- $\kappa$ B의 발현에 미치는 길경 추출물의 영향

Serine/threonine kinase에 속하는 Akt는 세포 성장의 신호 전달계에서 중요한 survival factor로 잘 알려져 있기 때문에 항암제에 의한 암세포의 apoptosis 유발에 주요 표적인자가 될 수 있다<sup>52)</sup>. 따라서 Akt가 과발현 되었을 경우 항암제에 대한 내성이 생길 수 있는 것으로 보고된 바 있으며<sup>53)</sup>, DNA topoisomerase 억제제의 처리나 성장인자 결핍은 Akt의 활성을 억제하여 세포 생존율을 억제시키거나 apoptosis를 유발할 수 있다<sup>54)</sup>. 특히 apoptosis 유발인자인 Bad는 Akt에 의하여 인산화될 수 있고, 이로 인한 Bcl-2와의 dimerization 형성이 억제되기 때문에 세포 성장을 촉진시킬 수 있다<sup>55,56)</sup>. Apoptosis에서 Akt의 활성화는 또한 caspase-9에 의하여 직접적으로 억제될 수 있으며<sup>55)</sup>, inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) family에 의해서도 조절되므로 cisplatin과 같은 항암제의 처리는 XIAP 단백질의 발현을 억제하고 Akt의 분해를 촉진시켜 apoptosis를 유발한다. 그러나 이러한 현상은 약제 감수성 암세포에서만 가능하며, 약제 저항성 암세포에서는 apoptosis가 일어나지 않기 때문에<sup>57)</sup> 항암제에 의한 Akt의 발현 억제 유도는 caspase-9의 조절 하에서 생기는 암세포의 apoptosis 유발을 일으킬 수 있다<sup>52)</sup>. 따라서 길경 추출물의 처리에 의한 A549 폐암세포의 apoptosis 유발에 Akt 신호전달 경로가 관여하는지의 여부를 조사하기 위하여 정상 및 길경 추출물이 함유된 배지에서 자란 암세포를 대상으로 Akt 단백질 및 인산화된 Akt 단백질(p-Akt)의 발현 정도를 측정하였다. Fig. 9에서 볼 수 있듯이 길경 추출물의 처리에 의한 apoptosis 유발과정에서 Akt 단백질 및 인산화된 Akt (p-Akt) 단백질의 발현이 모두

처리 농도 의존적으로 감소되었다.

이상의 상기 결과들, 즉 길경 추출물의 처리에 의한 폐암세포의 증식억제 및 apoptosis의 유발에 세포 증식에 중요한 전사 조절인자인 NF- $\kappa$ B가 관여하는지의 여부를 조사하기 위하여 길경 추출물이 처리된 세포와 정상 세포의 핵 및 세포질 내 NF- $\kappa$ B 발현의 영향을 비교 조사하였다. 이를 위하여 48시간 동안 다양한 농도의 길경 추출물이 함유된 배지 및 정상 배지에서 자란 A549 세포들을 대상으로 nuclear fraction과 cytosolic fraction을 분리하여 Western blot analysis에 의한 NF- $\kappa$ B 단백질의 발현 양상을 비교한 결과는 Fig. 10과 같다. 결과에서 알 수 있듯이 전체적으로 NF- $\kappa$ B 단백질의 발현은 감소되었으나, 0.4 및 0.8 mg/ml 길경 추출물이 함유된 배지에서 자란 폐암세포에서는 세포질에 비하여 핵 내 NF- $\kappa$ B 단백질의 발현이 다소 증가하였다. 즉 저농도 길경 추출물에 의한 초기 apoptosis 유발 조건에서 세포질의 NF- $\kappa$ B 단백질이 핵 내로 다소 이동하는 듯한 양상을 보여 줌으로서 길경 추출물 처리에 의한 apoptosis 유발의 초기 과정 NF- $\kappa$ B가 직·간접적으로 관여하거나, 길경 추출물 처리에 의한 apoptosis 유발의 반대작용으로 세포 자체의 증식을 위한 세포 자기 방어 수단의 관여함을 시사하여 주었다.

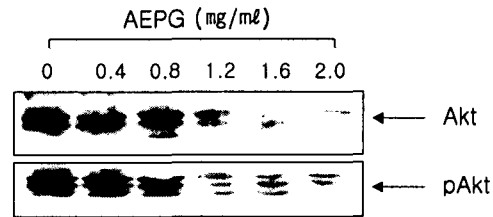


Fig. 9. Effects of AEPG treatment on the levels of Akt and pAkt protein in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with AEPG for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10 % SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-Akt anti-pAkt antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system.

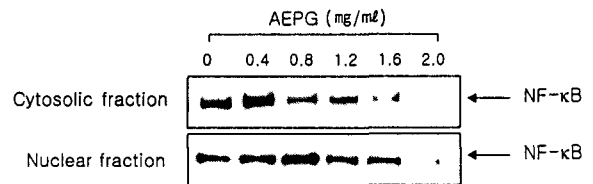


Fig. 10. Effects of AEPG treatment on the levels of NF- $\kappa$ B protein in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with AEPG for 48 h, lysed and nuclear fraction and cytosolic fraction were separated by 10 % SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-NF- $\kappa$ B antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system.

8. COXs의 발현 및 PGE2 생산에 미치는 길경 추출물의 영향

한편 염증을 포함한 다양한 생체 반응에서 prostaglandin은 세포분열이나 증식에 영향을 줌으로서 각종 인체 질병의 유발과 진행에 중요한 역할을 함이 최근 밝혀지고 있다<sup>27,28)</sup>. Prostaglandin의 합성에서 2가지의 COX isoform이 관여하고 있



는데, 대부분의 조직에서 일정한 수준으로 발현되는 COX-1의 경우 인체의 항상성 유지와 연관된 기능수행에 관여하며, COX-2는 암을 포함한 세포의 성장 및 분화와 연관된 각종 퇴행성 질환의 발병과 진행에 중요한 역할을 한다<sup>58,59</sup>. 역학적 조사와 여러 종류의 암 조직에서 COX-2와 iNOS가 높은 수준으로 발현되고 있으며 이들 두 유전자의 발현을 증대시킬 경우 apoptosis에 대한 저항성을 가지는 점으로 보아 특히 염증반응과 함께 세포의 암화에 COX-2는 iNOS와 밀접한 관계를 가진다고 볼 수 있다<sup>29,30</sup>. 또한 COX-2의 과발현에 의해 암조직에서의 혈관신생 및 전이능이 높아지고 apoptosis를 막는다는 점과 COX-2 specific inhibitor에 의한 angiogenesis와 종양형성의 억제 등<sup>60</sup>의 결과에서 이 유전자의 선택적 조절에 의한 암 예방전략이 대두되고 있다<sup>29,31</sup>. 한편 암 뿐만 아니라 면역계 질환, 심혈관 질환, 당뇨 등과 관련된 유전자의 promoter 영역에 결합하여 그들의 유전자발현을 유도하는 NF- $\kappa$ B에 의하여 COX-2 발현이 조절된다는 보고들이 있다<sup>29,61</sup>. COX-2의 최근 연구 방향은 이러한 전사활성 요소와 연관된 상위 신호전달 경로에 많은 관심이 모아지고 있으며 이들의 활성을 조절할 수 있는 물질의 탐색작업에 많은 비중을 두고 있다. 따라서 길경 추출물이 처리된 폐암세포를 대상으로 COXs 단백질 및 mRNA의 발현 변화 가능성을 먼저 조사하여 보았다. Fig. 11의 결과에서 볼 수 있듯이 길경 추출물의 처리에 의한 A549 폐암세포의 COX-1 발현에는 큰 영향이 없었으나, COX-2의 경우 단백질의 발현이 길경 추출물 처리 농도 의존적으로 다소 감소 되었음을 알 수 있었다. 따라서 COXs에 촉매활성의 결과 생산되는 arachidonic acid 대사체인 PGE2의 생성에 미치는 길경 추출물의 영향을 조사하였다. 이를 위하여 정상 및 길경이 처리된 배지에서 48시간 동안 배양된 폐암세포들을 대상으로 EIA를 적용시켜 얻은 결과는 Fig. 12과 같다. Fig. 12에서 볼 수 있듯이 COX product에 해당하는 PGE2의 생성은 길경 추출물 처리 농도 의존적으로 매우 감소되었다.

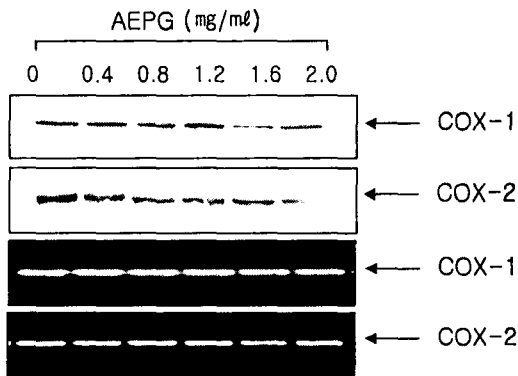


Fig. 11. Effects of AEPG treatment on the levels of COX-1 and COX-2 mRNA and protein in A549 human lung carcinoma cells. (A) A549 cells were incubated with AEPG for 48 h lysed and cellular proteins were separated by 10 % SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-COX-1 and anti-COX-2 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. (B) Cells were incubated with AEPG for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using COX-1 and COX-2 primers described in Materials and Methods.

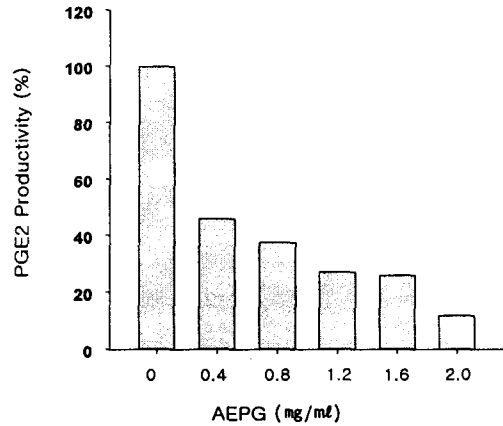


Fig. 12. Effects of AEPG treatment on PGE2 accumulation in A549 human lung carcinoma cells. After A549 cells were treated with various concentrations of AEPG for 48 h, PGE2 accumulation was determined as described in Materials and Methods. Data represent relative means of two independent experiments.

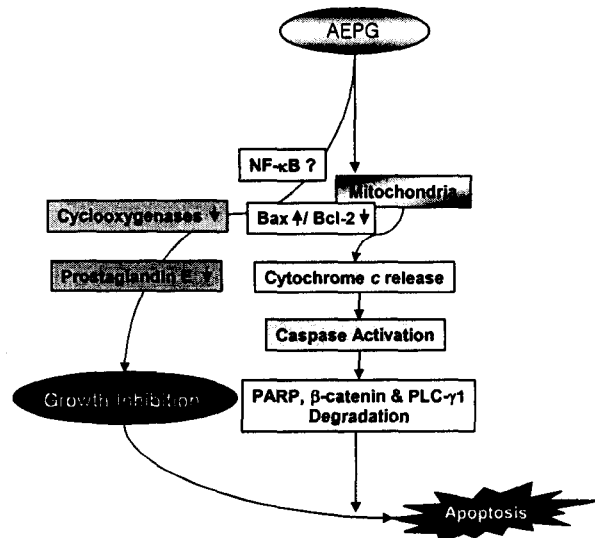


Fig. 13. Proposed schematic model for AEPG treatment-mediated growth inhibition and apoptosis of human lung carcinoma A549 cells.

이상의 결과에서 길경 수용액 추출물에 의한 A549 인체 폐암세포의 성장억제는 apoptosis 유발과 깊은 상관성이 있었으며, 길경 추출물에 의한 폐암세포의 apoptosis 유발에는 Bcl-2 유전자의 발현 감소 및 Bax 유전자 발현의 증가와 연관된 미토콘드리아에서 세포질 내로의 cytochrome c 유리 및 연관된 caspase-3의 활성화에 의한 것으로 요약될 수 있었다. 또한 COX의 발현 저하에 따른 PGE2의 생성 억제 및 Akt의 발현 감소, NF- $\kappa$ B의 발현 변화 등을 고려한 결과를 종합하여 볼 때, Fig. 13과 같이 폐암세포 성장억제 기전 모식도를 제시할 수 있었다. 즉 길경 추출물 처리에 의한 A549 폐암세포의 성장억제는 본 결과에서 제시한 몇 가지 유전자들의 발현 조절을 통하여 apoptosis를 유발시킬 것으로 추측되어진다. 그러나 길경 추출물의 정확한 항암 효과의 조사를 위해서는 보다 다양한 세포종식 억제 기전 해석

이 추가적으로 실시되어야 하며, 특히 수용액 추출물에서 항암 활성을 가지는 길경 함유물의 정확한 동정이 뒤따라야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

길경 수용액 추출물의 항암성 작용 검증을 위한 연구의 일환으로 인체 폐암세포주인 A549 세포의 성장에 미치는 길경 추출물의 영향을 조사한 결과, 길경 추출물의 처리 농도 의존적으로 A549 폐암세포의 생존율은 현저하게 감소되었고, 길경 추출물에 의한 폐암세포의 증식억제는 처리 농도 의존적으로 sub-G1 기의 증가 및 apoptotic body의 증가에 의한 apoptosis 유발과 연관이 있었으며, 길경 추출물은 apoptosis 조절에 관여하는 Bcl-2 family 유전자중 세포 생존에 관여하는 Bcl-2의 mRNA 및 단백질의 발현은 모두 감소시켰으며, apoptosis를 유도하는 Bax의 발현은 증가시켰다. 그리고 길경 추출물 처리에 의한 apoptosis 유발은 caspase-3의 활성화 및 미토콘드리아에서 세포질로의 cytochrome c 유리 증가와 연관성이 있었으며, 길경 추출물이 처리된 폐암세포에서는 전형적인 apoptosis에 의한 세포사에서 관찰되는 PARP,  $\beta$ -catenin 및 PLC- $\gamma$ 1 단백질의 발현저하 및 분해 현상도 관찰할 수 있었다. 길경 추출물에 의한 폐암세포 증식억제는 COXs의 단백질의 발현을 동시에 감소시켰으며, 그에 따른 PGE2의 생성도 처리 농도 의존적으로 감소되었다.

이상의 결과에서 길경 추출물에 의한 A549 인체 폐암세포의 성장억제는 apoptosis의 유발 및 세포증식 조절과 연관된 주요한 몇 가지 유전자들만을 선택적으로 조절함으로써 암세포의 성장을 막고 생존을 감소시키면서 apoptosis를 유발하는 것으로, 이러한 결과들은 길경 추출물을 이용한 인체 암세포의 성장억제제의 개발 가능성이 있음을 시사하여 준다.

## 감사의 글

이 논문은 동의대학교 교내 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

## 참고문헌

1. Lee, E.B., Pharmacological activities of crude platycodin. J. Pharm. Soc. Korea 19, 164-176, 1975.
2. Ozaki, Y., Studies on antiinflammatory effect of Japanese Oriental medicines (kampo medicines) used to treat inflammatory diseases. Biol. Pharm. Bull. 18, 559-562, 1995.
3. Shin, C.Y., Lee, W.J., Lee, E.B., Choi, E.Y. and Ko, K.H., Platycodin D and D3 increase airway mucin release in vivo and in vitro in rats and hamsters. Planta Med. 68, 221-225, 2002.
4. Chung, J.H., Shin, P.G., Ryu, J.C., Jang, D.S. and Cho, S.H., Pharmaceutical substances of Platycodon grandiflorum(jacquin) A. De Candolle. Arg. Chem. Biotech. 40, 152-156, 1997.
5. Saeki, T., Koike, K. and Nikaido, T., A comparative study on commercial, botanical gardens and wild samples of the roots of Platycodon grandiflorum by HPLC analysis. Planta Med. 65, 428-431, 1999.
6. Takagi, K. and Lee, E.B., Pharmacological studies on Platycodon grandiflorum A. DC. Yakugaku Zasshi. 92, 951-973, 1972.
7. Kiibo, M., Nagao, T., Matsuda, H. and Namba, K., Immune pharmacological studies on platycodi radix. I. Effect on the phagocytosis in the mouse. Shoyakugaku Zasshi J. Pharm. Soc. Jpn. 40, 367-374, 1996.
8. Bae, M.J., Park, M.H. and Son, G.M., Studies on immunomodulating function of components separated from Platycodi radix. Kor. J. Food Nut. 9, 69-75, 1996.
9. Johnson, J.P., Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. Cancer Metastasis. Rev. 18, 345-357, 1999.
10. Choi, C.Y., Kim, J.Y., Kim, Y.S., Chung, Y.C., Hahm, K.S. and Jeong, H.G., Augmentation of macrophage functions by an aqueous extract isolated from Platycodon grandiflorum. Cancer Lett. 166, 17-25, 2001.
11. Han, S.B., Park, H.S., Lee, K.H., Lee, C.W., Lee, S.H., Kim, H.C., Kim, Y.S., Lee, H.S. and Kim, H.M., Polysaccharide isolated from the radix of Platycodon grandiflorum selectively activates B cells and macrophages but not T cells. Int. Immunopharmacol. 1, 1969-1978, 2001.
12. Nagao, T., Matsuda, H., Namba, K. and Kubo, M., Immune pharmacological studies on platycodi radix (II). Antitumor activity of inulin from platycodi radix. Shoyakugaku Zasshi J. Pharm. Soc. Jpn. 40, 375-380, 1986.
13. Kim, Y.P., Lee, E.B., Kim, Y.S., Li, D., Ban, H.S., Lim, S.S., Shin, K.H. and Ohuchi, K., Inhibition of prostaglandin E2 production by platycodin D isolated from the root of Platycodon grandiflorum. Planta Med. 67, 362-364, 2001.
14. Kim, Y.S., Lee, E.B., Kim, K.J., Lee, Y.T., Gho, K.B. and Chung, Y.C., Antitumor and immunomodulatory activities of the Platycodon grandiflorum cultivated for more than 20 years. Yakhak Hoeji 42, 382-387, 1998.
15. Lee, J.Y., Hwang, W.I. and Lim, S.T., Effect of Platycodon grandiflorum DC extract on the growth of cancer cell lines, Kor. J. Food Sci. Technol. 30, 13-21, 1998.
16. Lee, K.J., You, H.J., Park, S.J., Kim, Y.S., Chung, Y.C., Jeong, T.C. and Jeong, H.G., Hepatoprotective effects of Platycodon grandiflorum on acetaminophen-induced liver damage in mice. Cancer Lett. 174, 73-81, 2001.
17. Choi, C.Y., Kim, J.Y., Kim, Y.S., Chung, Y.C., Seo, J.K. and Jeong, H.G., Aqueous extract isolated from Platycodon grandiflorum elicits the release of nitric oxide and tumor

- necrosis factor- $\alpha$  from murine macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 1, 1141-1151, 2001b.
18. Arends, M.J., Morris, R.G. and Wylli, A.H., Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 136, 593-608, 1990.
  19. Evans, V.G., Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol. Int.* 17, 461-476, 1993.
  20. Lieberthal, W., Koh, J.S. and Levine, J.S., Necrosis and apoptosis in acute renal failure. *Semin. Nephrol.* 18, 505-518, 1998.
  21. Shi, L., Nishioka, W.K., Th'ng, J., Bradbury, E.M., Litchfield, D.W. and Greenberg, A.H., Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science* 263, 1143-1145, 1994.
  22. Chiarugi, V., Magnelli, L. and Basi, G., Apoptosis and the cell cycle. *Cell. Mol. Biol. Res.* 40, 603-612, 1994.
  23. El-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietenpol, J.A., Burrell, M., Hill, D.E., Wang, Y., Wiman, K.G., Mercer, W.E., Kastan, M.B., Kohn, K.W., Elledge, S.J., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B., WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 54, 1169-1174, 1994.
  24. Miyashita, T. and Reed, J.C., Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299, 1995.
  25. Antonsson, B. and Martinou, J.C., The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.* 256, 50-57, 2000.
  26. Nagata, S., Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365, 1997.
  27. Turini, M.E. and DuBois, R.N., Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu. Rev. Med.* 53, 35-57, 2002.
  28. Giercksky, K.E., COX-2 inhibition and prevention of cancer. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 15, 821-833, 2001.
  29. Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K. and Lee, S.S., Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B activation. *Mutat. Res.* 480, 243-268, 2001.
  30. Chiarugi, V., Magnelli, L. and Gallo, O., Cox-2, iNOS and p53 as play-makers of tumor angiogenesis. *Int. J. Mol. Med.* 2, 715-719, 1998.
  31. Thun, M.J., Henley, S.J. and Patrono, C., Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 252-266, 2002.
  32. Lee, J.H., Choi, Y.H. and Choi, B.T., The aqueous extract from Platycodi radix attenuates lipopolysaccharide-induced NF- $\kappa$ B activation in RAW 264.7 cell and acute lung injury in rats. *J. Kor. Asso. Cancer Pre.* 7, 87-93, 2002.
  33. Lee, J.H., Kang, G.H., Kim, K.C., Kim, K.M., Park, D.I., Choi, B.T., Kang, H.S., Lee, Y.T. and Choi, Y.H., Tetrandrine-induced cell cycle arrest and apoptosis in A549 human lung carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 21, 1239-1244, 2002.
  34. Choi, Y.H. Research technics for the cell cycle study, *Exp. Mol. Med.* 33, S15-36, 2001.
  35. Choi, Y.H., Bae, J.H., Yoo, M.A., Chung, H.Y., Kim, N.D. and Kim, K.W., Induction of apoptosis by ursolic acid through activation of caspases and down-regulation of c-IAPs in human prostate epithelial cells. *Int. J. Oncol.* 17, 565-571, 2000.
  36. Choi, Y.H., Im, E.O., Suh, H.S., Jin, Y.E., Lee, W.H., Yoo, Y.H., Kim, K.W. and Kim, N.D., Apoptotic activity of novel bile acid derivatives in human leukemic T cells through the activation of caspases. *Int. J. Oncol.* 18, 979-984, 2001.
  37. Choi, Y.H., Lee, S.J., Nguyen, P., Jang, J.S., Lee, L., Wu, M.L., Takano, E., Maki, M., Henkart, P.A. and Trepel, J.B., Regulation of cyclin D1 by calpain protease. *J. Biol. Chem.* 272, 28479-28484, 1997.
  38. Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G. and Earnshaw, W.C., Cleavage of poly ADP-ribose polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371, 346-347, 1994.
  39. Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S. and Dixit, V.M., Yama/ CPP32, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81, 801-809, 1995.
  40. Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E. and Poirier, G.G., Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 53, 3976-3985, 1993.
  41. Wijnhoven, B.P., Dinjens, W.N. and Pignatelli, M., E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br. J. Surg.* 87, 992-1005, 2000.
  42. Debruyne, P., Vermeulen, S. and Mareel, M., The role of the E-cadherin/catenin complex in gastrointestinal cancer. *Acta Gastroenterol. Belg.* 62, 393-402, 1999.
  43. Fukuda, K., Apoptosis-associated cleavage of  $\beta$ -catenin in human colon cancer and rat hepatoma cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 31, 519-529, 1999.
  44. Steinhilber, U., Badock, V., Bauer, A., Behrens, J., Wittman-Liebold, B., Dorken, B. and Bommert, K., Apoptosis-induced cleavage of  $\beta$ -catenin by caspase-3 results in proteolytic fragments with reduced transactivation

- potential. *J. Biol. Chem.* 275, 16345-16353, 2000.
45. Jarpe, M.B., Widmann, C., Knall, C., Schlesinger, T.K., Gibson, S., Yujiri, T., Fanger, G.R., Gelfand, E.W. and Johnson, G.L., Anti-apoptotic versus pro-apoptotic signal transduction: checkpoints and stop signs along the road to death. *Oncogene*. 17: 1475-82, 1998
  46. Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C. and Toker, A., Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 275: 665-668, 1997.
  47. Bae, S.S., Lee, Y.H., Chang, J.S., Galadari, S.H., Kim, Y.S., Ryu, S.H. and Suh, P.G., Src homology domains of phospholipase C  $\gamma$ 1 inhibit nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *J. Neurochem.* 71, 178-185, 1998.
  48. Rhee, S.G., Suh, P.G., Ryu, S.H. and Lee, S.Y., Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science* 244, 546-550, 1989.
  49. Chang, J.S., Noh, D.Y., Park, I.A., Kim, M.J., Song, H., Ryu, S.H. and Suh, P.G., Overexpression of phospholipase C-1 in rat 3Y1 fibroblast cells leads to malignant transformation. *Cancer Res.* 57, 5465-5468, 1997.
  50. Myklebust, J.H., Blomhoff, H.K., Rusten, L.S., Stokke, T. and Smeland, E.B., Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is important for erythropoietin-induced erythropoiesis from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.* 30, 990-1000, 2002.
  51. Bae, S.S., Perry, D.K., Oh, Y.S., Choi, J.H., Galadari, S.H., Ghayur, T., Ryu, S.H., Hannun, Y.A. and Suh, P.G., Proteolytic cleavage of phospholipase C- $\gamma$ 1 during apoptosis in Molt-4 cells. *FASEB J.* 14, 1083-1092, 2000.
  52. Neri, L.M., Borgatti, P., Capitani, S. and Martelli, A.M., The nuclear phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: a new second messenger system. *Biochim. Biophys. Acta.* 1584, 73-80, 2002.
  53. Page, C., Lin, H.J., Jin, Y., Castle, V.P., Nunez, G., Huang, M. and Lin, J., Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis. *Anticancer Res.* 20, 407-416, 2000.
  54. Nakashio, A., Fujita, N., Rokudai, S., Sato, S. and Tsuruo, T., Prevention of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt survival signaling pathway during topotecan-induced apoptosis. *Cancer Res.* 60, 5303-5309, 2000.
  55. Zhou, H., Li, X.M., Meinkoth, J. and Pittman, R.N., Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J. Cell Biol.* 151, 483-494, 2000.
  56. Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. and Greenberg, M.E., Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241, 1997.
  57. Asselin, E., Mills, G.B. and Tsang, B.K., XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res.* 61, 1862-1868, 2001.
  58. Vainio, H., Is COX-2 inhibition a panacea for cancer prevention? *Int. J. Cancer* 94, 613-614, 2001.
  59. Dempke, W., Rie, C., Grothey, A. and Schmoll, H.J., Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127, 411-417, 2001.
  60. Sawaoka, H., Tsuji, S., Tsujii, M., Gunawan, E.S., Sasaki, Y., Kawano, S. and Hori, M., Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo. *Lab. Invest.* 79, 1469-1477, 1999.
  61. Yamamoto, Y. and Gaynor, R.B., Therapeutic potential of inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Invest.* 107, 135-142, 2001.