

길경 수용액 추출물에 의한 인체 폐암세포의 성장억제 기전 연구

강락원 · 이재훈¹ · 감철우 · 최병태² · 최영현¹ · 박동일*

동의대학교 한의과대학 내과학교실, 1: 생화학교실, 2: 해부학교실 및 한의학연구소

Cell Cycle Arrest of Human Lung Carcinoma A549 Cells by an Aqueous Extract from the Roots of *Platycodon grandiflorum*

Rak Won Kang, Jae Hun Lee¹, Cheol Woo Kam, Byung Tae Choi², Yung Hyun Choi¹, Dong Il Park*

Department of Internal Medicine, 1: Biochemistry, 2: Anatomy,
College of Oriental Medicine and Research Institute 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. We investigated the effects of an aqueous extract from the roots of *P. grandiflorum* (AEPG) on the cell proliferation of human lung carcinoma A549 cells in order to understand its anti-proliferative mechanism. AEPG treatment resulted in the inhibition of cell proliferation in a concentration-dependent manner. This anti-proliferative effect of A549 cells by AEPG treatment was associated with morphological changes such as membrane shrinking, cell rounding up and inhibition of cell migration. DNA flow cytometric histograms showed that populations of both S and G2/M phase of the cell cycle were increased by AEPG treatment in a concentration-dependent manner. AEPG treatment induced a marked accumulation of tumor suppressor p53 and a concomitant induction of cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p21 and p27. In addition, SBS treatment resulted in down-regulation of Cdk2 and Cdk4 expression. The present results indicated that AEPG-induced inhibition of lung cancer cell proliferation is associated with the blockage of S to G2/M phase progression the induction of apoptosis. Taken together, these findings suggest that *P. grandiflorum* has strong potential for development as an agent for prevention against human lung cancer.

Key words : *Platycodon grandiflorum*, Lung cancer cells, cell cycle, p53, p21, p27

서 론

세포의 증식과 암의 발생 측면에서 세포주기 조절의 교란에 의한 세포가 끝없이 이어져 증식에 계속되는 것이 암세포라고 할 수 있다^{1,2)}. 따라서 세포주기 조절과 연관된 특정인자들의 발현 조절을 통한 암세포의 증식억제 기구해석은 암을 포함한 특정 약제의 개발에 매우 중요한 의의를 가질 수 있다. 본 연구에서 길경(*Platycodi radix*) 수용액 추출물이 인체 폐암 세포주인 A549 세포의 성장에 미치는 영향을 조사한 결과, 세포주기 조절에 관여하는 몇 가지 유전자 발현의 조절을 통하여 DNA 합성기로의 진입은 가능하지만 세포의 분열은 저해되는 현상을 관찰할

수 있었다. 길경은 한국, 중국 및 일본 등지에 널리 자생하는 다년생 초본인 초롱꽃목 초롱꽃과(*Campanulaceae*)에 속하는 도라지(*Platycodon grandiflorum* A. DC)의 뿌리 껍질을 벗기거나 또는 그대로 밀린 것을 말하며, 전통적으로 염증성 호흡기 질환 및 식용으로 많이 사용되어져 오고 있다³⁻⁵⁾. 길경에 함유된 다양한 약리 성분의 분석에 관한 보고는 이미 다수의 연구자들에 의해 수행되었으며^{6,7)}, 각종 생리활성의 기능 향상에 관한 연구가 꾸준히 진행되어져 오고 있다. 그중 최근에 보고되어지는 항암 작용의 가능성은 매우 주목을 받고 있으나 대부분 현상의 관찰에 지나지 않으며, 정확한 항암기전을 제시한 예는 거의 없다⁸⁻¹¹⁾. 특히 한방처방의 형태로 섭취하는 길경의 성분이 수용성 성분인 점을 고려할 때, 여기에 관한 기전 연구는 거의 전무한 실정이다. 본 연구의 결과에 의하면 길경 수용액 추출물의 처리 농도 증가에 따른 인체 폐암세포의 성장억제 효과는 특히 세포주기 조절에

* 교신저자 : 박동일, 부산광역시 부산진구 양정동, 동의대학교 한의과대학
E-mail : dipark@dongeui.ac.kr Tel : 051-850-8650
· 접수 : 2002/11/30 · 수정 : 2003/01/04 · 채택 : 2003/02/04

가장 중요한 종양억제 유전자 p53 및 세포주기 조절 음성 인자 인 cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor의 발현증가와 연관성이 있었다. 이를 선행연구¹²⁾와 비교해 보면 본 결과에서 제시하는 몇 가지의 경로로 통한 세포주기 교란은 apoptosis 유발과 직접적인 연관성을 가진다고 사료된다. 그러나 길경 추출물의 정확한 항암 효과의 조사를 위해서는 보다 다양한 세포종식 억제 기전 해석이 유전적 background가 서로 다른 암세포주들을 대상으로 추가적으로 실시되어야 하며, 특히 수용액 추출물에서 항암 활성을 가지는 길경 함유물의 정확한 동정이 뒤따라야 할 것으로 사료된다.

재료 및 방법

1. 암세포의 배양 및 길경 수용액의 추출

본 실험에 사용한 A549 인체 폐암세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며 Lee et al.¹³⁾의 방법에 준하여 배양하였다. 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 μ m의 여과지를 이용하여 부유 성분을 걸러낸 후 수용성분을 동결 건조하여 사용하였다.

2. 세포형태 관찰 및 cell migration 억제 여부조사

길경 추출물 처리를 위하여 암세포를 24시간동안 안정화시킨 후, 다양한 농도(0-2.0 mg/ml)로 길경 추출물이 희석된 배지에 암세포를 48시간 배양 후, 위상차 현미경을 이용하여 400 배의 배율로 각 처리 농도에 따른 형태의 변화를 조사하였다. 길경 추출물 처리에 의한 cell migration 억제 여부 조사는 Igura et al.¹⁴⁾의 방법에 준하여 24시간 동안 암세포를 안정화시킨 후 razor blade를 이용하여 5 mm 정도의 폭으로 세포를 제거한 후, phosphate-buffered saline (PBS) 용액으로 수세 후 정상 또는 길경 추출물이 희석된 배지로 교체하여 48시간 배양하였다. 준비된 세포들을 Wright staining 용액(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)을 이용하여 염색 후 광학현미경하에서 세포의 migration 정도를 관찰하였다.

3. DNA flow cytometry에 의한 세포주기 분석

정상 및 길경 추출물이 함유된 배지에서 자란 세포들을 PBS로 두세 번 씻어내고, 고정액 (70% ethyl alcohol, 0.5% Tween 20)을 첨가하여 4°C에서 고정시킨 후, 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DNA intercalating dye propidium iodide (PI, concentration, 50 μ g/ml; Sigma)와 10 kunit의 RNase (Sigma)를 처리하고 4°C에서 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 분석하였다¹⁵⁾.

4. SDS-polyacrylamide gel 전기영동

Choi et al.¹⁶⁾의 방법에 준하여 정상 및 길경 추출물이 함유된 배지에서 자란 세포를 PBS로 세 번 씻어 내고, 적당량의 lysis buffer (40 mM Tris-Cl pH8.0, 120 mM NaCl, 0.1% NP-40, 0.1 mM sodium orthovanadate, 2 μ g/ml aprotinin, 2 μ g/ml leupeptin 및 100 μ g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride)를 첨가하여 4°C에서 20분간 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약과 그 사용방법에 따랐다(Bio-Rad, Hercules, CA, USA). 동량의 단백질을 SDS (sodium dodesyl sulfate) -polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다.

5. Western blot analysis

SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBST (0.1% Tween 20 in PBS)를 이용하여 4°C에서 1시간 이상 incubation하면서 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고, 특정 단백질에 대한 항체를 membrane에 적용시켜 항원 항체 반응을 일으킨 후, PBST로 씻어내고 특정 항체에 대한 이차 항체를 적용시킨 다음 Enhanced ChemiLuminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다^{15,16)}. 실험에 사용된 항체들 중, mouse monoclonal antibody인 cyclin A, B1, D1, p21, p27 및 p53은 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입한다. 그리고 rabbit polyclonal antibody인 cyclin E, Cdk2, Cdk4 및 Cdk6은 Santa Cruz Biotechnology Int. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Life Science에서 구입하였다.

6. RT-PCR

상기와 동일한 조건에서 준비된 암세포를 대상으로 RNAzol B (TEL-TEST, INC., Texas, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, Choi¹⁵⁾의 방법에 준하여 oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase를 이용하여 2 μ g의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 사용하여 Table 2에 나열된 유전자를 중심으로 polymerase chain reaction(PCR) 방법으로 증폭하였다(Table 1). 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 포함하여 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

결 과

1. 길경 추출물 처리에 따른 암세포 형태 변화 및 cell migration의 억제

길경 수용액 추출물의 처리에 따른 암세포 형태 변화의 결과는 Fig. 1에서 볼 수 있듯이 추출물의 농도 증가에 따른 암세포의 심한 형태적 변형이 관찰되었는데, 48시간 동안의 저농도 처리군 (0.4 mg/ml 및 0.8 mg/ml)에서의 경우는 전체적으로 세포질이 응축되면서 짧고 많은 가지를 친 듯한 모양으로 바뀌었으며, 1.2 mg/ml 이상의 고농도 처리군에서 처리 농도 증가에 따라 농도 의존적으로 암세포들이 부착력 상실 현상을 볼 수 있었다. 이러한 심한 형태적 변형은 전보에 보고한 길경 추출물의 처리에 의한 성장억제와 매우 큰 상관성을 지닌다고 할 수 있겠다¹²⁾. 한편 배양 dish에 암세포가 거의 포화상태로 꽉 찬 상태에서 Igura et al.¹⁴⁾의 방법에 의한 cell migration에 미치는 길경 추출물의 영향을 조사한 결과, 길경 추출물의 처리 농도 증가에 따라 암세포의 migration이 거의 이루어지지 못하였다(Fig. 2). 이상은 길경 추출물의 처리에 의하여 암세포의 증식이 농도 의존적으로 강하게 억제되었음을 보여 주는 결과이다.

Table 1. Sequences of primer used for RT-PCR

Gene name		Sequence
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'
GAPDH	Sence	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	Antisence	5'-AGC-CIT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

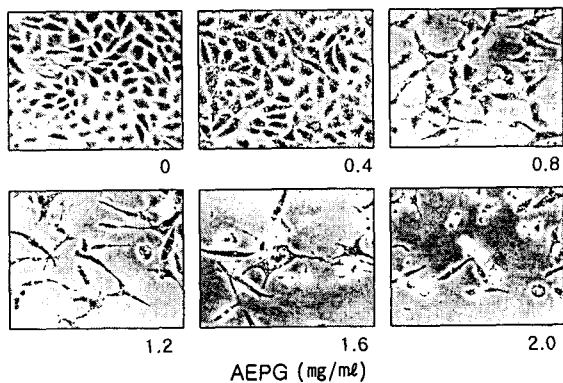


Fig. 1. Morphological changes in A549 human lung carcinoma cells following incubation with an aqueous extract of Platycodon grandiflorum (AEPG). Exponentially growing cells were incubated with either vehicle alone (0) or AEPG for 48 h. Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, X200.

2. 길경 추출물이 암세포의 세포주기 분포에 미치는 영향

이상의 길경 추출물에 의한 암세포 성장억제 효과의 기전 해석을 위하여 세포주기 조절과의 상관성 여부를 조사하였다. 이를 위하여 먼저 길경 추출물이 함유된 배지에서 48시간 동안 배양된 암세포를 대상으로 DNA flow cytometry 분석을 실시하였으며, 그 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다. Table 2에 나타난 바와 같이 정상 배지에서 자란 A549 폐암세포의 경우 G1기가 전체의 약 58.47%를 차지하고 있었으며, S기와 G2/M기에 속하는 세포가 각각 14.30% 및 27.23% 정도였다. 그러나 0.8 mg/ml의 길경 추출물 농도에서 48시간 배양된 세포의 경우 G1기가

55.79%로 감소되었으며, S기와 G2/M기가 약 14.64% 및 29.57%로 나타났다. 또한 1.2 mg/ml 및 1.6 mg/ml의 농도에서 자란 암세포의 경우는 G1기에 해당하는 세포의 분포가 46.95% 및 39.91%로 감소되었으며, 상대적으로 S기(16.30% 및 23.20%) 및 G2/M기(36.75% 및 35.53%)에 해당되는 세포의 빈도는 점점 증가되었다. 즉 길경 추출물의 처리 농도가 증가될수록 S기 및 G2/M기에서의 세포성장이 억제되는 결과를 보여 주었다. 이상의 결과를 종합하여 보면 길경 추출물의 처리에 의한 암세포의 성장억제 효과는 G1기보다는 DNA 합성기 및 분열기에 성장이 다소 억제되었음을 알 수 있었다.

Table 2. Fractions of each cell cycle phase of A549 lung carcinoma cells cultured in the presence or absence of various concentration of aqueous extract of Platycodon grandiflorum (AEPG) for 48 h.

AEPG (mg/ml)	% of the cells		
	G1	S	G2/M
0	58.47	14.30	27.23
0.4	58.00	14.86	27.14
0.8	55.79	14.64	29.57
1.2	46.95	16.30	36.75
1.6	39.91	23.20	35.53

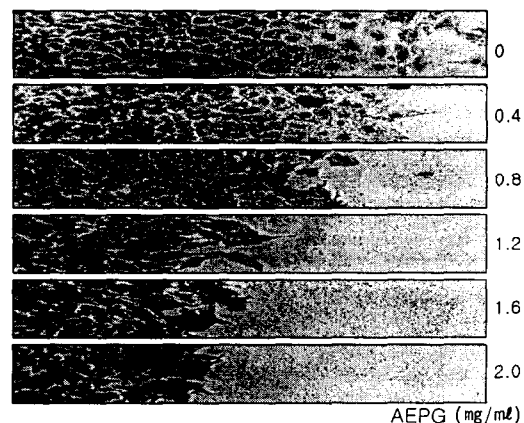


Fig. 2. Effect of AEPG treatment on the migration of A549 cells. Confluent cultures of A549 cells were wounded with a razor blade. The cells were incubated with the indicated concentrations of AEPG for 48 h. After fixation and staining, the morphology was pictured under light microscopy. Magnification, X200.

3. Cyclins 및 Cdks의 발현에 미치는 길경 추출물의 영향

다음은 세포주기 조절관점에서 이상의 결과와 연관된 기전 해석의 일환으로 길경 추출물이 함유된 배지에서 배양한 세포들을 대상으로 현재까지 밝혀진 cyclin들 중에서 특히 세포주기 checkpoint 관점에서 중요한 cyclin들의 발현 정도를 비교 조사하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 cyclin D1의 경우는 길경 추출물 처리 농도의 증가에 따라 단백질의 발현이 점차 감소함을 알 수 있었으나, cyclin A, cyclin B1 및 cyclin E의 발현에는 큰 영향이 주지 못하였다. 한편 세포주기 양성인자 조절인자와의 결합을 통해 세포의 증식을 활성화할 수 있으면서 그의 inhibitor에 의해 활성화가 억제되는 Cdks의 발현에 미치는 길경 추출물의

영향을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 길경 추출물의 처리에 의하여 조사된 3가지 Cdk들 중에서 Cdk2 및 Cdk4는 길경 추출물의 농도 증가에 따라 단백질 수준에서의 발현이 다소 감소되었으나 Cdk6의 경우는 대조군에 비하여 유의적인 변화가 없었다.

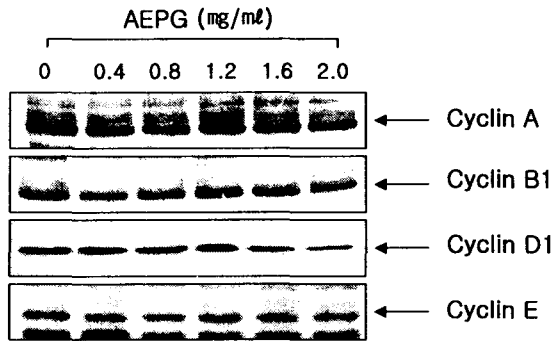


Fig. 3. Effect of AEPG treatment on the levels of cyclins in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with various concentrations of AEPG for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-cyclin A, cyclin B1, cyclin D1 and cyclin E antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system.

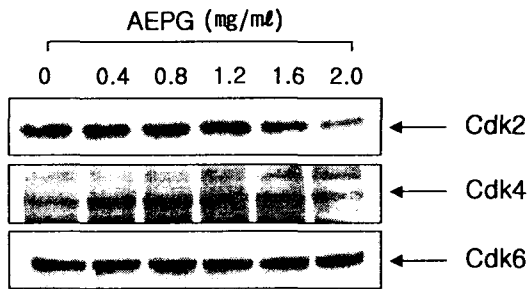


Fig. 4. Effect of AEPG treatment on the levels of Cdk in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with various concentrations of AEPG for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-Cdk2, Cdk4 and Cdk6 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system.

4. Cdk inhibitors의 발현에 미치는 길경 추출물의 영향

이상의 결과에서 길경 추출물 처리에 의한 암세포의 성장억제 효과에 Cdk의 활성을 조절하는 cyclin의 발현 감소효과는 비교적 강하게 나타나지 않았다. 따라서 이들 양성조절인자 외 다른 유전자 산물에 의한 조절 가능성이 매우 크기 때문에 길경 추출물의 처리에 의한 암세포의 증식억제가 Cdk inhibitor의 발현과 상관성이 있는지의 여부를 조사하였다. 이를 위해 위하여 현재까지 알려진 Cdk inhibitor 중 가장 많은 연구가 이루어져있는 p21 및 p27과 종양억제인자 p53의 발현에 미치는 길경 추출물의 영향을 Western blotting 및 RT-PCR법으로 조사하였다. Fig. 5A의 결과에서 알 수 있듯이 대조군 및 저농도 처리군에서는 거의 발현이 되지 않았던 종양억제 유전자 p53 단백질의 경우 1.2 mg/ml 처리군 이상에서 매우 강하게 발현이 증가되었으며, 이

는 전사 수준에서 조절됨을 RT-PCR로 확인할 수 있었다(Fig. 5B). 조사된 Cdk inhibitor 중 p21의 경우는 저농도 처리군에서부터 발현이 증가되었으나 mRNA의 발현은 대조군에 비하여 유의적인 증가 경향성을 볼 수 없었다. 또한 p27 단백질의 경우도 처리 농도 의존적으로 발현이 증가되었다. 따라서 길경 추출물 처리에 의한 세포 증식의 억제에는 Cdk의 단백질 발현 변화보다는 Cdk inhibitor의 발현 증가를 통하여 그들 활성 자체를 감소시켰을 것으로 생각되어진다.

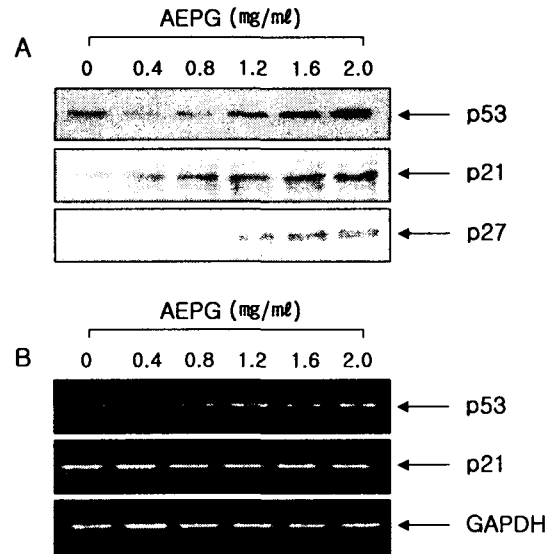


Fig. 5. Effect of AEPG treatment on the mRNA and protein levels of tumor suppressor p53 and Cdk inhibitors in A549 human lung carcinoma cells. (A) Cells were incubated with various concentrations of AEPG for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10% or 13% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-p53, p21 and p27 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. (B) Cells were incubated with SBS for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using p53 and Cdk inhibitor p21 primers described in Materials and Methods. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

논 의

최근 아주 활발한 연구가 진행중인 세포주기 조절은 각 세포주기별로 관여하는 다양한 유전자들에 의해 조절되는데, 기본적으로 세포주기 checkpoint 각 시기에 요구되어지는 cyclins에 의하여 Cdk의 연속적인 활성과 불활성이 결정되어진다^{1,2}. 먼저 Cdk4 및 Cdk6와 complex를 이루는 D-type cyclin은 G1기의 조절에 중요하며¹⁷, cyclin E는 Cdk2와 complex를 이루면서 S기의 전이에 중요한 역할을 담당하고 있다^{18,19}. 특히 D-type cyclin은 종양억제인자 retinoblastoma protein (pRB)의 인산화 조절과 이로 인한 G1/S 전이 및 DNA 합성 기전을 조절하는 유전자의 중요한 전사조절인자 E2F family의 활성을 조절한다¹. Cyclin A는 G1 후기에 발현을 시작하여 S기와 G2기 동안 발현이 증가되고 cyclin B1은 G2기에서 M기로의 이행을 조절하며, 각각은 Cdk2 및 Cdc2의 kinase 활성의 조절에 중요한 역할을 한다

20,21). 본 연구의 결과에 의하면 길경 추출물의 처리로 세포주기의 G1기에 해당하는 세포의 빈도가 낮아지면서 상대적으로 S기 및 G2/M기에 해당되는 세포들의 빈도는 증가하였다(Table 2). 또한 길경 수용액 추출물 처리에 의한 인체 폐암세포의 성장억제 과정에는 조사된 몇 가지 cyclin 중에서 cyclin D1만이 특이적으로 처리 농도 의존적으로 발현이 감소되었다(Fig. 3). 이는 cyclin D1이 G1기로의 이행을 위한 초기 단계에 중요한 역할을 한다는 점을 고려할 때 다소 일치되는 결과로 해석될 수 있다. 그러나 일반적으로 cyclin의 발현이 어느 정도 일정하게 유지되어도 Cdk와 complex를 형성하여 kinase 활성자체를 조절할 수 있는지의 여부가 더 중요하게 고려된다²²). 이러한 관점에서 길경 추출물의 처리에 의하여 강한 세포성장 억제 효과가 있어도 cyclin 및 Cdk의 발현이 어느 정도 유지된다는 점은 Cdk inhibitor와 같은 negative 조절인자가 더 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 의미한다. 다양한 세포증식 억제 신호에 의해 유도되는 Cdk inhibitor는 Cdk와의 강한 결합을 통하여 그들의 활성을 억제시키는 역할을 하는데, 그들은 크게 두 가지의 family로 분류(INK4 및 CIP/KIP family)되어지고 있다²²). 이들 중 Cdk2와 결합하면서 그들의 활성을 저해하는 것으로 알려진 CIP/KIP family에 속하는 p21은 DNA 손상에 의한 종양억제 유전자 p53에 의해 조절을 받으며, 이는 세포주기 상 G1기에서 세포증식을 억제하는 세포주기와 연관된 가장 중요한 조절인자로 알려져 왔다^{23,24}). 그러나 최근 연구에 의하면 p21의 유도는 세포증식의 억제뿐만 아니라, 세포의 분화에서도 중요한 역할을 하며^{23,25}), proliferating-cell nuclear antigen (PCNA)과도 결합을 하여 DNA replication을 억제할 수 있는 것으로 보고되어져 오고 있다²⁶). 아울러 p53에 의한 p21의 전사조절과는 관계없이 암세포의 세포성장 억제나 분화 유도에 p53 비의존적인 p21 유도 조절 기전이 하나씩 밝혀지고 있으며 p21 전사조절에 관여하는 coactivator와 suppressor에 대한 연구들이 활발하게 진행중이다²⁷⁻³¹). 비록 p21이 일반적으로 G1기에서 중요하다고 알려져 왔으나, 정상 섬유아세포의 세포주기 동안 p21 mRNA의 발현 수준이 G1기와 G2기에서 두 번 최고조를 이룬다는 사실에서 p21이 G2/M기의 조절 가능성이 제기되었으며³²), 최근 새로운 연구 결과들로부터 p21은 세포주기 상 G1기의 조절뿐만 아니라 G2/M기를 포함한 세포주기 전반에 걸친 조절자로서 다양한 cyclin/Cdk complex의 활성을 조절하며, 세포분화와 노화 및 apoptosis에도 관여하는 세포증식에 가장 중요한 조절인자로 인식되어져 오고 있다³³⁻³⁵). 본 연구의 결과에서 인체 폐암세포에 길경 추출물의 처리에 의하여 농도에 따른 반응에서 다소의 차이는 보이지만 p21의 발현을 조절하는 p53 뿐만 아니라 p21 및 p27의 발현이 모두 증가되었다. 그러나 특히 p53의 경우 길경 추출물의 처리에 의하여 전사 및 번역 수준에서 모두 발현이 증가되었지만, p21의 경우는 단백질의 발현만이 증가되었음은 매우 흥미롭다. 따라서 길경 추출물의 처리에 의한 p21 단백질의 발현 증가가 전사수준과는 무관한 단백질 자체의 half-life 증가에 의한 p53 비의존적인 단백질 축적 현상 가능성도 있을 것으로 사료된다. 본 연구에 사용된 A549 폐암세포는 정상 p53 유전자를

가지는 세포주이기 때문에 이에 관한 연구는 추가적으로 p53 null 또는 mutant 세포주를 사용한 검증이 필요할 것으로 생각되어진다. 한편 세포 증식에서 특정 조건의 변화로 인한 정상적인 세포주기의 이탈이나 Cdk 활성의 변화는 apoptosis 유발의 주원인이 될 수 있는데³⁶), apoptosis는 개체의 발생단계나 DNA 손상, 바이러스 감염 등에 의한 유전적 조절 하에서 일어나는 정교한 인체방어기전이란 점에서 necrosis와 구별되며, apoptosis는 개체보존수준에서 손상된 세포들의 제거를 위한 중요한 수단이다^{37,38}). Apoptosis의 유발에는 세포증식에 중요한 역할을 하는 종양억제 유전자 p53이나 Cdk inhibitor p21 뿐만 아니라, apoptosis를 직접 조절하는 Bcl-2 및 Bax와 같은 유전자가 관여한다는 사실이 알려지면서 apoptosis와 연관된 분자적 기전이 최근 많이 밝혀지고 있다^{27,39,40}). 잘 알려진 바와 같이 Bcl-2는 apoptosis를 억제하는 반면, Bax는 과발현되었을 때 apoptosis를 유도하며³⁹), 두 단백질은 서로 dimer를 형성하면서 mitochondria에서 cytochrome c 및 cysteine-related protease에 속하는 caspase와 같은 apoptosis 유발에 관여하는 인자들의 발현을 조절한다^{38,40}). 최근 발표된 선행연구에 의하면 길경 수용액 추출물에 의한 apoptosis의 유도에는 Bcl-2 유전자의 발현 감소 및 Bax 유전자 발현의 증가에 의한 caspase-3의 활성화에 의한 것으로 요약된 바 있다¹²). 따라서 길경 추출물에 의한 암세포의 성장억제는 본 연구결과에서와 같은 특정 유전자의 발현을 통한 세포주기의 교란과 연관된 apoptosis 유발에 의한 것으로 정리될 수 있으며, 이에 관한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

인체 폐암 세포주인 A549 세포의 성장에 미치는 길경 수용액 추출물의 영향을 조사한 결과, 길경 추출물의 처리 농도가 증가할수록 세포의 성장이 억제되었으며, 이는 암세포의 심한 형태적 변형 유발, 부착력 상실 및 cell migration의 억제 등과 연관성이 있었다. DNA flow cytometry 분석 결과, 세포주기 G1 빈도의 감소에 따른 상대적인 S기 및 G2/M기 증가 현상을 관찰할 수 있었다. 또한 길경 추출물 처리에 의한 cyclin의 변화 관찰여부에서는 길경 추출물의 처리로 cyclin D1 특이적인 발현감소 및 고동도 처리군에서의 Cdk2 및 Cdk4의 부분적인 발현 저하현상을 관찰할 수 있었다. 그리고 길경 추출물의 처리에 의하여 종양억제 유전자 p53의 발현이 mRNA 및 단백질 수준에서 모두 처리 농도 의존적으로 증가되었으며, Cdk inhibitors 중에서 p21 및 p27 단백질의 발현 또한 모두 증가되었다. 이러한 결과는 길경 추출물의 처리에 의한 폐암세포의 증식억제가 세포분열기로의 진행 억제와 연관된 apoptosis 유발과 연관이 있을 것 사료된다.

참고문헌

- Weinberg, R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell 81, 323-330, 1995.
- Sherr, C.J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited.

- Cancer Res. 60, 3689-3695, 2000.
3. Takagi, K. Lee, E.B. Pharmacological studies on Platycodon grandiflorum A. DC. Yakugaku Zasshi. 92, 951-973, 1972.
 4. Lee, E.B. Pharmacological activities of crude platycodin. J. Pharm. Soc. Korea 19, 164-176, 1975
 5. Ozaki, Y. Studies on antiinflammatory effect of Japanese Oriental medicines (kampo medicines) used to treat inflammatory diseases. Biol. Pharm. Bull. 18, 559-562, 1995.
 6. Saeki, T., Koike, K. 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.
 7. Chung, J.H., Shin, P.G., Ryu, J.C., Jang, D.S., Cho, S.H. Pharmaceutical substances of Platycodon grandiflorum (jacquin) A. De Candolle. Arg. Chem. Biotech. 40, 152-156, 1997.
 8. Kim, Y.P., Lee, E.B., Kim, S.Y., Li, D., Ban, H.S., Lim, S.S., Shin, K.H., Ohuchi, K. Inhibition of prostaglandin E2 production by platycodin D isolated from the root of Platycodon grandiflorum. Planta Med. 67, 362-364, 2001.
 9. Kim, Y.S., Lee, B.E., Kim, K.J., Lee, Y.T., Gho, K.B., Chung, Y.C., Antitumor and immunomodulatory activities of the Platycodon grandiflorum cultivated for more than 20 years. Yakhak Hoeji 42, 382-387, 1998.
 10. Lee, J.Y., Hwang, W.I., 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.
 11. Nagao, T., Matsuda, H., Namba, K., 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.
 12. Lee, S.Y., Lee, J.H., Kim, W.I., Park, D.I., Choi, Y.H. Apoptotic Cell Death of Human Lung Carcinoma A549 Cells by an Aqueous Extract from the Roots of Platycodon grandiflorum. Kor. J. Life Sci. (in press).
 13. Lee, J.H., Kang, G.H., Kim, G.C., Kim, K.M., Choi, B.T., Kang, H.S., Lee, Y.T., Choi, Y.H. Tetrandrine-induced cell cycle arrest and apoptosis in A549 human lung carcinoma cells. Int. J. Oncol. 21, 1239-1244, 2002.
 14. Igura, K., Ohta, T., Kuroda, Y., Kaji, K. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro. Cancer Lett. 171, 11-16, 2001.
 15. Choi, Y.H. Research technics for the cell cycle study, Exp. Mol. Med. 33, S15-36, 2001.
 16. Choi, Y.H., Lee, S.J., Nguyen, P., Jang, J.S., Lee, J., Wu, M.L., Takano, E., Maki, M., Henkart, P.A., Trepel, J.B. Regulation of cyclin D1 by calpain protease. J. Biol. Chem. 272, 28479-28484, 1997.
 17. Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C.J., Kato, J.Y. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. Mol. Cell. Biol. 14, 2066-2076, 1994.
 18. Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J.W., Elledge, S., Nishimoto, T., Morgan, D.O., Franza, B.R., Roberts, J.M. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. Science 257, 1689-1694, 1992.
 19. Meyerson, M., Harlow, E. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. Mol. Cell. Biol. 14, 2077-2086, 1994.
 20. Walker, D.H., Maller, J.L. Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication. Nature 354, 314-317, 1991.
 21. Ohtsubo, M., Roberts, J.M. Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. Science 259, 1908-1912, 1993.
 22. Elledge, S.J., Harper, J.W. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. Curr. Opin. Cell Biol. 6, 847-852, 1994.
 23. Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., Elledge, S.J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. Cell 75, 805-816, 1993.
 24. Morgan, D.O. Principles of CDK regulation. Nature 374, 131-134, 1995.
 25. El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculesco, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, E.W., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell 75, 817-825, 1993.
 26. Xiong, Y., Hannon, G., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. Nature 366, 701-704, 1993.
 27. 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., Vogelstein, B. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. Cancer Res. 54, 1169-1174, 1994.
 28. Datto, M.B., Yu, Y., Wang, X.F. Functional analysis of the transforming growth factor β responsive elements in the WAF/Cip1/p21 promoter. J. Biol. Chem. 270, 28623-28628, 1995.
 29. Zeng, Y.X., El-Deiry, W.S. Regulation of p21WAF1/CIP1 expression by p53-independent pathways. Oncogene 12, 1557-1564, 1996.
 30. Sowa, Y., Orita, T., Hiranabe-Minamikawa, S., Nakano, K., Mizuno, T., Nomura, H., Sakai, T. Histone deacetylase

- inhibitor activates the p21/WAF1/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 886, 195-199, 1999.
31. Choi, Y.H., Lee, W.H., Park, K.Y., Zhang, L. p53-independent induction of p21 (WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 91, 164-173, 2000.
 32. Li, Y., Jenkins, C.W., Nichols, M.A., Xiong, Y. Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* 9, 2261-2268, 1994.
 33. Zhang, H., Hannon, G.J., Casso, D., Beach, D. p21 is a component of active cell cycle kinases. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 59, 21-29, 1994.
 34. Xiao, Z.Q., Jaszewski, R., Majumdar, A.P. Aging enhances G(1) phase in the colonic mucosa of rats. *Mech. Ageing Dev.* 116, 1-14, 2000.
 35. Chai, F., Evdokiou, A., Young, G.P., Zalewski, P.D. Involvement of p21(Waf1/Cip1) and its cleavage by DEVD-caspase during apoptosis of colorectal cancer cells induced by butyrate. *Carcinogenesis* 21, 7-14, 2000.
 36. Shi, L., Nishioka, W.K., Th'ng, J., Bradbury, E.M., Litchfield, D.W., Greenberg, A.H. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science* 263, 1143-1145, 1994.
 37. Arends, M.J., Morris, R.G., Wyllie, A.H. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 136, 593-608, 1990.
 38. Evans, V.G. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol. Int.* 17, 461-476, 1993.
 39. Chiarugi, V., Magnelli, L., Cinelli, Basi, G. Apoptosis and the cell cycle. *Cell. Mol. Biol. Res.* 40, 603-612, 1994.
 40. Miyashita, T., Reed, J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299, 1995.