

## Resveratrol에 의한 A549 인체 폐암세포의 증식억제 및 apoptosis 유발에 관한 연구

김영애<sup>1</sup> · 임선영<sup>2</sup> · 이숙희<sup>3</sup> · 박건영<sup>3</sup> · 이원호<sup>4</sup> · 최영현\*

동의대학교 한의과대학 생화학교실, <sup>1</sup>日本 富山医科薬科大学 和漢薬研究所, <sup>2</sup>한국해양대학교 해양과학기술대학 해양과학부  
<sup>3</sup>부산대학교 생활환경대학 식품영양학과, <sup>4</sup>자연과학대학 생물학과

Received June 14, 2004 / Accepted September 20, 2004

**Induction of Cdk inhibitor p21 and inhibition of cyclooxygenase-2 by resveratrol in human lung carcinoma A549 cells.** Young Ae Kim<sup>1</sup>, Sun-Young Lim<sup>2</sup>, Sook-Hee Rhee<sup>3</sup>, Kun-Young Park<sup>3</sup>, Won Ho Lee<sup>4</sup> and Yung Hyun Choi\*. Department of Biochemistry, Dongeui University College of Oriental Medicine, Busan 614-052, Korea, <sup>1</sup>Institute of Natural Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama, Japan, <sup>2</sup>Division of Ocean Science, Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea, <sup>3</sup>Department of Food Science and Nutrition, <sup>4</sup>Department of Biology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea – Resveratrol, a phytoalexin found at high levels in grapes and in grape products such as red wine, has been reported to possess a wide range of biological and pharmacological activities including anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-mutagenic, and anti-carcinogenic effects. According to recent studies, this compound is an effective inhibitor of cell growth in general, triggers partial arrest of the cell cycle and induce apoptosis. In this study, the anti-proliferative effects of resveratrol in A549 human lung carcinoma cells were investigated. It is shown that resveratrol induced the growth inhibition in a time-dependent manner and morphological changes of A549 cells, which were associated with induction of S phase arrest of the cell cycle and apoptotic cell death. The Bcl-X<sub>L</sub> levels were markedly down-regulated in resveratrol treated cells, however, Bax and Bcl-2 were remained unchanged. Resveratrol treatment induced the proteolytic degradation of Sp-1 and proliferating cell nuclear antigen protein, and inhibited the expression of  $\beta$ -catenin protein. Resveratrol treatment also induced a marked up-regulation of cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p21 and inhibited the kinase activities of Cdk2 and Cdk4. In addition, resveratrol treatment inhibited the levels of cyclooxygenase (COX)-2 mRNA and protein, and the release of prostaglandin E2 without alteration of COX-1 expression. Taken together, these findings suggest that resveratrol may be a potential chemotherapeutic agent for the control of human lung carcinoma cells.

**Key words** – resveratrol, cell cycle, apoptosis, p21, Bcl-X<sub>L</sub>, cyclooxygenase

Resveratrol은 많은 식물체에서 박테리아를 포함한 다양한 외부 환경의 변화에 식물체 스스로가 자신을 보호하기 위한 수단으로 만들어내는 phytoalexin의 일종이다. Resveratrol은 포도, 오디 그리고 땅콩을 포함한 최소 70여종 이상의 식물체에서 발견되어지고 있는데, 특히 당도가 높은 포도에서 곰팡이(*Vitis vinifera* Vitaceae)와 같은 감염균으로부터 자신의 보호를 위한 방어물질로서 상대적으로 많은 양이 만들어진다[12]. 몇 가지 역학적 연구결과에 의하면 적당한 양의 알코올 섭취, 특히 적당량의 적포도주 섭취는 심혈관계 질환에 의한 사망률의 감소와 관련이 있는 것으로 나타났다. 특히 프랑스인들에게서 볼 수 있는 이러한 흥미로운 현상 때문에 “French paradox”란 말까지 생겨나게 되었으며, 적포도주의 이와 같은 생물학적 활성성과 관련이 있는 물질이 바로 resveratrol이다[18]. Resveratrol은 혈소판의 응축과 응고를 억제하며, eicosanoid 합성을 변화시키고 지질 단백질 대사를 조절할 수 있는 것으로 보고되어지고 있다[3,35,41]. 특히

Jang et al. [25]은 resveratrol의 강력한 항 발암 효과를 보고한 바 있는데, resveratrol은 발암의 3단계인 개시(initiation), 촉진(promotion) 및 진행(progression) 단계 모두를 차단할 수 있었다.

한편 개체를 구성하는 각 세포의 apoptosis는 유전적으로 손상을 입은 세포나 분화 자극제에 의해 부적절한 분화의 유도에 의한 종양의 발달을 막기 위해 이들 비정상적인 세포를 개체에서 제거하기 위한 수단, 즉 회복 불가능한 유전적 상해를 지닌 세포들을 개체에서 제거하기 위한 일반적인 수단이다. 이 개념은 일반적으로 사용되는 항암제가 암세포의 증식 억제와 연관된 apoptosis 과정을 통해 암세포의 사멸을 유도한다는 사실에 의해 뒷받침되고 있다[4,19]. 따라서 apoptosis 과정의 교란은 손상되거나 손상이 시작된 세포의 생존과 이들 세포의 성장을 유도하기 때문에 apoptosis의 억제는 암화 과정에서 중요한 역할을 한다. 아울러 암예방 효과가 있는 물질들은 이러한 비정상적인 세포의 apoptosis를 유도하며, 이들에 의한 apoptosis의 유발은 최소한 그들의 암예방 활성과 연관되어 있음이 보고 되어져왔다[16,36]. Resveratrol의 이와 연관된 연구로서, 최근 인체유방암, 전립선암, 대장암, 폐암

## \*Corresponding author

Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choihy@deu.ac.kr

등을 포함한 많은 암세포주에서 apoptosis를 유발함이 보고된 바 있다[1,10,21,28,29,39,42]. 또한 resveratrol은 생쥐 JB6 상피세포에서 종양 촉진자나 상피세포 성장인자에 의한 세포의 형질전환을 억제하였으며, 동일 농도에서 resveratrol은 apoptosis를 유도하였다[21]. 그리고 쥐의 pheochromocytoma (PC12) 세포에서 oxidative stress나 치매유발 인자로 알려진  $\beta$ -amyloid에 의한 세포독성을 완벽하게 보호해 주는 효과 등도 보고된 바 있다[23,24]. 최근의 이러한 다양한 연구결과들에 의하여 resveratrol의 암예방 및 항암작용을 포함한 약리 효과에 관여하는 유전자들의 역할에 관한 많은 정보를 제공하여 왔으나, 여전히 인체암세포 증식억제에 관한 기전의 많은 부분은 아직 알려지지 않은 상태로 남아있다. 본 연구에서는 resveratrol의 암세포 증식 억제 기전에 관한 부가적인 기전 해석을 위하여 A549 인체 폐암세포의 성장에 미치는 resveratrol의 영향을 조사하였으며 몇 가지 유의적인 결과를 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

**재료 및 방법**

**암세포의 배양 및 resveratrol 처리**

본 연구에 사용된 A549 인체 폐암세포는 한국생명공학연구원(대전)에서 분주 받아 사용하였으며, 90%의 RPMI-1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS), 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 배지를 사용하여 배양하였다. Resveratrol (Fig. 1A)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, Kim et al. [29]의 방법에 준하여 처리하였다.

**Hemocytometer를 이용한 생존율의 측정**

세포배양용 6 well plate를 이용하여 plate당  $2 \times 10^4$ 개의 A549 암세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후, 50  $\mu$ M의 resveratrol을 12시간 간격으로 처리한 후 세포를 phosphate-buffered saline (PBS) 용액으로 수세하고 trypan blue (Gibco BRL)로 염색하였다. 이를 hemocytometer에 옮긴 후 위상차 현미경( $\times 200$ ) 하에서 살아있는 세포의 수를 측정하여 대조군과 비교 분석하였다.

**Flow cytometry 분석**

정상 및 다양한 농도의 resveratrol이 함유된 배지에서 48시간 동안 자란 암세포들을 PBS로 두세 번 씻어내고, 고정액(70% ethyl alcohol, 0.5% Tween 20)을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 고정시킨 후, propidium iodide (PI, concentration, 50  $\mu$ g/ml; Sigma) 용액을 이용하여 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 염색하였다. 이를 다시 PBS로 두 번 씻어낸 후, DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 Modifit LT (Becton Dickinson) 프로

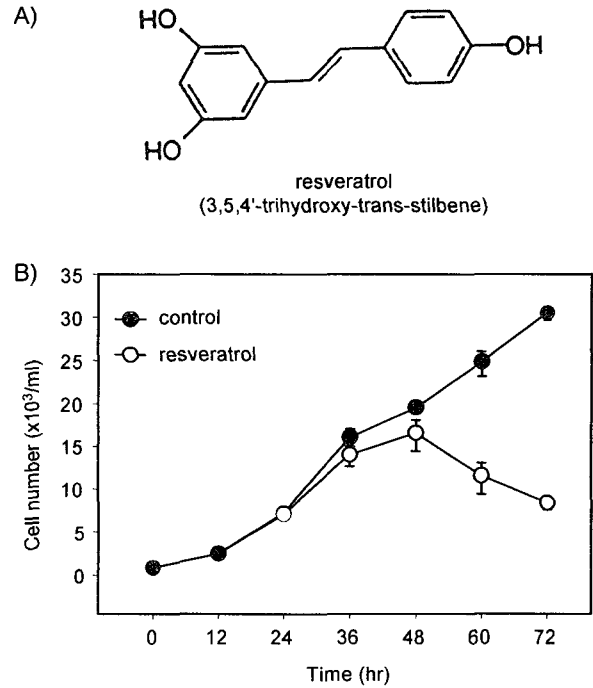


Fig. 1. A) Chemical structure of resveratrol and B) anti-proliferative effects of resveratrol in A549 human lung carcinoma cells. A549 cells were treated with 50  $\mu$ M resveratrol for indicated times and the viable cells were counted. Data are means  $\pm$  SD of three separate experiments.

그램으로 분석하였다.

**DAPI 염색을 통한 핵의 관찰**

Resveratrol의 처리에 의한 암세포의 apoptosis 유발 여부를 확인하기 위한 핵의 형태변화 관찰을 위하여 50  $\mu$ M의 resveratrol이 48시간 처리된 세포들을 PBS로 세척하고 3.7% paraformaldehyde (Sigma)로 상온에서 10분간 고정시킨 후 형광 염색물질인 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) 용액을 이용하여 10분간 염색하였다. 이들 세포를 다시 PBS로 2회 수세한 후 형광현미경을 이용하여 핵의 형태 변화를 정상군과 비교하였다.

**Reverse transcription-polymerase chain reaction 분석**

정상 및 서로 다른 농도의 resveratrol이 함유된 배지에서 48시간 배양된 암세포를 대상으로 RNAzol B(TEL-TEST, Inc., Texas, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, Choi et al. [9]의 방법에 준하여 oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase를 이용하여 2  $\mu$ 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)

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 <sub>L</sub>	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'
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'
GAPDH	Sence	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	Antisence	5'-AGC-CIT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

를 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)로 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

#### 단백질의 분리, 전기영동 및 Western blotting

상기와 동일 방법으로 준비된 암세포들을 선행 방법[8]에 준하여 정상 및 resveratrol이 처리된 배지에서 자란 세포들을 lysis buffer로 용해한 후, 세포 내 잔사물을 분리시키고 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 전이시킨 후, 특정 단백질에 대한 항체와 그에 대한 이차 항체 반응을 실시한 후 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 단백질의 발현정도를 분석하였다. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며, 이차 항체로 사용된 horseradish peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다.

#### In vitro immunocomplex kinase assay

Choi et al. [8]의 방법에 준하여 정상 및 다양한 농도의 resveratrol이 처리된 배지에서 48시간 자란 암세포들을 모은 다음 단백질을 정량한 후, 적정량의 단백질을 취하여 protein A-Sepharose (Sigma)와 혼합한 후 4°C에서 1시간동안 반응시켰다. 이를 1,500 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액만 모은 다음 Cdk2 및 Cdk4 항체를 첨가하고 다시 4°C에서 1시

간동안 반응시켰다. 다시 protein A-Sepharose를 넣고 4°C에서 2시간동안 반응시킨 후, 원심 분리하여 pellet을 모은 다음 세척한 후 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (ICN, Irvine, CA, USA) 및 histone H1 (Sigma)이 들어있는 reaction buffer를 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 동량의 2 X SDS sample buffer를 넣어 혼합한 후, 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 이렇게 분리된 gel을 말린 후 autoradiography로 반응의 정도를 비교하였다.

#### Prostaglandin E2 생성물의 측정

COX-2의 대사산물인 prostaglandin E2 (PGE2)의 생성에 미치는 resveratrol의 영향을 측정하기 위하여 사용된 enzyme immunoassay (EIA) kit는 Amersham Corp.에서 구입하였다. 먼저 준비된 A549 폐암 세포를 96-well plate에 well 당 160  $\mu$ l의 배지에 10<sup>4</sup> cell/well 정도로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, resveratrol을 농도별로 배지에 희석하여 처리하였다. 이때 마지막 배지의 양을 모두 180  $\mu$ l로 통일시켰다. 48시간 후 배지에 2.5%의 dodecyltrimethyl-ammonium bromide가 함유된 buffer를 20  $\mu$ l 첨가하여 총 배지의 양이 200  $\mu$ l되게 한 후 용해가 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 PGE2의 양을 추정하였다.

#### 결과 및 고찰

##### A549 세포의 증식에 미치는 resveratrol의 영향

A549 인체 폐암세포의 증식에 미치는 resveratrol의 영향

을 조사하기 위하여 정상 및 50  $\mu\text{M}$  resveratrol이 처리된 배지에서 3일간 암세포들을 배양하면서 12시간 간격으로 살아 있는 암세포의 수를 계수하였다. Fig. 1B에 나타난 바와 같이 24시간 후부터 정상배지에서 배양된 세포에 비하여 resveratrol이 함유된 배지에서 자란 암세포의 수는 감소하기 시작하여 48시간 이후부터 생존된 암세포의 수는 급격하게 줄어들었으며, 이는 MTT assay에 의한 A549 세포에서의 결과와도 유사한 경향성임을 알 수 있었다(data not shown), 이러한 resveratrol 처리에 따른 A549 폐암세포의 증식억제는 Fig. 2A에 나타난 바와 같이 암세포의 전체적인 형태변화에도 연관성이 있었다. 즉 resveratrol의 처리에 따라 전체적인 암세포의 크기가 응축되었고 다양한 모양의 분지를 형성하면서 배지위로 부유되는 현상을 관찰할 수 있었다. 다음은 이러한 형태적 변화에 따른 암세포의 증식억제가 세포주기

진행과정의 특정시기 교란 현상과 연관성이 있는지의 여부를 조사하였다. 이를 위하여 정상 및 resveratrol이 처리된 배지에서 배양된 암세포를 대상으로 flow cytometry 분석을 실시한 결과는 Fig. 2B에 나타내었다. Fig. 2B의 결과에서 알 수 있듯이 정상배지에서 배양된 암세포에 비하여 resveratrol의 농도가 증가될수록 세포주기 G1기에 해당되는 세포의 빈도는 감소되는 반면 S기에 해당되는 세포의 빈도는 resveratrol 농도 증가에 따라 점차적으로 증가하였으며, G2/M기에 속하는 세포의 빈도도 다소 증가하였음을 알 수 있었다. 이러한 현상은 인체흑색종세포, leukemia 세포, 유방암세포, 전립선암세포, 대장암세포 등에서 관찰된 결과들과 유사하였다 [14,27,28-30,45,48].

**Resveratrol 처리에 의한 폐암세포의 apoptosis 유발**

이상의 resveratrol 처리에 의한 A549 폐암세포의 증식억제 및 세포주기 교란현상 관찰에서 resveratrol의 처리에 의한 암세포 증식의 억제는 암세포의 apoptosis 유발과 연관성이 있을 것으로 기대되어 재료 및 방법에서 서술한 것과 같이 정상 및 resveratrol이 처리된 배지에서 자란 세포를 대상으로 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DAPI 염색을 통하여 핵의 형태변형 여부를 조사하였다. Fig. 3A에 나타난 것처럼 resveratrol이 처리되지 않은 정상 배지에서 자란 세포의 핵은 전체적으로 뚜렷하게 염색이 되었다. 그러나 resveratrol이 처리된 암세포의 경우, apoptosis가 일어난 세포

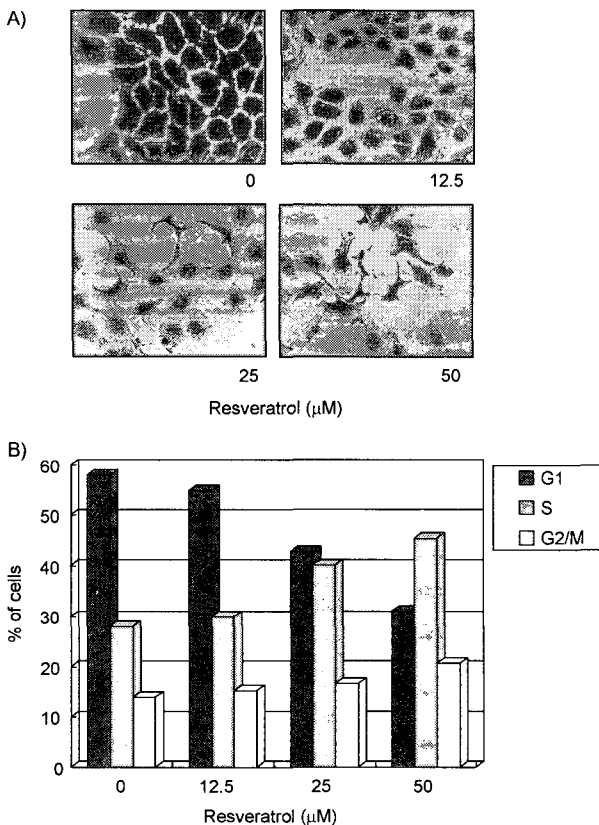


Fig. 2. A) Morphological changes in A549 human lung carcinoma cells following treatment with resveratrol. Exponentially growing cells were incubated with either vehicle alone (0) or resveratrol for 48 h. Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification,  $\times 200$ . B) Effects of resveratrol on distribution of the cell cycle in A549 cells. Cells were treated with resveratrol for indicated concentrations. After 48 h incubation, the cells were fixed, stained with PI and then analyzed by flow cytometry. Data are means average of two separate experiments.

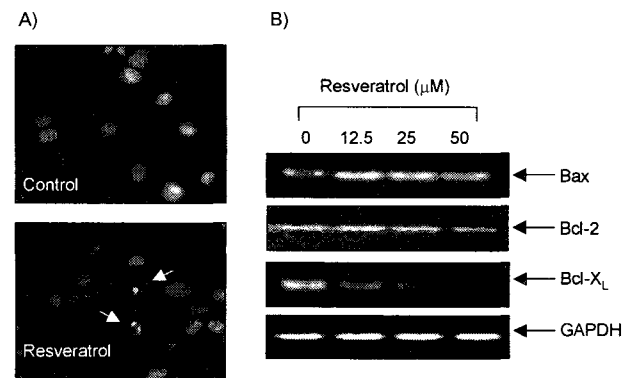


Fig. 3. A) Induction of apoptotic bodies in resveratrol-treated A549 human lung carcinoma cells. Cells were treated with 50  $\mu\text{M}$  resveratrol for 48 h, fixed and then stained with DAPI. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescence microscope using blue filter. Magnification,  $\times 400$ . B) Down-regulation of Bcl- $X_L$  mRNA by resveratrol treatment in A549 cells. Cells were incubated with resveratrol for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using Bax, Bcl-2 and Bcl- $X_L$  primers described in materials and methods. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

에서 전형적으로 관찰되는 염색질 응축 (chromatin condensation)에 의한 apoptotic body의 출현이 매우 증가하였음을 알 수 있었다[2,15]. 즉 이는 nuclease에 의한 염색체 nucleosome의 linker DNA 부분의 절단에 의한 DNA 단편화의 결과이므로 resveratrol의 처리에 의한 암세포의 증식억제 및 형태적 변형이 암세포의 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음을 시사하여 주는 것으로 사료된다. 또한 flow cytometry 결과 분석에서 정상세지에서 배양된 세포의 자연적 세포사의 빈도는 3% 이하로 나타났지만 resveratrol의 첨가 농도가 증가될수록 세포사의 빈도는 증가되어 12.5  $\mu\text{M}$  처리군에서 4% 정도, 그리고 25  $\mu\text{M}$  및 50  $\mu\text{M}$  처리군에서는 각각 5.3% 및 11.8%로 증가되었음을 알 수 있었다.

**Bcl-2 family의 발현에 미치는 resveratrol의 영향**

한편 apoptosis는 다양한 유전자의 발현에 의하여 조절되는데 그중 가장 중요한 유전자로 알려진 Bcl-2 family에 속하는 유전자 산물들은 apoptosis를 직접적으로 유발하거나 억제하는데 관여하며, 그들 사이의 상대적인 유전자 발현의 양적 차이에 의해 apoptosis 유발 여부가 결정 되어진다[20,37]. Bcl-2 family의 대표적 유전자인 Bcl-2 member에 속하는 유전자 산물들은 anti-apoptotic 인자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax member에 속하는 유전자들은 pro-apoptotic 인자로 apoptosis의 유발과 관계가 있다[6]. 이들은 세포 내 소기관 중 mitochondria로부터의 cytochrome c를 유리시켜 종양억제 유전자인 p53, cysteine-related protease인 caspase, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절한다[6,32]. 이들은 서로 dimer의 형태로 존재하며 그들의 발현 수준에 변화가 초래되면 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다. 따라서 resveratrol의 처리에 의한 A549 폐암세포의 apoptosis 유발이 Bcl-2 family의 발현 변화와 관련이 있는 것인지를 조사하기 위하여 Bcl-2 family에 속하는 몇 가지 유전자들의 전사 수준에 미치는 resveratrol의 영향을 조사하였다. Fig. 3B에 나타난 바와 같이 apoptosis 유발과 관련이 있는 Bax의 경우 resveratrol의 처리에 의하여 다소 발현이 증가하였으며, apoptosis 억제와 관련이 있는 Bcl-X<sub>L</sub>의 발현은 resveratrol 처리 농도 의존적으로 매우 감소되었으며 Bcl-2의 경우 큰 변화는 없었다. 즉 resveratrol 처리에 의한 Bax 유전자의 상대적인 발현의 증가가 apoptosis 유발과 어느 정도 관련성이 있음을 알 수 있었다.

**Sp-1, PCNA 및  $\beta$ -catenin 단백질의 발현에 미치는 resveratrol의 영향**

세포내외의 어떤 신호 전달에 의한 apoptosis 유발과정에는 다양한 protease 들의 활성화로 특정 단백질의 분해 현상을 관찰할 수 있으며, 이는 apoptosis가 유발되었다는 생화학적 지표로 많이 사용되어지고 있다. 가장 많이 사용되어지는 apoptosis 표적 단백질로는 poly (ADP-ribose) polymerase

(PARP),  $\beta$ -catenin 및 Rad 51 등이 있으며, 이들 단백질의 분해는 대부분의 apoptosis 유발에 가장 중요한 역할을 하는 caspase의 활성화에 의한 것으로 알려져 있다[5,22,44]. 그리고 최근 연구에 의하면 전사조절인자인 Sp-1 단백질 역시 활성화된 caspase의 기질이 될 수가 있으며[38], 세포주기 진행에 중요한 조절인자인 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 단백질도 apoptosis가 유발되었을 경우 발현의 감소가 동반될 수 있는 것으로 보고되어져 오고 있다[31]. 그리고 resveratrol에 의한 apoptosis 유발에서 PARP 및  $\beta$ -catenin 등과 같은 단백질의 분해가 동반되는 사실은 이미 선행연구에서 보고된 바 있으며[10,26,27], 본 연구에서도 resveratrol의 처리에 의하여  $\beta$ -catenin의 발현이 감소함을 확인하였다 (Fig. 4). 따라서 부가적으로 Sp-1 및 PCNA와 같은 단백질이 resveratrol 처리 의한 apoptosis 유발과정에서 분해될 수 있을지의 여부를 조사하였으며, Fig. 4의 결과에서 알 수 있듯이 resveratrol의 처리 시간과 농도가 증가될수록 두 단백질 모두 절단된 분절화 현상을 뚜렷하게 관찰할 수 있었다. 이는 아마도 resveratrol에 의한 caspase와 같은 효소의 활성화에 기인된 것으로 추정되며, Sp-1 및 PCNA 단백질이 resveratrol에 의한 apoptosis 유도 표적 단백질로 사용될 수 있음을 의미한다. 아울러 이러한 단백질들이 어떤 경로를 통하여 분해되는지에 관한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

**p53과 p21의 발현 및 Cdk kinase 활성화에 미치는 resveratrol의 영향**

다음은 resveratrol의 처리에 의한 A549 폐암세포의 증식

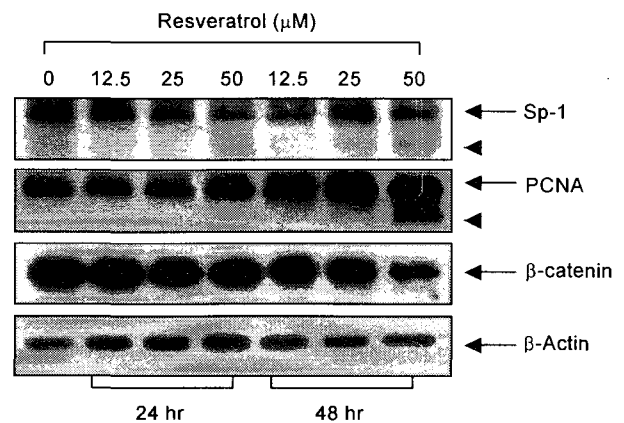


Fig. 4. Degradation of Sp-1, PCNA and  $\beta$ -catenin protein by resveratrol treatment in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with resveratrol, lysed and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

억제가 종양억제 유전자 또는 세포주기 조절 억제자들의 발현 변화와 상관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 현재까지 알려진 Cdk inhibitor 중 가장 많은 연구가 이루어졌으며, 세포주기 진행 중 G1기에서 S기로 전이에 중요한 역할을 하는 종양억제 유전자 p53 및 Cdk inhibitor p21의 발현 변화를 조사하였다. Fig. 5A의 RT-PCR의 결과에서 볼 수 있듯이 종양 억제 유전자 p53 및 Cdk inhibitor p21의 전사수준이 resveratrol의 처리에 의하여 처리 농도 의존적으로 모두 증가되었음을 알 수 있었다. 특히 Cdk inhibitor인 p21은 p53의 발현 증가에 의하여 전사 수준이 조절될 수 있으며[13,33], 암세포의 증식 억제, apoptosis 및 분화 유도에 중요한 역할을 하는 세포주기 전반에 걸친 가장 중요한 조절인자란 점 [34,40]에서 resveratrol의 처리에 의한 발현의 증가는 매우 의미 있는 결과라고 사료된다. 잘 알려진 바와 같이 p21의 발현 증가는 cyclin/Cdk 복합체의 형성을 방해함으로써 그들의 kinase 활성을 억제할 수 있으며[34,40], 이러한 kinase 활성의 억제는 세포주기 특정 시기의 진행을 억제할 수 있으므로 세포주기 조절 전반에 걸쳐 중요한 kinase의 역할을 하고 있는 Cdks의 활성에 미치는 resveratrol의 영향을 조사하였다. Fig. 5B의 결과에서 볼 수 있듯이 정상배지에서 성장된 암세포에 비하여 resveratrol에 처리된 배지에서 배양된 암세포의 경우 조사된 두 가지 Cdk2 및 Cdk4 모두 그들의 kinase 활성이 매우 억제되었음을 확인하였다.

**COXs의 발현 및 PGE2의 생성에 미치는 resveratrol의 영향**

염증을 포함한 다양한 생체 반응에서 prostaglandin 계열 물질들은 세포분열이나 증식에 영향을 줌으로서 각종 인체 질병의 유발과 진행에 중요한 역할을 함이 최근 밝혀지고 있다[17,46]. Prostaglandin의 합성에서 2가지의 COX isoform이 관여하고 있는데, 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[11,47]. 많은 종류의 암 조직에서 COX-2는 높은 수준으로 발현되고 있으며, COX-2 유전자의 발현을 증대시킬 경우 혈관신생 및 전이능이 높아지고 apoptosis에 대한 저항성을 가지는 점으로 보아 특히 염증반응과 함께 세포의 암화에 COX-2는 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[7,43]. 그리고 COX-2 특이적 억제제에 의한 angiogenesis와 종양형성의 억제 등의 결과에서 이 유전자의 선택적 조절에 의한 암 예방전략이 대두되고 있다[43].

본 연구에서는 이상의 resveratrol에 의한 A549 폐암세포의 증식억제가 COX-2의 선택적 발현억제 및 prostaglandin 생성 저하 등과 관련성이 있는지의 여부를 조사하였다. 이를 위하여 resveratrol이 처리된 암세포를 대상으로 COX-1 및

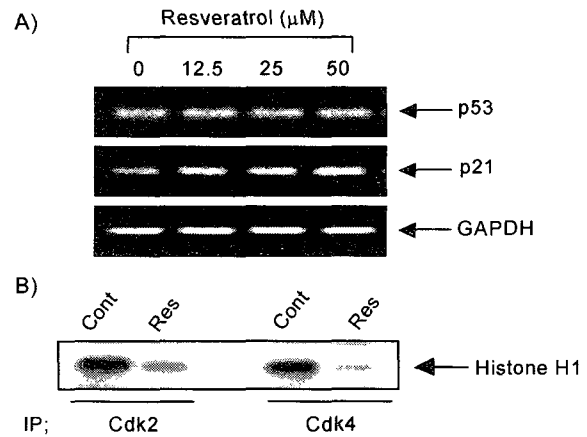


Fig. 5. A) Effects of resveratrol treatment on the levels of tumor suppressor p53 and Cdk inhibitor p21 in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with resveratrol for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using p53 and p21 primers described in materials and methods. GAPDH was used as a house-keeping control gene. B) Inhibition of kinase activities of Cdk2 and Cdk4 by resveratrol treatment in A549 cells. Total cell lysate (0.5 mg protein) from control cells and cells treated with resveratrol for 48 h were immunoprecipitated with anti-Cdk2 and anti-Cdk4 antibodies. Kinase activities were measured on the immunocomplexes using histone H1 as a substrate. Phosphorylated histone H1 was analyzed by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and autoradiography of the electroblotted gels.

COX-2의 mRNA 발현변화 여부를 RT-PCR 및 Western blot analysis로 조사한 결과인 Fig. 6A 및 B에서 볼 수 있듯이 resveratrol의 처리에 의하여 A549 폐암세포의 COX-1 발현은 아무런 변화가 없었으나, COX-2의 경우 저농도 처리군에서부터 발현의 감소가 관찰되었으며 고농도 처리군에서는 대조군에 비하여 COX-2의 발현이 매우 감소되었음을 관찰할 수 있었다. 즉 resveratrol에 의한 A549 폐암세포의 증식억제는 COX-2 특이적 발현 억제 현상과 뚜렷한 상관성이 있음을 알 수 있었다. 따라서 COXs에 촉매활성의 결과 생산되는 arachidonic acid 대사체인 PGE2의 생성에 미치는 resveratrol의 영향을 조사한 결과, Fig. 6C에서 볼 수 있듯이 COX-2의 산물에 해당하는 PGE2의 생성은 resveratrol의 처리 농도 의존적으로 점차 감소되었으며, 감소되는 경향성은 COX-2의 발현 감소와 유사한 경향성임을 알 수 있었다. 이상의 결과는 그동안 알려진 resveratrol의 항암작용 기전 해석을 위한 추가적인 자료로서 유용하게 사용될 것으로 생각한다.

**요 약**

Resveratrol은 포도와 같은 식물에서 각종 감염균으로부터

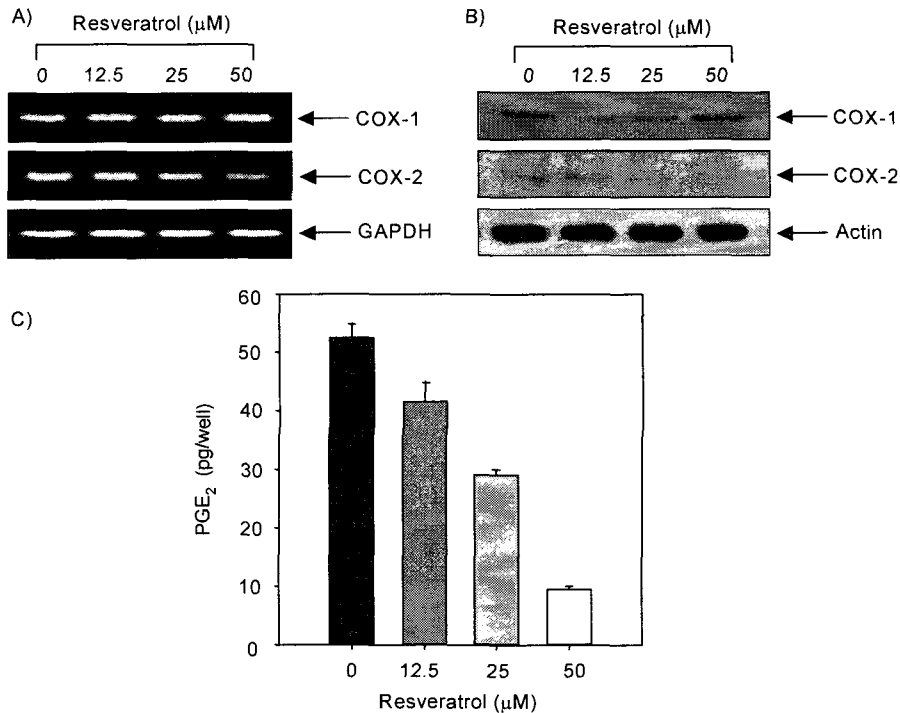


Fig. 6. Effects of resveratrol treatment on the levels of COXs and PGE<sub>2</sub> release in A549 human lung carcinoma cells. A) Cells were incubated with resveratrol for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using indicated primers described in materials and methods. GAPDH was used as a house-keeping control gene. B) After 48 h treatment with resveratrol, cellular proteins were separated by 10 % SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control. C) Cells were seeded in 96-well plates (1x10<sup>4</sup> cells/well) and treated with resveratrol for 48 h. The PGE<sub>2</sub> levels in the culture medium was measured by EIA. Values are mean ± S.E. of three independent experiments.

자신의 몸을 보호하기 위하여 생성되는 물질인 phytoalexin의 일종으로 강력한 항산화작용, 암예방 효과 및 항암 작용을 포함한 각종 약리작용을 가진 것으로 보고되어져 오고 있다. 본 연구에서는 resveratrol의 항암작용 기전해석을 위하여 A549 인체폐암세포의 증식에 미치는 resveratrol의 영향을 조사하였다. A549 세포의 생존율은 resveratrol의 처리시간 증가에 따라 강력하게 억제되었으며, 이는 암세포의 다양한 형태변형을 동반한 세포주기 G2/M arrest 및 염색질 응축 현상을 동반한 apoptosis 유발에 의한 것임을 알 수 있었다. Resveratrol 처리에 의한 apoptosis 유발은 Bcl-2의 발현 변화 없이 Bcl-X<sub>L</sub>의 발현 감소에 따른 상대적인 Bax의 발현 증가와 Sp-1, PCNA 및 β-catenin 등과 같은 단백질의 분해 현상과 연관성이 있었다. 또한 resveratrol에 의한 A549 세포의 증식억제는 Cdk inhibitor p21의 발현 증가에 따른 Cdk의 kinase 활성 저하 및 COX-2의 선택적 저해에 따른 PGE<sub>2</sub> 생성 저하와 관련이 있었다.

**감사의 글**

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원(O2-PJ1-

PG3-20905-0009)에 의하여 이루어진 결과의 일부분입니다.

**참고 문헌**

- Ahmad, N., V.M. Adhami, F. Afaq, D.K. Feyes and H. Mukhtar. 2001. Revertatrol causes WAF-1/p21-mediated G1-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Clin Cancer Res* 7, 1466-1473.
- Arends, M.J., R.G. Morris and A.H. Wyllie. 1990. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 136, 593-608.
- Arichi, H., Y. Kimura, H. Okuda, K. Baba, M. Kozawa and S. Arichi. 1982. Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. on lipid metabolism. *Chem Pharm Bull* 30, 1766-1770.
- Barry, M.A., C.A. Behnke and A. Eastman. 1990. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem Pharmacol* 40, 2353-2362.
- Brancolini, C., D. Lazarevic, J. Rodriguez and C. Schneider. 1997. Dismantling cell-cell contacts during apoptosis is coupled to a caspase-dependent proteolytic cleavage of β-catenin. *J Cell Biol* 139, 759-771.

6. Chiarugi, V., L. Magnelli and G. Basi. 1994. Apoptosis and the cell cycle. *Cell Mol Biol Res* **40**, 603-612.
7. Chiarugi, V., L. Magnelli and O. Gallo. 1998. Cox-2, iNOS and p53 as play-makers of tumor angiogenesis. *Int J Mol Med* **2**, 715-719.
8. Choi, Y.H., W.H. Lee, L. Zhang and K.Y. Park. 2000. p53-independent induction of p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavones genistein in human prostate carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res* **91**, 164-173.
9. Choi, Y.H., K.R. Kong, Y.A. Kim, K.O. Jung, J.H. Kil, S.H. Rhee and K.Y. Park. 2003. Induction of Bax and activation of caspases during  $\beta$ -sitosterol-mediated apoptosis in human colon cancer cells. *Int J Oncol* **23**, 1657-1661
10. Clement, M.V., J.L. Hirpara, C.S.H. Hawdhury and S. Pervaiz. 1998. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood* **92**, 996-1002.
11. Dempke, W., C. Rie, A. Grothey and H.J. Schmoll. 2001. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol* **127**, 411-417.
12. Dercks, W. and L.L. Creasy. 1989. The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiol Mol Plant Pathol* **34**, 189-202.
13. El-Deiry, W.S., T. Tokino, V.E. Velculesco, D.B. Levy, R. Parsons, J.M. Trent, D. Lin, D., E.W. Mercer, K.W. Kinzler and B. Vogelstein. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817-825.
14. Estrov, Z., S. Shishodia, S. Faderl, D. Harris, Q. Van, H.M. Kantarjian, M. Talpaz and B.B. Aggarwal. 2003. Resveratrol blocks interleukin- $\beta$ -induced activation of the nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Blood* **102**, 987-995.
15. Evans, V.G. 1995. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol Int* **17**, 461-476.
16. Fesus, L., Z. Szondy and I. Uray. 1995. Probing the molecular program of apoptosis by cancer chemopreventative agents. *J Cell Biochem* **22**, 151-161.
17. Giercksky, K.E. 2001. COX-2 inhibition and prevention of cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **15**, 821-833.
18. Goldberg, D.M., S.E. Hahn and J.G. Parkes. 1995. Beyond alcohol-beverage consumption and cardiovascular mortality. *Clin Chim Acta* **237**, 155-187.
19. Hickman, J.A. 1992. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev* **11**, 121-129.
20. Hockenbery, D.M., Z.N. Oltvai, X.M. Yin, C.L. Milliman and S.J. Korsmeyer. 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* **75**, 241-251.
21. Huang, C., W.Y. Ma, A. Goranson and Z. Dong. 1999. Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway. *Carcinogenesis* **20**, 237-242.
22. Huang, Y., S. Nakada, T. Ishiko, T. Utsugisawa, R. Datta, S. Kharbanda, K. Yoshida, R.V. Talanian, R. Weichselbaum, D. Kufe and Z.M. Yuan. 1999. Role for caspase-mediated cleavage of Rad51 in induction of apoptosis by DNA damage. *Mol Cell Biol* **19**, 2986-2997.
23. Jang, J.H. and Y.J. Surh. 2003. Protective effect of resveratrol on  $\beta$ -amyloid-induced oxidative PC12 cell death. *Free Radic Biol Med* **34**, 1100-1110.
24. Jang, J.H. and Y.J. Surh. 2001. Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Mutat Res* **496**, 181-190.
25. Jang, M., L. Cai, G.O. Udeani, K.V. Slowing, C.F. Thomas, C.W.W. Beecher, H.H.S. Fong, N.R. Farnsworth, A.D. Kinghorn, R.G. Mehta, R.C. Moon and J.M. Pezzuto. 1997. Cancer chemopreventative activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **275**, 218-220.
26. Jo, E.H., H.D. Hong, N.C. Ahn, J.W. Jung, S.R. Yang, J.S. Park, S.H. Kim, Y.S. Lee and K.S. Kang. 2004. Modulations of the Bcl-2/Bax family were involved in the chemopreventive effects of licorice root (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) in MCF-7 human breast cancer cell. *J Agric Food Chem* **52**, 1715-1719.
27. Joe, A.K., H. Liu, M. Suzui, M.E. Vural, D. Xiao and I.B. Weinstein. 2002. Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin Cancer Res* **8**, 893-903.
28. Kim, Y.A., B.T. Choi, Y.T. Lee, D.I. Park, S.H. Rhee, K.Y. Park and Y.H. Choi. 2004. Resveratrol inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human breast carcinoma MCF-7 cells. *Oncol Rep* **11**, 441-446.
29. Kim, Y.A., W.H. Lee, T.H. Choi, S.H. Lee, K.Y. Park and Y.H. Choi. 2003. Involvement of p21, pRB, Bax and NF- $\kappa$ B in induction of growth arrest and apoptosis by resveratrol in human lung carcinoma A549 cells. *Int J Oncol* **23**, 1143-1149.
30. Larrosa, M., F.A. Tomas-Barberan and J.C. Espin. 2003. Grape polyphenol resveratrol and the related molecule 4-hydroxystilbene induce growth inhibition, apoptosis, S-phase arrest, and upregulation of cyclins A, E, and B1 in human SK-Mel-28 melanoma cells. *J Agric Food Chem* **51**, 4576-4584.
31. Liu, W.K., S.X. Xu and C.T. Che. 2000. Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line. *Life Sci* **67**, 1297-1306.
32. Lowe, S.W., H.E. Ruley, T. Jacks and D.E. Housman. 1993. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* **74**, 957-967.
33. Miyashita, T. and J.C. Reed. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**, 293-299.
34. Morgan, D.O. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* **374**, 131-134.
35. Paceasciak, C.R., S. Hahn, E.P. Diamandis, G. Soleas and D.M. Goldberg. 1995. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis-implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta* **235**, 207-219.
36. Reddy, B.S., C.X. Wang, H. Samaha, R. Lubet, V.E. Steele,



- G.J. Kelloff and C.V. Rao. 1997. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary perillyl alcohol. *Cancer Res* **57**, 420-425.
37. Reed, J.C. 1998. Bcl-2 family proteins, *Oncogene* **17**, 3225-3236.
38. Rickers, A., N. Peters, V. Badock, R. Beyaert, P. Vandenaabeele, B. Dorken and, K. Bommert. 1999. Cleavage of transcription factor SP1 by caspases during anti-IgM-induced B-cell apoptosis. *Eur J Biochem* **261**, 269-274.
39. She, Q.B., A.M. Bode, W.Y. Ma, N.Y. Chen and Z. Dong. 2001. Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase. *Cancer Res* **61**, 1604-1610.
40. Sherr, C.J. 2000. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* **60**, 3689-3695.
41. Subbaramaiah, K., W.J. Chung, P. Michaluart, N. Telang, T. Tanabe, H. Inoue, M. Jang, J.M. Pezzuto and A.J. Danneberg. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *J Biol Chem* **273**, 21875-21882.
42. Surh, Y.J., Y.J. Hurh, J.Y. Kang, E. Lee, G. Kong and S.J. Lee. 1999. Resveratrol, an antioxidant present in red wine, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Cancer Lett* **140**, 1-10.
43. Surh, Y.J., K.S. Chun, H.H. Cha, S.S. Han, Y.S. Keum, K.K. Park and S.S. Lee. 2001. 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* **480-481**, 243-268.
44. Tewari, M., L.T. Quan, K. O'Rourke, S. Desnoyers, Z. Zeng, D.R. Beidler, G.G. Poirier, G.S. Salvesen and V.M. Dixit. 1995. Yama/ CPP32  $\beta$ , a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* **81**, 801-809.
45. Tsan, M.F., J.E. White, J.G. Maheshwari and G. Chikkappa. 2002. Anti-leukemia effect of resveratrol. *Leuk Lymphoma* **43**, 983-987.
46. Turini, M.E. and R.N. DuBois. 2002. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med* **53**, 35-57.
47. Vainio, H. 2001. Is COX-2 inhibition a panacea for cancer prevention? *Int J Cancer* **94**, 613-614.
48. Wolter, F., B. Akoglu, A. Clausnitzer and J. Stein. 2001. Downregulation of the cyclin D1/Cdk4 complex occurs during resveratrol-induced cell cycle arrest in colon cancer cell lines. *J Nutr* **131**, 2197-2203.