

# Tabebuia avellanedae에서 유래된 $\beta$ -lapachone의 인체 폐암세포 apoptosis 유발에 관한 연구

최영현\* · 최병태<sup>1</sup> · 이용태<sup>2</sup>

동의대학교 한의과대학 생화학교실 및 대학원 바이오품질제어학과,  
1: 한의과대학 해부학교실, 2: 한의과대학 생리학교실 및 한방바이오효과연구센터

## Growth Inhibition of Human Lung Carcinoma Cells by $\beta$ -lapachone through Induction of Apoptosis

Yung Hyun Choi\*, Byung Tae Choi<sup>1</sup>, Yong Tae Lee<sup>2</sup>

Department of Biochemistry and Department of Biomaterial Control, 1: Department of Anatomy,  
2: Department of Physiology, Dong-Eui University College of Oriental Medicine and Biomedical Research Center of Oriental Medicine

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

Key words :  $\beta$ -lapachone, lung carcinoma, apoptosis, Bax, Bcl-2

### 서 론

Apoptosis는 개체의 발생단계나 DNA 손상, 바이러스 감염 등에 의한 유전적 조절 하에서 일어나는 정교한 개체의 방어기전 이란 점에서 necrosis와 구별된다<sup>1)</sup>. 또한 apoptosis는 개체보존수 준에서 손상된 세포들의 제거를 위한 중요한 수단이며, 세포주기 의존적 또는 비의존적으로 동시에 일어날 수 있으나, 정상적인 세포주기의 이탈이나 세포주기조절에 중요한 cyclin-dependent kinases (Cdks) 활성의 변화가 apoptotic cell death의 주원인이

될 수 있다<sup>2)</sup>. Apoptosis의 유발에 p53이나, Bcl-2 및 Bax와 같은 유전자가 관여한다는 사실이 알려지면서 apoptosis와 연관된 분자적 기전이 최근 많이 밝혀지고 있다<sup>3,4)</sup>. 그중 대표적인 것으로 Bcl-2는 apoptosis를 억제하는 반면, Bax는 과발현 되었을 때 apoptosis를 유도하는데, 두 단백질은 서로 dimer를 형성하면서 cytochrome c와 같은 apoptosis 유발에 관여하는 인자들의 조절에 관여한다<sup>5,6)</sup>. 또한 caspases라고 이름 붙여진 ICE/CED-like protease family 역시 apoptosis 유발에 중요한 역할을 하는데, 이들은 proenzyme 형태로 존재하다가 Bax를 포함한 apoptosis 유도를 활성화시키는 신호에 의해 활성화된 cysteine-related proteases로 되어 직접 또는 간접적으로 세포 내 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다<sup>7,8)</sup>. 따라서 항암제 개발을 위한 후보물질의 암세포 apoptosis 조절관련 기전해석은 필수적으로

\* 교신저자 : 최영현, 부산시 부산진구 양정동 산45-1 동의대학교 한의과대학  
· E-mail : choiyh@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-7413  
· 접수 : 2005/03/11 · 수정 : 2005/04/14 · 채택 : 2005/05/16

선행되어져야할 분야로 인식되어지고 있다.

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

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

## 재료 및 방법

### 1. 암세포의 배양 및 $\beta$ -lapachone의 처리

본 실험에 사용한 A549 인체 폐암세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며 RPMI-1640 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 조건하에서 배양하였다.  $\beta$ -lapachone은 Biomol (Plymouth Meeting, PA, USA)에서 구입하였으며 이를 순수 alcohol에 녹여 10 mM의 stock 용액으로 제조한 뒤 -20°C에 보관하여 적정 농도로 배지에 희석하여 처리하였다.

### 2. 암세포의 성장억제 및 형태적 변화 관찰

준비된 암세포를 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 후,  $\beta$ -lapachone을 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 48시간 처리 후, trypsin을 처리하고 phosphate-buffered saline (PBS)로 수세하였다. 이를 trypan blue로 염색한 뒤 hemacytometer를 이용하여 살아 있는 세포의 수를 정상 배지에서 자란 암세포와 비교하였다. 또는  $\beta$ -lapachone이 처리된 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis,

MO, USA) 시약을 0.5 mg/ml 농도가 되도록 성장배지로 희석하여 2 ml씩 분주하여 3시간 동안 배양한 다음, MTT 시약을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)를 첨가하여 well에 생성된 formazin을 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3. DAPI 염색을 통한 핵의 관찰

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

### 4. DNA fragmentation 분석

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

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-XS/L	Sence	5'-CAG-CTG-CAC-CTG-ACG-3'
	Antisence	5'-GCT-GGG-TAG-GTG-CAT-3'
Bcl-2	Sence	5'-CAG-CTG-CAC-CTG-ACG-3'
	Antisence	5'-GCT-GGG-TAG-GTG-CAT-3'
p53	Sence	5'-GCT-CTG-ACT-GTA-CCA-CCA-TCC-3'
	Antisence	5'-CTC-TCG-GAA-CAT-CTC-GAA-GCG-3'
p21	Sence	5'-CTC-AGA-GGA-GGC-GCC-ATG-3'
	Antisence	5'-GGG-CGG-ATT-AGG-GCT-TCC-3'
hTERT <sup>1</sup>	Sence	5'-AGC-CAG-TCT-CAC-CTT-CAA-CC-3'
	Antisence	5'-GTT-CIT-CCA-AAC-TTG-CTG-ATG-3'
hTEP-1 <sup>2</sup>	Sence	5'-TCA-AGC-CAA-ACC-TGA-ATC-TGA-G-3'
	Antisence	5'-CCC-CGA-GTG-AAT-CIT-TCT-ACG-C-3'
hTR <sup>3</sup>	Sence	5'-TCT-AAC-CCT-AAC-TGA-GAA-GGG-CGT-AG-3'
	Antisence	5'-GTT-TGC-TCT-AGA-ATG-AAC-GGT-GGA-AG-3'
c-myc	Sence	5'-AAG-ACT-CCA-GCG-CCT-TCT-CTC-3'
	Antisence	5'-GTT-TTC-CAA-CTC-CGG-GAT-CTG-3'
GAPDH <sup>4</sup>	Sence	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	Antisence	5'-AGC-CIT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

<sup>1</sup>telomerase reverse transcriptase, <sup>2</sup>telomerase-associated protein, <sup>3</sup>telomeric repeat binding factor, <sup>4</sup>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

### 5. Reverse transcription-PCR 분석

동일한 조건에서 준비된 암세포를 대상으로 RNazol B (TEL-TEST, Inc., Texas, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하

였다. 분리된 RNA를 정량한 후, 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)를 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 EtBr로 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

6. 전기영동 및 Western blotting

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

결과 및 고찰

1. 암세포의 성장에 미치는  $\beta$ -lapachone의 영향

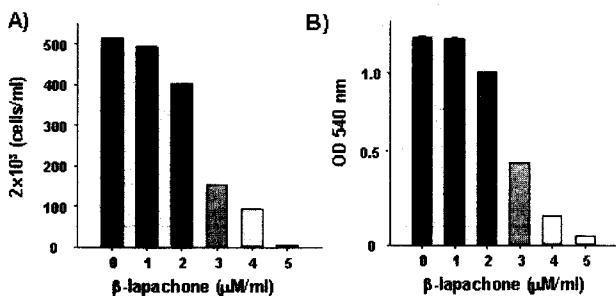


Fig. 1. Anti-proliferative effects of  $\beta$ -lapachone treatment in A549 human lung carcinoma cells. A549 cells were seeded and treated with  $\beta$ -lapachone at different concentrations for 48 h. (A) The viable cells were counted after  $\beta$ -lapachone treatment by hemacytometer counts of trypan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

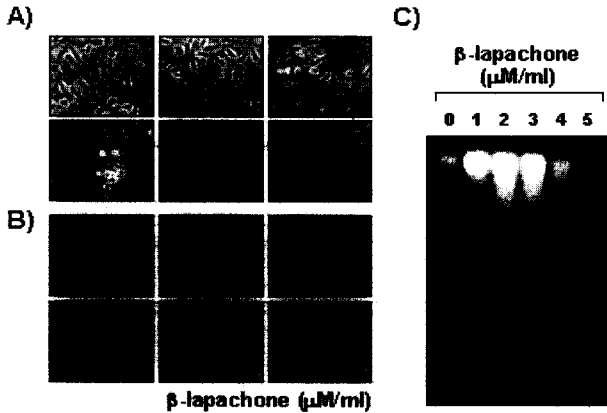
A549 인체 폐암세포의 성장에 미치는  $\beta$ -lapachone의 영향

을 알아보기 위하여 48시간동안  $\beta$ -lapachone을 처리한 후 살아 있는 세포를 hemacytometer를 이용하여 조사해본 결과, Fig. 1A에서처럼  $\beta$ -lapachone의 처리농도 의존적으로 암세포의 증식이 억제되었다. 이는 Fig. 1B에 나타난 바와 같은 MTT assay에 의한 결과와도 유사한 경향성이었음을 알 수 있었다. 특히 3  $\mu$ M 이상의  $\beta$ -lapachone 처리군에서는 50% 이상의 세포증식 억제 효과가 있었으며, 이는 다른 종류의 전립선 암세포<sup>16,19-22</sup>), 신경교종<sup>23</sup>), 간암세포<sup>24</sup>), 백혈병세포<sup>18,25,26</sup>), 대장암세포<sup>27,28</sup>) 및 유방암세포<sup>29-31</sup>) 등 대부분의 암세포에서 나타난 결과들과 유사하였다.

2.  $\beta$ -lapachone에 의한 암세포의 형태변화 및 apoptosis의 유발

$\beta$ -lapachone의 처리에 따른 A549 폐암세포의 증식억제과정에서 암세포의 전체적인 형태변화를 관찰하기 위하여 48시간 동안  $\beta$ -lapachone을 처리한 후 위상차 현미경을 이용하여 조사한 결과는 Fig. 2A에 나타난 바와 같다. 결과에서 알 수 있듯이  $\beta$ -lapachone이 함유된 배지에서 자란 세포는  $\beta$ -lapachone 처리 농도 의존적으로 전체적으로 세포질이 응축되면서 배양접시의 바닥에 낮게 부착되는 형태의 모습을 보였다. 또한 세포의 모양이 길어지면서 돌기와 같은 형태가 분지를 이루기 시작하면서 membrane shrinking 및 세포의 rounding up 현상 등 매우 심한 세포의 형태적 변형을 초래하였으며 3  $\mu$ M 농도에서 거의 모든 세포들이 부착력을 상실하여 배지 위로 부유되는 현상을 관찰할 수 있었다. 이는 정상 전립선 상피세포에서 관찰된 dendrite 형태와 비슷한 구조를 형성하는 것과는 매우 대조적인 양상이었으나<sup>15</sup>), 선행 연구의 결과들<sup>21,22,24,26</sup>)과는 유사하여 암세포의 종류에 따라  $\beta$ -lapachone에 의한 세포의 형태 변형은 다소 차이가 있음을 알 수 있었다.

$\beta$ -lapachone에 의한 이상의 암세포 세포성장 억제에 따른 심한 형태적 변형이 apoptosis 유발과 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 먼저 DAPI 염색에 의한 암세포의 핵 형태를 조사하였다. Fig. 2B에 나타난 바와 같이 정상 배지에서 자란 암세포에서는 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나  $\beta$ -lapachone이 함유된 배지에서 자란 암세포에서는 apoptosis의 전형적인 특징인 chromatin condensation 현상에 의한 apoptotic body를 쉽게 관찰할 수 있었다<sup>32,33</sup>). 한편 apoptotic body 형성과 함께 apoptosis 유발의 직접적인 증거에 해당하는 DNA fragmentation 여부를 agarose gel 전기영동으로 조사하였다. 이를 위하여 정상 및  $\beta$ -lapachone이 함유된 배지에서 자란 세포를 대상으로 총 DNA를 추출하여 조사한 결과는 Fig. 2C에 나타난 바와 같다. 즉  $\beta$ -lapachone이 처리된 암세포에서는 apoptosis가 일어난 세포들에서 볼 수 있는 전형적인 DNA laddering을 관찰할 수 있었다. 이는 결국  $\beta$ -lapachone의 처리에 의하여 endonuclease가 활성화되어 chromosomal DNA가 단편화되었음을 의미하는 것이며<sup>32,33</sup>),  $\beta$ -lapachone 처리에 의한 이상의 두 가지 현상은 간암세포<sup>24</sup>), 백혈병세포<sup>18,25</sup>), 유방암 세포<sup>29</sup>) 및 대장암 세포<sup>28</sup>) 등에서 관찰된 결과들과 일치하였다. 따라서 이상의 결과에서  $\beta$ -lapachone 처리에 의한 A549 폐암세포의 증식 억제가 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다.

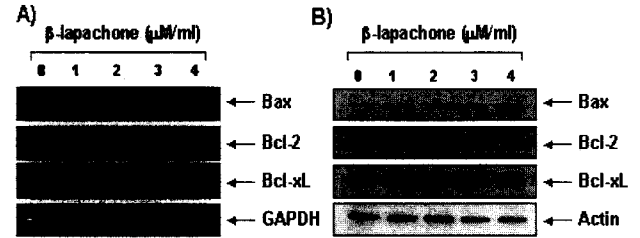


**Fig. 2. Morphological changes, chromatin condensation and DNA fragmentation by  $\beta$ -lapachone treatment in A549 human lung carcinoma cells.** (A) Cells were untreated or treated with  $\beta$ -lapachone for 48 h, stained and then photographed by microscope. Magnification, x200. (B) The untreated cells and  $\beta$ -lapachone treated cells for 48 h were harvested, and spun down. After fixing, the cells were stained with DAPI solution. Stained nuclei were then observed under fluorescent microscope using blue filter. Magnification, x400. (C). Genomic DNA was extracted and analyzed by 1% agarose gel electrophoresis in the presence of EtBr.

### 3. Bcl-2 family의 발현에 미치는 $\beta$ -lapachone의 영향

Bcl-2 family에 속하는 몇 가지 중요한 인자들은 apoptosis 유발 조절에 가장 대표적인 유전자로 알려져 있는데, 그중 Bcl-2는 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax는 pro-apoptotic 분자로 Bax 단백질 발현의 증가는 apoptosis의 유발과 관계가 있다. 이들 두 유전자는 세포 내 소기관 중 mitochondria로부터의 cytochrome c를 유리시켜 종양억제 유전자인 p53, caspases, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절한다<sup>34,35</sup>. 이들은 서로 dimer의 형태로 존재하며 그들의 발현 수준에 변화가 초래되면 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다<sup>5,6</sup>. 따라서 인체 폐암세포 A549에서  $\beta$ -lapachone에 의한 apoptosis 유발에 이들 유전자가 관련되어 있는지의 여부를 RT-PCR 및 Western blotting으로 조사한 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 apoptosis를 유발하는 것과 관련이 있는 Bax 유전자의 발현은 전사 및 번역 수준에서  $\beta$ -lapachone 처리 농도 의존적으로 매우 증가된 반면, Bcl-2의 발현은 특히 단백질 수준에서  $\beta$ -lapachone 처리 농도의 존적으로 매우 감소되었다. 그리고 Bcl-2와 함께 apoptosis 유발 억제에 관여하는 Bcl-xL의 경우  $\beta$ -lapachone 처리에 따른 발현의 큰 변화는 관찰할 수 없었으나, 저농도 처리군에서부터 인산화의 정도가 매우 높게 나타남을 알 수 있었다. 이는 결국  $\beta$ -lapachone 처리에 의한 apoptosis이 유발에는 최소한 Bcl-2 family가 중요한 역할을 하고 있음을 의미하는 것이며, Bax의 상대적 발현 증가로 인한 apoptosis 유발 관련 효소들의 활성화가 이루어지고 있음을 시사하여 주는 것이다. 본 연구의 결과는 Choi et al.<sup>22,28</sup>에 의한 대장암세포와 전립선암세포, Wuerzberger et al.<sup>29</sup>에 의한 유방암세포, Weller et al.<sup>23</sup>에 의한 신경교종 등에서 관찰된  $\beta$ -lapachone에 의한 apoptosis 유발에서 나타난 현상과 유사한 현상임을 알 수 있었다. 또한 Bcl-2 유전자가 인위적인 과발현된 백혈병세포에서  $\beta$ -lapachone에 의한 apoptosis가 억제되었음<sup>25</sup>은  $\beta$ -lapachone에 의한 apoptosis 유발에 Bcl-2의 발현 감소에 따른 Bax의 발현증가가 중요한 역할을 하고 있음을 뒷받침

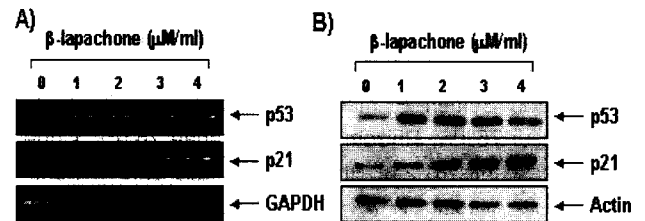
하여 주는 결과이다.



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

### 4. p53 및 p21WAF1/CIP1의 발현에 미치는 $\beta$ -lapachone의 영향

다음은  $\beta$ -lapachone의 처리에 의한 폐암세포의 증식억제 현상이 종양억제 유전자 또는 세포주기 조절 억제인자들의 발현 변화와 상관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 현재까지 알려진 종양억제 유전자 중 가장 중요한 p53 및 전체적인 세포주기의 진해에 중요한 역할을 하는 Cdk inhibitor p21의 발현에 미치는  $\beta$ -lapachone의 영향을 조사하였다.



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

Fig. 4의 결과에서 볼 수 있듯이 p53 및 p21 두 유전자의 발현은  $\beta$ -lapachone의 처리에 따라 전사 및 번역 수준에서 모두 증가하였음을 알 수 있었다. Cdk inhibitor인 p21은 p53의 발현 증가에 의하여 전사 수준이 조절될 수 있으며<sup>36-38</sup>, 암세포의 증식 억제, apoptosis 및 분화 유도에 중요한 역할을 하는 세포주기 전반에 걸친 가장 중요한 조절인자란 점에서  $\beta$ -lapachone의 처리에 의하여 두 유전자가 동시에 발현이 증가되었다는 점은 매우 흥미로운 결과라고 사료된다. 그러나 Hueber et al.<sup>39</sup>의 결과에 의하면 인체 망막 상피세포에서는  $\beta$ -lapachone의 처리에 의한 apoptosis 유발에서는 p53 및 p21의 유전자 발현이 관찰되지 않았다고 보고한 바 있고, 인체 유방암세포에서도 이와 유사한 결과가 보고된 바 있다<sup>29</sup>. 또한 Weller et al.<sup>23</sup>의 결과에 의하면, 정상 p53 유전자를 가진 신경교종세포에서는  $\beta$ -lapachone의 처리에 의하여 p21의 발현이 p53과 동시에 증가하였으나, 동일조건에서 p53 유전자가 결여된 세포에서는 p21의 발현에 아무런 영향이 없었다.

그러나 최근 본 연구실의 결과에 의하면 p53 유전자가 결여된 인체 전립선암세포에서는  $\beta$ -lapachone의 처리에 의하여 p53 비 의존적으로 p21의 단백질 발현이 증가되었으며, p21 promoter 활성 또한  $\beta$ -lapachone의 처리 농도 및 시간 의존적으로 증가되었던 점<sup>22)</sup>등을 고려해 볼 때 p53 비 의존적인 p21 활성 조절 가능성은 여전히 높을 것으로 예상되며, 세포주에 따른 세포주기 조절 관련 유전자들에 관한 연구가 더 필요할 것으로 예상된다.

5. Telomere 조절관련 인자들의 발현에 미치는  $\beta$ -lapachone의 영향

한편 telomere는 염색체의 말단 부위에 repeat sequences [(TTAGGG)n]로 이루어져 있으며, 이런 반복구조의 형성 및 유지에 관여하는 효소가 telomerase이다<sup>40-42)</sup>. 정상 체세포에서는 telomerase의 활성이 없기 때문에 세포가 분열할수록 telomere의 길이는 짧아지게 되지만, 암세포의 90% 이상에서는 telomerase의 catalytic subunit 단백질을 coding하는 hTERT가 과발현되어 있고 이로 인한 높은 telomerase의 활성을 나타내고 있다. 따라서 노화, 혈관신생 및 면역계제한 등에서 뿐 만 아니라 암의 발생과 진행도 이들과 밀접한 연관성이 있으며, 암의 진단과 진행의 정도를 나타내는 지표로 사용될 수 있음을 시사하여 준다<sup>40-42)</sup>. 노화의 개념에서 결국 telomere의 소실은 염색체의 안정성이 상실되는 것이며 이는 DNA damaging agent에 의한 p53 및 p21의 발현증가로 인한 세포주기 교란 유발로 설명되어지고 있다<sup>43,44)</sup>. 특히 암과 연관된 부분에서 telomerase의 활성은 hTERT 유전자의 발현 조절에 의한 것이고, hTERT 유전자의 promoter 부위에는 다른 유전자의 promoter 보다 훨씬 더 많은 전사조절인자의 결합부위를 보유하고 있어 activator 또는 repressor로 작용할 수 있다<sup>40,42)</sup>. 이러한 중요성을 고려하여  $\beta$ -lapachone의 처리에 의한 A549 폐암세포의 증식 억제가 염색체 말단에 존재하는 telomere의 조절과 어떤 관계가 있는지를 조사하였다.

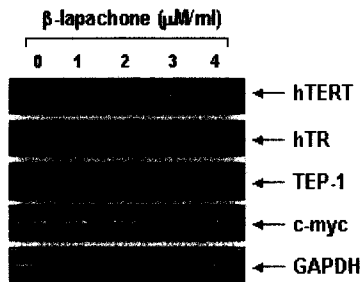


Fig. 5. Effects of  $\beta$ -lapachone on the levels of telomere-regulatory genes expression in A549 human lung carcinoma cells. Cells were treated with various concentrations of  $\beta$ -lapachone. After 48 h incubation, total RNAs were isolated, and RT-PCR was performed using indicated primers. The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

Fig. 5의 결과에서 알 수 있듯이  $\beta$ -lapachone의 처리에 의하여 hTERT 및 hTR 유전자의 전사수준이 다소 감소되었으나, 또 다른 조절인자인 TEP-1 및 hTERT의 발현 조절에 중요한 인자에 해당하는 c-myc의 발현은  $\beta$ -lapachone의 처리에 의하여 큰 변화가 관찰되지 않았다. 그러나  $\beta$ -lapachone 처리에 의한 암세포의 증식억제 효과와 telomere 관련 분야에 관한 기존의 연구가

전혀 이루어져 있지 않았기 때문에 이에 관한 보다 구체적인 후속 연관이 연관된 뒤 따라야 할 것으로 생각된다.

결 론

DNA topoisomerase 활성 억제제로 알려진  $\beta$ -lapachone은 남미지역에 서식하는 *Tabebuia avellaneda*의 수피에서 동정된 천연 quinone계 물질로서 다양한 종류의 암세포에서 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 왔다. 본 연구에서는  $\beta$ -lapachone의 항암활성 기전 해석의 일환으로 인체 폐암세포 A549의 증식에 미치는  $\beta$ -lapachone의 영향을 조사하였다. Hemocytometer count 및 MTT assay에 의한 결과에서,  $\beta$ -lapachone의 처리에 따라 A549 폐암세포들은  $\beta$ -lapachone 처리 농도 의존적으로 증식이 억제되었음을 확인하였으며,  $\beta$ -lapachone이 처리된 세포에서 apoptosis가 유발된 세포에서 특징적으로 관찰되는 chromatin condensation 및 DNA fragmentation 현상을 관찰하였다. 이러한  $\beta$ -lapachone의 apoptosis 유발에는 pro-apoptotic 인자인 Bax의 발현증가에 따른 anti-apoptotic 인자인 Bcl-2 발현의 감소와 직접적인 연관성이 있음을 관찰할 수 있었다. 그리고 세포의 성장 조절에 중요한 역할을 하는 p53 및 p21의 발현 증가 및 telomere의 길이 조절과 관련이 있는 유전자의 발현 교란 역시  $\beta$ -lapachone에 의한 암세포의 성장억제와 어느 정도 관련이 있는 것으로 추정되어진다. 그러나 본 연구의 결과만으로  $\beta$ -lapachone의 항암작용 여부를 직접적으로 논하기에는 어렵기 때문에 다양한 추가적인 실험이 필수적으로 수행되어야 할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Evans, V.G. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol. Int.* 17, 461-476, 1993.
2. 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.
3. Chiarugi, V., Magnelli, L., Turchetti, A., Cinelli, M., Cavari, S., Ruggiero, M., Cell survival and death programmes. *Pharmacol. Res.* 29, 101-110, 1994.
4. Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365, 1997.
5. Lenaz, G., Bovina, C., Formiggini, G., Castelli, G.P. Mitochondria, oxidative stress, and antioxidant defences. *Acta. Biochim. Pol.* 46, 1-21, 1999.
6. Antonsson, B., Martinou, J.C. The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.* 256, 50-57, 2000.
7. Martin, S.J., Finucane, D.M., Amarante-Mendes, G.P., O'Brien, G.A., Green, D.R. Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. *J. Biol. Chem.* 271, 28753-28756, 1996.
8. Steinhilber, U., Badock, V., Bauer, A., Behrens, J., Wittman

- Liebold, B., Dorken, B., 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.
9. Schaffner-Sabba, K., Schmidt-Ruppin, K.H., Wehrli, W., Schuerch, A.R., Wasley, J.W.  $\beta$ -lapachone: synthesis of derivatives and activities in tumor models. *J. Med. Chem.* 27, 990-994, 1984.
  10. Li, C.J., Averboukh, L., Pardee, A.B.  $\beta$ -Lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. *J. Biol. Chem.* 268, 22463-22468, 1993.
  11. Pardee, A.B., Li, Y.Z., Li, C.J. Cancer therapy with  $\beta$ -lapachone. *Curr. Cancer Drug Targets* 2, 227-242, 2002.
  12. Lopes, J.N., Cruz, F.S., Docampo, R., Vasconcellos, M.E., Sampaio, M.C., Pinto, A.V., Gilbert, B. In vitro and in vivo evaluation of the toxicity of 1,4-naphthoquinone and 1,2-naphthoquinone derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 72, 523-531, 1978.
  13. Goijman, S.G., Stoppani, A.O. Effects of  $\beta$ -lapachone, a peroxide-generating quinone, on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. *Arch. Biochem. Biophys.* 240, 273-280, 1985.
  14. Boothman, D.A., Schlegel, R., Pardee, A.B. Anticarcinogenic potential of DNA-repair modulators. *Mutat. Res.* 202, 393-411, 1988.
  15. Guiraud, P., Steiman, R., Campos-Takaki, G.M., Seigle-Murandi, F., Simeon de Buochberg, M., Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and  $\beta$ -lapachone. *Planta Med.* 60, 373-374, 1994.
  16. Li, C.J., Wang, C., Pardee, A. B. Induction of apoptosis by  $\beta$ -lapachone in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 55, 3712-3715, 1995.
  17. Docampo, R., Cruz, F.S., Boveris, A., Muniz, R.P., Esquivel, D.M.  $\beta$ -lapachone enhancement of lipid peroxidation and superoxide anion and hydrogen peroxide formation by sarcoma 180 ascites tumor cells. *Biochem. Pharmacol.* 28, 723-728, 1979.
  18. Shiah, S.G., Chuang, S.E., Chau, Y.P., Shen, S.C., Kuo, M.L. Activation of c-Jun NH2-terminal kinase and subsequent CPP32/Yama during topoisomerase inhibitor  $\beta$ -lapachone-induced apoptosis through an oxidation-dependent pathway. *Cancer Res.* 59, 391-398, 1999.
  19. Planchon, S.M., Pink, J.J., Tagliarino, C., Bornmann, W.G., Varnes, M.E., Boothman, D.A.  $\beta$ -lapachone-induced apoptosis in human prostate cancer cells: involvement of NQO1/xip3. *Exp. Cell Res.* 267, 95-106, 2001.
  20. Planchon, M., Wuerzberger, S., Frydman, B., Witiak, D.T., Hutson, P., Church, D.R., Wilding, G., Boothman, D.A.  $\beta$ -lapachone-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) and human prostate cancer cells: a p53-independent response. *Cancer Res.* 55, 3706-3711, 1995.
  21. Don, M.J., Chang, Y.H., Chen, K.K., Ho, L.K., Chau, Y.P. Induction of CDK inhibitors (p21(WAF1) and p27(Kip1)) and Bak in the  $\beta$ -lapachone-induced apoptosis of human prostate cancer cells. *Mol. Pharmacol.* 59, 784-794, 2001.
  22. Choi, Y.H., Kang, H.S., Yoo, M.A. Suppression of human prostate cancer cell growth by  $\beta$ -lapachone via down-regulation of pRB phosphorylation and induction of Cdk inhibitor p21(WAF1/CIP1). *J. Biochem. Mol. Biol.* 36, 223-229, 2003.
  23. Weller, M., Winter, S., Schmidt, C., Esser, P., Fontana, A., Dichgans, J., Groscurth, P. Topoisomerase-I inhibitors for human malignant glioma: differential modulation of p53, p21, bax and bcl-2 expression and of CD95-mediated apoptosis by camptothecin and  $\beta$ -lapachone. *Int. J. Cancer* 73, 707-714, 1997.
  24. Lai, C.C., Liu, T.J., Ho, L.K., Don, M.J., Chau, Y.P.  $\beta$ -lapachone induced cell death in human hepatoma (HepA2) cells. *Histol. Histopathol.* 13, 89-97, 1998.
  25. Planchon, S.M., Wuerzberger-Davis, S.M., Pink, J.J., Robertson, K.A., Bornmann, W.G., Boothman, D.A. Bcl-2 protects against  $\beta$ -lapachone-mediated caspase 3 activation and apoptosis in human myeloid leukemia (HL-60) cells. *Oncol. Rep.* 6, 485-492, 1999.
  26. Gupta, D., Podar, K., Tai, Y.T., Lin, B., Hideshima, T., Akiyama, M., LeBlanc, R., Catley, L., Mitsiades, N., Mitsiades, C., Chauhan, D., Munshi, N.C. and Anderson, K.C.,  $\beta$ -lapachone, a novel plant product, overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Exp. Hematol.* 30, 711-720, 2002.
  27. Huang, L., Pardee, A.B.  $\beta$ -lapachone induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Mol. Med.* 5, 711-720, 1999.
  28. Choi, B. T., Cheong, J., Choi, Y.H.  $\beta$ -lapachone-induced apoptosis is associated with activation of caspase-3 and inactivation of NF-kappaB in human colon cancer HCT-116 cells. *Anticancer Drugs* 14, 845-850, 2003.
  29. Wuerzberger, S.M., Pink, J.J., Planchon, S.M., Byers, K.L., Bornmann, W.G., Boothman, D.A. Induction of apoptosis in MCF-7:WS8 breast cancer cells by  $\beta$ -lapachone. *Cancer Res.* 58, 1876-1885, 1998.
  30. Pink, J.J., Wuerzberger-Davis, S., Tagliarino, C., Planchon, S.M., Yang, X., Froelich, C.J., Boothman, D.A. Activation of a cysteine protease in MCF-7 and T47D breast cancer cells during  $\beta$ -lapachone-mediated apoptosis. *Exp. Cell Res.* 255,

- 144-155, 2000.
31. Tagliarino, C., Pink, J.J., Dubyak, G.R., Nieminen, A.L., Boothman, D.A. Calcium is a key signaling molecule in  $\beta$ -lapachone-mediated cell death. *J. Biol. Chem.* 276, 19150-19159, 2001.
  32. Arends, M.J., Morris, R.G., Wyllie, A.H. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 136, 593-608, 1990.
  33. Cohen, J.J., Duke, R.C., Fadok, V.A., Sellins, K.S. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 10, 267-93, 1992.
  34. Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A., Jacks, T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362, 847-849, 1993.
  35. Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., Borner, C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 391, 496-499, 1998.
  36. Miyashita, T., Reed, J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299, 1995.
  37. 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.
  38. 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.
  39. Hueber, A., Esser, P., Heimann, K., Kociok, N., Winter, S., Weller, M. The topoisomerase I inhibitors, camptothecin and  $\beta$ -lapachone, induce apoptosis of human retinal pigment epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 67, 525-530, 1998.
  40. Kyo, S., Inoue, M. Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: How can we apply them for cancer therapy. *Oncogene* 21, 688-697, 2002.
  41. Poole, J.C., Andrews, L.G., Tollefsbol, T.O., Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene* 269, 1-12, 2001.
  42. Cerni, C. Telomeres, telomerase, and myc. An update. *Mutat. Res.* 462, 31-47, 2000.
  43. Narayan, S., Jaiswal, A.S., Multani, A.S., Pathak, S. DNA damage-induced cell cycle checkpoints involve both p53-dependent and -independent pathways: role of telomere repeat binding factor 2. *Br. J. Cancer* 85, 898-901, 2001
  44. Vaziri, H., West, M.D., Allsopp, R.C., Davison, T.S., Wu, Y.S., Arrowsmith, C.H., Poirier, G.G., Benchimol, S. ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. *EMBO J.* 16, 6018-6033, 1997.