

Cordycepin Induced Apoptosis via Intracellular Ca^{2+} Modulation and Mitochondrial Dysfunction in Human Prostate Cancer PC-3 Cells

Dong-Min Kang¹, Kwang-Youn Kim¹, Sun-Nyoung Yu¹, Young-Rang Jin¹, Hyun-Joo Jeon¹, Sang-Hun Kim¹, Sung-Sik Chun², Hack-Ryong Ko³ and Soon-Cheol Ahn^{1,4,*}

¹Department of Microbiology and Immunology, Pusan National University School of Medicine, Yangsan 626-870, Korea

²Division of Food Science, International University of Korea, Jinju 660-759, Korea

³Bio21 Center, Jinju 660-844, Korea

⁴Medical Research Institute, Pusan National University, Yangsan 626-870, Korea

Received March 5, 2011 / Accepted March 12, 2011

Cordycepin (3'-deoxyadenosine), a nucleoside derivative isolated from *Cordyceps militaris*, is reported to have antitumor effects. However, neither its molecular mechanism nor its molecular targets are well understood. In the present study, molecular mechanisms for the anti-tumor effects of cordycepin were investigated in human prostate cancer PC-3 cells. The MTT assay was used to detect cell viability. Annexin V/FITC assay, reactive oxygen species (ROS) production, mitochondrial membrane potential (MMP), and Ca^{2+} flux were used to assess for the presence of apoptosis. Western blot analysis was used to detect protein expression. Treatment of cordycepin resulted in significantly decreased cell viability of PC-3 cells in a dose- and time-dependent manner. A dose-dependent apoptotic cell death was also measured by flow cytometry analysis. Molecular mechanistic studies of apoptosis unraveled cordycepin treatment resulted in significant mitochondrial dysfunction, ROS production, and elevation of Ca^{2+} concentrations. These phenomena were followed activation of caspase-3, subsequently leading to PARP cleavage and cell apoptosis. Taken together, cordycepin induces apoptosis in PC-3 cells through regulation of a mitochondrial mediated pathway.

Key words : Cordycepin, apoptosis, Ca^{2+} flux, mitochondrial membrane potential (MMP)

서 론

전립선암은 북미나 서구 유럽 등에서 가장 흔한 암으로, 미국 암 협회(American Cancer Society)의 보고에 따르면 2010년 기준으로 전체 암환자 중 발병률 1위, 암 관련 사망률 2위를 차지하고 있다[11]. 우리나라의 경우도 서구화 된 식습관과 생활습관의 변화 및 고령화로 인해 발생빈도가 빠르게 증가하고 있는 추세이며, 현재 국내 암 발병률 5위, 증가율 1위를 차지하고 있다[3]. 전립선암은 나이, 인종, 국가, 가족력, 유전자, 식이, 비만 및 전립선에서의 염증 및 감염 등으로 인해 발병할 수 있다고 알려져 있으나 정확한 메커니즘은 밝혀져 있지 않다[1]. 발병 초기 전립선암 치료를 위해 androgen을 제거하는 방법을 기초로 하여 화학, 방사선 및 외과적 요법을 병행 하지만 부작용이 따를 뿐만 아니라 androgen 비의존성 암 환자의 경우 치료하기가 아주 힘들기 때문에 근본적인 치료책으로는 사용되지 못하고 있다. 이에 최근에는 천연물을 이용한 생물학적 치료를 통해 암의 세포사멸을 유도하는 연구가 많이 이루어지고 있다[21,25].

동충하초(genus *Cordyceps*)는 자낭균아문, 맥각균강, 맥각

균목, 맥각균과에 속하고, 일반적으로 곤충의 몸을 숙주로 사용하여 내생균핵을 만든 다음 밖으로 자실체를 형성하는 것으로 알려져 있다[19,26]. 이러한 동충하초는 전통 한약재로서 면역력 증강, 항산화 효과, 호흡기질환 그리고 자양강장 등에 사용되었으며, 최근 연구에 따르면 동충하초의 한 종류인 *C. militaris*와 *C. sinensis*로부터 항암 및 항염증 효과, 면역 조절 및 항산화 효과 그리고 혈중 콜레스테롤 수치의 감소에 관한 효과에 대한 연구가 수행되었다[6,8,14,15,20,24]. 또한 동충하초에는 cordycepin, ergosterol, myriocin, polysaccharide 및 glycoprotein 등 다양한 생리활성 물질들이 함유되어 있다. 특히 cordycepin (3'-deoxyadenosine)은 동충하초에 함유된 주요 생리활성 물질로서, 아데노신 리보오스 잔기의 3번째 탄소에 산소가 결합된 구조로(Fig. 1A), 다양한 암세포에서 세포사멸 유도에 관한 활성이 보고되어 있다[4,12,18,23].

본 연구에서는 cordycepin이 인간 전립선암 세포주인 PC-3와 LNCaP 세포에 대하여 세포독성을 확인하고, 호르몬 의존성 세포주보다 항암 치료가 힘들다고 알려진 호르몬 비의존성 PC-3 세포에 대하여 세포사멸 기전을 조사하여 얻어진 결과를 보고하고자 한다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-8092, Fax : +82-55-382-8090

E-mail : ahnsc@pusan.ac.kr

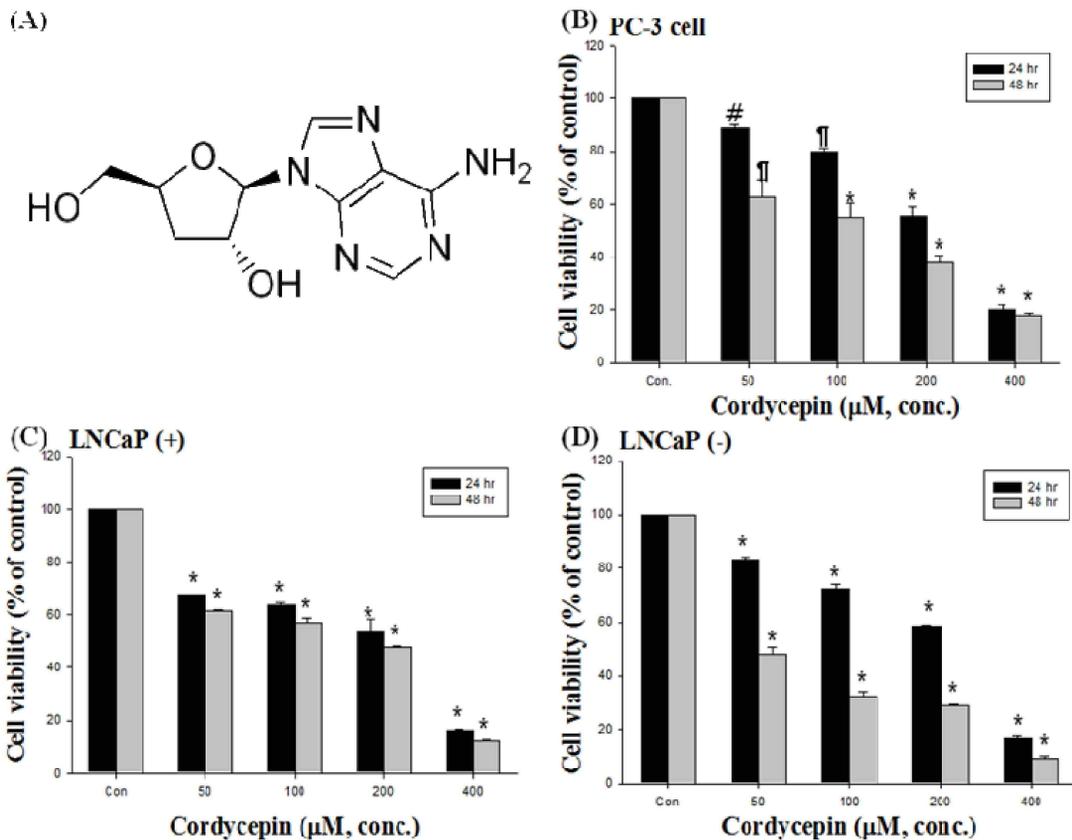


Fig. 1. Chemical structure of cordycepin and its inhibition on proliferation in prostate cancer cells. A. The structure of cordycepin (3'-deoxyadenosine), B, PC-3 cells; C, LNCaP (androgen -); D, LNCaP (androgen +). Cell viability was determined using the MTT assay as described in Materials and Methods. Data are presented as mean±SD (n=3 in each group). #*p*<0.05, †*p*<0.01, **p*<0.001 vs. the control group.

재료 및 방법

사용시약

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), propidium iodide (PI), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), 3,3-dihexyloxycarbocyanine (DiOC₆), Fluo-3/AM 그리고 *N*-acetyl-L-cysteine (NAC)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 1,2-bis-(*o*-Aminophenoxy) ethane-tetraacetic acid tetra-(acetoxymethyl) ester (BAPTA/AM)는 Calbiochem (Merck, Darmstadt, Germany)에서 구입하였으며, Annexin-V-Fluo Staining Kits는 BD Bioscience (San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Western blotting에 사용한 antibody로 Bax, Caspase-3, PARP 그리고 β-Actin은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Ca, USA)에서 구입하였고, Bcl-2는 Cell Signaling (Beverly, MS, USA)에서 구입하였다.

본 실험에서 사용한 cordycepin은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여, methanol로 50 mM의 농도

로 녹여 -20°C에서 보관하여 실험에 사용하였다.

세포의 배양

인간 전립선 암세포주인 PC-3와 LNCaP cell은 각각 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)과 Korea Cell Line Bank (KCLB, Seoul, Korea)로부터 분양 받아 10% fetal bovine serum (FBS) (WelGene Inc., Korea)과 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin (WelGene Inc., Korea)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 RPMI1640 (WelGene Inc., Korea) 배지에서 5%의 CO₂가 포함된 37°C 배양기에서 배양하였다. 모든 실험에서 항산화제인 NAC와 Ca²⁺ chelator인 BAPTA/AM은 cordycepin을 처리하기 1시간 전에 전처리하였다.

MTT assay를 이용한 세포독성의 측정

세포 배양용 48-well plate를 이용하여 1×10⁴ cells/well의 농도로 전립선 암세포주인 PC-3와 LNCaP 세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후, cordycepin을 다양한 농도로 24 또는 48 시간 동안 처리하였다. 이후 0.5 mg/ml 농도가 되게

MTT 시약을 처리하여 37°C에서 4 시간 반응하였다. 생성된 보라색의 formazan을 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 녹인 후 ELISA reader (VERSA_{MAX} microplate reader, Molecular Devices, Toronto, Canada)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다[10]. 이 흡광도는 MTT가 세포에 의해서 환원된 양으로, 각 well에 존재하는 세포의 생존 수와 비례한다.

Annexin V / PI assay를 이용한 apoptosis 유도 세포의 측정

PC-3 세포에서 cordycepin의 apoptosis 유도 여부를 확인하기 위하여 FITC Annexin-V Apoptosis Detection kit를 이용하여 측정하였다[22]. PC-3 세포를 1×10^5 이 되도록 6-well plate에서 24 시간 동안 안정화시킨 후, cordycepin을 적정 농도로 24 시간 동안 처리한 후, 세포를 분리하여 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 세척하고, cell pellet을 Annexin-V/PI 시약과 $1 \times$ binding buffer를 이용하여 조심스럽게 현탁 후, 상온에서 15 분간 염색하였다. 염색된 세포는 flow cytometry (FACS Calibur, BD Biosciences)를 이용하여 측정하였고, Cell Quest software (Becton Dickinson Co.)를 이용하여 apoptosis가 유도된 세포를 분석하였다.

세포 내 Ca^{2+} 농도의 측정

Cordycepin에 의한 Ca^{2+} 이온 농도 변화를 Fluo-3/AM 형광 염색법을 이용하여 측정하였다[9]. PC-3 세포를 1×10^5 이 되도록 6-well plate에서 24 시간 동안 안정화시킨 후, cordycepin을 200 μ M의 농도로 6 시간 동안 처리하였다. 세포를 분리하여 PBS (pH 7.4)로 세척한 뒤, 5 μ M Fluo-3/AM을 처리하여 37°C에서 30 분간 염색하였다. 염색된 세포는 flow cytometry를 이용하여 측정하였고, Cell Quest software를 이용하여 Ca^{2+} 농도의 변화를 분석하였다.

세포 내 reactive oxygen species (ROS) 생성 측정

Cordycepin에 의한 세포 내 ROS의 생성을 DCFH-DA 형광 염색법을 이용하여 측정하였다[2]. PC-3 세포를 1×10^5 이 되도록 6-well plate에서 24 시간 동안 안정화시킨 후, cordycepin을 200 μ M의 농도로 다양한 시간 동안 처리하였다. 세포를 분리하여 PBS (pH 7.4)로 세척한 뒤, 10 μ M의 DCFH-DA를 처리하여 37°C에서 30 분간 염색하였다. 염색된 세포는 flow cytometry를 이용하여 측정하였고, Cell Quest software를 이용하여 ROS 생성을 분석하였다.

Mitochondrial membrane potential (MMP)의 측정

Cordycepin에 의한 MMP의 변화를 DiOC₆ 형광 염색법을 이용하여 측정하였다[7]. PC-3 세포를 1×10^5 이 되도록 6-well plate에서 24 시간 동안 안정화시킨 후, cordycepin을 200 μ M의 농도로 다양한 시간 동안 처리하였다. 세포를 분리하여

PBS (pH 7.4)로 세척한 뒤, 100 nM의 DiOC₆를 처리하여 37°C에서 30 분간 염색하였다. 염색된 세포는 flow cytometry를 이용하여 측정하였고, Cell Quest software를 이용하여 MMP의 변화를 분석하였다.

Western blotting을 이용한 단백질의 분석

Cordycepin에 의한 PC-3의 apoptosis 유도 기전을 알아보기 위하여 western blotting을 이용하여 단백질의 발현변화를 관찰하였다. PC-3 세포를 1×10^5 이 되도록 6-well plate에서 24 시간 안정화시킨 후, cordycepin을 적정 농도로 24 시간 동안 처리하였다. 세포를 분리하여 PBS (pH 7.4)로 세척하였고 lysis buffer [150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7.4), 5 mM EDTA (pH 8.0), 1%-Triton X-100, 1mM PMSF, 20 mg/ml aprotinin, 50 μ g/ml leupeptin, 1 mM benzaidine, 1 mg/ml pepstatin]를 이용하여 분해하였다. Bradford 법을 이용하여 정량 한 뒤, 40 μ g의 protein은 12-15%의 sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 분리하였다. 분리된 protein을 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane으로 transfer 하여 5% skim milk가 함유된 TBS-T buffer [20 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20]를 이용하여 실온에서 1 시간 동안 blocking 하였고 primary antibody와 horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 secondary antibody를 이용하여 target protein에 결합하였다. 이후, Enhanced Chemiluminescence (ECL) western blotting detection 시약을 이용하여 발색하고, fluorescence scanner (LAS-3000, Fuji Film, Tokyo, Japan)을 이용하여 확인 하였으며, Multi Gauge V3.0 software를 이용하여 분석하였다.

통계처리

모든 실험의 표시된 결과는 3번 수행하였으며, 통계분석은 mean \pm S.D로 표시하였고, ANOVA에 의해 분석하였다. 통계적 유의성은 $p \leq 0.05$ 로 판정하였다.

결과 및 고찰

PC-3 세포에 대한 cordycepin의 세포독성 효과

사람 전립선암 세포주인 PC-3와 LNCaP 세포에 대한 cordycepin의 세포독성을 알아보기 위하여 시간 및 농도별로 cordycepin을 처리하여 MTT assay를 실시하였다. 그 결과, 농도 및 시간 의존적으로 cordycepin에 의해 유의적으로 세포독성이 증가하였으며, IC₅₀ (50% 저해농도) 값은 200 μ M로 관찰되었다(Fig. 1B). 또한, 호르몬 의존성 세포주인 LNCaP의 경우, dihydrotestosterone (DHT)를 첨가하지 않고 배양한 LNCaP 세포가 DHT를 첨가하여 배양한 세포보다 높은 세포독성을 나타내었다(Fig. 1C, D). 게다가 호르몬 비의존성 PC-3 세포와 호르몬 의존성 LNCaP 세포의 생존율을 비교하였을

때, PC-3 세포가 LNCaP 세포보다 cordycepin에 대한 저항성이 높음을 알 수 있었다(Fig. 1B, C, D). 따라서 cordycepin이 전립선 암세포주인 PC-3와 LNCaP 세포의 증식을 억제하는 것을 확인하였고, 세포증식에서 호르몬이 영향을 미치는 것을 확인하였다. 이후 실험에서는 호르몬 비의존성 세포인 PC-3 세포를 사용하여 다양한 apoptosis 유도 기전에 대해 탐색을 하였다.

PC-3 세포에 대한 cordycepin의 apoptosis 유발

Cordycepin의 PC-3 세포에 대한 세포독성이 apoptosis 유도에 의한 것임을 Annexin-V/PI 염색을 통해 확인하였다. Cordycepin을 50-400 μM의 농도로 24 시간 처리한 뒤, FITC Annexin-V Apoptosis Detection kit를 이용하여 apoptosis를 정량화 하였다. Annexin-V가 염색된 부분인 초기 apoptosis와 annexin-V와 PI가 함께 염색된 부분인 후기 apoptosis 세포가 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인 하였다. 특히 200 μM cordycepin 을 24 시간 처리하였을 때 28.36%로 유의적으로 증가하였다(Fig. 2A). 이상의 결과는 cordycepin에 의한 세포 독성이 PC-3 세포의 apoptosis 유도에 기인함을 알 수 있었다.

PC-3 세포에서 cordycepin의 Bcl-2 family 발현과 caspase-3 및 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)의 활성화

Apoptosis의 유도는 세포 내의 apoptosis 관련 단백질의 발현에 영향을 주게 되는데 Bcl-2 family, caspase-9, caspase-3 그리고 PARP 등이 가장 잘 알려져 있다. 그 중 Bcl-2 family는 Bax, Bak 그리고 Bim 등과 같은 apoptosis 유도 단백질 (pro-apoptotic protein)과 Bcl-2, Bcl-x 등과 같은 apoptosis 억제 단백질(anti-apoptotic protein)으로 구성되어 있다[13]. 두 구성성분들은 평소 세포 내에서 일정하게 균형을 유지하고 있으나 ROS, UV 및 호르몬 등의 자극으로 인해 불균형이 유발 됨으로써 세포를 apoptosis 기전으로 유도시킨다. 또한, Bax나 Bak 등은 막이 붕괴된 미토콘드리아 내부로 유입되어 cytochrome c를 방출하게 되고, 방출된 cytochrome c는 caspase-9을 활성화시키며, 활성화된 caspase-9은 caspase-3를 활성화 시키고, caspase-3는 PARP를 분절시킴으로써 apoptosis 신호가 전달되게 된다[23]. 따라서 PC-3세포에서 cordycepin의 apoptosis 유도경로를 확인하기 위해 Bax, Bcl-2, caspase-3 그리고 PARP의 발현양을 western blotting을 통해 확인한 결과, cordycepin의 농도 의존적으로 Bax의 발현양 증가와 Bcl-2의 감소를 확인 할 수 있었으며, Bax와 Bcl-2의 비율이 200 μM에서 6.25배까지 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 3A). Total caspase-3의 발현양도 농도 의존적으로 감소하였고, caspase-3의 기질인 PARP의 분절형태가 200 μM에서 1.6배 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 3B). 이상의 결과는 cordycepin이 Bcl-2 family 단백질의 변화를 초래하고, caspase-3 의존적 경로를

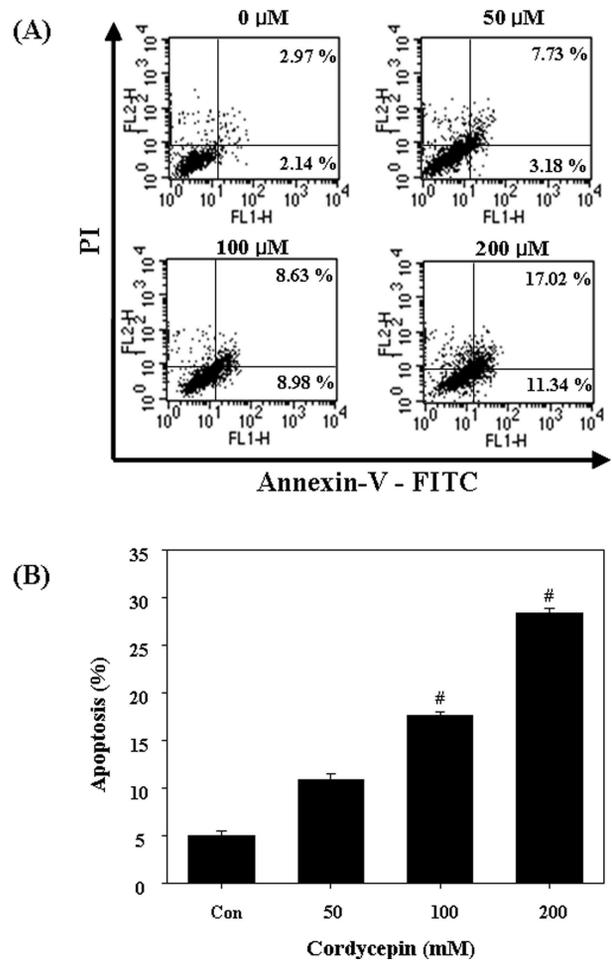


Fig. 2. Induction of apoptosis by cordycepin in PC-3 cells. A, Annexin-V/propidium iodide (PI) double staining assay detected by flow cytometry. B, The percentage of apoptotic cell for each treatment group. Data are presented as mean±SD (n=3 in each group). #p<0.05 vs. the control group.

통해 apoptosis를 유도함을 확인하였다.

Cordycepin에 의한 PC-3 세포 내 Ca²⁺ 농도의 증가

Ca²⁺의 항상성은 세포의 성장, 분화 및 세포사멸을 포함한 다양한 세포 기능에서 매우 중요하다. 특히, 세포 내 Ca²⁺ 이온 농도의 증가는 미토콘드리아 막의 이온 균형에 영향을 주게 되어 세포벽의 파괴를 유발하게 되고, Bax나 Bak과 같은 pro-apoptosis 단백질을 미토콘드리아 내로 유입시켜 apoptosis를 일으키게 한다[17]. 따라서 cordycepin에 의한 PC-3세포에서 Ca²⁺ 이온의 변화를 확인하기 위해 Flou-3/AM 형광염색법을 통해 측정하였다. 200 μM cordycepin을 6 시간 동안 처리한 PC-3세포를 5 μM의 Flou-3/AM을 처리하여 30분간 염색 후, flow cytometry를 이용하여 세포 내 Ca²⁺ 농도의 변화를 확인한 결과, cordycepin은 PC-3세포에 대해 Ca²⁺의 농도를 시간 의존적으로 증가시킴을 확인 할 수 있었고, 항산화제인

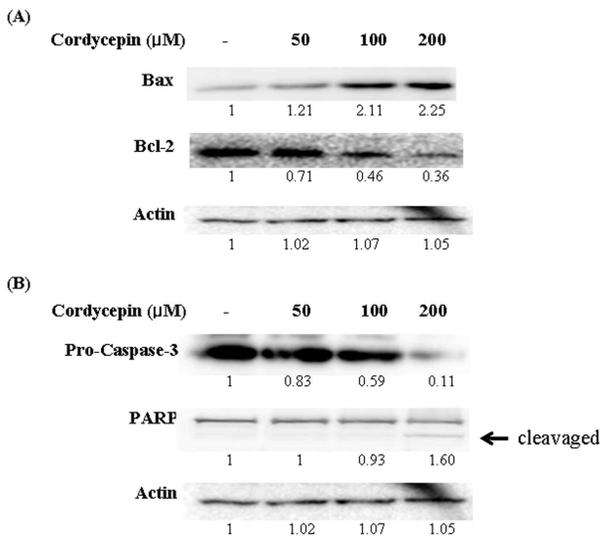


Fig. 3. Effects of cordycepin on expression of Bcl-2 family, pro-caspase-3 and PARP protein in PC-3 cells. A, The expression of Bax and Bcl-2 proteins and its ratio. The cell was exposed to 50-200 μM of cordycepin for 24 hr. B, The expression of procaspase-3 and PARP proteins. The cell was exposed to 50-200 μM of cordycepin for 24 hr. A and B were determined by Western blot.

NAC과 Ca²⁺ chelator 인 BAPTA/AM을 전처리 하였을 때, 46.9%까지 증가한 Ca²⁺ 농도가 각각 22.81%와 6.74%까지 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이상의 결과로 cordycepin에 의한 세포 내 Ca²⁺의 증가가 PC-3 세포의 apoptosis 유도 기전 중의 하나로 사료된다.

PC-3 세포에서 cordycepin의 reactive oxygen species (ROS) 생성 유도

ROS는 apoptosis를 유도하는 주요 인자 중 하나로 잘 알려져 있다[16]. ROS는 DNA에 손상을 줄 뿐만 아니라 unfolding protein response (UPR)을 일으켜 ER-stress의 원인이 되기도 하고, 미토콘드리아의 기능을 저해하기도 한다. 또한 세포내의 ROS 증가는 세포의 산화적 stress를 증가시켜 세포의 손상을 유발시킨다. 따라서 cordycepin의 PC-3에 대한 apoptosis 유도에서 ROS 생성의 관여하는지 알아 보기 위해서 DCFH-DA 형광 염색법을 이용하여 측정하였다. 200 μM의 cordycepin을 15-720 분 동안 처리한 PC-3 세포를 수거하여 10 μM의 DCFH-DA를 30 분간 처리하여 생성된 ROS를 flow cytometry를 이용하여 측정하였다. 시간에 따른 ROS의 생성을 확인한 결과, 1.86%에서 69.31%까지 시간 의존적으로 증가

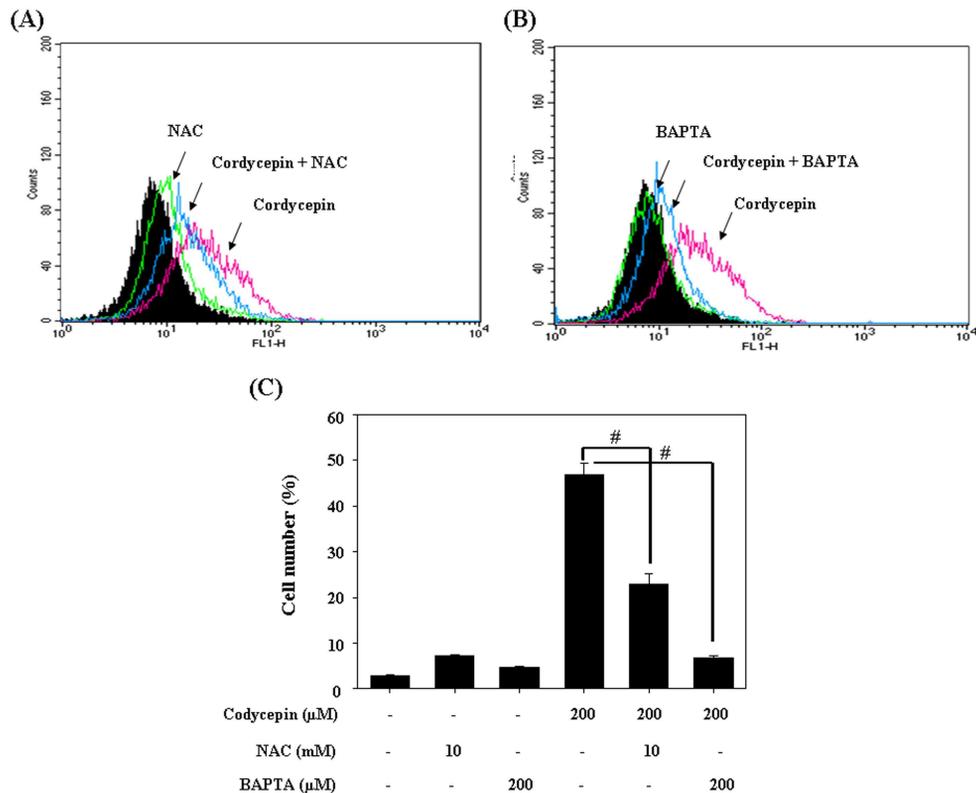


Fig. 4. Effects of NAC and BAPTA/AM on cordycepin-induced Ca²⁺ flux in PC-3 cells. A, B. The intracellular Ca²⁺ concentration was determined by the fluorescence of FLuo-3/AM by flow cytometry. PC-3 cells were treated with 200 μM cordycepin in the absence or presence of 10 mM NAC and 200 μM BAPTA for 6 hr. C. The percentage of intracellular Ca²⁺ concentration. Data are presented as mean±SD (n=3 in each group). #p<0.05 vs. the control group.

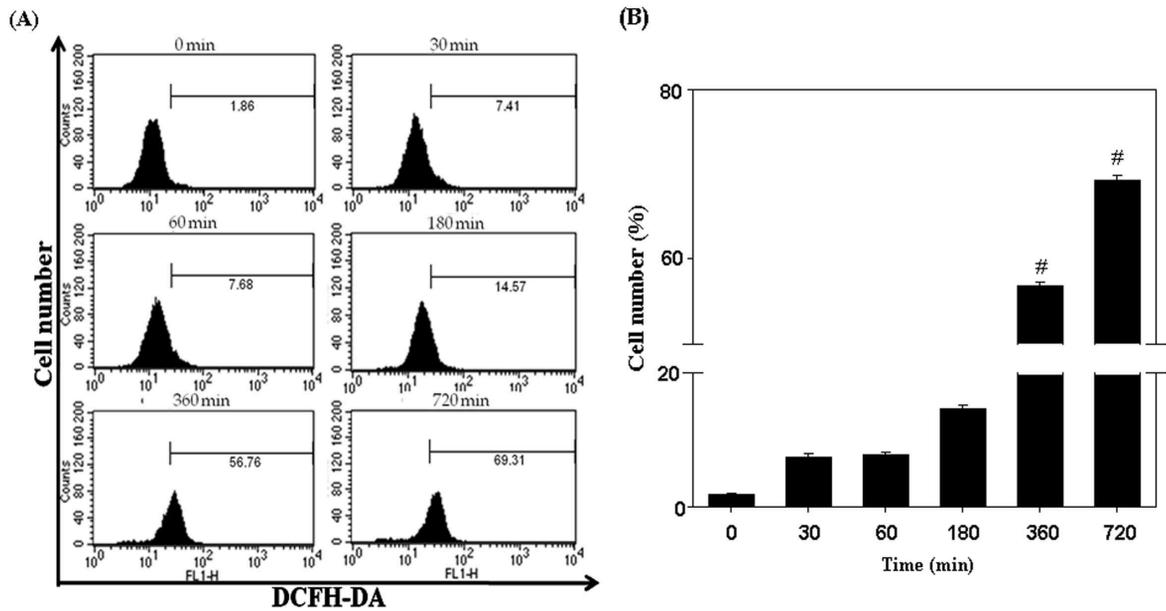


Fig. 5. Effect of cordycepin on ROS generation in PC-3 cells. A. The ROS generation was determined by the fluorescence of DCFH-DA by flow cytometry. PC-3 cells were treated with 200 μ M cordycepin for 30-720 min. B. The percentage of ROS generation. Data are presented as mean \pm SD (n=3 in each group). #*p*<0.05 vs. the control group.

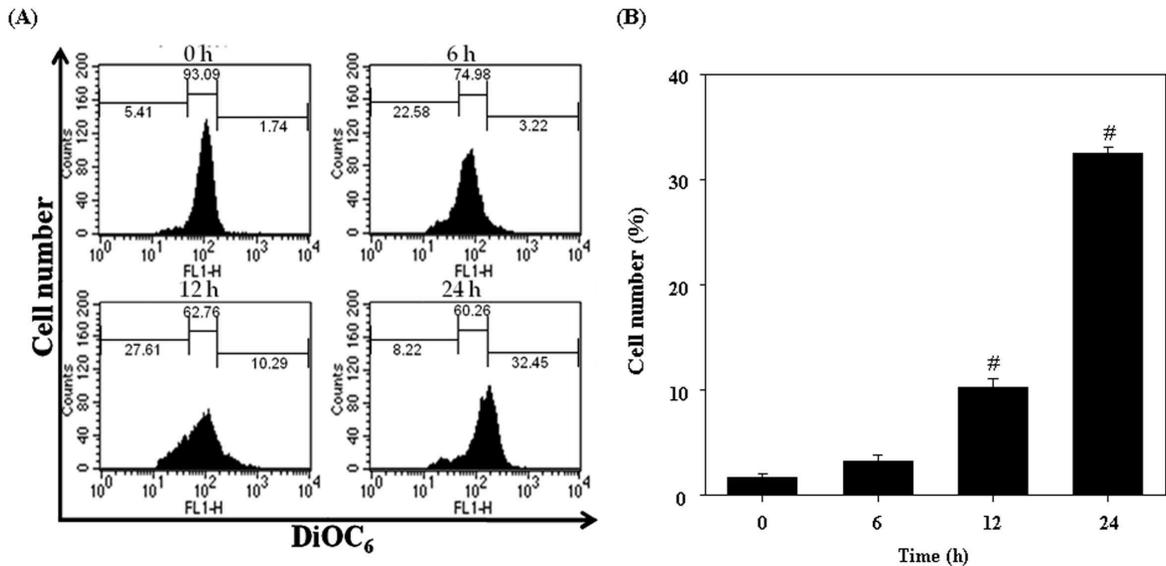


Fig. 6. Effect of cordycepin on MMP in PC-3 cells. A. The MMP was determined by the fluorescence of DiOC₆ by flow cytometry. PC-3 cells were treated with 200 μ M cordycepin for 6-24 hr. B. The percentage of MMP dysfunction. Data are presented as mean \pm SD (n=3 in each group). #*p*<0.05 vs. the control group.

하는 것을 확인하였고, 특히 6시간 이후부터 유의적으로 증가함을 확인하였다(Fig. 5). 하지만, 항산화제인 NAC이나 Ca²⁺ chelator 인 BAPTA/AM을 처리한 세포에서는 ROS의 변화가 유의성을 보이지 않았다(data not shown).

PC-3 세포에서 cordycepin의 MMP 불균형의 유발
MMP의 변화는 apoptosis의 시작과 활성화에 관련이 있다.

이러한 MMP의 변화로 인해 미토콘드리아의 세포막이 파괴되고 세포질에 있던 Bax나 Bak 등의 pro-apoptosis 관련 단백질들이 미토콘드리아 내부로 유입되게 되며, cytochrome c와 같은 caspase 활성화 물질이 세포질로 분비되어 apoptosis가 일어나게 된다[5]. 따라서 cordycepin에 의한 PC-3의 MMP 변화를 측정하기 위해 DiOC₆ 염색법을 이용하여 확인하였다. PC-3 세포에 200 μ M cordycepin을 6-24 시간 동안 처리한 후,

100 nM의 DiOC₆ 시약으로 30 분간 반응하여 flow cytometry로 측정하였다. 이 결과에서 cordycepin에 노출된 PC-3의 MMP는 시간 의존적으로 1.74%에서 32.45%로 과분극 되는 것을 확인하였다(Fig. 6). 하지만 NAC과 BAPTA에 의한 MMP 불균형 저해는 큰 변화를 보이지 않았다(data not shown).

이상의 결과들은 cordycepin이 PC-3 세포에 apoptosis를 유도하여 암세포의 증식을 농도 의존적으로 억제함을 나타낸다. 특히 cordycepin은 apoptosis의 주요한 인자인 Bcl-2 family 단백질 발현 변화에 의한 미토콘드리아의 막 전위의 변화 유도와 caspase-3 활성 증가 및 PARP의 분해를 통해 apoptosis를 유도하는 것으로 사료된다. 또한 세포 내 Ca²⁺ 농도를 증가시키고 이를 통해 ROS의 생산을 통해서 apoptosis가 조절되는 것으로 사료된다. 본 연구를 통해 cordycepin이 전립선 암에 대한 apoptosis 기전을 밝혔으나 향후 암 예방 및 암 치료제로서 cordycepin을 활용하기 위해서는 다양한 동물실험 및 임상실험을 수행해야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의해 연구되었음.

References

- ACS. 2010. Prostate cancer overview: What is prostate cancer?. *American cancer society*.
- Chang, M. C., Y. S. Ho, P. H. Lee, C. P. Chan, J. J. Lee, L. J. Hahn, Y. J. Wang, and J. H. Jeng. 2001. Areca nut extract and arecoline induced the cell cycle arrest but not apoptosis of cultured oral KB epithelial cells: association of glutathione, reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential. *Carcinogenesis* **22**, 1527-1535.
- Chi, B. H. and I. H. Chang. 2010. Prostate cancer: recent trends in Korea. *Urol. Int.* **85**, 88-93.
- Crompton, M. 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* **341**, 233-249.
- Green, D. R. and Jc. Reed. Mitochondria and apoptosis. 1998. *Science* **281**, 1309-1312.
- Guo, P., Q. Kai, J. Gao, Z. Q. Lian, C. M. Wu, C. A. Wu, and H. B. Zhu. 2010. Cordycepin prevents hyperlipidemia in hamsters fed a high-fat diet via activation of AMP-activated protein kinase. *J. Pharmacol. Sci.* **113**, 395-403.
- Hail, Jr. N., E. M. Youssef, and R. Lotan. 2001. Evidence supporting a role for mitochondrial respiration in apoptosis induction by the synthetic retinoid CD437. *Cancer Res.* **61**, 6698-6702.
- Hsu, C. H., H. L. Sun, J. N. Sheu, M. S. Ku, C. M. Hu, Y. Chan, and K. H. Lue. 2008. Effects of the immunomodulatory agent *Cordyceps militaris* on airway inflammation in a mouse asthma model. *Pediatr. Neonatol.* **49**, 171-178.
- Jang, E. S., J. Y. Kim, and B. G. Kim. 2007. Tamoxifen induces mitochondrial-dependent apoptosis via intracellular Ca²⁺ modulation. *J. Life Sci.* **17**, 1053-1062.
- Jarrett, S. G., J. Albon, and M. Boulton. 2006. The contribution of DNA repair and antioxidants in determining cell type-specific resistance to oxidative stress. *Free Radic. Res.* **40**, 1155-1165.
- Jemal, A., R. Siegel, J. Xu, and E. Ward. 2010. Cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* **60**, 277-300.
- Kaur, J. and S. N. Sanyal. 2010. Intrinsic mitochondrial membrane potential change and associated events mediate apoptosis in chemopreventive effect of diclofenac in colon cancer. *Oncol. Res.* **18**, 481-492.
- Kim, E. J., J. J. Lee, H. K. Shin, and J. H. Yoon. 2006. A study on the mechanisms by which the aqueous extract of *Inonotus obliquus* induces apoptosis and inhibits proliferation in HT-29 human colon cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 516-523.
- Koh, J. H., K. M. Kim, J. M. Kim, J. C. Song, and H. J. Suh. 2003. Antifatigue and antistress effect of the hot-water fraction from mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 691-694.
- Lee, S. J., G. S. Moon, K. H. Jung, W. J. Kim, and S. K. Moon. 2010. C-Jun N-terminal kinase 1 is required for cordycepin-mediated induction of G₂/M cell-cycle arrest via p21^{WAF1} expression in human colon cancer. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 277-283.
- Ling, Y. H., L. Liebes, Y. Zou, and R. Perez-Soler. 2003. Reactive oxygen species generation and mitochondrial dysfunction in the apoptotic response to bortezomib, a novel proteasome inhibitor, in human h460 non-small cell lung cancer cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 33714-33723.
- Ron, D. and P. Walter. 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 519-529.
- Moon, D. O., M. O. Kim, Y. H. Choi, J. W. Hyun, W. Y. Chang, and G. Y. Kim. 2010. Butein induces G₂/M phase arrest and apoptosis in human hepatoma cancer cells through ROS generation. *Cancer Lett.* **288**, 204-213.
- Paterson, R. R. 2008. Cordyceps: a traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory?. *Phytochemistry* **69**, 1469-1495.
- Shin, S., S. Lee, J. Kwon, S. Moon, S. Lee, C.K. Lee, K. Cho, N. J. Ha, and K. Kim. 2009. Cordycepin suppresses expression of diabetes regulating genes by inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammation in macrophages. *Immune Netw.* **9**, 98-105.
- Surh, Y. J. 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 768-780.
- Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken, and C. Reutelingsperger. 1995. A novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* **184**, 39-51.
- Wong, W. W. and H. Puthalakath. 2008. Bcl-2 family proteins: the sentinels of mitochondrial apoptosis pathway. *IUBMB*

- Life* **60**, 390-397.
24. Yu, H. M., B. S. Wang, S. C. Huang, and P. D. Duh. 2006. Comparison of protective effect between cultured *Cordyceps militaris* and natural *Cordyceps sinensis* against oxidative damage. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 3132-3138.
25. Zhang, H. N., C. X. Yu, W. W. Chen, A. L. Jiang, F. Kong, J. T. Deng, J. Y. Zhang, and C. Y. Young. 2007. Curcumin downregulates homeobox gene NKX3.1 in prostate cancer cell LNCaP. *Acta. Pharmacol. Sin.* **28**, 423-430.
26. Zhou, X., Z. Gong, Y. Su, J. Lin, and K. Tang. 2009. *Cordyceps* fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products. *J. Pharm. Pharmacol.* **61**, 279-291.

초록 : 전립선암 세포주인 PC-3에서 cordycepin에 의해 유도된 세포 내 칼슘농도 변화와 미토콘드리아 기능 상실을 통한 세포사멸 유도

강동민¹ · 김광연¹ · 유선영¹ · 진영량¹ · 전현주¹ · 김상현¹ · 전성식² · 고태룡³ · 안순철^{1,4,*}

(¹부산대학교 의학전문대학원 미생물학 및 면역학 교실, ²한국국제대학교 보건과학대학 식품과학과, ³바이오 21센터, ⁴부산대학교 의학연구소)

Cordycepin은 동충하초로부터 분리한 생리활성 물질로써 항암활성을 가진다고 보고되어 있다. 하지만 그 정확한 항암 기전은 아직 확실하게 밝혀져 있지 않다. 이에 인간 전립선 암 세포주인 PC-3 세포를 이용하여 apoptosis와 그에 관련한 경로를 조사함으로써 cordycepin의 항암효과를 연구하였다. MTT assay를 통해 세포독성을 알아보고 Annexin-V/PI 염색과 Ca²⁺ 농도, ROS의 생성, MMP의 변화를 관찰하여 apoptosis 경로를 확인하였다. 뿐만 아니라 Western blot analysis를 이용하여 apoptosis와 관련된 단백질의 발현 정도를 확인하였다. 본 연구의 결과에서 cordycepin은 apoptosis 관련 단백질의 발현을 조절함으로써 apoptosis와 관련이 있음을 확인할 수 있었고, 미토콘드리아 관련 apoptosis 경로를 확인한 결과, ROS의 생성, Ca²⁺의 증가 그리고 미토콘드리아 막 전위의 붕괴를 통해 apoptosis 기전이 유도됨을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 cordycepin은 PC-3 세포에 대하여 ROS와 Ca²⁺의 농도 증가를 통해 MMP를 변화시켜 미토콘드리아 관련 apoptosis 기전을 거쳐 caspase의 활성을 증가시킴으로써 apoptosis를 유도함을 알 수 있었다.