ISSN : 1225-9918
Journal of Life Science **2012** Vol. 22. No. 6. 815~822 DOI : http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2012.22.6.815

Induction of Apoptosis and Inhibition of NO Production by Piceatannol in Human Lung Cancer A549 Cells

Yung Hyun Choi*

Department of Biochemistry, Dongeui University College of Oriental Medicine, Busan 614-052, and Department of Biomaterial Control (BK21 program), Anti-Aging Research Center and Blue-Bio Industry RIC, Dongeui University, Busan 614-714, Korea

Received March 29, 2012 / Revised April 10, 2012 / Accepted April 10, 2012

Piceatannol (trans-3,4,3′,5′-tetrahydroxystilbene), a natural stilbene, is an analogue of resveratrol. Although recent experimental data have revealed the health benefit potency of piceatannol, the molecular mechanisms underlying the anti-cancer activity have not yet been studied in detail. In the present study, the further possible mechanisms by which piceatannol exerts its pro-apoptotic action in cultured human lung cancer A549 cells were investigated. Exposure of A549 cells to piceatannol resulted in growth inhibition and induction of apoptosis. Apoptosis induction of A549 cells by piceatannol showed correlation with proteolytic activation of caspase-3, -8, and -9, and concomitant degradation of activated caspase-3 target proteins such as poly (ADP-ribose) polymerase, phospholipase C-γ1, β-catenin, and Inhibitor caspase-activated DNase. The increase in apoptosis by piceatannol treatment was also associated with an increase of pro-apoptotic Bax expression and decrease of anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-xL expression, and caused down-regulation of the inhibitor of apoptosis protein family members and up-regulation of Fas and Fas legend. In addition, piceatannol treatment markedly inhibited the expression of mRNA and proteins of inducible nitric oxide (NO) synthase, and the levels of NO production were progressively down-regulated by piceatannol treatment in a dose-dependent fashion. The results indicate that piceatannol may have therapeutic potential against human gastric cancer cells.

Key words : Piceatannol, A549 cells, apoptosis, nitric oxide (NO)

서 론

Programmed cell death로 정의되는 세포사멸(apoptosis)은 세포의 능동적인 죽음으로서 개체의 발생 단계나 DNA 손상, 바이러스 감염 등에 의한 유전적 조절하에 일어나는 정교한 방어기전인 점에서 necrosis와는 구분될 수 있다. Apoptosis는 extrinsic pathway라고 하는 세포막과 연관된 death receptor pathway와 미토콘드리아와 연계된 intrinsic pathway로 구분되며, apoptosis의 특징인 mitochondria 기능의 변화, 세포의 수축, 염색질 응축, 핵의 단편화 현상, 세포막의 수포화 현상, caspases 활성화, 세포막 표면에 phosphatidylserine의 발현 및 apoptotic body의 형성 등과 같은 형태적 또는 생화학적인 변화를 동반한다[13,18,25]. 아울러 apoptosis는 대부분의 조직에서 손상을 입었거나 감염된 세포들을 제거하는 중요한 과정으로서 apoptosis의 실패는 암을 포함한 다양한 질환의 원인이 된다[10,12,16,17,30]. 따라서 항암활성을 가지는 특정 약물에 의한 apoptosis 유도는 암화 과정의 여러 단계에서 암을 치료하는 중요한 표적이 될 수 있다.

한편 산화질소(nitric oxide, NO)는 다양한 NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine로 부터 생성되는 물질로 내피세포의 이완작용, 신경계 및 면역계에서 중요한 매개물질로 작용을 하며, 특히, 신생혈관형성 유도인자 합성을 유발하며 신생혈관형성을 유도하고 내피세포 분화에도 중요한 역할을 한다[26,34]. 특히 염증성 NOS인 inducible NOS (iNOS)의 과다생성은 대장암을 포함한 많은 암종의 생성과 진행을 촉진하는 것으로 알려져[14,27,33], iNOS의 선택적 차단에 의한 NO 생성의 억제와 동반된 apoptosis의 유도는 새로운 항암제 발굴의 표적이 되고 있다[15,27].

Piceatannol (3,3′,4,5′-tetrahydroxy-*trans*-stilbene)은 포도에 풍부하게 들어있는 resveratrol 유도체의 일종인 stilbene계열 물질의 한 종류이다[4,9,11,28]. Piceatannol의 다양한 생리활성 중, 면역 조절 및 항염증 효능은 protein‐tyrosine kinase와 nuclear factor kappa B (NF-κB)의 활성 억제와[1] 연관이 있으며, 특히 림프구에서 interferon-α에 의해 유도된 signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)의 signal transducer의 기능을 억제함으로서[3,20,29], 다양한 세포 내 표적인자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. 또한 piceatannol의 항암활성에 관한 최근 연구에 의하면, piceatannol은 세포주기 교란 및 apoptosis 유도를 통하여 암세포의 증식을 억제할 수 있는 것으로 알려져 있으나[3,8,21,32], apoptosis 유도에 관한 구체적인 기전과 NO 생성 억제와의 상관성에 대해

*Corresponding author
Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036
E-mail : choiyh@deu.ac.kr

서는 알려진 바 없다.

본 연구에서는 piceatannol의 항암 효능에 관한 지속적인 연구의 하나로서 piceatannol에 의한 A549 인체 폐암세포의 apoptosis 유발과 연관된 NO 생성 조절인자인 iNOS의 발현 억제에 관한 연관성을 조사하였다.

재료 및 방법

세포배양, piceatannol의 처리 및 생존율 측정

본 연구에 사용된 A549 폐암세포(American Type Culture Collection, Rockville, MD)는 10% fetal bovine serum (FBS)에 1%의 penicillin 및 streptomycin이 포함된 90%의 DMEM 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY)를 사용하여 37℃, 5% CO_2 조건 하에서 배양하였다. Piceatannol (Fig. 1A)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)에서 구입하여 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 10 mM의 stock solution으로 만든 후, 적정 농도로 배지에 희석하여 처리하였다. A549 세포의 증식에 미치는 piceatannol의 영향을 조사하기 위하여 6 well plate에 A549 세포를 1×10^3개로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후, 적정 농도의 piceatannol을 처리하였다. 48시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 부유시켜서 phosphate-buffered saline (PBS)를 각 well 당 적정량을 첨가하여 세포를 모았다. 이렇게 모인 세포를 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 세포만 남긴 다음 다시 1 ml의 PBS와 동량의 0.5% trypan blue (Gibco BRL)를 첨가하여 2분간 처리한 후 위상차 현미경을 이용하여 살아있는 세포를 계수하였다.

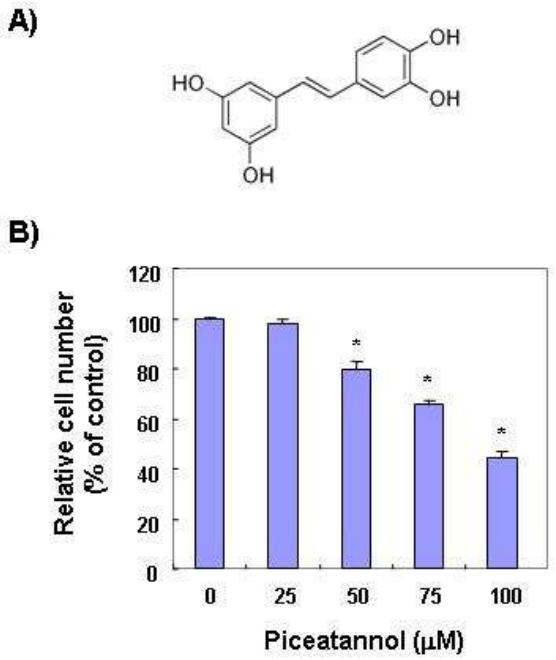

Fig. 1. Inhibition of the cell viability by piceatannol in A549 human lung cancer cells. (A) Chemical structure of piceatannol. (B) Cells were plated at $1x10^3$ cells per 60-mm plate, and incubated for 24 hr. The cells were treated with variable concentrations of piceatannol for 48 hr and the cell viability was measured by hemocytometer counts of trypan blue excluding cells. Results are expressed as percentage of the vehicle treated control±SD of three separate experiments. Significance was determined using a Student's t-test (*, $p<0.05$ vs. untreated control).

Flow cytometry를 이용한 세포주기 분석

적정농도의 piceatannol이 48시간 처리된 A549 세포들을 모아 Cycle TEST PLUS (Becton Dickinson, San Jose, CA) solution A 및 B를 상온에서 각각 10분씩 처리한 후, Cycle TEST PLUS solution C를 처리하여 4℃에서 10분간 염색하였다. 그 후 DNA flow cytometer를 사용하여 세포주기의 각각에 해당되는 histogram을 분석하였다.

DAPI staining에 의한 세포핵의 형태 관찰

Apoptosis가 유발되었을 경우 특이적으로 나타나는 핵의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 37% formaldehyde 용액과 PBS를 1 : 9의 비율로 섞은 fixing solution을 모아진 세포에 첨가하여 충분히 섞은 후, 상온에서 10분 동안 고정하였다. 고정된 세포를 2,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 fixing solution을 제거하고 1,000 rpm에서 5분간 cytospin하여 세포를 slide glass에 부착하였다. 세포가 부착된 slide glass를 PBS로 2~3회 정도 세척하고 PBS가 마르기 전에 0.2%의 Triton X-100 (Amresco, Solon, OH, USA)을 첨가하여 상온에서 10분간 고정한 후 2.5 μg/ml 농도의 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) 용액을 처리하여 상온에서 15분간 염색하였다. 염색이 끝난 후 DAPI 용액을 충분하게 세척하고 mounting solution을 처리한 후 형광 현미경(Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석

동일한 조건에서 배양된 A549 세포들에 TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA)를 4℃에서 1시간동안 처리하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, 각각의 primer (Table 1), DEPC water 그리고 ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit (Intron, Korea)를 넣고 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 증폭하였다. 각 PCR 산물들의 양적 차이를 확인하기 위하여 1X TAE buffer로 1% agarose gel을 만들고 well 당 각각의 primer에 해당하는 PCR 산물에 DNA gel loading solution을 섞어서 loading 한 후 50 V에서 전기영동을 행하였다. 전기영동으로 DNA 분리

Table 1. Oligonucleotides used in RT-PCR

Gene name		Sequence
GAPDH	Sense	5′-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3′
	Antisense	5′-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3′
Fas	Sense	5′-TCT AAC TTG GGG TGG CTT TGT CTT C-3′
	Antisense	5′-GTG TCA TAC GCT TTC TTT CCA T-3′
FasL	Sense	5′-GGA TTG GGC CTG GGG ATG TTT CA-3′
	Antisense	5′-AGC CCA GTT TCA TTG ATC ACA AGG-3′
Bcl-2	Sense	5′-CAG CTG CAC CTG ACG-3′
	Antisense	5′-ATG CAC CTA CCC AGC-3′
Bcl-xL	Sense	5′-CGG GCA TTC AGT GAC CTG AC-3′
	Antisense	5′-TCA GGA ACC AGC GGT TGA AG-3′
Bax	Sense	5′-ATG GAC GGG TCC GGG GAG-3′
	Antisense	5′-TCA GCC CAT CTT CTT CCA-3′
XIAP	Sense	5′-GAA GAC CCT TGG GAA CAA CA-3′
	Antisense	5′-CGC CTT AGC TGC TCT CTT CAG T-3′
cIAP-1	Sense	5′-TGA GCA TGC AGA CAC ATG C-3′
	Antisense	5′-TGA CGG ATG AAC TCC TGT CC-3′
cIAP-2	Sense	5′-CAG AAT TGG CAA GAG CTG G-3′
	Antisense	5′-CAC TTG CAA GCT GCT CAG G-3′
survivin	Sense	5′-GCA TGG GTG CCC CGA CGT TG-3′
	Antisense	5′-GCT CCG GCC AGA GGC CTC AA-3′
iNOS	Sense	5′-AAG-CAC-ATG-CAG-AAT-GAG-TAC-CG-3′
	Antisense	5′-GTG-GGA-CAG-CTT-CTG-GTC-GAT-3′

가 끝난 gel을 ethidium bromide (EtBr)을 이용하여 염색한 후 UV 하에서 발현의 차이를 확인하였으며, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 internal control로 사용하였다.

단백질의 분리, 전기영동 및 Western blot 분석

Piceatannol이 처리된 세포들에 적정량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyfluoride, 5 mM dithiothreitol]를 첨가하여 4℃에서 1시간 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액에서 얻은 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH)으로 전이시킨 후, 적정 항체를 처리하여 enhanced cheiluminoscence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlignton Heights, IL)을 적용시킨 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 양을 분석하였다. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc.에서 구입하였으며, immunoblotting을 위한 peroxidase-labeled 항체는 Amersham에서 구입하였다.

In vitro caspase 활성 변화 측정

Piceatannol 처리에 의한 caspase의 활성화 정도를 알아보기 위하여 준비된 세포를 모은 뒤 단백질을 추출하고 정량하여 각각 150 μg의 단백질을 fluorogenic peptide 기질 100 μM이 함유된 extraction buffer [40 mM HEPES (pH 7.4), 20% glycerol (v/v), 1 mM EDTA, 0.2% NP-40 and 10 mM DL-DTT] 50 μl에 혼합하였으며, microtiter plate에 다시 extraction buffer에 희석하여 각 sample 당 총 volume이 100 μl가 되게 하였다. 실험에 사용된 기질은 caspase-3의 경우에는 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-p-nitroaniline (pNA)이었고, caspase-8의 경우에는 Ile-Glu-Thr-Asp (IETD)-pNA이었으며, caspase-9는 Leu-Glu-His-Asp (LEHD)-pNA였다. 준비된 plate를 37°C에서 3시간동안 incubation 시킨 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm의 흡광도를 이용하여 반응의 정도를 측정하였다.

NO의 측정

A549 세포로부터 생성되는 NO의 농도를 세포 배양액에 존재하는 NO_2^-를 인지하는 Griess 시약을 이용하여 검출하였다. 이를 위하여 A549 세포를 6-well culture plate에 24시간 동안 배양한 후 다양한 농도의 piceatannol을 48시간 처

리한 뒤 세포 배양액을 수거하고 배양액에 동량의 Griess 시약(0.1% naphthylethylenediamine & 1% sulfanilamide in 5% H_3PO_4)을 넣어 실온에서 반응 시켰다. 반응액을 micro-plate reader를 이용하여 540 nm 흡광도에서 측정하였으며, 세포로부터 생성된 NO의 양은 $NaNO_2$ 표준액의 농도를 기준으로 계산하였다.

통계 처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 표시하였고 SigmaPlot을 이용하여 Student *t*-test를 이용하여 통계적 유의성을 얻었다.

결과 및 고찰

Piceatannol에 의한 A549 세포의 증식 억제 및 apoptosis 유발

Piceatannol의 처리에 따른 A549 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아 보기위하여 piceatannol을 적정 농도로 48시간 동안 처리한 후 hemocytometer counting을 실시하였다. Fig. 1B에 나타낸 바와 같이 A549 세포에 piceatannol을 처리하였을 경우 처리 농도 의존적으로 생존율이 유의적으로 감소되었음을 알 수 있었다. Piceatannol 처리에 의해 유발되는 생존율 감소가 apoptosis 유발과 직접적인 연관이 있는지를 확인하기 위하여 정상 및 piceatannol이 처리된 배지에서 48시간 동안 배양된 A549 세포를 대상으로 flow cytometry를 이용하여 apoptosis가 유발되었을 것으로 예상되는 sub-G1기에 해당하는 세포의 빈도를 측정한 결과는 Fig. 2A에 나타낸 바와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 정상 배지에서 자란 암세포에서의 자연적 apoptosis 유발 빈도는 약 2.03%로 매우 낮았으나 piceatannol 처리 농도가 증가할수록 sub-G1기의 세포의 빈도가 증가하여 75 μM 및 100 μM 처리군에서는 각각 8.97% 및 20.71%에 해당하는 세포가 sub-G1기로 관찰되었다. 이러한 sub-G1기 세포의 빈도 증가가 apoptosis 유발에 의한 것이라는 직접적인 증거를 제시하기 위하여 piceatannol이 처리된 배지에서 배양된 A549 세포 핵의 형태변화를 관찰하였다. Fig. 2B에 나타낸 바와 같이 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DAPI 염색을 실시하고 형광현미경을 이용하여 관찰한 결과, piceatannol이 처리되지 않은 정상 배지에서 자란 A549 세포에서는 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나 piceatannol이 처리된 세포의 경우는 piceatannol의 처리 농도의 증가에 따른 밀도의 감소와 더불어 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 염색질 응축에 의한 apoptotic body가 관찰되었다. 이상의 결과는 piceatannol 처리에 의한 A549 세포의 생존율 감소는 apoptosis 유발과 밀접한 연관이 있음을 알 수 있었다.

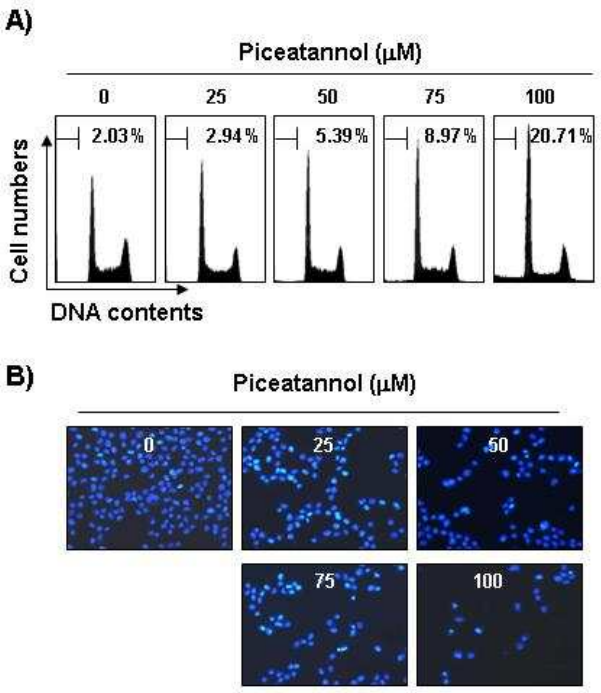

Fig. 2. Induction of apoptosis by piceatannol treatment in A549 cells. Cells were treated with the indicated concentrations of piceatannol for 48 hr. (A) To quantify the degree of apoptosis induced by piceatannol, the cells were evaluated for sub-G1 DNA content, which represents the fractions undergoing apoptotic DNA degradation, using a flow cytometer. Results are expressed as percentage of the vehicle treated control±SD of two separate experiments. (B) The cells were fixed and stained with DAPI solution. After 10 min incubation at room temperature, stained nuclei were then observed under a fluorescent microscope (original magnification, X400).

Apoptosis 조절 인자들의 발현에 미치는 piceatannol의 영향

일반적으로 apoptosis는 death receptor 및 ligand에 의하여 유발되는 extrinsic pathway와 Bcl-2 family member에 의하여 조절되는 intrinsic pathway를 경유하여 활성화 되는 것으로 알려져 있다[13,18,25]. 따라서 piceatannol에 의하여 유발되는 apoptosis가 어떤 경로를 통하여 활성화되는지를 조사하기 위하여 이들 유전자의 발현 변화를 조사하였다. 조사한 몇 가지 유전자 중, 먼저 extrinsic pathway의 활성화에 관여하는 대표적인 Fas/FasL system의 경우는 Fig. 3에 나타난 바와 같이 piceatannol 처리 농도의 증가에 따라 Fas 및 FasL 모두 전사 및 번역 수준에서 증가되었으며, intrinsic pathway의 활성 조절에 관여하는 Bcl-2 family 중, pro-apoptotic Bax의 발현은 증가되었으나 anti-apoptotic Bcl-2 및 Bax의 발현은 감소되는 경향성을 보였다. 그리고 caspase와의 직접적인 결합을 통하여 그들의 활성을 억제하

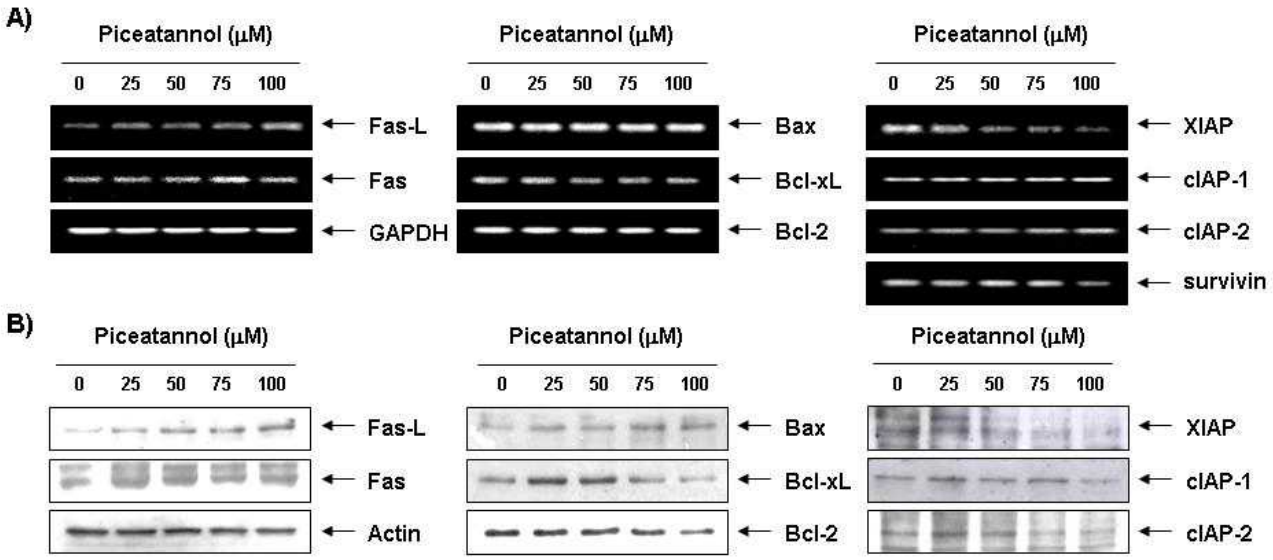

Fig. 3. Effects of piceatannol on the expression of apoptosis regulatory gene products in A549 cells. (A) After 48 hr incubation with piceatannol, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with the indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) The cells grown under the same conditions as (A) were lysed and then 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 an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

는 IAP family 인자들의 발현도 모두 감소되었다. 이상의 결과는 piceatannol 처리에 의한 apoptosis 유도에는 extrinsic 및 intrinsic pathway가 모두 관여할 것이며, caspase의 활성 감소가 연관되었을 것을 의미하는 것이다.

Piceatannol에 의한 caspase의 활성 증가 및 기질 단백질 단편화

이상의 결과에서 piceatannol에 의한 apoptosis 유도에 extrinsic 및 intrinsic pathway가 동시에 관여할 가능성을 보여주었기에, 두 pathway의 초기 활성화에 중요한 caspase-8 및 -9와 이들 두 caspase의 활성에 의하여 최종 apoptosis 유도를 위한 effector caspase로서 작용하는 caspase-3의 발현 및 활성에 미치는 piceatannol의 영향을 조사하였다. 먼저 caspase의 발현 정도를 확인한 결과, Fig. 4A에서 나타난 바와 같이 piceatannol의 처리 농도 증가에 따라 이들 세 가지 caspase의 pro-form 발현의 감소가 관찰되었다. 이러한 pro-form의 발현 감소가 active-from의 발현 증가와 연관이 있는지를 조사하기 위하여 *in vitro* caspase activity assay를 실시한 결과, piceatannol의 처리에 따라 이들 caspase의 활성이 모두 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 4B).

다음으로 활성화된 caspase-3/-7에 의하여 특이하게 분해가 일어나는 몇 가지 기질 단백질의 발현에 미치는 piceatannol의 영향을 조사하였는데, Fig. 4A에서 볼 수 있듯이 piceatannol의 처리에 의하여 DNA repair와 genomic stability에 관여하는 poly (ADP-ribose) polymerases (PARP) 단백질[19,22]과 세포내 골격 유지와 부착성 세포의 전사 조절에 중요한 역할을 하는 β-catenin 단백질[6,23]의 발현이 모두 감소되었다. 또한 세포의 증식에 중요한 조절인자인 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate를 protein kinase C activator인 diacylglycerol 및 세포 내 Ca^{2+} 조절에 중요한 역할을 하는 inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3)로 가수분해되는 PLC-γ1 [5,24]도 caspase-3의 기질 단백질의 일종이며[2], piceatannol의 처리에 의하여 처리 농도 의존적으로 감소되었다. 한편 apoptosis 유도 동안 genomic DNA 단편화의 결정적인 조절인자 중의 하나가 caspase-activated DNase (CAD; DNA Fragmentation Factor 40, DFF40)인데, 활성화된 caspase-3/-7은 inhibitor of CAD (ICAD)의 단편화를 유도하며 활성형 CAD nuclease는 핵 내로 이동되어 염색질 응축을 촉진시키는 역할[7,31]을 하는데, Fig. 4A의 결과에서 알 수 있듯이 piceatannol의 처리에 의하여 이들 단백질의 발현이 매우 감소되었음을 알 수 있었다. 따라서 piceatannol은 extrinsic 및 intrinsic pathway에 관여하는 initiator caspase (-8/-9)의 활성을 증가시켜 effector caspase (-3)의 활성 유도를 통하여 세포의 증식에 필수적인 세포 내 다양한 단백질들의 단편화를 유도시킴으로서 apoptosis를 유도하였음을 알 수 있었다.

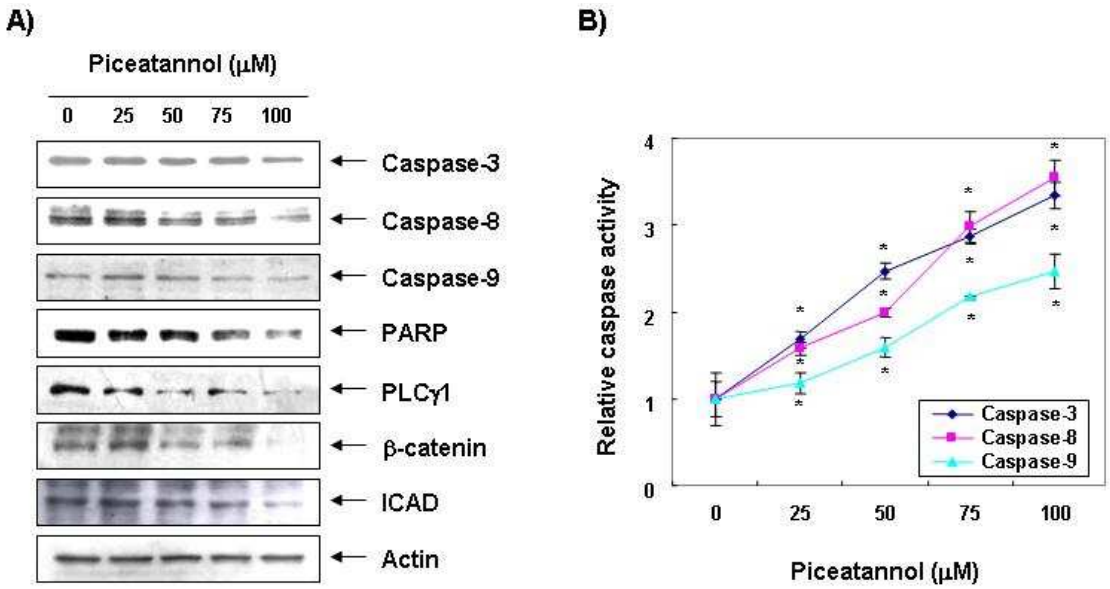

Fig. 4. Activation of caspases and the degradation of activated caspase-3 target proteins by piceatannol treatment in A549 cells. (A) The cells were treated with the indicated concentrations of piceatannol for 48 hr, lysed and then equal amounts of cell lysates were separated on SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control. (B) After 48 hr incubation with the indicated concentrations of piceatannol, the cells were lysed and aliquots (50 μg protein) were assayed for *in vitro* caspase-3, -8, and -9 activity using DEVD-pNA, IETD-pNA, and LEHD-pNA as substrates, respectively, at 37°C for 1 hr. The released fluorescent products were measured. Data are expressed as mean±SD of three independent experiments. Significance was determined using a Student's t-test (*, $p<0.05$ vs. untreated control).

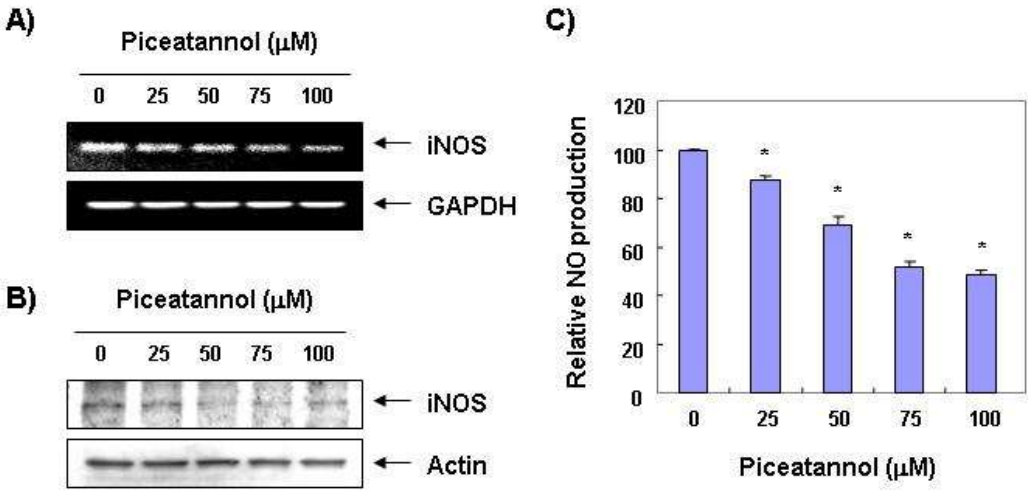

Fig. 5. Effects of piceatannol on the expression of iNOS and production of NO in A549 cells. (A) After incubation with the indicated concentrations of piceatannol for 48 hr, cells were sampled, and total RNAs were isolated, and then reverse-transcribed using iNOS primers. Resulting cDNAs were then subjected to PCR and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) A549 cells grown under the same conditions as (A) were lysed and equal amounts of cell lysate were resolved by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose. Western blotting was then performed using anti-iNOS antibody, and an ECL detection system. Actin was used as an internal control. (C) The amounts of NO were determined using Griess reagent and a standard curve created using $NaNO_2$ in culture medium. Results are expressed as means±S.D. from three independent experiments. Significance was determined using a Student's t-test (*, $p<0.05$ vs. untreated control).

Piceatannol에 의한 iNOS 발현 및 NO 생성의 감소

최근 들어 NO는 암의 발생과 진행에 영향을 미치는 가장 중요한 인자 중의 하나로 인식되어지고 있는데, 특히 NO는 지속적인 염증의 진행에 의한 종양의 형성을 촉진하는 인자중의 하나로 인식되어지고 있다[26,34]. 이러한 과정에 관여하는 NO의 생성은 현재까지 일려진 4가지의 NO 생성 효소 중 iNOS의 발현 증가와 연관성이 크기 때문에 NO의 생성 억제는 암의 예방 및 진행 억제의 새로운 표적이 될 수 있다[15,27]. 따라서 본 연구에서는 piceatannol의 처리에 의한 A549 세포의 apoptosis 유발에 NO 생성의 억제가 연관되어 있는지의 여부를 조사하였다. Fig. 5의 결과에서 알 수 있듯이 NO 생성에 결정적인 역할을 하는 iNOS의 발현이 piceatannol 처리 농도 의존적으로 전사 및 번역 수준에서 모두 감소되었음을 알 수 있었다. 그리고 piceatannol의 처리에 따라 NO의 생성 역시 유의적으로 감소되었는데(Fig. 5B), 이는 iNOS의 발현 감소에 의한 것임을 알 수 있었다. 따라서 piceatannol 처리에 의한 A549 세포의 증식억제와 연관된 apoptosis 유발에 NO의 생성 억제가 동반되고 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부·부산광역시 지원 지역혁신센터사업 동의대학교 블루바이오 소재 개발 및 실용화 지원 센터(RIC 08-06-07)의 지원에 의하여 이루어진 결과의 일부입니다.

References

1. Ashikawa K., Majumdar, S., Banerjee, S., Bharti, A. C., Shishodia, S. and Aggarwal, B.B. 2002. Piceatannol inhibits TNF-induced NF-κB activation and NF-κB-mediated gene expression through suppression of IκBα kinase and p65 phosphorylation. *J. Immunol.* **169,** 6490-6497.
2. Bae, S. S., Perry, D. K., Oh, Y. S., Choi, J. H., Galadari, S. H., Ghayur, T., Ryu, S. H., Hannun, Y. A. and Suh, P. G. 2000. Proteolytic cleavage of phospholipase C-gamma1 during apoptosis in Molt-4 cells. *FASEB J.* **14,** 1083-1092.
3. Barton, B. E., Karras, J. G., Murphy, T. F., Barton, A. and Huang, H. F. 2004. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation in prostate cancer: Direct STAT3 inhibition induces apoptosis in prostate cancer lines. *Mol. Cancer Ther.* **3,** 11-20.
4. Bavaresco, L., Fregoni, C., Cantu, E. and Trevisan, M. 1999. Stilbene compounds: from the grapevine to wine. *Drugs Exp. Clin. Res.* **25,** 57-63.
5. Berridge, M. J. and Irvine, R. F. 1984. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* **312,** 315-321.
6. Brancolini, C., Lazarevic, D., Rodriguez, J. and Schneider, C. 1997. Dismantling cell-cell contacts during apoptosis is coupled to a caspase-dependent proteolytic cleavage of β-catenin. *J. Cell Biol.* **139,** 759-771.
7. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A and Nagata, S. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391,** 43-50.
8. Ferreira, M. J., Duarte, N., Gyemant, N., Radics, R., Cherepnev, G., Varga, A. and Molnar, J. 2006. Interaction between doxorubicin and the resistance modifier stilbene on multidrug resistant mouse lymphoma and human breast cancer cells. *Anticancer Res.* **26,** 3541-3546.
9. Ferrigni, N. R., McLaughlin, J. L., Powell, R. G. and Smith, Jr. C. R. 1984. Use of potato disc and brine shrimp bioassays to detect activity and isolate piceatannol as the antileukemic principle from the seeds of *Euphorbia lagascae*. *J. Nat. Prod.* **47,** 347-352.
10. Galluzzi, L., Larochette, N., Zamzami, N. and Kroemer, G. 2006. Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy. *Oncogene* **25,** 4812-4830.
11. Geahlen, R. L. and McLaughlin, J. L. 1989. Piceatannol (3,4,3′,5′-tetrahydroxy-trans-stilbene) is a naturally occurring protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **165,** 241-245.
12. Ghobrial, I. M., Witzig, T. E. and Adjei, A. A. 2005. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J. Clin.* **55,** 178-194.
13. Han, S. I., Kim, Y. S. and Kim, T. H. 2008. Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. *BMB Rep.* **41,** 1-10.
14. Hellmuth, M., Paulukat, J., Ninic, R., Pfeilschifter, J. and Mühl, H. 2004. Nitric oxide differentially regulates pro- and anti-angiogenic markers in DLD-1 colon carcinoma cells. *FEBS Lett.* **563,** 98-102.
15. Hirst, D. G. and Robson, T. 2010. Nitrosative stress as a mediator of apoptosis: implications for cancer therapy. *Curr. Pharm. Des.* **16,** 45-55.
16. Javadov, S. and Karmazyn, M. 2007. Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. *Cell. Physiol. Biochem.* **20,** 1-22.
17. Jeong, S. Y. and Seol, D. W. 2008. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep.* **41,** 11-22.
18. Jin, Z. and El-Deiry, W. S. 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol. Ther.* **4,** 139-163.
19. Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E. and Poirier, G. G. 1993. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* **53,** 3976-3985.
20. Kumari, A. L., Ali, A. M., Das, S., Pardhasaradhi, B. V., Varalakshmi, C. H. and Khar, A. 2005. Role of STAT3 and NF-κB signaling in the serum factor-induced apoptosis in AK-5 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **336,** 860-867.
21. Larrosa, M., Tomás-Barberán, F. A. and Espín, J. C. 2004. The grape and wine polyphenol piceatannol is a potent inducer of apoptosis in human SK-Mel-28 melanoma cells. *Eur. J. Nutr.* **43,** 275-284.
22. Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G.

G. and Earnshaw, W. C. 1994. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371,** 346-347.
23. Nakamoto, K., Kuratsu, J. and Ozawa, M. 2005. β-catenin cleavage in non-apoptotic cells with reduced cell adhesion activity. *Int. J. Mol. Med.* **15,** 973-979.
24. Nishizuka, Y. and Kikkawa, U. 2003. Early studies of protein kinase C: a historical perspective. *Methods Mol. Biol.* **233,** 9-18.
25. Okada, H. and Mak, T. W. 2004. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat. Rev. Cancer* **4,** 592-603.
26. Pance, A. 2006. Nitric oxide and hormones in breast cancer: allies or enemies? *Future Oncol.* **2,** 275-288.
27. Rao, C. V. 2004. Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. *Mutat. Res.* **555,** 107-119.
28. Roupe, K., Teng, X. W., Fu, X., Meadows, G. G. and Davies, N. M. 2004. Determination of piceatannol in rat serum and liver microsomes: pharmacokinetics and phase I and II biotransformation. *Biomed. Chromatogr.* **18,** 486-491.
29. Su, L. and David, M. 2000. Distinct mechanisms of STAT phosphorylation via the interferon-α/β receptor. Selective inhibition of STAT3 and STAT5 by piceatannol. *J. Biol. Chem.* **275,** 12661-12666.
30. Wesche-Soldato, D. E., Swan, R. Z., Chung, C. S. and Ayala, A. 2007. The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis. *Curr. Drug Targets* **8,** 493-500.
31. Widłak, P. 2004. The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta Biochim. Pol.* 47, 1037-1044.
32. Wieder, T., Prokop, A., Bagci, B., Essmann, F., Bernicke, D., Schulze-Osthoff, K., Dorken, B., Schmalz, H. G., Daniel, P. T. and Henze. G. 2001. Piceatannol, a hydroxylated analog of the chemopreventive agent resveratrol, is a potent inducer of apoptosis in the lymphoma cell line BJAB and in primary, leukemic lymphoblasts. *Leukemia* **15,** 1735-1742.
33. Xu, M. H., Deng, C. S., Zhu, Y. Q. and Lin, J. 2003. Role of inducible nitric oxide synthase expression in aberrant crypt foci-adenoma-carcinoma sequence. *World J. Gastroenterol.* **9,** 1246-1250.
34. Yang, G. Y., Taboada, S. and Liao, J. 2009. Induced nitric oxide synthase as a major player in the oncogenic transformation of inflamed tissue. *Methods Mol. Biol.* **512,** 119-156.

초록 : A549 인체 폐암세포에서 piceatannol에 의한 apoptosis 유발과 NO 생성의 억제

최영현*
(동의대학교 한의과대학 생화학교실, 대학원 바이오물질제어학과(BK21 Program). 항노화연구소 및 블루바이오소재개발센터)

Resveratrol 유도체의 일종으로 stilbene계열 물질인 piceatannol은 암세포의 증식을 억제하고 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 A549 인체 폐암세포를 대상으로 piceatannol에 의한 암세포 증식억제와 연관된 부가적인 기전연구를 실시하였다. 본 연구의 결과에서 piceatannol이 A549 세포에서 extrinsic 및 intrinsic pathway의 동시 활성을 통하여 apoptosis를 유발하였음을 Fas/FasL의 발현 증가와 caspase-8 및 -9의 활성증가로 확인하였다. 또한 piceatannol은 caspase-3의 활성을 증가시켰으며, caspase-3의 다양한 표적 단백질들의 발현 감소가 동반되었다. 아울러 piceatannol에 의한 apoptosis 유발 과정은 iNOS의 발현 감소에 의한 NO의 생성 억제와도 연관성이 있었다.