

Pro-apoptotic Effects of Platycodin D Isolated from *Platycodon grandiflorum* in Human Leukemia Cells

Sang Eun Park¹, Su Young Lee¹, Dong Yeok Shin², Jin-Woo Jeong^{2,4}, Myung Ho Jin¹, Seon Young Park¹, Yoon Ho Chung⁵, Hye Jin Hwang^{3,4}, Sang Hoon Hong¹ and Yung Hyun Choi^{2,4*}

¹Departments of ¹Internal Medicine and ²Biochemistry, Dongeui University College of Oriental Medicine, Busan 614-052, Korea

³Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Dongeui University, Busan 614-714, Korea

⁴Anti-Aging Research Center & Blue-Bio Industry RIC, Dongeui University, Busan 614-714, Korea

⁵Duksan B&F Co. LTD., Busan 614-853, Korea

Received January 23, 2013 / Revised March 7, 2013 / Accepted March 7, 2013

Platycodin D is a major constituent of triterpene saponins, which is found in the root of *Platycodon grandiflorum*, Platycodi Radix, which is widely used in traditional Oriental medicine for the treatment of many chronic inflammatory diseases. Several pharmacological effects of this compound have been reported recently, such as anti-inflammation, immunogenicity, anti-adipogenesis, lowered cholesterol, and anti-cancer activity. However, the mechanism by which this action occurs is poorly understood. In this study, we found that platycodin D greatly increased the potential of the anti-proliferative effect in various cancer cell lines. Our data revealed that platycodin D treatment resulted in a time- and concentration-response growth inhibition of U937 cells by inducing apoptosis, as evidenced by the formation of apoptotic bodies, chromatin condensation, and the accumulation of cells in the sub-G1 phase. Apoptosis induction of U937 cells by platycodin D correlated with an increase in the Bax/Bcl-2 ratio and caused the down-regulation of IAP family members. In addition, platycodin D treatment resulted in proteolytic activation of caspase-3, the concomitant degradation of poly(ADP-ribose) polymerases, and the collapse of the mitochondria membrane potential ($\Delta\Psi_m$). However, the cytotoxic effects induced by platycodin D treatment were significantly inhibited by z-DEVD-fmk, a caspase-3 inhibitor, which demonstrated the important role that caspase-3 played in the observed cytotoxic effect. These findings suggest that platycodin D may be a potential chemotherapeutic agent for use in the control of human leukemia U937 cells. These findings also provided important new insights into possible molecular mechanisms of the anti-cancer activity of platycodin D.

Key words : Platycodon D, apoptosis, U937, caspase-3

서 론

혈구암은 백혈구의 비정상적인 증식을 유발시키는 특징을 가지며 혈액 또는 골수에서 유발되는 암으로서 인체에서 발병하는 여러 종류의 암 중에서 여섯 번째로 높은 발병율을 가지는 것으로 알려져 있다[4]. 혈구암은 급성 및 만성 혈구암으로 구분되어지는데 급성 혈구암의 경우에는 어린이나 젊은 층에서 주로 발병하지만 만성 혈구암의 경우에는 나이가 많은 사람에게 주로 발병하는 것으로 알려져 있다. 또한 혈구암은 골

수에 위치하는 림프구에서 유발되는 급성 림프구성 백혈병(acute lymphocytic leukemia)과 과립성 백혈구 및 단핵 백혈구에서 유발되는 골수성 백혈병(myelogenous leukemia)으로 구분되어 진다[1, 8]. 대부분의 혈구암은 항암제에 대한 화학적 저항성을 가지고 있으므로 치료가 어려우며 재발의 확률도 매우 높은 것으로 보고되어지고 있으며, 혈구암의 치료를 위하여 사용되어지고 있는 다양한 종류의 항암제들은 개개인에 따라서 약리작용이 다르게 나타나고 독성에 의한 부작용이 문제점으로 지적되고 있다. 따라서 혈구암을 치료하는데 있어서 보다 더 효과적인 후보 물질을 발굴하고 분자 및 세포 수준에서의 기전을 밝히는 것이 중요 할 것이다.

암의 효과적인 예방과 치료에 있어서 세포사멸(apoptosis) 과정을 통하여 비정상적인 세포나 암세포를 제거하는 치료제의 개발이 최근 중요시되고 있다. Apoptosis의 특징으로는 세포 질 및 염색질의 응축, DNA 단편화, 세포 표면에 phosphatidylserine의 발현 및 세포막의 수포화 현상 등과 같은 형태적

*Corresponding author

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

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

또는 생화학적인 변화를 동반하며, 만약 이러한 과정이 실패하게 되면 암과 같은 여러 가지 질병의 원인이 되므로 apoptosis는 암화 과정의 여러 단계에서 암을 치료하는 중요한 표적이 되고 있다[9, 12, 19]. Apoptosis 조절에 관여하는 가장 중요한 인자는 Bcl-2 family에 속하는 단백질들로서 apoptosis의 유도과 억제를 동시에 조절하는 인자들로 구성되어 있다[3]. 또한, caspase라 불리는 protease 역시 apoptosis 유발에 중요한 역할을 하는데, 이들은 정상적으로 증식 중인 세포에서는 pro-enzyme 형태로 존재한다. 이들은 apoptosis 유도신호에 의해 활성화되어 직접 또는 간접적으로 세포 내 존재하는 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 등과 같은 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다[13, 16]. 이외에도 apoptosis에 관여하는 여러 인자들 중에서 inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) family에 속하는 단백질들은 외부 신호에 의한 세포 내 anti-apoptotic 활성을 지닌다. 이들 중 몇몇 IAPs는 caspase와의 직접적인 결합을 통하여 그들의 apoptotic 활성을 억제할 수 있는 것으로 알려져 있다[10, 11]. 최근 연구에 따르면 식생활과 밀접한 연관이 있는 천연물들이 암예방 및 항암작용이 있는 것으로 알려져 있으며 이러한 종류의 chemopreventive 및 chemotherapeutic agent들은 apoptosis 유발에 의한 세포의 죽음을 일으키는 것으로 알려져 있으므로 새로운 항암제 개발에 있어서도 apoptotic cell death 유발이 중요한 기전으로 연구되어지고 있다[14, 18].

도라지(*Platycodon grandiflorum*)의 뿌리는 길경(*Platycodon radix*)이라고 불리며 감기, 기침, 냉병, 복통, 부스럼, 설사, 산후병, 부인병, 불면증, 염증 등에 효과가 좋아 예로부터 민간처방 약재로 사용되었을 뿐만 아니라 건강식품으로도 섭취되고 있다. 특히 도라지의 뿌리 부분에는 다량의 사포닌이 함유되어 있는데, 이러한 사포닌에는 platycodin A, C, D와 polygalacin D, spinasterol, spinasterol glucoside, inulin 등의 성분이 알려져 있다[15, 21]. 이 중 platycodin D는 triterpenoid 사포닌계 화합물 중 하나로 항암활성 효과[5], 항염증 효과[2, 22], 항비만 효과[17], 콜레스테롤 저하[23] 효과 등이 있는 것으로 보고되어지고 있으나 정확한 분자생물학적 기전은 아직 명확하게 밝혀지지 않은 상태이다.

따라서 본 연구에서는 platycodin D의 항암활성에 관한 기전을 조사하기 위하여 다양한 인체 암세포주를 대상으로 항암활성의 정도를 비교하였으며, 그 중 세포독성에 대한 감수성이 가장 높았던 인체 혈구암세포인 U937 세포를 대상으로 platycodin D에 의한 암세포 성장억제 효과와 apoptosis 유발에 어떠한 영향을 미치는지를 유전자 수준에서 조사한 결과 Bcl-2 family와 IAP family에 관여하는 몇 가지 중요한 유전자들과 caspase-3의 발현 변화에 대한 유의적인 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 actin, Bcl-2, Bcl-X_L, Bax, XIAP, cIAP-1, cIAP-2, caspase-3 및 PARP 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, immunoblotting을 위해 2차 항체로 사용된 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse 및 anti-rabbit 항체는 Amersham Life Science Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다. 또한 caspases-3의 *in vitro* 활성 측정을 위한 colorimetric assay kits는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였으며, caspase-3의 활성을 억제하기 위하여 사용된 caspase-3 specific inhibitor인 z-DEVD-fmk는 CalBiochem (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다.

세포배양

실험에 사용된 인체 혈구암세포(U937 및 HL-60), 인체 간암세포(HepG2 및 Hep3B), 대장암세포(HT29 및 HCT116)는 한국생명공학연구소(KRIBB, Daejeon, Korea)에서 분양 받았으며, 암세포의 배양을 위해 RPMI-1640 배지(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)와 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 성장배지를 사용하여 37°C, 5%, CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 성장배지의 교환을 매 48시간마다 실시하여 적정수의 세포를 유지하였다. 아울러 Bcl-2의 과발현이 platycodin D에 의한 apoptosis에 미치는 영향을 조사하기 위하여 U937 세포에서 Bcl-2가 과발현된 세포주(U937/Bcl-2)를 사용하였다. U937/Bcl-2 세포는 계명대학교 의과대학 면역학교실 권택규 교수에게 제공받았으며 0.7 µg/ml geneticin (G418 sulfate, Calbiochem)이 첨가된 배지를 사용하여 배양하였다.

MTT assay를 이용한 세포 생존율의 측정 및 형태의 관찰

세포 배양용 6 well plate에 3×10⁵개/ml로 암세포를 분주하고 platycodin D를 배지에 희석하여 각 well 당 적정 농도로 처리하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Amersco, Solon, Ohio, USA)를 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 37°C에서 3시간 동안 다시 배양하였다. 배양이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)로 생성된 formazan을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Platycodin D 처리에 의한 U937 세포의 형태 변화 정도를 살펴보기 위하여 platycodin D를 적정 농도로 희석 처리하여 배양 48시간 경과 후 도립 현미경을 이용하여 200배의 배율로 관찰하였다.

DAPI staining에 의한 세포핵의 형태 관찰

Apoptosis가 유발되었을 경우 특이적으로 나타나는 핵의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 platycodin D가 처리된 세포를 모은 다음 37% formaldehyde 용액과 PBS를 1:9의 비율로 섞은 fixing solution으로 10분 동안 고정하였다. 고정된 세포를 cytospin을 이용하여 slide glass에 부착하였다. 세포가 부착된 slide glass를 PBS로 2~3회 정도 세척하고 PBS가 마르기 전에 0.2%의 Triton X-100 (Amresco)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 400배의 배율로 각 농도에 따른 암세포의 핵의 형태 변화를 관찰하였다.

DNA fragmentation의 분석

Apoptosis 유발의 증거 중 하나인 DNA fragmentation 현상의 분석을 위하여 정상 및 platycodin D가 48시간 동안 처리된 세포들을 모은 다음 lysis buffer [5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100]를 첨가하여 상온에서 30분간 lysis 시킨 다음 14,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리하여 찌꺼기가 제거된 상층액 750 µl를 회수하였다. 회수된 상층액에 proteinase K solution (Sigma)를 0.5 mg/ml의 농도로 처리하여 50°C에서 3시간 동안 반응시킨 후 750 µl의 phenol : chloroform : isoamyl alcohol 혼합 용액(25 : 24 : 1, Sigma)을 첨가하고 30분간 회전교반 시킨 다음 14,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 여기서 얻어진 상층액 600 µl에 300 µl의 isopropanol (Sigma)과 100 µl의 5 M NaCl를 첨가하여 4°C에서 24시간 동안 반응시킨 후, 14,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리시켜 상층액을 제거하고 DNA pellet을 추출하였다. DNA pellet에 RNase A가 적당량 들어있는 TE buffer를 이용하여 녹인 후, 6X gel loading dye (Bioneer, Daejeon, Korea)를 섞어 주었다. 마지막으로 1.6% agarose gel을 만들어서 1시간 동안 50 V로 전기영동 시킨 후 ethidium bromide (EtBr, Sigma)로 염색하여 DNA fragmentation 현상을 확인한 다음 ultra violet (UV) 하에서 관찰하였다.

Flow cytometry 분석

U937 세포에서 platycodin D가 유발하는 apoptosis 정도를 정량적으로 분석하기 위하여 정상 및 platycodin D가 48시간 동안 처리된 세포들을 모은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 PBS를 이용하여 2~3회 정도 세척하였다. 준비된 세포는 CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 고정 및 염색을 하여 4°C, 암실에서 30분 동안 반응을 시켰다. 반응시킨 세포를 35-mm mesh를 이용하여 단일세포로 분리한 후 FACSCalibur (Becton Dickinson)를 적용시켜 형광반응에 따른 Cellular DNA content 및 histogram을 CellQuest software

및 Modifit LT (Becton Dickinson) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

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

동일한 조건에서 배양된 U937 세포들에 TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA)를 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, 각각의 primer, 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 1.5% agarose gel을 만들고 well 당 각각의 primer에 해당하는 PCR 산물에 DNA gel loading solution을 섞어서 loading 한 후 50 V에서 전기영동을 행하였다. 전기영동으로 DNA 분리가 끝난 gel을 EtBr로 염색한 후 UV 하에서 관찰하였으며, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 internal control로 사용하였다.

Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

준비된 세포에 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]를 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 총 단백질을 분리하였다. 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 사용방법에 준하여 정량 후 다음 동량의 Laemmli sample buffer (Bio-Rad)를 섞어서 sample을 만들었다. 동량의 sample을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후, nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시켰다. 분리된 단백질이 전이된 nitrocellulose membrane을 5% skim milk를 처리하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 1차 antibody를 처리하여 상온에서 2시간 이상 또는 4°C에서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 세척하고 처리된 1차 antibody에 맞는 2차 antibody를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 반응이 끝난 후 암실에서 Enhanced Chemiluminescence (ECL) solution (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 발현 양을 분석하였다.

Mitochondrial membrane potential (MMP, $\Delta\Psi_m$) 변화의 측정

Platycodin D 처리에 따른 apoptosis 유발과정에서 미토콘드리아막 전위(MMP)의 변화 여부를 조사하기 위하여 dual-emission potential-sensitive probe인 5,5',6,6'-tetra-chloro-1,1',3,3'-V-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide (JC-1,

Sigma) 염색을 실시하였다. 이를 위하여 정상 및 platycodin D이 처리된 배지에서 배양된 세포들을 원심분리를 이용하여 모으고, PBS로 수세 후, 2 mg/l의 JC-1을 배지에 희석하여 37°C에서 20분간 염색하고 수세 후, flow cytometer를 이용하여 분석하였다.

In vitro caspase-3의 activity 측정

Caspases-3의 활성 정도가 platycodin D 처리에 의하여 어떠한 변화를 유발하는지 알아보기 위하여 정상 및 platycodin D가 처리된 배지에서 48 시간 배양된 세포를 모은 뒤 상기와 동일한 방법으로 단백질을 추출하고 정량하였다. 150 µg의 단백질이 함유된 50 µl의 sample에 기질 100 µM이 함유된 reaction buffer [40 mM HEPES (pH 7.4), 20% glycerol (v/v), 1 mM EDTA, 0.2% NP-40 and 10 mM DL-DTT] 50 µl를 혼합하여 각 sample 당 총 volume이 100 µl가 되게 하였다. 여기에 caspase-3에 따른 기질 5 µl를 첨가하여 37°C, 암실에서 3시간 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm의 흡광도를 이용하여 반응의 정도를 측정하였다. 실험에 사용된 기질은 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-p-nitroaniline (pNA)였다.

결 과

Platycodin D가 여러 암세포의 증식에 미치는 영향

Platycodin D (Fig. 1A)의 처리에 따른 암세포 생존율 및 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 다양한 암세포들을 대상으로 MTT assay를 통하여 조사한 결과, Fig. 1B에서 볼 수 있듯이 조사된 모든 종류의 암세포에서 platycodin D 처리 농도 의존적으로 증식억제 효과를 보였으며, 12 µM 처리군에서 인체 혈구암세포인 U937에서 약 50% 이상의 증식억제 효과가 있었으나 HL-60 세포에서는 약 30% 정도의 증식억제를 보였다. 또한 인체 간암세포에서는 약 30-40%, 대장암세포에서는 약 10-20% 정도의 증식억제를 보여주었다. 또한 platycodin D 처리시 시간 의존적으로 세포 증식억제 효과를 보였으며(Fig. 1C), platycodin D는 특히 인체 혈구암세포인 U937 세포에서 농도 및 시간 의존적으로 감수성이 높게 나타났음을 알 수 있었다.

Platycodin D에 의한 U937 세포의 형태 변화 및 apoptosis 유발

Platycodin D 처리시 생존율 감소 및 증식억제 현상에 따른 U937 세포의 형태변화를 관찰하기 위하여 platycodin D를 다양한 농도 범위로 48시간 동안 처리한 후 독립현미경을 이용하여 정상 및 platycodin D이 처리된 조건에서 배양된 U937의 모양을 관찰하였다. Fig. 2A에 나타난 바와 같이 platycodin D 처리농도가 증가할수록 전체적인 세포의 밀도가 감소하였

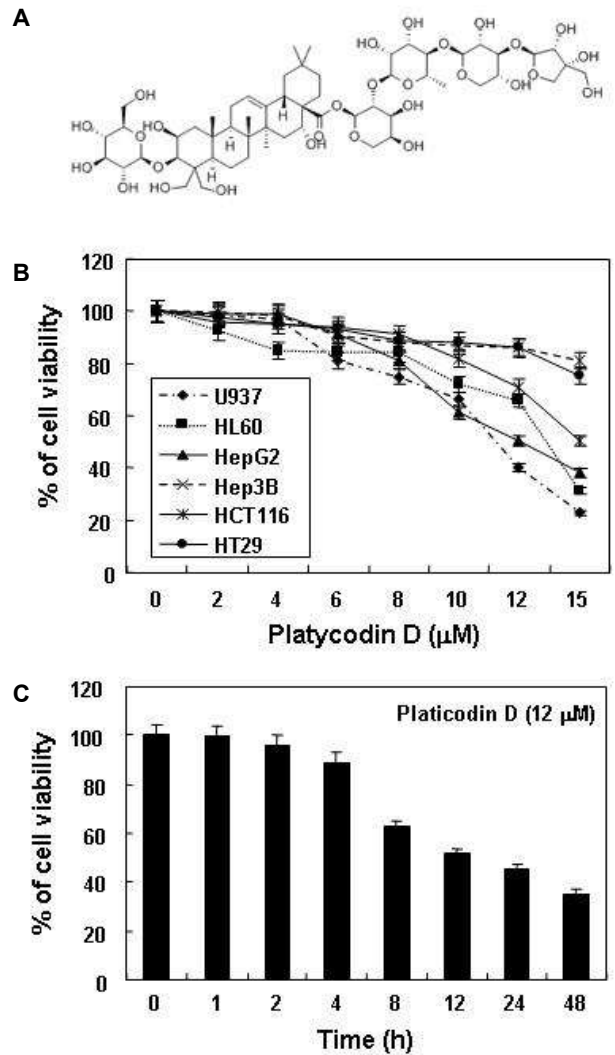


Fig. 1. Inhibition of the cell viability by platycodin D treatment in several human cancer cell lines. (A) The chemical structure of platycodin D. (B) The cells were treated with various concentrations of platycodin D for 48 hr. (C) U937 cells were stimulated with 12 µM platycodin D for the indicated times. After treatment with platycodin D, MTT assay was performed. Results are expressed as percentage of the vehicle treated control ± SD of three separate experiments.

고 apoptosis 유발 시 특이하게 관찰되는 membrane blebbing 현상을 포함한 형태적 변형이 관찰되었다. 이러한 세포의 형태적 변형이 apoptosis의 유발과 관계가 있을 것으로 예상되어 핵산에 특이적으로 결합하는 DAPI 염색을 통하여 현광현미경으로 관찰하였다. 그 결과 Fig. 2B에서도 platycodin D 처리시 농도 의존적으로 세포의 밀도가 감소하였고, 전형적으로 apoptosis가 일어난 세포에서 관찰되는 apoptotic body의 형성이 증가하는 것을 확인하였다. 아울러 platycodin D 처리에 의하여 유발되는 apoptosis의 정도를 정량화하기 위하여

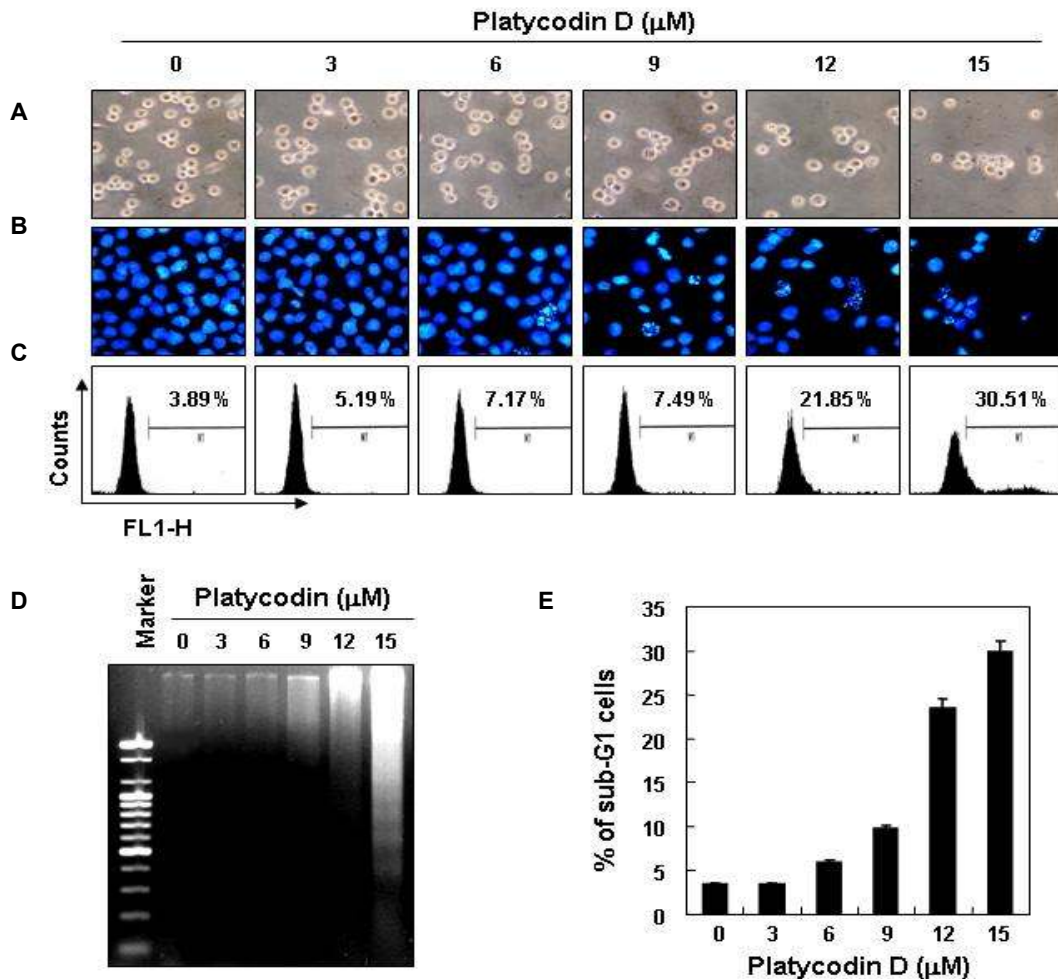


Fig. 2. Induction of apoptosis by platycodin D treatment in human leukemia U937 cells. The cells were treated with the indicated concentration of platycodin D for 48 hr. (A) Cell morphology was visualized by a light microscope. Magnification, $\times 200$. (B) Stained nuclei with DAPI solution were photographed with a fluorescent microscope using a blue filter. Magnification, $\times 400$. (C) Cells were fixed and stained with annexin V and PI. Apoptotic cells were determined by a DNA flow cytometry analysis. (D) After platycodin D treatment for 48 hr, the cells were collected and DNA was extracted, electrophoresed in a 1.5% agarose gel and then visualized by EtBr staining. (E) To quantify the degree of apoptosis induced by platycodin D, 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 \pm SD of three separate experiments.

annexin V에 positive한 염색 반응을 보이는 세포의 정도를 DNA flow cytometry를 이용하여 분석하였다. Fig. 2C에서 알 수 있듯이 platycodin D의 처리 농도 증가에 따라, annexin V에 positive한 세포의 수가 점점 증가하는 것을 확인하였다. 또한 apoptosis 유발의 직접적인 증거에 해당하는 DNA의 단편화 여부를 확인한 결과, Fig. 2D에 나타낸 바와 같이 platycodin D 처리에 의해 DNA가 단편화되는 것을 알 수 있었다. 이러한 apoptosis 유발 정도를 정량적으로 재분석하기 위하여 상기와 동일한 조건으로 배양된 U937 세포를 대상으로 DNA flow cytometry를 이용하여 sub-G1기에 해당하는 세포의 빈도를 조사하였다. Fig. 2E의 결과에서 알 수 있듯이 platycodin D 처리 농도의 증가에 따라 sub-G1기에 해당하는 세포의 빈도

는 매우 증가함을 알 수 있었다. 즉 정상배지에서 자란 암세포의 경우에는 자연적 apoptosis 유발 빈도가 약 4.5%로 매우 낮았으나 platycodin D 처리 농도가 증가할수록 sub-G1기의 세포의 빈도가 증가하여 12 μ M의 농도에서는 약 24.5%가 관찰되었고 15 μ M의 농도에서는 약 30%에 해당하는 세포가 sub-G1기로 관찰되었다. 이상의 결과는 U937 세포에서 platycodin D 처리에 의한 생존율 감소, 증식억제 및 형태변화는 apoptosis 유발과 밀접한 연관이 있음을 의미한다.

Apoptosis 조절 주요 인자들의 발현에 미치는 platycodin D의 영향

Platycodin D 처리에 의한 apoptosis 유발 기전해석의 일환

으로 주요 apoptosis 조절인자들의 발현에 미치는 platycodin D의 영향을 RT-PCR과 Western blotting을 통하여 mRNA 및 단백질 수준에서의 변화 여부를 확인하였다. 먼저 Bcl-2 family에 속하는 인자들 중, pro-apoptotic 유전자인 Bax의 발현이 platycodin D 처리농도 의존적으로 현저하게 증가된 반면, anti-apoptotic 유전자인 Bcl-2 및 Bcl-xL의 발현에는 큰 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 3). 다음으로 caspases 활성을 억제함으로써 apoptosis를 억제하는 것으로 알려진 IAP family의 발현에 platycodin D이 어떠한 영향을 미치는 지를 확인한 결과, cIAP-1의 발현에는 큰 변화가 관찰되지 않았지만 XIAP 및 cIAP-2의 발현이 platycodin D 처리에 의하여 감소되는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 살펴볼 때 platycodin D에 의하여 유발되는 apoptosis는 pro-apoptotic 유전자인 Bax의 증가와 IAP family 유전자 중 XIAP 및 cIAP-2의 발현 감소가 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

Caspases의 활성 및 기질 단백질의 발현에 미치는 platycodin D의 영향

Caspase protease는 apoptosis 유발에 중심적인 조절인자로서 작용하는데, 이 효소들은 핵과 mitochondria의 외막에 불활성화 상태인 pro-enzyme 형태로 존재하다가 Bcl-2 family와 같은 apoptosis 유도를 활성화시키는 신호에 의해 mitochondria로부터 유리된 cytochrome c에 의하여 활성화된 protease로 전환되어 직접 또는 간접적으로 세포 내에 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다. 따라서 caspase의 활성화는 apoptosis의 유발에 대한 직접적인 증거로서 많은 선행연구 등에서 검증되어 왔다. 본 연구에서는 지금까지 알려진 caspase 중 apoptosis가 유발될 때 최종적으로 높은 활성도를 보여주는 caspase-3의 발현 및 *in vitro* 활성에 미치는 platycodin D의 영향을 조사하였다. Fig. 4A의 결과에서 알 수 있듯이 platycodin D 처리 농도 의존적으로 비활성화 상태의 pro-form의 caspase-3의 발현이 감소하였으며, 활성화 상태의 cleavage-form이 점차 증가됨을 알 수 있었다. 또한 caspase-3의 활성 여부를 재확인하기 위하여 *in vitro* caspase-3 활성을 정량적인 방법으로 분석한 결과, Fig. 4C에 나타난 바와 같이 DEVD-pNA를 기질로 한 *in vitro* 활성 결과에서도 caspase-3이 platycodin D 처리농도 의존적으로 증가하였다. 다음으로 활성화된 caspase-3에 의하여 특이하게 분해가 일어나는 기질 단백질의 발현에 미치는 platycodin D의 영향을 조사한 결과, platycodin D의 처리에 의하여 DNA repair와 genomic stability에 관여하는 PARP 단백질의 주단백질 발현감소와 더불어 단편화된 단백질의 발현 증가가 관찰되었다(Fig. 4A). 이러한 platycodin D 처리에 의한 U937 세포의 apoptosis 유발은 세포 내 에너지 생산 기관으로 세포의 생존에 중요한 기능을 수행하는 미토콘드리아의 손상과 연계성을 가지는지를 조사하기 위하여 JC-1 염색을 통한 MMP 소실의 정도를 조사한

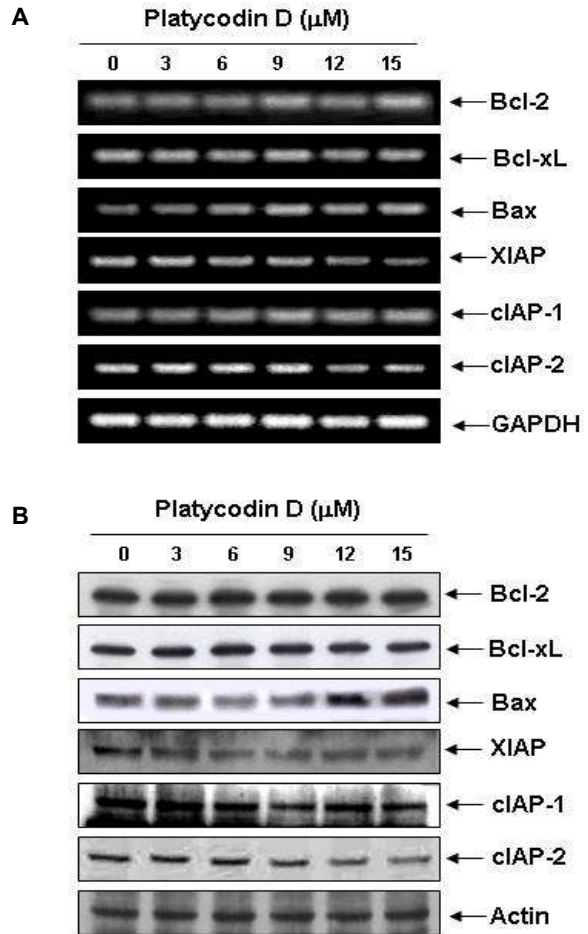


Fig. 3. Expression levels of apoptosis-related gene products by platycodin D treatment in human leukemia U937 cells. (A) After 48 hr incubation with platycodin D, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with the indicated primers and reaction products were subjected to electrophoresis in 1.5% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) The cells were lysed and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies and the proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

결과, platycodin D 처리농도 의존적으로 MMP의 소실이 증가되어 platycodin D 처리에 의한 U937 세포의 apoptosis 유발은 미토콘드리아 기능 손상과 연계성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 4B). 이상의 결과를 살펴볼 때 platycodin D 처리에 따른 인체 혈구암세포인 U937 세포에서의 apoptosis 유발은 pro-apoptotic 유전자인 Bax의 증가와 IAP family 유전자 중 XIAP 및 cIAP-2의 감소를 통해 미토콘드리아 기능 손상을 초래하여 caspase-3의 활성화와 더불어 기질단백질들

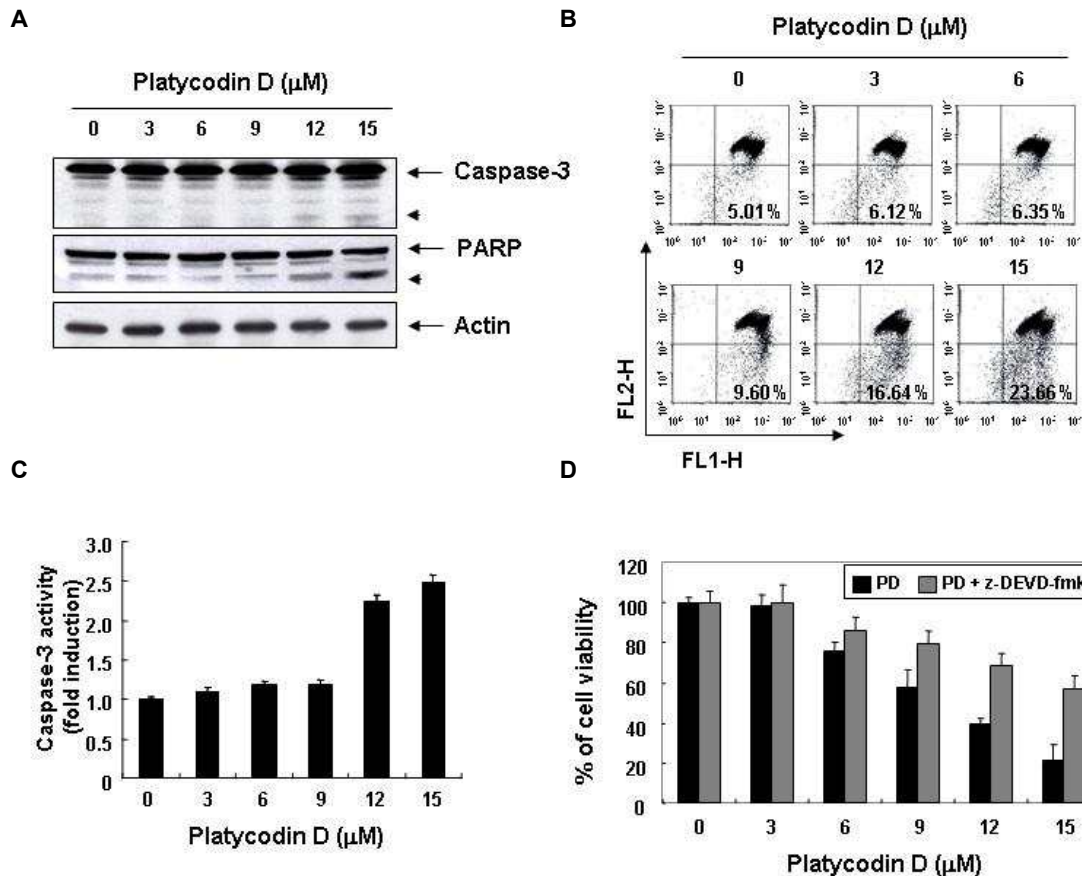


Fig. 4. Activation of caspase-3 and loss of MMP by platycodin D treatment in human leukemia U937 cells. Cells were treated with the indicated concentrations of platycodin D for 48 hr. (A) The cells were lysed and then equal amounts of cell lysates were separated on SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were probed with anti-caspase-3 and anti-PARP antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control. (B) The cells were stained with JC-1 at 37°C for 20 min and then the mean JC-1 fluorescence intensity detected by a flow cytometer. (C) Caspase-3 activity was determined using caspase assay kit obtained from R&D according to the protocol of the manufacturer. (D) The cells were pre-treated with z-DEVD-fmk (50 μM) for 1 hr before a challenge with platycodin D for 48 hr. The level of cell viability was measured using a MTT assay. Results are expressed as percentage of the vehicle treated control ± SD of three separate experiments.

의 단편화 및 발현 감소 등과 같은 전형적인 mitochondrial pathway를 통하여 일어난다는 것을 알 수 있었으며, 특히 caspase-3의 활성화가 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

Caspase-3 활성 억제에 의한 platycodin D 유발 apoptosis의 억제

이상의 결과에서 platycodin D 처리에 따른 인체 혈구암세포인 U937 세포에서의 apoptosis 유발에 있어서 caspase-3의 활성화가 중요한 역할을 하는 것으로 나타났으므로 caspase-3의 활성을 억제하였을 경우에 apoptosis가 억제되는지의 여부를 MTT assay를 통한 세포 생존율 변화로서 조사하였다. 그 결과, Fig. 4D에서 나타난 바와 같이 platycodin D에 의하여 유발된 세포 증식억제가 caspase-3 특이적 저해제인 z-DEVD-fmk를 1시간 선처리하여 caspase-3의 활성을 억제한 다음 pla-

tycodin D를 처리하였을 경우에는 정상배지에서 자란 암세포의 수준으로 회복되어 platycodin D에 의하여 유발되는 apoptosis에 있어서 caspase-3이 중요한 조절자로서 역할을 하였음을 알 수 있었다.

Platycodin D에 의한 U937 세포의 생존율 억제에 미치는 Bcl-2의 영향

Platycodin D의 처리에 의한 U937 세포의 증식억제에 미치는 Bcl-2의 영향을 비교하기 위하여 Bcl-2가 과발현된 U937/Bcl-2 세포주의 Bcl-2 단백질 발현의 정도를 U937/vector 세포주와 먼저 비교하였다. Fig. 5A에 나타난 Western blotting의 결과에서 알 수 있듯이 U937/Bcl-2 세포에서의 Bcl-2 단백질의 발현은 U937/vector 세포보다 약 5배 이상 과발현되어 있음을 확인하였다. 다음은 이와 같은 Bcl-2 발현의 차이가

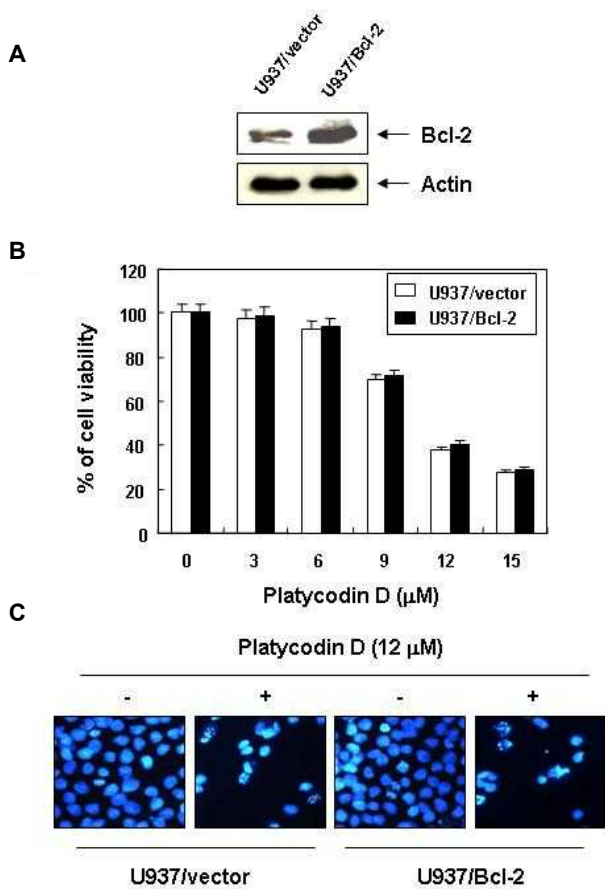


Fig. 5. Effects Bcl-2 over-expressing on the cell viability and apoptosis induced by platycodin D in U937 cells. (A) Cellular proteins isolated from U937/vector and U937/Bcl-2 cells were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membrane. The membrane was probed with anti-Bcl-2 antibody and visualized using ECL detection system. To confirm equal loading, the same blot was stripped and re-probed with the anti-actin antibody. (B) U937/vector and U937/Bcl-2 cells were treated with platycodin D for 48 hr and MTT assay was performed. Results are expressed as percentage of the vehicle treated control \pm SD of three separate experiments. (C) After platycodin D treatment for 48 hr, the cells were fixed and stained with DAPI. And nuclear morphology was photographed with a fluorescence using blue filter. Magnification, $\times 400$.

있는 두 세포주에서 platycodin D의 세포증식 억제 정도의 MTT assay와 DAPI 염색을 통해서 확인한 결과 U937/Bcl-2에서도 U937/vector와 유사한 정도의 억제를 나타내었다(Fig. 5B 및 C). 이러한 결과는 platycodin D에 의한 apoptosis 유발은 Bcl-2의 발현 차이와는 무관하다는 것을 의미한다.

고 찰

본 연구에서는 도라지 뿌리에서 유래된 platycodin D에 의

하여 유발되는 인체암세포의 증식억제 및 apoptosis 기전을 알아보기 위하여 고형암세포인 간암세포(HepG2 및 Hep3B), 대장암세포(HT29 및 HCT116) 및 인체 혈구암세포(U937 및 HL-60)를 대상으로 증식억제 정도를 조사하였다. Fig. 1B의 결과에 의하면 동일 조건에서 부착성 암세포주에서는 platycodin D에 의한 증식억제 효과가 크게 나타나지 않은 반면 혈구암세포주에서는 증식억제 효과가 크게 나타났으며, 특히 U937 세포에서 platycodin D에 대한 감수성이 가장 높게 나타났다. 이러한 증식 억제 현상이 암세포의 형태 변화에 영향을 미치는 지를 확인한 결과, platycodin D 처리농도 의존적으로 급격한 세포 밀도의 감소 현상이 나타났으며, 특히 apoptosis 유발 시 특이하게 관찰되는 membrane blebbing 현상 등과 같은 심한 형태적 변형이 관찰되었다(Fig. 2A). Platycodin D 처리에 의하여 나타나는 증식 억제 및 형태 변화가 apoptosis 유발과 어떠한 연관성이 있는지를 확인하기 위하여 먼저 암세포의 핵 형태 변화를 관찰한 결과, platycodin D 처리 농도의 증가에 따라 핵의 밀도 감소와 더불어 nucleosome의 linker DNA 부분의 절단을 유발함으로써 나타나는 DNA 단편화 현상으로서 apoptosis 유발 시 전형적으로 관찰되는 염색질 응축에 의한 apoptotic body 형성을 관찰할 수 있었고, annexin V 분석에 의한 apoptosis 유도 정도를 정량적으로 제시하였다(Fig. 2B 및 C). 아울러 또 다른 apoptosis 유발의 직접적인 증거인 DNA 단편화 여부를 확인한 결과, platycodin D를 처리하지 않은 조건에서 배양된 세포의 경우 DNA 단편화 현상을 관찰할 수 없었지만 platycodin D 처리농도 증가에 따라 endonuclease가 활성화되어 chromosomal DNA가 단편화되어 나타나는 DNA 단편화 현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 2D). 이러한 apoptosis 유발 정도를 정량적으로 다시 확인하기 위하여 flow cytometry 분석에 의한 apoptosis 유발 세포군에 해당하는 sub-G1기에 속하는 세포들의 빈도를 조사한 결과, platycodin D를 처리하지 않았을 경우에는 약 4%의 apoptosis 유발 빈도가 나타났으나 platycodin D 처리 농도가 증가할수록 sub-G1기의 세포의 빈도가 증가하여 고농도인 15 μM 처리군에서는 약 30%에 해당하는 세포가 sub-G1기로 관찰되어 고농도 처리군에서 현저하게 증가한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 4B). 이상의 결과에서 platycodin D 처리에 의한 인체 혈구암세포인 U937 세포의 생존을 감소, 증식 억제 및 형태변화는 apoptosis 유발에 의하여 일어나는 현상이라는 것을 알 수 있었다.

미토콘드리아는 apoptosis의 intrinsic pathway에서 가장 중요한 역할을 하는 기관으로 Bcl-2 family에 속하는 인자들의 발현 변화에 의하여 미토콘드리아 막의 전위가 조절된다고 알려져 있다[6]. Bcl-2 family는 apoptosis를 억제하는 anti-apoptotic 인자(Bcl-2 및 Bcl-xL 등)와 apoptosis를 유발하는 pro-apoptotic 인자(Bax 및 Bad 등)로 구성되어 있으며 이들은 서로 dimer의 형태로 결합을 할 수 있다[7]. 하지만 세포 내

스트레스나 세포 독성에 의해 mitochondria의 막 전위가 변화되면, 이 균형은 깨어지고 mitochondria에서 cytochrome c와 같은 apoptosis 유발 인자들이 세포질로 방출된다. 방출되어진 cytochrome c는 apoptotic protease activating factor (Apaf)-1과 caspase-9에 결합함으로써 apoptosome을 형성하여 caspase-9를 활성화시키며, 결과적으로 caspase-3을 활성화 시킴으로써 apoptosis를 유발시키는 것으로 알려져 있다[7]. 또한 antagonist로 작용하는 IAP family의 발현 변화 역시 caspase 활성을 억제함으로써 apoptosis 억제 조절인자로 작용한다[10, 20]. 더불어 PARP와 β -catenin과 같은 단백질들의 단편화는 caspase의 활성화와 연관된 apoptosis가 유발되었음을 보여주는 지표 단백질로 활성화된 caspase-3의 표적 단백질로 알려져 있다[13, 16]. 많은 선행 연구들의 결과에서와 부분적으로 유사하게 RT-PCR과 Western blot 분석의 결과에서 알 수 있듯이 platycodin D가 처리된 배지에서 배양된 U937 세포에서 이들 유전자들은 매우 다양한 발현 양의 변화를 보여주었는데, apoptosis를 유도하는 Bax가 증가하는 반면, apoptosis를 억제하는데 관여하는 XIAP와 cIAP-2가 감소하였으나, Bcl-2, Bcl-xL 및 cIAP-1은 아무런 변화가 보이지 않았다(Fig. 3). 또한 caspase의 활성화가 apoptosis의 유발에 대한 증거가 될 수 있다고 보고되어진 바 본 연구에서는 effector caspase인 caspase-3의 발현 및 활성화에 platycodin D가 어떠한 영향을 미치는 지를 조사하였다. 그 결과, caspase-3의 불활성화 단백질의 발현이 감소하는 반면 활성화 단백질의 발현이 증가하는 것으로 나타났으며, caspase-3의 기질단백질인 PARP의 경우에도 platycodin D의 처리에 의하여 단편화가 유발되는 것으로 나타났다(Fig. 4). 이상의 결과에서 platycodin D에 의해 유발되는 apoptosis에 있어서 caspase-3가 중요한 역할을 할 것으로 생각되어 caspase-3 특이적 억제제인 z-DEVD-fmk를 이용하여 caspase-3의 활성을 억제하였을 경우에 platycodin D에 의하여 유발되는 apoptosis가 억제되는 지를 MTT assay를 이용하여 확인한 결과, platycodin D를 단독으로 처리하였을 경우에 나타난 증식억제 효과가 z-DEVD-fmk의 선처리에 의하여 현저하게 회복되었다(Fig. 4D). 한편 platycodin D의 처리에 의한 U937 세포의 증식억제에 미치는 Bcl-2의 영향을 비교하기 위하여 Bcl-2 과발현세포주인 U937/Bcl-2 세포를 사용하여 확인한 결과, platycodin D에 의한 apoptosis 유발에 Bcl-2의 과발현은 큰 영향을 주지 못하였다.

이상의 결과를 종합해 보면 인체 혈구암세포주인 U937 세포에 platycodin D를 처리하였을 경우에 유발되는 생존을 감소, 증식 억제 및 형태 변화는 apoptosis 유발과 밀접한 연관이 있었다. 이러한 apoptosis 유발은 Bax의 발현 증가와 연관된 미토콘드리아 막 전위의 소실 및 caspase-3의 활성화와 기질단백질들의 분해에 의한 것임을 알 수 있었으며, IAP family 인자들의 발현 감소가 caspase의 활성 증가에도 영향을 미친 것으로 추정된다. 또한 z-DEVD-fmk 선처리에 의하여 platyco-

din D에 의하여 유발된 apoptosis가 억제되었기에, platycodin D 처리에 의하여 유발되는 apoptosis는 미토콘드리아 경로에 의하여 조절되며, 여러 종류의 유전자 중에서 caspase-3의 활성화가 핵심적인 역할을 한 것으로 생각되어진다.

감사의 글

이 연구는 지식경제부·부산광역시 지원 지역혁신센터사업(RIC08-06-07) 동의대학교 블루바이오 소재개발 및 실용화 지원센터의 지원으로 이루어졌습니다.

References

1. Abramson, N. and Melton, B. 2000. Leukocytosis: basics of clinical assessment. *Am Fam Physician* **62**, 2053-2060.
2. Ahn, K. S., Noh, E. J., Zhao, H. L., Jung, S. H., Kang, S. S. and Kim, Y. S. 2005. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase II by *Platycodon grandiflorum* saponins via suppression of nuclear factor-kB activation in RAW 264.7 cells. *Life Sci* **76**, 2315-2328.
3. Antonsson, B. and Martinou, J. C. 2000. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* **256**, 50-57.
4. Chang, H., Lin, H., Yi, L., Zhu, J., Zhou, Y., Mi, M. and Zhang, Q. 2010. 3,6-Dihydroxyflavone induces apoptosis in leukemia HL-60 cell via reactive oxygen species-mediated p38 MAPK/JNK pathway. *Eur J Pharmacol* **648**, 31-38.
5. Choi, C. Y., Kim, J. Y., Kim, Y. S., Chung, Y. C., Seo, J. K. and Jeong, H. G. 2001. Aqueous extract isolated from *platycodon grandiflorum* elicits the release of nitric oxide and tumor necrosis factor- α from murine macrophages. *Int Immunopharmacol* **1**, 1141-1151.
6. Donovan, M. and Cotter, T. G. 2004. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta* **1644**, 133-47.
7. Ghobrial, I. M., Witzig, T. E. and Adjei, A. A. 2005. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin* **55**, 178-194.
8. Gilliland, D. G., Jordan, C. T. and Felix, C. A. 2004. The molecular basis of leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 80-97.
9. 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.
10. Holcik, M., Gibson, H. and Korneluk, R. G. 2001. XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis* **6**, 253-261.
11. Hussein, M. R., Haemel, A. K. and Wood, G. S. 2003. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. *J Pathol* **199**, 275-288.
12. Jin, Z. and El-Deiry, W. S. 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* **4**, 139-163.
13. 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.
14. Khan, N., Adhami, V. M. and Mukhtar, H. 2008. Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of cancer. *Biochem Pharmacol* **76**, 1333-1339.
 15. Konishi, T., Tada, A., Shoji, J. and Tanaka, O. 1976. The structures of platycodin A and C, monoacetylated saponins of the roots of *Platycodon grandiflorum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **26**, 668-670.
 16. 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.
 17. Lee, H., Kang, R., Kim, Y. S., Chung, S. I. and Yoon, Y. 2010. Platycodin D inhibits adipogenesis of 3T3 L1 cells by modulating kruppel like factor 2 and peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Phytother Res* **24**, 161-167.
 18. Meiler, J. and Schuler, M. 2006. Therapeutic targeting of apoptotic pathways in cancer. *Curr Drug Targets* **7**, 1361-1369.
 19. Okada, H. and Mak, T. W. 2004. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* **4**, 592-603.
 20. Salvesen, G. S. and Duckett, C. S. 2002. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 401-410.
 21. Tada, A., Kanejwa, Y., Shoji, J. and Shibata, S. 1975. Studies on the saponins of the root of *Platycodon grandiflorum* A, De Can dolle. I. Isolation and the structure of platycodin D. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **23**, 2965-2972.
 22. Wang, C., Schuller Levis, G. B., Lee, E. B., Levis, W. R., Lee, D. W., Kim, B. S., Park, S. Y. and Park, E. 2004. Platycodin D and D3 isolated from the root of *Platycodon grandiflorum* modulate the production of nitric oxide and secretion of TNF- α in activated RAW 264.7 cells. *Int Immunopharmacol* **4**, 1039-1049.
 23. Zhao, H. L., Cho, K. H., Ha, Y. W., Jeong, T. S., Lee, W. S. and Kim, Y. S. 2006. Cholesterol-lowering effect of platycodin D in hypercholesterolemic ICR mice. *Eur J Pharmacol* **537**, 166-173.

초록 : 도라지 유래 사포닌 platycodin D에 의한 인체 백혈병세포의 apoptosis 유도

박상은¹ · 이수영¹ · 신동역² · 정진우^{2,4} · 진명호¹ · 박선영¹ · 정운호⁵ · 황혜진^{3,4} · 홍상훈¹ · 최영현^{2,4,*}

(동의대학교 한의과대학 ¹내과학교실 및 ²생화학교실, ³생활과학대학 식품영양학과, ⁴항노화연구소 및 Blue-Bio 소재개발센터, ⁵쥬덕산 B&F)

Platycodin D는 도라지(*Platycodon grandiflorum*)의 뿌리인 길경(Platycodi Radix)에 함유된 은 triterpene saponin의 일종으로 다양한 약리효능이 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 다양한 암세포 중 platycodin D의 항암활성 감수성이 가장 높았던 인체 혈구암 U937 세포를 대상으로 platycodin D 처리에 따른 apoptosis 유발 기전에 대하여 조사하였다. 본 연구의 결과에 의하면 U937 세포에서 platycodin D 처리에 의한 증식억제는 apoptosis 유발과 밀접한 연관이 있음을 알 수 있었다. 이러한 platycodin D에 의한 apoptosis 유발은 pro-apoptotic Bax의 발현 증가와 연관된 미토콘드리아 막 전위의 소실 및 caspase-3의 활성화와 기질단백질들의 분해에 의한 것임을 알 수 있었으며, IAP family 인자들의 발현 감소가 caspase의 활성 증가에도 영향을 미친 것으로 추정된다. 또한 z-DEVD-fmk 선처리에 의하여 platycodin D에 의하여 유발된 apoptosis가 유의적으로 억제되었기에, platycodin D 처리에 의하여 유발되는 apoptosis는 미토콘드리아 경로에 의하여 조절되며, caspase-3의 활성화가 핵심적인 역할을 한 것으로 생각된다.