

Induction of Apoptosis and G2/M Cell Cycle Arrest by Cordycepin in Human Prostate Carcinoma LNCap Cells

Hye Hyeon Lee¹, Won Deok Hwang², Jin-Woo Jeong³, Cheol Park⁴, Min Ho Han^{5,6}, Su Hyun Hong⁵, Yong Kee Jeong¹ and Yung Hyun Choi^{5,6*}

¹Department of Biotechnology, College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

²Department of Internal Medicine, Dongeui University College of Oriental Medicine, Busan 614-052, Korea

³Center for Core Research Facilities, Daegu-Gyeongbuk Institute of Science & Technology, Daegu 711-873, Korea

⁴Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Dongeui University, Busan 614-714, Korea

⁵Department of Biochemistry, Dongeui University College of Oriental Medicine, Busan 614-052, Korea

⁶Anti-Aging Research Center & Blue-Bio Industry RIC, Dongeui University, Busan 614-714, Korea

Received November 17, 2013 / Revised December 17, 2013 / Accepted December 19, 2013

Cordycepin, an active component originally isolated from the traditional medicine *Cordyceps militaris*, is a derivative of the nucleoside adenosine, which has been shown to possess a number of pharmacological properties, including antioxidant and anti-inflammatory activities, immunological stimulation, and antitumor effects. This study was conducted on cultured human prostate carcinoma LNCap cells to elucidate the possible mechanisms by which cordycepin exerts its anticancer activity, which, until now, has remained poorly understood. Cordycepin treatment of LNCap cells resulted in dose-dependent inhibition of cell growth and the induction of apoptotic cell death as detected by a MTT assay, cleavage of poly ADP-ribose polymerase, and annexin V-FITC staining. Flow cytometric analysis revealed that cordycepin resulted in G2/M arrest in cell cycle progression and downregulation of cyclin B1 and cyclin A expression in a concentration-dependent manner. Moreover, the incubation of cells with cordycepin caused a striking induction in the expression of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p21Waf1/Cip1 without affecting the expression of the tumor suppressor p53. It also resulted in a significant increase in the binding of CDK2 and CDC2 to p21. These findings suggest that cordycepin-induced G2/M arrest and apoptosis in human prostate carcinoma cells is mediated through p53-independent upregulation of the CDK inhibitor p21.

Key words : Apoptosis, cordycepin, G2/M arrest, p21, prostate carcinoma LNCap cells

서 론

Cordycepin (3'-deoxyadenosine)은 전통 동양의학에서 오랜 동안 다양한 질환의 치료 목적으로 사용되어온 *Cordyceps* genus에 속하는 *Cordyceps militaris*에서 처음 분리된 nucleoside adenosine 유도체의 일종이다[21, 29]. Cordycepin은 ribose moiety의 3' 부분에 산소가 결여된 구조적인 특징을 가지고 있으며, 이는 RNA 합성과정에 삽입됨으로써 RNA 사슬의 연장을 차단시키는 효과를 가진다[18, 26]. 최근 cordycepin은 강력한 항산화[23, 28], 면역증강[10, 30] 및 항염증[7, 12, 13, 24, 25] 효능 등이 있는 것으로 보고 되었다. 또한 cordycepin은 다양한 암세포들의 증식을 효율적으로 차단함[3, 4, 18, 19]

이 밝혀지면서 암 화학요법제로서의 개발 가능성을 보여주고 있다. 최근 본 연구실의 결과에 의하면, cordycepin에 의한 암 세포의 증식억제는 reactive oxygen species (ROS) 생성 의존적 apoptosis와 연관이 있음을 알 수 있었으며[9, 16], cordycepin의 암세포 이동 및 침윤성 억제에는 phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/Akt 경로 활성의 억제 또한 중요한 역할을 함을 알 수 있었고[8], TRAIL 저항성을 극복하기 위한 새로운 항암제로서의 가능성이 있음을 보고한 바도 있다[15].

한편 cordycepin의 항암활성과 관련된 세포주기 조절 측면에서의 결과들에 의하면, 인체 방광암세포나 대장암세포에서 cordycepin은 G2/M arrest를 유발시킨다고 보고된 바 있으나[14, 17], 혈관 평활근세포에서는 G1 arrest가 유발되는 것으로 나타났다[11]. 이러한 cordycepin에 의한 세포주기 arrest 현상의 서로 다른 현상에서 G2/M arrest 유발에는 cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor인 p21Waf1/Cip1의 발현 증가가[14, 17], G1 arrest에서는 p27의 발현 증가가 중요한 역할을 하고 있었다[11]. 하지만 cordycepin에 의한 세포주기 G2/M arrest가 암세포 특징적인 현상인지는 확실하지 않다. 따라서 본 연구에서는 cordycepin에 의한 세포주기 조절에 대한 추가

*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.

적인 결과를 얻기 위하여 인체 전립선암세포 모델에서 cordycepin에 의한 항암활성과 연관된 세포주기 조절 측면의 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 MTT assay

본 연구에 사용된 LNCap 세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 이들 세포는 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) 및 1% penicillin - streptomycin이 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. Cordycepin은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 증류수에 1 mg/ml 농도로 녹여 적정 농도로 희석하여 처리하였다. LNCap 세포의 증식에 미치는 cordycepin의 영향을 조사하기 위해서는 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich)가 미토콘드리아 효소에 의하여 MTT-formazan을 형성하는 원리에 기반을 둔 MTT assay를 이용하여 조사하였다.

Flow cytometry를 이용한 세포주기 변화 분석

Cordycepin 처리에 따른 LNCap 세포의 증식억제가 세포주기 빈도에 어떤 영향을 주는지를 정량적으로 분석하기 위하여 정상 및 cordycepin이 48시간 동안 처리된 세포들을 모은 다음 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.

Flow cytometry를 이용한 apoptosis 정량화

Cordycepin 처리에 의해 유발된 apoptosis의 정도를 정량적으로 분석하기 위하여 정상 및 cordycepin이 48시간 동안 처리된 세포들을 annexin V binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl and 2.5 mM CaCl₂)에 부유시킨 후 annexin V fluorescein isothiocyanate (FITC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 및 propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich)를 첨가하여 암실에서 15분 동안 반응을 시켰다. 반응시킨 세포를 35-mm mesh를 이용하여 단일세포로 분리한 후 FACSCalibur를 적용시켜 apoptosis가 유발된 세포(V⁺/PI)의 빈도를 측정하였다.

단백질의 분리, immunoprecipitation 및 Western blot analysis

단백질 발현 변화 분석을 위한 총 단백질은 25 mM Tris - Cl

(pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM ethylenediaminetetra acetic acid, 1% nonidet P-40, 0.1 mM sodium orthovanadate, 2 µg/ml leupeptin 및 100 µg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride가 함유된 lysis buffer를 이용하여 분리하였다. 분리된 단백질들의 농도를 측정 후, Western blot analysis를 위해 동량의 단백질들을 sodium dodecyl sulfate (SDS) - polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 분리하고 nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA)으로 전이시켰다. 각각의 membrane을 적정 항체 및 enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Corp., Arlington Heights, IL, USA) 용액을 이용하여 단백질들의 발현 변화를 조사하였다. 아울러 p21과 CDKs 단백질들과의 결합 여부 확인을 위한 immunoprecipitation을 위해서, 500 µg의 단백질을 4°C에서 CDK2 및 CDC2 항체와 면역 반응을 1시간 동안 시킨 다음, immunocomplex를 protein G/A-Sepharose beads (Sigma-Aldrich)를 이용하여 준비한 후, 이를 Western blot analysis에 사용하였다. 본 실험에 사용된 1차 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며, 2차 항체들은 Amersham Corp.에서 구입하였다.

통계 처리

모든 실험결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였고 SigmaPlot (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA)을 이용하여 Student *t*-test를 이용하여 통계적 유의성을 얻었다.

결 과

Cordycepin에 의한 LNCap 세포의 증식억제 및 형태변화

Cordycepin이 LNCap 세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해 cordycepin을 농도 별로 48시간 처리하여 배양한 후 MTT assay를 이용하여 세포 증식억제의 정도를 확인하였다. Fig. 1A에서 보이는 바와 같이 cordycepin의 처리 농도 의존적으로 LNCap 세포의 증식이 억제되었다. 또한 cordycepin 처리에 따라 세포의 밀도가 농도 의존적으로 현저히 감소하는 것을 확인하였으며, 분지형성 및 부착력 상실 등을 포함한 다양한 세포의 형태 변화가 동반되었다(Fig. 1B).

Cordycepin 처리에 의한 LNCap 세포의 G2/M arrest 유발

이상에서 관찰된 cordycepin에 의한 LNCap 세포의 증식억제효과가 세포주기 진행에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기 위해 flow cytometer를 이용하여 분석하였다. Fig. 1C에 나타난 결과처럼, cordycepin의 처리 농도가 증가 할수록 G2/M기에 해당되는 세포의 빈도가 매우 증가하였다. 이는 cordycepin에 의한 LNCap 세포의 증식억제가 G2/M 세포주

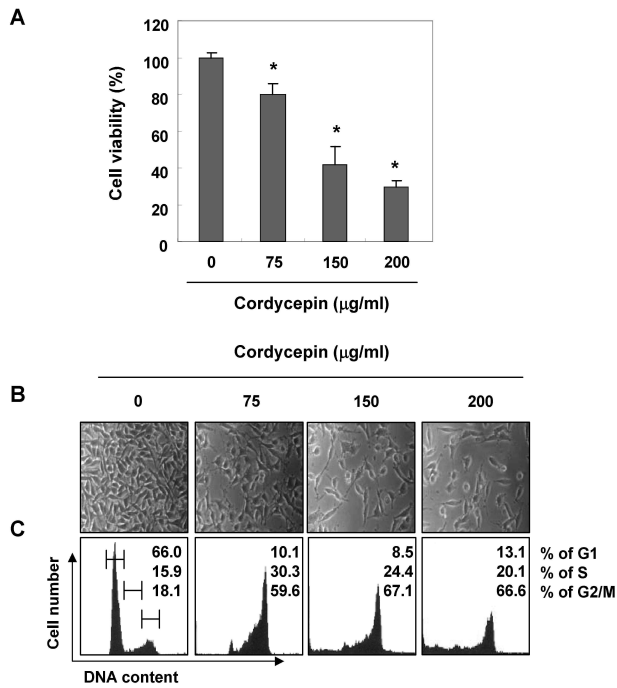


Fig. 1. Cordycepin inhibits cell viability and induces G2/M arrest in LNCap cells. (A) Cells were treated with the indicated concentrations of cordycepin for 48 hr. Cell viability was determined by MTT assay. The data is expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. The significance was determined by the Student's t-test (*, $p < 0.05$ vs. untreated control). (B) After treatment with cordycepin for 48 hr, the morphological changes of cells were imaged using an inverted microscope (original magnification, $\times 200$, upper panels). (C) The cells were harvested and 10,000 events were analyzed for each sample. DNA content is represented on the x-axis and the number of cells counted is represented on the y-axis. Each point represents the mean of two independent experiments.

기 억제를 통해 이루어짐을 의미하는 결과이다.

Cordycepin 처리에 의한 LNCap 세포의 apoptosis 유발

Cordycepin에 의한 LNCap 세포의 G2/M arrest를 통한 증식억제가 apoptosis 유발과 연관성이 있는지를 조사하였다 이를 위하여, apoptosis가 일어났을 경우 활성화된 caspase-3에 의하여 분해가 일어나는 apoptosis의 대표적인 표지 단백질인 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)의 단편화[27] 여부를 조사한 결과, Fig. 2A에서 알 수 있듯이 cordycepin 처리 농도의 증가에 따라 PARP의 단편화 현상이 뚜렷하게 증가되었다. 또한 cordycepin에 의한 apoptosis 유발 정도의 정량화를 위하여 Annexin V 염색을 통한 apoptosis가 일어난 세포의 빈도를 측정된 결과, Fig. 2B에 나타난 바와 같이 cordycepin 처리 농도의 증가에 따라 apoptosis 유발 빈도의 유의적인 증가를 확

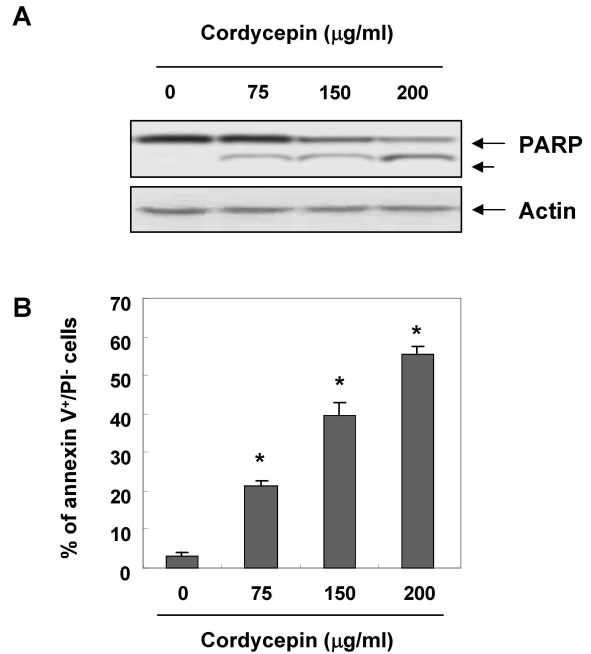


Fig. 2. Induction of apoptosis by cordycepin in LNCap cells. (A) After treatment with various concentrations of cordycepin for 48 hr, the total cell lysates were prepared and separated by electrophoresis on an 8% SDS - polyacrylamide gel. Western blotting was then performed using anti-PARP antibody. Actin was used as an internal control. (B) To quantify the degree of apoptosis induced by cordycepin, the cells were stained with annexin-V/PI and the percentages of apoptotic cells were then analyzed using flow cytometric analysis. Each point represents the mean \pm SD of three independent experiments. Significance was determined using Student's t-test (*, $p < 0.05$ vs. untreated control).

인할 수 있었다. 이상의 결과는 cordycepin에 의한 LNCap 세포의 G2/M arrest를 동반한 증식억제가 apoptosis 유발과 연관되었음을 의미한다.

LNCap 세포의 G2/M기 조절 단백질의 발현에 미치는 cordycepin의 영향

이상에서 관찰된 cordycepin 처리에 의한 G2/M arrest 유발에 관련된 기전 조사를 위하여 G2/M기를 중심으로 한 주요 세포주기 조절인자들의 단백질 발현 변화를 조사하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 cordycepin 처리에 의해 세포주기 양성 조절 인자인 cyclin A 및 cyclin B1의 발현이 다소 감소되었지만, cyclin 단백질들과 결합하여 세포주기에 조절에 중요한 역할을 하는 CDKs인 CDK2 및 CDC2의 발현에는 큰 차이가 없었으며, CDC2의 인산화뿐만 아니라, Cdc25C의 인산화에서도 뚜렷한 차이점이 관찰되지 않았다.

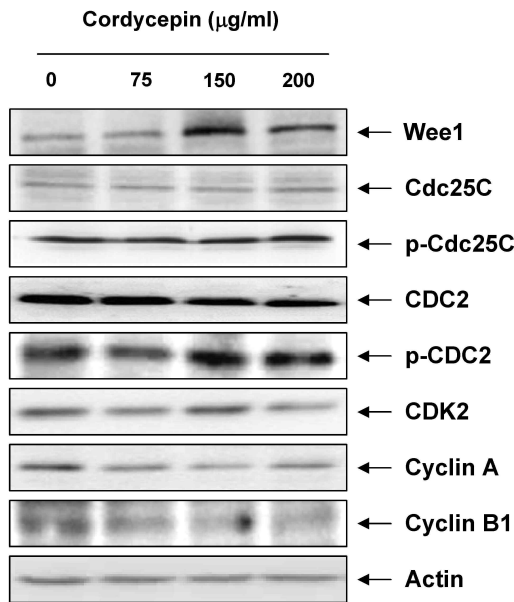


Fig. 3. Effects of cordycepin on the levels of G2/M-associated regulators in LNCap cells. (A) After treatment with various concentrations of cordycepin for 48 h, cell lysates were prepared and equal amounts of total cell lysates were subjected to SDS-polyacrylamide gels, transferred, and probed with the indicated antibodies. Actin was used as an internal control.

LNCap 세포의 p53 및 p21의 발현에 미치는 cordycepin의 영향

다음은 cyclin/CDKs 복합체와의 결합을 통한 cyclin/CDKs 활성 억제인자이면서 광범위한 세포주기 진행의 음성 조절인자에 해당되는 p21의 발현 및 p21의 조절인자로 알려진 종양억제유전자 p53의 발현에 미치는 cordycepin의 영향을 조사하였다. Fig. 4A에 나타난 바와 같이, cordycepin 처리에 따라 p53의 발현은 큰 변화가 없었으나 75 µg/ml 및 150 µg/ml 처리군에서 p21의 발현이 현저하게 증가되었다. 따라서 cordycepin 처리에 의하여 증가된 p21의 역할을 조사하기 위하여 co-immunoprecipitation 반응을 수행하였다. 이를 위하여 150 µg/ml의 cordycepin이 처리된 세포에서 분리된 단백질을 이용하여 p21과 CDK2 및 CDC2 단백질과의 결합여부를 조사한 결과, cordycepin에 의하여 증가된 p21은 CDK2 및 CDC2과의 복합체를 형성하고 있음을 확인하였다.

고 찰

비록 cordycepin이 다양한 *in vitro* 및 *in vivo* 실험계에서 항산화 작용, 염증 반응의 억제, 암세포에서의 apoptosis 및 autophagy 유발, 암세포 전이 억제 등을 통하여 항암활성을 가진다고 보고된 바 있으나, 세포주기 조절 측면에서의 연구는 상대적으로 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는

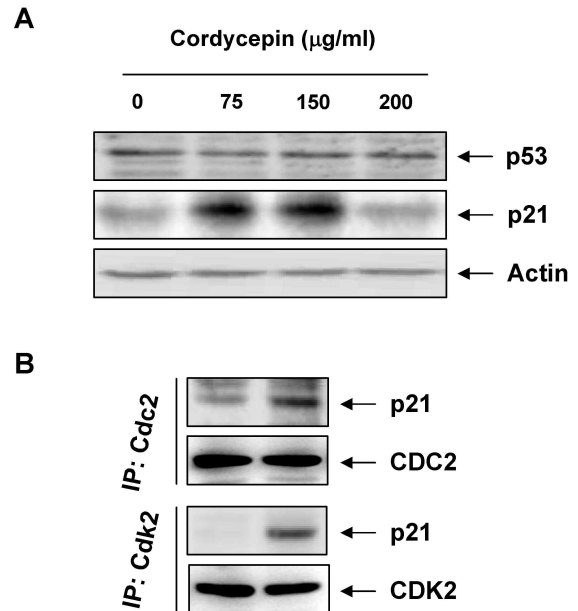


Fig. 4. induction of CDK inhibitor p21 and increased association of p21 with CDKs by cordycepin in LNCap cells. (A) After treatment with the indicated concentrations of cordycepin for 48 h, the total cell lysates were prepared and separated by electrophoresis on a 10% or 12% SDS-polyacrylamide gel. Western blotting was then performed using anti-p53 and anti-p21 antibodies. Actin was used as an internal control. (B) Total cell lysates from cells treated with 150 µg/ml cordycepin were prepared and immunoprecipitated with anti-CDC2 or anti-CDK2 antibody, separated on 12% SDS-polyacrylamide gels, and transferred onto nitrocellulose membranes. Western blots were probed with anti-p21, anti-CDC2 and anti-CDK2 antibodies and an ECL detection system. IP, immunoprecipitation.

LNCap 인체 전립선 암세포 모델에서 암세포의 증식에 미치는 cordycepin의 영향을 세포주기 조절 중심으로 조사하였다.

본 연구를 통하여 얻어진 결과에 의하면, cordycepin은 LNCap 세포에서 G2/M arrest를 유발하였으며, 이는 apoptosis 유발과 연관성이 있었음을 알 수 있었다. Cordycepin 처리에 의한 apoptosis의 유발 여부는 대표적인 apoptosis 유발 biomarker인 PARP의 단편화 및 annexin V의 염색을 통한 정량화 등을 통하여 확인하였다. 세포주기의 G2/M기는 G1기와 함께 세포주기 진행에 중요한 check point로서 세포분열이 시작되기 전 DNA 손상에 대한 복구를 시행하여 세포증식과 분열에 대한 문제를 해결하는 시기이다[5, 20, 22]. 아울러 각각의 세포주기 단계는 다양한 cyclins, CDKs 및 CDK 억제자의 상호 작용에 의하여 조절되는데, 특히 G2기에서 M기로의 전이에는 cyclin A 및 cyclin B의 발현 증가와 연관된 CDK2 및 CDC2의 인산화/탈인산화가 요구되는데, CDC2의 인산화는 Cdc25C의 탈인산화 과정과 Wee1의 인산화를 통하여 조절된

다[1, 6, 22]. 본 연구의 결과에 의하면 cordycepin은 LNCap 세포에서 cyclin A 및 cyclin B의 발현을 다소 억제하였으며, 비록 Wee1의 발현이 증가되었으나, CDK2, CDC2 및 Cdc25C의 발현에는 큰 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 Wee1의 증가와 CDC2의 인산화 변화에 관한 추가적인 연구가 요구된다.

따라서 cordycepin에 의한 G2/M arrest에는 이들 인자들의 발현보다 CDK 억제자에 의한 조절 가능성이 높을 것으로 기대되어, 대표적인 세포주기 진행 억제자에 해당되는 p21의 발현을 조사한 결과, cordycepin 처리에 따른 현저한 증가를 관찰하였다. 또한 cordycepin에 의하여 발현이 증가된 p21 단백질은 CDK2 및 CDC2와 복합체를 형성하고 있음이 확인하였으며, 이는 p21의 발현 증가에 따른 CDK2 및 CDC2의 kinase 활성이 억제되었음을 보여주는 결과이다. 그러나 LNCap 세포가 p53이 정상적으로 존재하는 암세포임[2]에도 불구하고 p53의 발현이 증가되지 않은 것은 cordycepin에 의한 p21의 발현 증가는 p53 비의존적으로 이루어지고 있음을 의미한다. 특히 인체 대장암세포 및 방광암세포에서 cordycepin에 의한 세포주기 G2/M arrest에서도 p21의 발현 증가가 동반되었으며[14, 17], 이 경우에도 p53 비의존적이었음을 고려할 때, cordycepin에 의한 암세포의 증식억제와 연관된 G2/M arrest에는 p53 비의존적 p21의 발현 증가가 중요한 인자로 작용하고 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단(2013 041811 및 2012046358) 및 농림수산식품부(농림, 610003-03-1-SU000)기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Boutros, R., Dozier, C. and Ducommun, B. 2006. The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 185-191.
- Carroll, A. G., Voeller, H. J., Sugars, L. and Gelmann, E. P. 1993. p53 oncogene mutations in three human prostate cancer cell lines. *Prostate* **23**, 123-134.
- Chen, L. S., Stellrecht, C. M. and Gandhi, V. 2008. RNA-directed agent, cordycepin, induces cell death in multiple myeloma cells. *Br J Haematol* **140**, 682-691.
- Choi, S., Lim, M. H., Kim, K. M., Jeon, B. H., Song, W. O. and Kim, T. W. 2011. Cordycepin-induced apoptosis and autophagy in breast cancer cells are independent of the estrogen receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* **257**, 165-173.
- Cuddihy, A. and O'Connell, M. 2003. Cell-cycle responses to DNA damage in G2. *Int Rev Cytol* **222**, 99-140.
- Han, S. J. and Conti, M. 2006. New pathways from PKA to the Cdc2/cyclin B complex in oocytes: Wee1B as a potential PKA substrate. *Cell Cycle* **5**, 227-231.
- Jeong, J. W., Jin, C. Y., Kim, G. Y., Lee, J. D., Park, C., Kim, G. D., Kim, W. J., Jung, W. K., Seo, S. K., Choi, I. W. and Choi, Y. H. 2010. Anti-inflammatory effects of cordycepin *via* suppression of inflammatory mediators in BV2 microglial cells. *Int Immunopharmacol* **10**, 1580-1586.
- Jeong, J. W., Jin, C. Y., Park, C., Han, M. H., Kim, G. Y., Moon, S. K., Kim, C. G., Jeong, Y. K., Kim, W. J., Lee, J. D. and Choi, Y. H. 2012. Inhibition of migration and invasion of LNCaP human prostate carcinoma cells by cordycepin through inactivation of Akt. *Int J Oncol* **40**, 1697-1704.
- Jeong, J. W., Jin, C. Y., Park, C., Hong, S. H., Kim, G. Y., Jeong, Y. K., Lee, J. D., Yoo, Y. H. and Choi, Y. H. 2011. Induction of apoptosis by cordycepin *via* reactive oxygen species generation in human leukemia cells. *Toxicol In Vitro* **25**, 817-824.
- Jeong, M. H., Seo, M. J., Park, J. U., Kang, B. W., Kim, K. S., Lee, J. Y., Kim, G. Y., Kim, J. I., Choi, Y. H., Kim, K. H. and Jeong, Y. K. 2012. Effect of cordycepin purified from *Cordyceps militaris* on Th1 and Th2 cytokines in mouse splenocytes. *J Microbiol Biotechnol* **22**, 1161-1164.
- Jung, S. M., Park, S. S., Kim, W. J. and Moon, S. K. 2012. Ras/ERK1 pathway regulation of p27KIP1-mediated G1-phase cell-cycle arrest in cordycepin-induced inhibition of the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* **681**, 15-22.
- Kim, H. G., Shrestha, B., Lim, S. Y., Yoon, D. H., Chang, W. C., Shin, D. J., Han, S. K., Park, S. M., Park, J. H., Park, H. I., Sung, J. M., Jang, Y., Chung, N., Hwang, K. C. and Kim, T. W. 2006. Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF-kappaB through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells. *Eur J Pharmacol* **545**, 192-199.
- Kondrashov, A., Meijer, H. A., Barthet-Barateig, A., Parker, H. N., Khurshid, A., Tessier, S., Sicard, M., Knox, A. J., Pang, L. and De Moor, C. H. 2012. Inhibition of polyadenylation reduces inflammatory gene induction. *RNA* **18**, 2236-2250.
- Lee, S. J., Moon, G. S., Jung, K. H., Kim, W. J. and Moon, S. K. 2010. c-Jun N-terminal kinase 1 is required for cordycepin-mediated induction of G2/M cell-cycle arrest *via* p21WAF1 expression in human colon cancer cells. *Food Chem Toxicol* **48**, 277-283.
- Lee, H. H., Jeong, J. W., Lee, J. H., Kim, G. Y., Cheong, J., Jeong, Y. K., Yoo, Y. H. and Choi, Y. H. 2013. Cordycepin increases sensitivity of Hep3B human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-mediated apoptosis by inactivating the JNK signaling pathway. *Oncol Rep* doi: 10.3892/or.2013.2589.
- Lee, H. H., Park, C., Jeong, J. W., Kim, M. J., Seo, M. J., Kang, B. W., Park, J. U., Kim, G. Y., Choi, B. T., Choi, Y. H. and Jeong, Y. K. 2013. Apoptosis induction of human prostate carcinoma cells by cordycepin through reactive oxygen species-mediated mitochondrial death pathway. *Int J Oncol* **42**, 1036-1044.
- Lee, S. J., Kim, S. K., Choi, W. S., Kim, W. J. and Moon, S. K. 2009. Cordycepin causes p21WAF1-mediated G2/M cell-cycle arrest by regulating c-Jun N-terminal kinase activation in human bladder cancer cells. *Arch Biochem Biophys*

- 490, 103-109.
18. Müller, W. E., Seibert, G., Beyer, R., Breter, H. J., Maidhof, A. and Zahn, R. K. 1977. Effect of cordycepin on nucleic acid metabolism in L5178Y cells and on nucleic acid-synthesizing enzyme systems. *Cancer Res* **37**, 3824-3833.
 19. Nakamura, K., Yoshikawa, N., Yamaguchi, Y., Kagota, S., Shinozuka, K. and Kunitomo, M. 2006. Antitumor effect of cordycepin (3'-deoxyadenosine) on mouse melanoma and lung carcinoma cells involves adenosine A3 receptor stimulation. *Anticancer Res* **26**, 43-47.
 20. Niida, H. and Nakanishi, M. 2006. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* **21**, 3-9.
 21. Paterson, R. R. 2008. Cordyceps: a traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory?. *Phytochemistry* **69**, 1469-1495.
 22. Raleigh, J. M. and O'Connell, M. J. 2000. The G(2) DNA damage checkpoint targets both Wee1 and Cdc25. *J Cell Sci* **113**, 1727-1736.
 23. Ramesh, T., Yoo, S. K., Kim, S. W., Hwang, S. Y., Sohn, S. H., Kim, I. W. and Kim, S. K. 2012. Cordycepin (3'-deoxyadenosine) attenuates age-related oxidative stress and ameliorates antioxidant capacity in rats. *Exp Gerontol* **47**, 979-987.
 24. Ren, Z., Cui, J., Huo, Z., Xue, J., Cui, H., Luo, B., Jiang, L. and Yang, R. 2012. Cordycepin suppresses TNF- α -induced NF- κ B activation by reducing p65 transcriptional activity, inhibiting I κ B α phosphorylation, and blocking IKK γ ubiquitination. *Int Immunopharmacol* **14**, 698-703.
 25. Shin, S., Lee, S., Kwon, J., Moon, S., Lee, S., Lee, C. K., Cho, K., Ha, N. J. and Kim, K. 2009. Cordycepin suppresses expression of diabetes regulating genes by inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammation in macrophages. *Immune Netw* **9**, 98-105.
 26. Siev, M., Weinberg, R. and Penman, S. 1969. The selective interruption of nucleolar RNA synthesis in HeLa cells by cordycepin. *J Cell Biol* **41**, 510-520.
 27. Tewari, M., Quan, L. T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D. R., Poirier, G. G., Salvesen, G. S. and Dixit, V. M. 1995. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* **81**, 801-809.
 28. Xiao, L., Ge, Y., Sun, L., Xu, X., Xie, P., Zhan, M., Wang, M., Dong, Z., Li, J., Duan, S., Liu, F. and Xiao, P. 2012. Cordycepin inhibits albumin-induced epithelial-mesenchymal transition of renal tubular epithelial cells by reducing reactive oxygen species production. *Free Radic Res* **46**, 174-183.
 29. Yue, K., Ye, M., Zhou, Z., Sun, W. and Lin, X. 2013. The genus *Cordyceps*: a chemical and pharmacological review. *J Pharm Pharmacol* **65**, 474-493.
 30. Zhou, X., Luo, L., Dressel, W., Shadier, G., Krumbiegel, D., Schmidtke, P., Zepp, F. and Meyer, C. U. 2008. Cordycepin is an immunoregulatory active ingredient of *Cordyceps sinensis*. *Am J Chin Med* **36**, 967-980.

초록 : Cordycepin에 의한 LNCap 인체 전립선 암세포의 apoptosis 및 G2/M arrest 유발

이혜현¹ · 황원덕² · 정진우³ · 박 철⁴ · 한민호^{5,6} · 홍수현⁵ · 정영기¹ · 최영현^{5,6}*

(¹동아대학교 생명자원과학대학 생명공학과, ²동의대학교 한의과대학 내과학교실, ³대구경북과학기술원 중앙기기센터, ⁴동의대학교 자연과학대학 분자생물학과, ⁵동의대학교 한의과대학 생화학교실, ⁶동의대학교 항노화연구소 및 블루바이오소재개발센터)

Cordycepin은 *Cordyceps militaris*에서 처음 유래된 nucleoside adenosine 유도체의 일종으로 면역증강 및 항암 활성을 포함한 다양한 약리 기능이 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 LNCap 인체 전립선 암세포 모델을 이용하여 cordycepin에 의한 항암활성 기전을 연구하였다. Cordycepin 처리에 따라 LNCap 세포는 처리 농도 의존적으로 증식이 억제되었으며, 이는 apoptosis 유발과 연관성이 있음을 poly ADP-ribose polymerase의 단편화 현상과 Annexin V 염색에 의한 정량적 분석으로 확인하였다. Cordycepin 처리에 따른 flow cytometric analysis 결과로서 cordycepin이 세포주기 G2/M기 정체 현상을 유발하였음을 알 수 있었으며, 이는 cyclin B1 및 cyclin A의 발현 감소와 연관성이 있었다. 또한 cordycepin이 처리된 LNCap 세포에서 cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p21Waf1/Cip1의 발현이 증가되었지만, CDK2, CDC2 및 Cdc25C의 발현에는 큰 영향을 미치지 않았으며, cordycepin에 의하여 증가된 p21 단백질은 CDK2 및 CDC2와의 복합체를 형성하고 있었다. 본 연구의 결과는 LNCap 전립선 암세포에서 cordycepin에 의한 G2/M 및 apoptosis 유발은 p53 비존속적인 CDK inhibitor p21의 발현 증가가 중요한 역할을 하고 있음을 보여주는 것이다.