ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science 2015 Vol. 25. No. 1. 93~100 DOI : http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2015.25.1.93

- Note -

Induction of Apoptosis by Pachymic Acid in T24 Human Bladder Cancer Cells

Jin-Woo Jeong[1], Jun Young Baek[3], Kwang Dong Kim[1,2], Yung Hyun Choi[4,5] and Jae-Dong Lee[3]*

[1]*Division of Applied Life Science (BK21 Plus), Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea*
[2]*PMBBRC, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea*
[3]*Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan 609-735, Korea*
[4]*Department of Biochemistry, Dong-Eui University College of Korean Medicine, Busan 614-052, Korea*
[5]*Anti-Aging Research Center & Blue-Bio Industry RIC, Dongeui University, Busan 614-714, Korea*

Received October 16, 2014 / Revised December 5, 2014 / Accepted January 8, 2015

Pachymic acid (PA) is a lanostane-type triterpenoid derived from the *Poria cocos* mushroom. Several beneficial biological features of PA provide medicine with a wide variety of valuable effects, such as anticancer and anti-inflammatory activity; it also has antioxidant effects against oxidative stress. Nonetheless, the biological properties and mechanisms that produce this anti-cancer action of PA remain largely undetermined. In this study, we investigated the pro-apoptotic effects of PA in T24 human bladder cancer cells. It was found that PA could inhibit the cell growth of T24 cells in a dose-dependent manner, which was associated with the induction of apoptotic cell death, as evidenced by the formation of apoptotic bodies and chromatin condensation and accumulation of cells in the sub-G1 phase. The induction of apoptotic cell death by PA was connected with an up-regulation of pro-apoptotic Bax and Bad protein expression and down-regulation of anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-xL proteins, and inhibition of apoptosis family proteins. In addition, apoptosis-inducing concentrations of PA induced the activation of caspase-9, an initiator caspase of the mitochondrial-mediated intrinsic pathway, and caspase-3, accompanied by proteolytic degradation of poly (ADP-ribose)-polymerase. PA also induced apoptosis *via* a death receptor-mediated extrinsic pathway by caspase-8 activation, resulting in the truncation of Bid and suggesting the existence of cross-talk between the extrinsic and intrinsic pathways. Taken together, the present results suggest that PA may be a potential chemotherapeutic agent for the control of human bladder cancer cells.

Key words : Apoptosis, bladder cancer cells, caspase, pachymic acid (PA), tBid

서 론

방광암은 비뇨기계에서 발생하는 암 중 전립선암 다음으로 가장 흔한 종양이다. 최근 통계에 의하면 연령이 증가함에 따라 방광암 발병률이 높아지며, 남성의 경우 방광암이 여성에 비해 3-4배 더 많이 발생하는 것으로 알려져 있다[10]. 방광암은 수술 후에도 재발 확률이 높은 것으로 알려져 있어[19, 24] 방광암의 치료에 보다 효과적인 생리활성을 갖는 물질을 발굴하고 그와 관련된 분자 및 세포수준에서의 기전을 밝히는 것이 중요하다고 할 수 있다.

항암치료의 전략은 다양한 기전을 통하여 암세포의 분열과 성장을 억제하고 선택적으로 암 세포를 제거하는데 있다. 특히 세포자가사멸 기전으로 알려진 apoptosis는 죽음 수용체 (death receptor, DR)를 매개하는 외인적 경로(extrinsic pathway)와 mitochondria를 매개하는 내인적 경로(intrinsic pathway)로 구분 되어진다. Extrinsic pathway의 경우에는 세포막에 존재하는 DR에 특정 ligand가 결합함으로써 initiator caspase인 caspase-8의 활성화를 유발하며, 활성화된 caspase-8은 effector caspase인 caspase-3를 직접적으로 활성화 시킴으로써 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)과 같은 기질 단백질들의 분해를 동반한 DNA 단편화 등을 유발함으로써 apoptosis를 유발한다[9, 12]. 하지만 어떤 조건에서는 활성화된 caspase-8이 직접적으로 caspase-3를 활성화 시키는 것이 아니라 Bcl-2 homology 3 (BH3)-only protein인 Bid의 단편화를 통해 intrinsic pathway를 경유하여 apoptosis를 유발하기도 한다[15, 18]. 반면 intrinsic pathway는 mitochondrial dysfunction과 연관이 있으며, 이는 caspase-9의 활성에 의한 caspase-3의 활성과 연계되어 있다[6, 16]. 이러한 두 경로의 주요 조절인자인 caspase 효소들은 inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) family에 속하는 단백질들과의 직접적인 결합을 통하여 그들의 apoptotic 활성이 억제될 수 있다[7, 22].

복령[茯苓, *Poria cocos* (Fr.) Wolf]은 담자균아강-다공균목-구멍쟁이버섯과에 속하며 소나무 뿌리 주위에 기생하는 균핵

***Corresponding author**
Tel : +82-51-510-2269, Fax : +82-51-514-1778
E-mail : leejd@pusan.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.

으로 균사가 흰색으로 성장하다가 서로 엉키어 환경 조건의 변화에 의하여 단단한 조직의 균핵을 형성되는데, 이 균핵의 내부 색깔에 따라 백복령과 적복령으로 구분된다[1, 13, 17]. 복령의 주요 생리활성 성분은 pachymic acid로 대표되는 lanostane type의 triterpene계 화합물이며, 그 동족체로서 tumulosic acid, eburicoic acid, dehydropachymic acid, poricoic acid 등이 보고되어 있다[25, 26]. 최근 연구에 의하면 pachymic acid은 항염증 및 항산화 효과[5, 28, 29] 뿐만 아니라, 암세포의 신생혈관 생성 억제, 세포주기 억제 및 apoptosis 유발 등과 같은 항암활성을 가지는 것으로 보고 되어지고 있다[4, 8, 14]. 하지만 pachymic acid에 의해 유발하는 항암활성 작용 및 그에 따른 분자생물학적 기전에 대해서는 명확히 밝혀져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 복령 유래의 pachymic acid가 인체 방광암세포 T24에 미치는 항암 효과의 생화학적 기전의 해석을 위하여 T24 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하였고, pachymic acid가 유발하는 증식억제 현상이 apoptosis에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하여 유의적인 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바 이다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용된 pachymic acid는 Nagara Science Co., Ltd. (Gifu, Japan)에서 구입하였으며 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)에 20 mM 농도로 녹여 사용하였다. 암세포의 증식억제 정도를 측정 하기 위한 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)와 세포 핵의 형태변화 관찰을 위한 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)은 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하였다. 단백질 분석을 위하여 사용된 actin, Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bad, Bid, XIAP, cIAP-1, cIAP-2, caspase-3, -8, -9 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 Co. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다. Caspase의 *in vitro* 활성 측정을 위한 colorimetric assay kit는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. 세포주기 분석을 위하여 사용된 CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit는 Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)에서 구입하였다.

세포 배양, MTT assay 및 trypan blue assay

실험에 사용한 T24 세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 분주 받아 10%의 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS), 1%의 penicillin 및 streptomycin이 포함된 RPMI-1640 배지(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. Pachymic acid 처리에 따른 세포 증식 억제 정도를 측정하기 위하여 6-well plate에 T24 세포를 well당 3×10^5개를 분주하고 pachymic acid를 적정 농도로 처리하여 배양하였다. 그 후 MTT 시약을 0.5 mg/ml 농도가 되게 처리하여 2시간 동안 배양하고, 배지를 제거한 후 DMSO를 2 ml씩 분주하여 well에 생성된 formazan을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 세포의 생존율을 측정하기 위하여 위와 같은 조건으로 세포를 배양한 후 배지를 제거하고 phosphate-buffered saline (PBS)를 각 well 당 1 ml을 첨가하여 세포를 부유시킨 다음 0.5% trypan blue solution (Gibco-BRL)을 동량으로 첨가하여 2분간 처리하였다. 처리된 sample을 hemocytometer에 적용한 후 도립 현미경(Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 살아있는 세포의 수를 비교하였다.

DAPI staining에 의한 세포 핵의 형태 관찰

Apoptosis가 유발되었을 경우 특이적으로 나타나는 핵의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 pachymic acid가 처리된 세포를 모은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 37% formaldehyde 용액과 PBS를 1:9의 비율로 섞은 fixing solution을 모아진 세포에 500 μl 첨가하여 충분히 섞은 후, 상온에서 10분 동안 고정하였다. 고정된 세포를 2,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 fixing solution을 제거하고 PBS 200 μl에 부유시킨 후 세포가 포함되어 있는 PBS 80 μl를 slide glass 위에 떨어뜨리고 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 (Sigma-Aldrich Co.)을 첨가하여 상온에서 10분간 고정한 후 2.5 μg/ml 농도의 DAPI 용액을 처리하여 상온에서 15분간 염색하였다. 염색이 끝난 후 DAPI 용액을 충분하게 세척하고 mounting solution을 처리한 후 형광 현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 400배의 배율로 각 농도에 따른 암세포 핵의 형태 변화를 관찰하였다.

DNA flow cytometry 분석

Pachymic acid에 의하여 유발된 apoptosis의 정도를 정량적으로 분석하기 위하여 정상 및 pachymic acid가 24시간 동안 처리된 세포들을 모은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거한 후 PBS를 이용하여 2~3회 정도 세척하였다. 준비된 세포는 CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit를 이용하여 고정 및 염색을 하여 4℃, 암실에서 30분 동안 반응을 시켰다. 반응시킨 세포를 35-mm mesh를 이용하여 단일세포로 분리한 후 FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 적용시켜 형광반응에 따른 Cellular DNA con-

tent 및 histogram을 CellQuest software 및 ModiFit LT (Becton Dickinson) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

상기와 동일한 방법으로 처리된 세포에 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenymethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]를 첨가하여 4℃에서 1시간 동안 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 상층액에 있는 total 단백질을 분리하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 정량 한 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 비 특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 1차 항체를 처리하여 상온에서 2시간 이상 또는 4℃에서 over night 시킨 다음 PBS-T로 세척(15분간 1번, 5분간 5번)하고 처리된 1차 항체에 맞는 2차 항체(PBS-T로 1:1,500으로 희석하여 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 반응이 끝난 후 암실에서 enhanced chemiluminoesence (ECL) solution (Amersham Life Science Co.)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 발현 양을 분석하였다.

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

MMP 값의 변화 여부를 조사하기 위하여 dual-emission potential-sensitive probe인 5,5′,6,6′-tetrachloro-1,1′,3,3′-tetraethyl- imidacarbocyanine iodide (JC-1, Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였다. 적정 시간 pachymic acid가 처리된 세포를 모은 후, 10 μM의 JC-1 용액을 이용하여 실온, 암하의 조건에서 염색을 시켰다. 30분 후, JC-1 용약을 제거하고 PBS로 수세한 후 FACSCalibur를 이용하여 MMP의 양적 변화를 조사하였다.

In vitro caspase activity 측정

Apoptosis 유발에 있어서 중요한 작용을 하는 것으로 알려진 caspase의 활성 정도가 pachymic acid 처리에 의하여 어떠한 변화를 유발하는지 알아보기 위하여 정상 및 pachymic acid가 처리된 배지에서 24시간 배양된 세포를 모은 뒤 상기와 동일한 방법으로 단백질을 추출하고 정량 하였다. 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 양이 100 μl가 되게 하였다. 여기에 caspase-3에 따른 기질 5 μl를 첨가하여 37℃, 암실에서 3시간 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm의 흡광도를 이용하여 반응의 정도를 측정하였다. 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-9은 Leu-Glu-His-Asp (LEHD)-pNA였다.

통계 처리

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

결 과

Pachymic acid에 의한 방광암 T24 세포의 apoptosis 유발

인체방광암 T24 세포의 증식에 미치는 pachymic acid의 영향을 알아보기 위하여 pachymic acid를 적정농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 hemocytometer counting 및 MTT as-

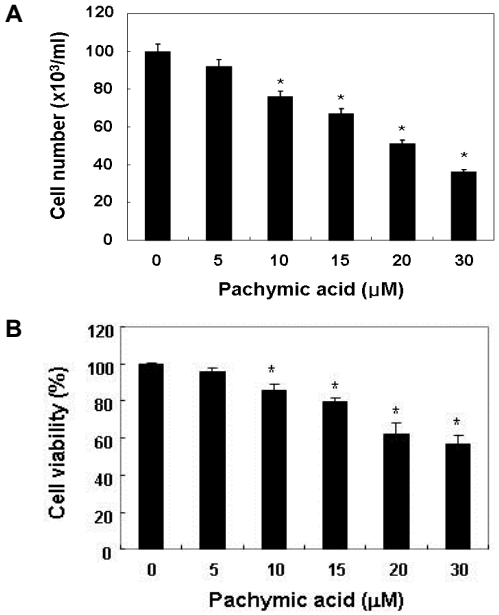

Fig. 1. Inhibition of cell proliferation by pachymic acid in T24 human bladder cancer cells. Cells were seeded in 6 well plate at 3×10^5 cells/ml and treated with the indicated concentrations of pachymic acid for 24 hr. Cell number (A) and viability (B) were measured by the metabolic-dye-based MTT assay and trypan blue assay, respectively. Each point represents the mean ± SD of three independent experiments. The significance was determined by the Student's t-test (*p<0.05 vs. untreated control).

say를 실시하였다. Fig. 1A 및 B에 나타난 바와 같이 pachymic acid는 처리 농도 의존적으로 T24 세포의 생존율의 감소 및 증식 억제 효과를 보여주었다. 아울러 pachymic acid 처리에 의해 유발되는 증식억제가 apoptosis 유발과 직접적인 연관이 있는지를 확인하기 위하여 정상 및 pachymic acid를 적정농도로 처리한 배지에서 24시간 동안 배양된 T24 세포에서 핵의 형태변화 및 sub-G1기 세포의 빈도를 조사하였다. 먼저 Fig. 2A에 나타낸 바와 같이 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DAPI 염색을 실시한 결과, 정상 배지에서 자란 T24 세포에서는 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색되었으나 pachymic acid가 처리된 세포의 경우는 처리 농도의 증가에 따라 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 염색질 응축에 의한 apoptotic body가 관찰되었다. 다음으로 pachymic acid 처리에 따른 apoptosis 유발 정도를 정량적으로 비교 분석하기 위하여 상기와 동일한 조건으로 배양된 T24 세포를 대상으로 flow cytometry를 이용하여 apoptosis가 유발되었을 것으로 예상되는 sub-G1기에 해당하는 세포를 측정한 결과 Fig. 2B에 나타낸 바와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 정상 배지에서 자란 암세포에서의 자연적 apoptosis 유발 빈도는 약 3.7%로 매우 낮았으나 pachymic acid 처리 농도가 증가할수록 sub-G1기의 세포의 빈도가 증가하여 20 μM 처리군에서는 약 24.8%에 해당하는 세포가 sub-G1기로 관찰되었다. 이상의 결과는 pachymic acid 처리에 의한 증식억제가 apoptosis 유발과 밀접한 연관이 있음을 보는 주는 것이다.

Pachymic acid 처리에 따른 Bcl-2 family 인자들의 발현 변화

다음은 apoptosis 유발 조절에 있어서 가장 대표적인 유전자로 알려진 Bcl-2 family 인자들의 발현에 미치는 pachymic acid의 영향을 Western blotting을 이용하여 조사하였다. 그 결과 Bcl-2 family에 속하는 인자들 중, pro-apoptotic 유전자인 Bax 및 Bad의 발현이 pachymic acid 처리 농도 의존적으로 현저하게 증가되었으며, anti-apoptotic 유전자인 Bcl-2와 Bcl-xL의 발현은 현저히 감소되었다. 또한 세포질에 있는 Bid의 경우 caspase-8의 활성화에 의해 truncation이 일어나 tBid로 되면 mitochondria로 이동하여 intrinsic 경로를 증폭시키는 단백질로 알려져 있으며, pachymic acid 처리 시 Bid의 발현이 감소하고 tBid의 발현이 증가하였다(Fig. 3A).

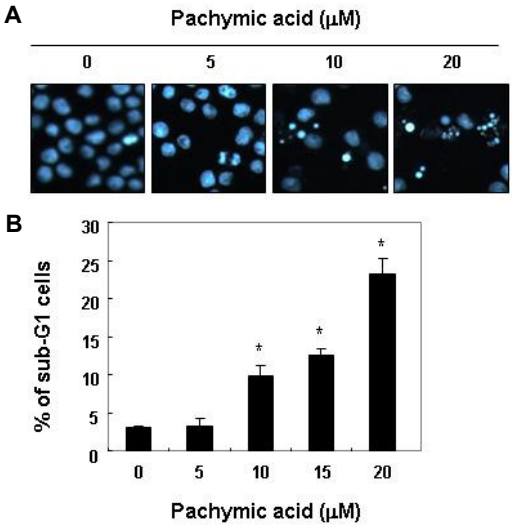

Fig. 2. Induction of apoptosis by pachymic acid treatment in T24 human bladder cancer cells. (A) Cells were treated with the indicated concentrations of pachymic acid for 24 h. The cells were fixed and stained with DAPI solution. The stained nuclei were observed under a fluorescent microscope (original magnification 400×). (B) To quantify the degree of apoptosis induced by pachymic acid, the cells grown under the same conditions as (A) were evaluated for sub-G1 DNA content, which represents the fractions undergoing apoptotic DNA degradation, using a DNA flow cytometer. 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).

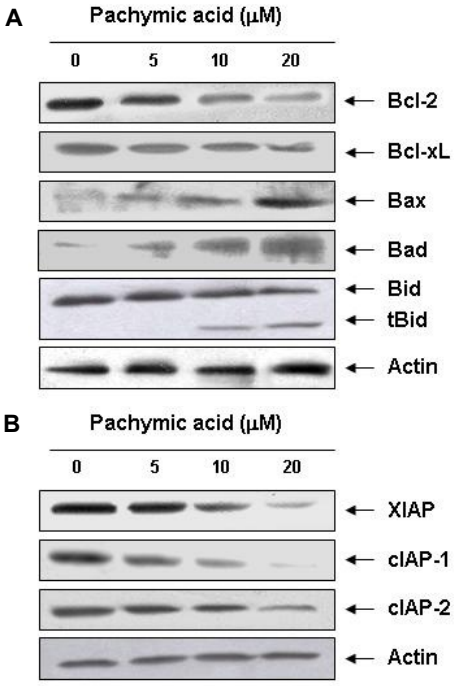

Fig. 3. Effects of pachymic acid on the expression of Bcl-2 and IAP family proteins in T24 human bladder cancer cells. Cells were treated with pachymic acid for 24 hr, and aliquots containing total proteins were subjected to SDS-polyacrylamide gels followed by immunoblot analysis with specific antibodies against Bcl-2 (A) and IAP (B) family proteins, and an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

Pachymic acid 처리에 따른 IAP family 인자들의 발현 변화

다음은 apoptosis 유도에 중심적인 역할을 하는 caspase 단백질들의 활성을 억제하는 IAP family에 속하는 cIAP-1, cIAP-2 및 XIAP의 발현 변화를 Western blotting을 통해 관찰하였으며, 조사된 3가지 IAP family 인자들의 발현이 pachymic acid 처리에 의하여 현저하게 감소되었다(Fig. 3B). 이상의 결과를 살펴볼 때 pachymic acid에 의해 유발되는 apoptosis 과정에는 Bcl-2 및 IAP family 인자들의 발현 변화가 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

MMP 변화에 미치는 pachymic acid의 영향

이상의 결과에서 pachymic acid에 의한 apoptosis의 유발에는 mitochondria의 기능 손상이 연관되었을 것으로 추정되어 mitochondria 활성의 평가로 이용되는 MMP의 값을 JC-1 염색으로 통하여 분석하였다. Fig. 4의 결과에서 알 수 있듯이, pachymic acid의 처리 농도가 증가될수록 mitochondria의 기능이 정상적으로 이루어지고 있음을 보여주는 적형광의 색을 띠는 세포의 수가 감소된 만큼, MMP의 소실을 의미하는 녹형광색을 띠는 세포의 수가 증가되었다. 이는 pachymic acid 처리에 따른 mitochondria 막의 교란 유도가 증가되었음을 보여준 결과이다.

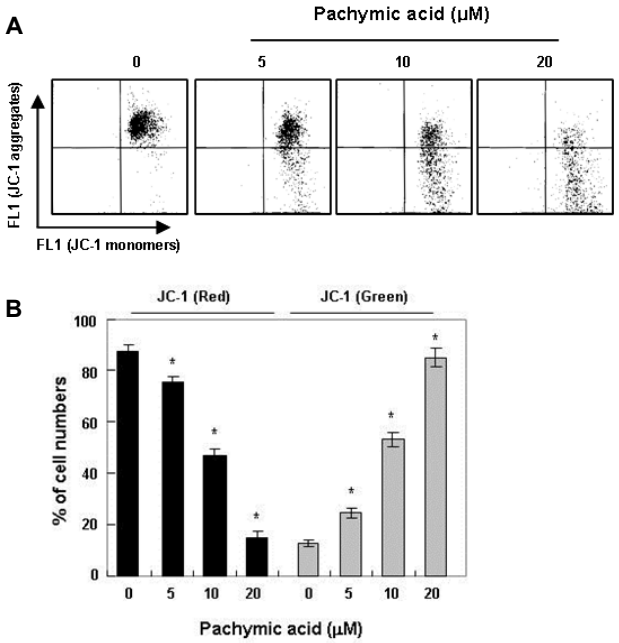

Fig. 4. Effects of pachymic acid on the MMP values in T24 human bladder cancer cells. (A) Cells were treated with pachymic acid for 24 hr, collected and then incubated with JC-1 (10 μM) for 20 min at 37°C in the dark. The cells were then washed once with PBS and analyzed by a flow cytometer. (B) Results 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).

Caspase의 활성 및 기질 단백질의 발현에 미치는 pachymic acid의 영향

Extrinsic 및 intrinsic pathway의 활성화를 통한 apoptosis 유발에는 여러 종류의 caspase가 관여하는 것으로 알려져 있기에, pachymic acid 처리에 의한 apoptosis 유발에 있어서 이들의 활성이 관여하는 지의 여부를 조사하였다. 먼저 caspase의 발현 정도를 확인한 결과, Fig. 5에서 나타난 바와 같이 pachymic acid 처리시 caspase-3, -8 및 -9의 활성형 단백질의 발현이 증가되고 불활성형 단백질의 발현이 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 caspase의 활성 여부를 정량적으로 재확인하기 위하여 *in vitro* caspase 활성을 분석한 결과, pachymic acid 처리에 따라 caspase-3, -8 및 -9의 활성 정도가 대조군과 비교하였을 때 처리 농도 의존적으로 유의적으로 증가되었음을 알 수 있었다(Fig. 6).

한편 활성화된 caspase는 세포의 정상적인 생존에 필수적인 세포 내 주요 단백질들을 분해할 수 있으며, 단편화가 일어난 이들 단백질들은 apoptosis가 유발되었다는 표지인자로서 활용이 된다. 본 연구에서는 대표적인 caspase-3의 기질 단백질에 해당되는 PARP의 발현 변화를 조사하였다. PARP는 정상세포의 DNA 수복이나 유전자 안정성 유지에 중요한 역할을 하며, apoptosis 유발 시 caspase-3에 의해 분해가 일어나면 이러한 회복기능이 상실된다[23]. Fig. 5A에 나타낸 것처럼 pachymic acid 처리 농도의 증가에 따라 PARP 단백질의 단편화가 증가하였으며, pachymic acid 처리에 따른 T24 세포의

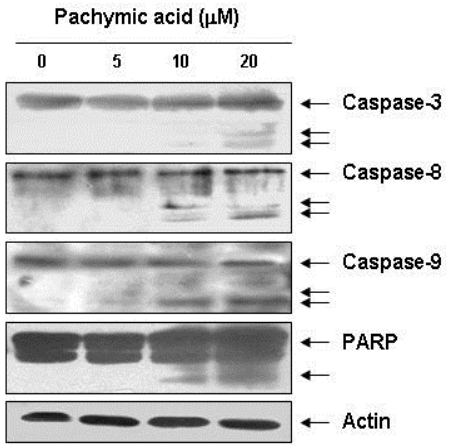

Fig. 5. Effects of pachymic acid on the expression of capases and PARP in T24 human bladder cancer cells. Cells were treated with pachymic acid for 24 hr, and aliquots containing total proteins were subjected to SDS-polyacrylamide gels followed by immunoblot analysis with specific antibodies and an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

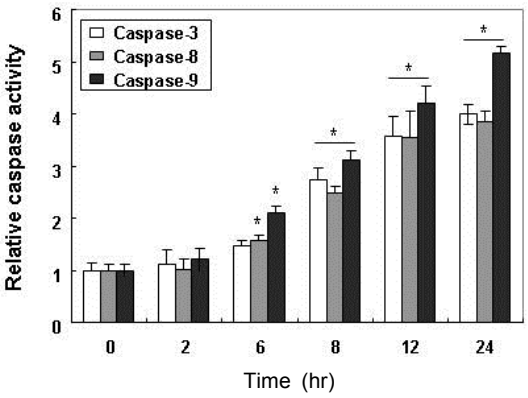

Fig. 6. Activation of caspases by pachymic acid treatment in T24 human bladder cancer cells. Cells were treated with the indicated concentrations of pachymic acid for 24 hr. The cells were lysed, and aliquots (50 μg protein) were assayed for *in vitro* caspase-3, -8 and -9 activity using DEVD-pNA, IETD-pNA and LEHD-pNA as substrates, respectively, at 37°C for 1 hr. The released fluorescent products were measured. The data are expressed as the mean ± SD of three independent experiments. The significance was determined by the Student's t-test (*p<0.05 vs. untreated control).

apoptosis 유발은 caspase-3의 활성을 통한 표적단백질의 단편화에 의하여 이루어지고 있음을 알 수 있었다.

고 찰

본 연구에서는 다양한 약리학적 활성을 가지는 것으로 알려진 pachymic acid의 항암효능을 알아보기 위하여 인체 방광암 세포주인 T24 세포의 생존율 및 증식 억제에 미치는 영향과 이와 연관된 apoptosis 유발 여부 및 관련 인자들의 발현 변화를 조사하였다. 이를 위하여 먼저 pachymic acid의 처리에 따른 증식억제 정도를 조사한 결과, pachymic acid 처리 농도 의존적으로 생존율 및 증식억제 현상이 나타났으며(Fig. 1), pachymic acid의 처리에 의한 암세포 생존율 및 증식의 억제는 apoptosis 유발과 밀접한 연관성이 있을 것으로 기대되어 이에 대한 증거를 제시하기 위하여 암세포의 핵 형태 변화를 관찰한 결과, pachymic acid를 처리하지 않은 암세포에서는 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나 pachymic acid가 처리된 암세포의 경우, pachymic acid 처리 농도 의존적으로 염색질 응축에 의한 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 apoptotic body가 증가 되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2A). 이는 nucleosome의 linker DNA 부분의 절단에 의한 DNA 단편화의 결과이므로 pachymic acid의 처리에 의한 암세포의 증식억제 및 형태적 변형이 암세포의 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음을 시사하여 주는 것으로 사료된다. 아울러 flow cytometry 분석에 의한 apoptosis 유발 세포군에 해당하는 sub-G1기에 속하는 세포들의 빈도 역시 pachymic acid 처리 농도 의존적으로 증가되어 pachymic acid 처리에 따른 암세포의 증식 억제는 apoptosis 유발과 직접적인 연관이 있음을 알 수 있었다(Fig. 2B).

Apoptosis 유발에 있어서 중요한 역할을 하는 Bcl-2 family는 mitochondria 외막에 존재하고 있으며, 네 가지의 Bcl homology (BH) domains (BH1–BH4) 중 최소한 한 개의 domain을 포함하고 있으며 mitochondria 기능 보존과 연관된 apoptosis에 있어서 중요한 역할을 한다. Bcl-2 family에는 Bcl-2 및 Bcl-xL 등과 같은 apoptosis를 억제하는 anti-apoptotic 유전자와 Bax, Bak, Bad, Bim 및 Bid 등과 같은 apoptosis를 유발하는 pro-apoptotic 유전자로 구성되어 있으며, anti-apoptotic 및 pro-apoptotic 유전자들은 dimer의 형태로 결합하여 균형을 이루고 있는 것으로 알려져 있다[11, 20]. 하지만 이들 사이에 균형이 깨어지게 되면 mitochondria 내부로부터 세포질로 cytochrome *c* 등과 같은 apoptosis를 유발하는 물질들이 방출되어 cysteine-related proteases인 caspase 및 DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성이 증가되어 apoptosis가 유발된다[3, 21]. 따라서 본 연구에서는 pachymic acid 처리에 의한 apoptosis 유발에 관여하는 유전자의 탐색을 위하여 apoptosis와 연관성을 가지는 Bcl-2 family에 속하는 유전자의 발현을 조사하였다. 그 결과 pachymic acid 처리 농도 의존적으로 Bax, Bad 및 tBid 단백질의 발현 증가와 더불어 Bcl-2 및 Bcl-xL 단백질의 발현 감소가 관찰되어(Fig. 3A), pachymic acid에 의한 T24 세포의 apoptosis 유발에 Bcl-2 family에 속하는 유전자의 발현의 변동이 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다. 아울러 pachymic acid의 처리에 따른 MMP의 소실은 pachymic acid에 의한 mitochondria 막의 교란이 유발되었음을 의미하는 것으로(Fig. 4) 이러한 MMP 값의 변동은 Bcl-2 family 단백질의 발현 변화에 의한 것이라 추정된다.

한편 apoptosis 조절에 있어서 caspase와 직접적으로 결합하여 활성을 억제하는 것으로 알려진 IAP family는 대부분의 암세포에서 높게 발현이 되어있으므로 암 치료 시 약물에 저항성을 가지는 원인이 되는 것으로 알려져 있다[2]. 현재까지 밝혀진 여덟 종류의 IAP 인자들은 caspase의 ubiquitination 및 degradation을 조절하는 RING finger domain 또는 protein-protein interaction 기능을 하는 caspase-recruitment domain (CARD)을 가지며, 한 개 이상의 baculovirus IAP repeat (BIR) domain을 가지는 것으로 알려져 있다. 특히 이들 중 XIAP는 가장 강력한 IAP로서 대부분의 암세포에서 높은 수준으로 존재하고 있는 것으로 밝혀져 있다[2, 7]. Pachymic acid 처리에 의한 암세포의 apoptosis 유발에 IAP family가 관여하는지의 여부를 조사한 결과, pachymic acid 처리 농도 의존적으로 T24 세포에서 조사된 3가지의 IAP family 단백질 모두의 발현이 감소되었다(Fig. 3B).

Cystein-containing aspartate-specific protease family인

caspase 또한 apoptosis에 의해 유발되는 많은 생화학적 또는 형태적 변화에 있어서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Caspase는 large subunit과 small subunit으로 구성되어 있으며 세포가 정상적으로 성장 및 생존할 때 핵과 mitochondria의 외막에 불활성 상태인 proenzyme 형태로 존재하지만 apoptosis를 유발하는 세포 내/외의 자극에 의하여 활성화되어 표적 단백질들의 분해를 유발한다. 이러한 caspase는 initiator caspase 및 effector caspase로 구분되어지며 특히 effector caspase인 caspase-3의 경우에는 extrinsic pathway에 의하여 활성화된 caspase-8 및 intrinsic pathway에 의하여 활성화된 caspase-9에 의하여 활성화되어 여러 종류의 기질 단백질들을 분해함으로써 apoptosis를 유발하는 중요한 효소로 알려져 있다. Caspase-3의 기질단백질 중 하나인 PARP 단백질은 eukaryotic nuclear enzyme family로서 DNA repair, 유전자 전사, 세포주기 진행, 염색체 기능, genomic stability 및 세포 죽음을 조절하며, caspase-3가 활성화되면 116 kDa의 분자량을 가진 PARP 단백질의 Asp214와 Gly215 사이에서 분해가 일어나서 85 및 24 kDa의 단편으로 proteolytic cleavage가 일어나서 apoptosis 촉진을 위한 효소적 활성을 획득하는 것으로 알려져 있다[23, 27]. 따라서 본 연구에서는 apoptosis에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 caspase-3, -8 및 -9의 발현에 pachymic acid가 어떠한 영향을 미치는 지를 조사한 결과, caspase-3, -8 및 -9의 활성형 단백질 발현 및 정량적 활성 증가를 확인하였으며, caspase-3의 기질단백질인 PARP가 pachymic acid의 처리에 의하여 단편화가 유발되었음을 확인하였다 (Fig. 5 및 6).

이상의 결과에서 pachymic acid는 extrinsic 및 intrinsic apoptosis pathway의 개시에 핵심적인 역할을 하는 caspase-8 및 -9의 활성을 모두 증가시켰으며, 이에 따른 caspase-3의 활성증가에 의하여 apoptosis가 유발되었음을 알 수 있었다. 이러한 두 경로의 동시 활성화에는 mitochondria의 기능 소실과 Bcl-2 및 IAP family의 발현 변화가 관여하고 있었으며, 특히 tBid의 발현 증가는 pachymic acid에 의한 intrinsic pathway를 증폭시키는 효과로 작용했을 것이라 추정된다. 방광암의 치료에 보다 효과적인 생리활성을 갖는 물질을 발굴하고 그와 관련된 분자 및 세포수준에서의 기전을 밝히는 것이 중요하기에 본 연구의 결과는 향후 pachymic acid로 수행 될 추가 실험을 위한 기초자료로서 그 가치가 매우 높을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

References

1. Binder, M., Hibbett, D. S., Larsson, K. H., Larsson, E., Langer, E. and Langer, G. 2005. The phylogenetic distribution of resupinate forms across the major clades of mushroom-forming fungi (Homobasidiomycetes). *Syst. Biodivers.* **3**, 113-157.
2. Checinska, A., Hoogeland, B. S., Rodriguez, J. A., Giaccone, G. and Kruyt, F. A. 2007. Role of XIAP in inhibiting cisplatin-induced caspase activation in non-small cell lung cancer cells: a small molecule Smac mimic sensitizes for chemotherapy-induced apoptosis by enhancing caspase-3 activation. *Exp. Cell Res.* **313**, 1215-1224.
3. 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**, 133-147.
4. Gapter, L., Wang, Z., Glinski, J. and Ng, K. Y. 2005. Induction of apoptosis in prostate cancer cells by pachymic acid from Poria cocos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332**, 1153-1161.
5. Giner, E. M., Manez, S., Recio, M. C., Giner, R. M., Cerda-Nicolas, M. and Rios, J. L. 2000. *In vivo* studies on the anti-inflammatory activity of pachymic and dehydrotumulosic acids. *Planta Med.* **66**, 221-227.
6. 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.
7. Holcik, M., Gibson, H. and Korneluk, R. G. 2001. XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis* **6**, 253-261.
8. Kaminaga, T., Yasukawa, K., Kanno, H., Tai, T., Nunoura, Y. and Takido, M. 1996. Inhibitory effects of lanostane-type triterpene acids, the components of Poria cocos, on tumor promotion by 12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology* **53**, 382-385.
9. 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.
10. Kirkali, Z., Chan, T., Manoharan, M., Algaba, F., Busch, C., Cheng, L., Kiemeney, L., Kriegmair, M., Montironi, R., Murphy, W. M., Sesterhenn, I. A., Tachibana, M. and Weider, J. 2005. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* **66**, 4-34.
11. Kroemer, G. 1997. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat. Med.* **3**, 614-620.
12. 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.
13. Lee, K. Y. and Jeon, Y. J. 2003. Polysaccharide isolated from *Poria cocos* sclerotiuminduces NF-κB/Rel activation and iNOS expression in murine macrophages. *Int. Immunopharmacol.* **3**, 1353-1362.
14. Li, G., Xu, M. L., Lee, C. S., Woo, M. H., Chang, H. W. and Son, J. K. 2004. Cytotoxicity and DNA topoisomerases inhibitory activity of constituents from the sclerotium of Poria cocos. *Arch. Pharm. Res.* **27**, 829-833.
15. Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. and Yuan, J. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the

Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501.
16. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. and Wang, X. 1997. Cytochrome *c* and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-489.
17. Lindner, D. L. and Banik, M. T. 2008. Molecular phylogeny of *Laetiporus* and other brown rot polypore genera in North America. *Mycologia* **100**, 417-430.
18. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481-490.
19. Nargund, V. H., Tanabalan, C. K. and Kabir, M. N. 2012. Management of non-muscle-invasive (superficial) bladder cancer. *Semin. Oncol.* **39**, 559-572.
20. Reed, J. C. 1998. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* **17**, 3225-3236.
21. Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B. and Borner, C. 1998. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome *c*. *Nature* **391**, 496-499.
22. 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.
23. Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J. C. and de Murcia, G. 2006. Poly (ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 517-528.
24. Smaldone, M. C., Jacobs, B. L., Smaldone, A. M. and Hrebinko, R. L. Jr. 2008. Long-term results of selective partial cystectomy for invasive urothelial bladder carcinoma. *Urology* **72**, 613-616.
25. Tai, T., Shingu, T., Kikuchi, T., Tezuka, Y. and Akahori, A. 1995. Isolation of lanostane-type triterpene acids having an acetoxyl group from sclerotia of Poria cocos. *Phytochemistry* **40**, 225-231.
26. Tai, T., Shingu, T., Kikuchi, T., Tezuka, Y. and Akahori, A. 1995. Triterpenes from the surface layer of Poria cocos. *Phytochemistry* **39**, 1165-1169.
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. Yasukawa, K., Kaminaga, T., Kitanaka, S., Tai, T., Nunoura, Y., Natori, S. and Takido, M. 1998. 3β-p-Hydrooxybenzoyl-dehydrotumulosic acid from Poria cocos, and anti-inflammatory effect. *Phytochemistry* **48**, 1357-1360.
29. Zhou, L., Zhang, Y., Gapter, L. A., Ling, H., Agarwal, R. and Ng, K. Y. 2008. Cytotoxic and anti-oxidant activities of lanostane-type triterpenes isolated from Poria cocos. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **56**, 1459-1462.

초록 : T24 인체방광암 세포에서 pachymic acid에 의한 apoptosis 유발

정진우[1] · 백준영[3] · 김광동[1,2] · 최영현[4,5] · 이재동[3]*

([1]경상대학교 응용생명과학부(BK21 Plus), [2]식물생명공학연구소, [3]부산대학교 자연과학대학 미생물학과, [4]동의대학교 한의과대학 생화학교실, [5]동의대학교 항노화연구소)

Pachymic acid는 복령에서 분리된 lanostane-type인 triterpenoid의 일종이다. 최근 pachymic acid가 항암 및 항염증 효능과 산화적 스트레스에 대한 항산화 효능 등과 같은 약리적인 효능이 있는 것으로 밝혀지고 있으나, 그에 대한 구체적인 분자생물학적 기전 연구는 매우 미비한 실정이다. 본 연구에서는 pachymic acid의 항암활성 및 관련 기전 조사의 일환으로 T24 인체 방광암세포 모델을 이용하여 pachymic acid에 의한 apoptosis 유발 여부를 검증하였다. 본 연구의 결과에 의하면 pachymic acid는 T24 세포의 증식을 유의적으로 억제시켰으며, 이는 apoptosis 유발과 연관성이 있음을 다양한 방법으로 확인하였다. Pachymic acid에 의한 apoptosis 유도에는 pro-apoptotic 인자들의 발현 증가와 anti-apoptotic 유전자 산물들의 발현 감소가 동반되었으며, MMP의 소실과 tBid의 발현 증가가 관찰되었다. 아울러 pachymic acid는 extrinsic 및 intrinsic apoptosis 경로의 개시에 관여하는 caspase-8 및 -9의 활성뿐 만 아니라, caspase-3의 활성도 증가시킴으로서 PARP와 같은 기질 단백질의 단편화를 초래하였다. 따라서 pachymic acid는 항암활성을 지니는 천연생리활성 물질로서의 잠재력이 매우 높음을 알 수 있었다.