

Apoptotic Effect of Pinosylvin at a High Concentration Regulated by c-Jun N-Terminal Kinase in Bovine Aortic Endothelial Cells

Jina Song[†], Jinsun Park[†], Eunsil Jeong, A-Young So, Jaeho Pyee and Heonyong Park^{*}

Department of Molecular Biology & Institute of Nanosensor and Biotechnology, CKII undergraduate program of Chembio, Dankook University, 152, Jookjeon-ro, Suji-ku, Yongin-si, Gyeonggi-do 448-701, Korea

Received January 15, 2015 / Revised February 5, 2015 / Accepted February 6, 2015

Pinosylvin is a stilbenoid found in the *Pinus* species. Pinosylvin at ~pM to ~nM concentrations induces cell proliferation, cell migration and anti-inflammatory activity in endothelial cells. However, it was recently reported that pinosylvin at high concentrations (50 to 100 μ M) induces cell death in bovine aortic endothelial cells. In this study, we conducted a series of experiments to discover how pinosylvin at a high concentration (50 μ M) induces endothelial cell death. Pinosylvin at the high concentration was shown to induce endothelial cell apoptosis through enhancing caspase-3 activity, flip-flop of phosphatidyl serine, and nuclear fragmentation. We found that pinosylvin at the high concentration additively increased caspase-3 activity enhanced by serum-starvation or treatment with 100 μ M etoposide. We also determined that pinosylvin at the high concentration promoted activations of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and endothelial nitric oxide synthetase (eNOS). We further ran a series of experiments to find out which signaling molecule plays a critical role in the pinosylvin-induced apoptosis. We finally found that SP-600125, a JNK inhibitor, had an inhibitory effect on the pinosylvin-induced endothelial cell death, but L-NAME, an eNOS inhibitor, had no effect. These data indicate that JNK is involved in the pinosylvin-induced apoptosis. Collectively, pinosylvin at high doses induces cell apoptosis via JNK activation.

Key words : Apoptosis, cell death, c-Jun N-terminal kinase, endothelial cells, pinosylvin

서 론

피노실빈(pinosylvin)은 소나무의 잎이나 목재 등에서 흔히 발견되는 폴리페놀 성분 중의 하나이다[6, 29, 31]. 이것은 stilbene의 일종으로 이미 많은 연구가 되어 있는 포도의 주요 기능성 물질인 resveratrol에 비해 수산기 하나가 없는 구조를 가지고 있다[14]. 지금까지 구조적으로 비슷한 resveratrol에 대해서는 많은 연구가 수행되어 왔지만, 피노실빈에 관한 연구는 상대적으로 미흡한 형편이다. 최근에 피노실빈에 관한 연구가 국내에서 비교적 활발히 진행되어, 항균 및 암치료를 위한 천연물 소재로서의 활용 가능성에 대해 제안한 연구 논문들이 수 편 발표되었다[19, 23, 24, 25]. 또한 본 실험실에서는 피노실빈의 심혈관 기능에 관한 *in vitro* 결과들을 보여주는 논문을 보고하였다[15, 27]. 혈관내피세포에서 피노실빈의 효과는 resveratrol과 마찬가지로 농도에 따라 상이하게 나타났

다. 피노실빈의 농도가 ~nM 이하에서는 내피세포의 성장, 세포 이동과 세포사멸의 억제, 항염증반응의 유도 등의 효과가 나타났다[15]. 그러나 50~100 μ M 의 농도에서는 피노실빈이 세포사를 유도하였는데, 흥미롭게도 세포의 괴사(necrosis)는 억제하면서 세포사멸과 오토파지(autophagy)를 유도하여 세포사를 촉진시켰다[27]. 세포의 괴사는 심혈관의 기능에서 혈전을 유도하는 특징 때문에 일반적으로 심근경색과 같은 심혈관의 병리적 효과와의 연관성에 초점이 맞추어져 있다[30]. 고농도의 피노실빈이 혈관내피세포의 세포사에 미치는 생리적 혹은 병리적 효과가 중요함에도 불구하고 아직까지 이에 대한 추가적인 기전 연구는 미흡한 실정이다.

세포사는 세포괴사, 세포사멸, 오토파지 등으로 일어난다. 이 가운데 세포사멸(apoptosis)은 세포괴사나 오토파지와 달리 caspases가 절단되어 활성화된 후, PARP의 inactivation이 유발되어 핵의 응축이나 DNA의 laddering이 일어나며 세포사가 진행된다[33]. 세포사멸의 또 다른 특징은 세포막 내엽(inner leaflet)에 위치하는 phosphatidyl serine의 플립플롭과 세포외 기질(extracellular matrix (ECM))로부터 세포의 분리 등이다[30]. 한편 세포사를 유발하는 천연물은 특정 세포신호 전달 경로를 활성화시키며, 활성화된 신호전달경로를 통해 세포사를 조절한다. 지금까지 잘 알려진 세포사를 조절하는 신호전달 물질들은 mitogen activated protein kinases (MAPK) 일종인 p38 MAPK와 c-Jun N-terminal kinase (JNK) 등이 있

[†] Authors contributed equally.

^{*}Corresponding author

Tel : +82-31-8005-3193, Fax : +82-31-8021-7201

E-mail : heonyong@dankook.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.

다[2, 11, 16, 20, 21, 36].

심혈관계에서 내피세포는 혈관의 가장 안쪽에서 한 층의 세포층으로 이루어져 있으며, 혈류와 직접 접촉하면서 혈관의 다양한 생리적 기능을 조절하는 중요한 세포이다. 이렇게 심혈관계의 기능에 중요한 혈관내피세포의 수명은 약 20년 정도로 추정된다[28]. 즉, 혈관내피세포는 정상 혈관 내에서 세포사가 잘 일어나지 않는다. 그러나 심혈관의 병리적 현상이 유발되면 혈관내피세포의 세포사가 발생한다[5, 7, 9, 13, 22]. 내피세포의 세포사멸과 관련이 있는 잘 알려져 있는 병리적 현상은 동맥경화발생이다.

혈관은 적절한 신축성을 유지하고 있어야 수축과 이완을 통해 혈류를 원활하게 한다. 그러나 여러 원인에 의하여 혈관이 경화가 되거나, 혈관벽에 동맥경화반(atherosclerotic plaque)이 형성되어 혈관벽이 좁아지면 혈류가 방해되어 뇌경색이나 심장마비가 일어날 수 있다[5, 7, 9, 13, 22]. 이러한 병리적 현상은 혈관내피세포의 수명을 단축시킬 수 있으며, 또한 혈관내피세포의 세포사는 내피세포 안쪽에서 세포부착에 기여하는 콜라겐 등의 세포외 기질로 이루어진 연결조직이 혈액에 직접 노출되면서 혈전을 형성할 수 있는 가능성을 높게 된다. 그러나 아직까지 혈관내피세포의 세포사와 혈관의 생리적 혹은 병리적 현상과의 상관관계는 명확하게 규정되지 않았다. 다만 혈관내피세포의 세포사의 조절이 심혈관계의 건강 유지에 중요하다는 것은 기존의 연구 결과를 통해 알 수 있기 때문에[35], 세포사의 조절 기전에 관한 연구는 심혈관 기능을 이해하는 데에 필수적이다.

이번 연구는 고농도의 피노실빈이 혈관내피세포의 세포사를 유도할 뿐만 아니라 기존에 알려지지 않았던 고농도의 피노실빈이 촉발하는 세포사 신호전달경로들을 규명하였고, 특히 어느 신호전달경로가 가장 중요하게 세포사를 조절하는지를 결정하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 피노실빈은 기존에 보고된 방법에 의거하여 합성하여 사용하였다[26]. 합성방법을 간략하게 소개하면, 포스포네이트(phosphonate)와 방향족 알데히드(aromatic aldehyde)를 이용하는 Horner-Wadsworth-Emmons 반응을 수행하여 3,5-dimethoxy-*trans*-stilbene을 생산한 뒤, 190°C에서 pyridine hydrochloride 촉매반응을 통하여 피노실빈을 합성하였다.

세포배양

소 대동맥 내피세포인 BAEC (bovine aortic endothelial cell)은 세포외 기질에 부착하여 성장하는 세포(adhesion cell)로, 소의 대동맥에서 추출한 후 계대수가 3에서 10 사이의 일

차세포를 실험에 사용하였다. BAEC은 20% 소태아혈청(fetal bovine serum (FBS), Welgene, Seoul, Korea)과 항생제(50 µg/ml penicillin/streptomycin)가 포함된 DMEM (glucose 1 g/l, Welgene)을 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

세포사멸 실험

전면 성장한 BAEC을 0.5% FBS가 포함된 DMEM 배지로 12시간 이상 혈청기아 시킨 후 다양한 농도의 피노실빈을 0~48시간 동안 처리하였다. 20 µM PD-98059 (ERK 억제자, Enzo Life Science, Farmingdale, NY, USA), 2.5 µM L-NAME (eNOS 억제자, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), 1 µM wortmannin (AKT 억제자, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 10 µM SP-600125 (JNK 억제자, Enzo Life Science), 10 µM SB-203580 (p38 억제자, Enzo Life Science) 등의 억제자는 피노실빈을 처리하기 1시간 전에 처리하였다. 시간 경과에 따른 변화를 현미경을 이용해 사진 촬영하여 기록했으며, 세포사멸 비율은 세포사멸 세포(원형 탈착 부유 세포)를 계산하여 결정하였다[12, 22].

Western Blot

각 실험 조건에 따라 처리한 BAEC을 분해완충액(50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride)으로 분해한 뒤, 원심분리를 통해 상층액을 획득했다. Bio-Rad DC assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용해 세포 분해액의 단백질량을 측정하였으며 동일한 양의 단백질을 SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)에 의해 분리시켰다. 분리된 단백질을 polyvinylidene fluoride (PVDF) 막 (Millipore, Billerica, MA, USA)으로 전달시킨 후, 분석하고자 하는 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 1차 항체와 반응시켰다. 1차 항체는 caspase-3, p-ERK, ERK, p-Akt, Akt, p-p38 MAP kinase, p38 MAP kinase, p-JNK, JNK, p-eNOS, eNOS (Cell Signaling)를 표적으로 하는 항체를 사용하였다. 2차 항체와 연속적으로 반응시킨 후, 이를 화학발광 검출법을 통해 X-선 필름에 감광시켜 단백질을 검출하였다.

Flow cytometry 분석

전면 성장한 BAEC을 24시간 동안 혈청기아 시킨 후 50 µM 피노실빈을 24시간 처리하였다. 세포사 분석을 위하여 Apo-Scan Annexin V-FITC apoptosis detection kit (BioBud, Seongnam, Korea)를 이용하여 세포를 Annexin V-FITC와 propidium iodide (PI)로 염색하였다. 그 후 flow cytometry (Guava easyCyte system, Milipore)를 이용하여 분석하였다.

Caspase-3 활성 측정

Caspase-3 활성은 Caspase-3 Colorimetric Activity Assay

Kit (Chemicon, Temecula, CA, USA)를 이용해 Ac-DEVD-pNA를 기질로 하여 측정하였다. BAEC를 전면 성장 시킨 후 혈청기아 배지에서 100 μ M etoposide (ETO, Sigma-Aldrich) 또는 50 μ M 피노실빈을 12시간 이상 처리한 뒤 세포를 분해하였다. 세포 분해액을 236 μ M Ac-DEVD-pNA을 포함하는 반응용 완충용액에 37°C에 2시간 반응시켰다. Caspase-3 활성은 microplate reader (Bio-Rad, Model 550)를 이용해 흡광도 405 nm에서 측정하였다.

Hoechst 염색

전면 성장한 BAEC을 12시간 동안 혈청기아 시킨 후 혈청기아 상태 유지, 100 μ M ETO 또는 50 μ M 피노실빈을 24시간 동안 처리하였다. BAEC을 Conroy's fixative로 10분 동안 고정시키고 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척하고 10분 동안 공기 중에서 건조시켜 주었다. 그 후 Hoechst 33258(12.5 μ g/ml, Sigma-Aldrich)로 상온에서 30분 동안 세포를 염색시킨 후, PBS로 세척해주고 형광 현미경(Zeiss autoplan 2, Jena, Germany)으로 핵을 관찰하였다.

통계분석

실험결과는 mean \pm S.E.로 나타내었고 분석된 데이터는 실험자료로부터 one-way ANOVA를 이용하여 유의성이 있을 경우 post-hoc test를 통해 95% 수준에서 유의성을 검증하였다.

결 과

혈관내피세포 세포사 실험결과

피노실빈의 세포사에 미치는 효과를 평가하기 위하여 피노실빈을 농도별(0.1~50 μ M)로 처리한 후 재료 및 방법에 기술한 방법으로 BAEC의 세포사를 관찰하였다. Fig. 1A는 현미경을 통해 관찰된 세포들의 대표 사진이다. 같은 방법으로 여러 번 반복 시행한 실험 결과의 평균치를 Fig. 1B에서 선형 그래프로 나타내었다. 그 결과, 피노실빈 10 μ M 이하의 농도에서는 내피 세포의 세포사에 크게 영향을 주지 않았으나, 50 μ M에서 세포사가 통계적으로 유의있게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. Etoposide (ETO)는 topoisomerase II와 복합체를 형성하여 DNA 사슬의 재연결을 방해하여 DNA 사슬을 파괴하는 시약으로 BAEC의 세포사를 유도하는 양성 대조군으로 사용하였다. 본 실험에서는 ETO를 100 μ M로 처리하여 BAEC의 세포사가 유도됨을 관찰하였다. 흥미롭게도 50 μ M의 피노실빈이 100 μ M의 ETO와 유사한 효과를 나타내는 것으로 보아, 피노실빈이 ETO보다 더 강력하게 세포사를 유도함을 알 수 있었다.

고농도 피노실빈이 유도하는 혈관내피 세포사가 세포사멸 (apoptosis)임을 증명한 실험결과

세포사는 세포괴사(necrosis), 세포사멸(apoptosis) 및 오토

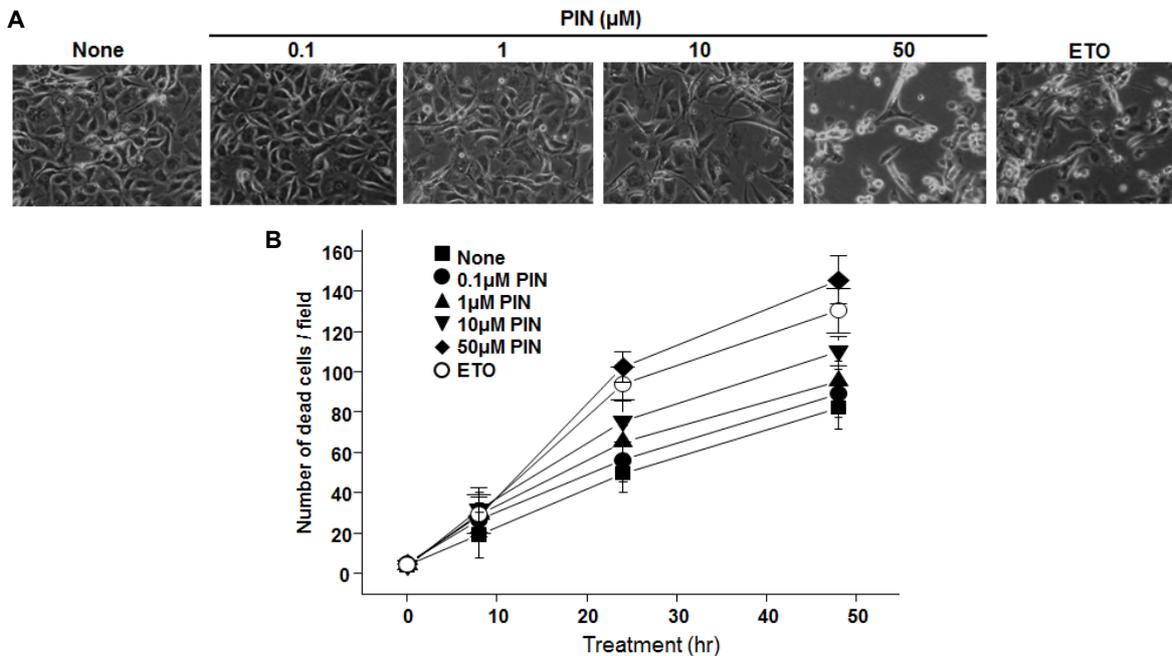


Fig. 1. Pinosylvin at high concentration induces cell death in bovine aortic endothelial cells. (A) Confluent BAECs were serum-starved for 12 hr and then cells were treated for 24 hr with none, 100 μ mol/l etoposide (ETO) or various concentrations of pinosylvin (PIN). Then, photographs of BAECs were captured by a camera connected to a microscope. After triplicate experiments were performed, representative pictures for each condition were shown in panel A. (B) Dead cells (round shrunken cells) were counted and quantified. The line graphs represent numbers of dead cells per a field (means \pm SE, n=3).

파지(autophagy) 등으로 세분화되기 때문에 피노실빈에 의해 유도되는 세포사가 어떤 종류의 세포사 인지 규명하고자 하였다. 고농도의 피노실빈이 유도하는 세포사의 경우, 위의 실험 결과를 통해 알 수 있듯이 세포가 위축되는 현상이 관찰되었기 때문에 세포사멸로 진행되는 세포사일 가능성이 매우 높다. 이를 증명하기 위하여, 세포사멸의 특징인 caspase-3 활성화와 phosphatidyl serine의 플립플롭, 핵의 분절 등이 고농도의 피노실빈에 의해 나타나는 지 관찰하였다. Fig. 2A에서 보는 바와 같이, 고농도(50 μ M)의 피노실빈은 caspase-3를 절단시켜 활성화된 작은 caspase-3단편이 Western blot으로 관찰되었다. 또한 flow cytometry를 통해, Annexin V의 표면 염색 정도를 측정할 결과, 고농도의 피노실빈이 처리된 샘플의 경우 평균형광강도(mean fluorescence intensity, MFI)가 584 \pm 9로, 피노실빈을 처리하지 않은 음성대조군의 MFI (401 \pm 7) 보다 45% 정도 상승하였다(Fig. 2B). 이는 phosphatidyl serine이 고농도의 피노실빈에 의해 플립플롭이 일어났음을 의미하는 것으로 피노실빈이 세포사멸을 유도함을 보여주는 결과이다. 추가적으로 Hoechst 33258를 이용한 핵의 염색을 통해서 핵의 분절이 유도됨을 볼 수 있었다(Fig. 2C). 이와 같은 실험 결과

들은 고농도의 피노실빈이 세포사멸을 통해 혈관내피세포의 세포사를 유도함을 증명한 것들이다.

또한 두 종류의 자극, 즉 혈청기아와 ETO (100 μ M)의 처리로 내피세포의 세포사멸을 촉발할 때, 고농도의 피노실빈을 함께 처리하면 세포사멸이 어떻게 되는지 관찰하였다. 그 결과, Fig. 2C와 D에서 보는 바와 같이, 고농도의 피노실빈은 혈청기아나 ETO에 의해 유발되는 세포사 혹은 세포사멸을 추가적으로 더 증가시켰다. 이와 같은 현상은 아마도 고농도의 피노실빈이 ETO나 혈청기아가 유발하는 세포사멸 혹은 세포사의 유도 경로와 다른 독립적인 세포사멸 또는 세포사의 유도 경로를 갖고 있음을 암시한다.

고농도의 피노실빈이 eNOS와 JNK의 활성을 촉발하는 것을 보여주는 실험결과

피노실빈 처리 시간에 따른 여러 신호전달물질들의 활성화 정도를 관찰한 실험결과들의 대표 그림을 Fig. 3A에 보여주었다. 또한 Western blot의 정량값을 나타내는 Fig. 3B의 선형 그래프를 보면, JNK와 eNOS의 인산화의 정도는 고농도의 피노실빈을 처리한 후 초기 15분 동안은 증가하나, 15분이 지난

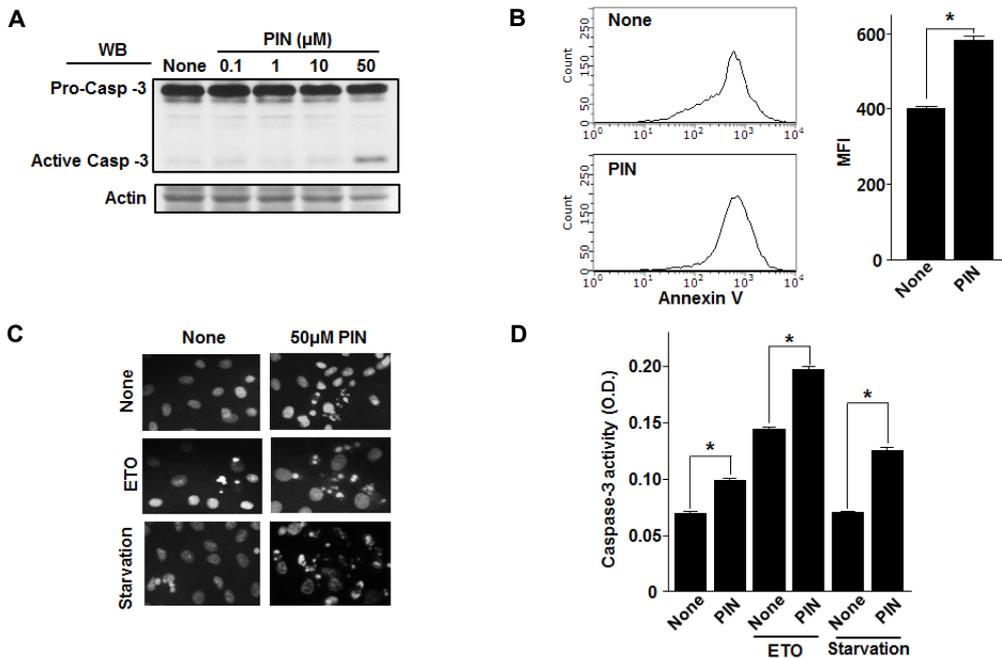


Fig. 2. Pinosylvin induces apoptosis in bovine aortic endothelial cells. (A) Serum-depleted BAECs (grown in DMEM) were stimulated with the indicated pinosylvin (PIN) concentrations. After cells were lysed, proteins in the cell lysates were resolved with SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes and immunoblotted with an anti-caspase-3 antibody. (B) BAECs were treated with none or 50 μ M PIN, then stained with FITC-tagged annexin V, as described in Materials and Methods. Stained cells were analyzed with flow cytometry (left panel). Mean fluorescence intensities of flow cytometry data were plotted in the bar graph (means \pm SE, n=3). * p <0.05. (C) Serum-supplemented or -depleted BAECs treated with none or 50 μ M PIN and/or 100 μ M etoposide (ETO) for 24 hr were stained with Hoechst 33258. Then cells were observed under a fluorescent microscope. (D) Serum-depleted BAECs were treated with none or 50 μ M PIN and/or 100 μ M etoposide (ETO) for 24 hr and then lysed. Caspase-3 in cell lysates reacted with Ac-DEVD-pNA in a reaction buffer for 2 hr at 37 $^{\circ}$ C. Enzyme activity of cell lysates was compared by absorbance at 405 nm. The bar graph represents means \pm S.E. (n=3). * p <0.05.

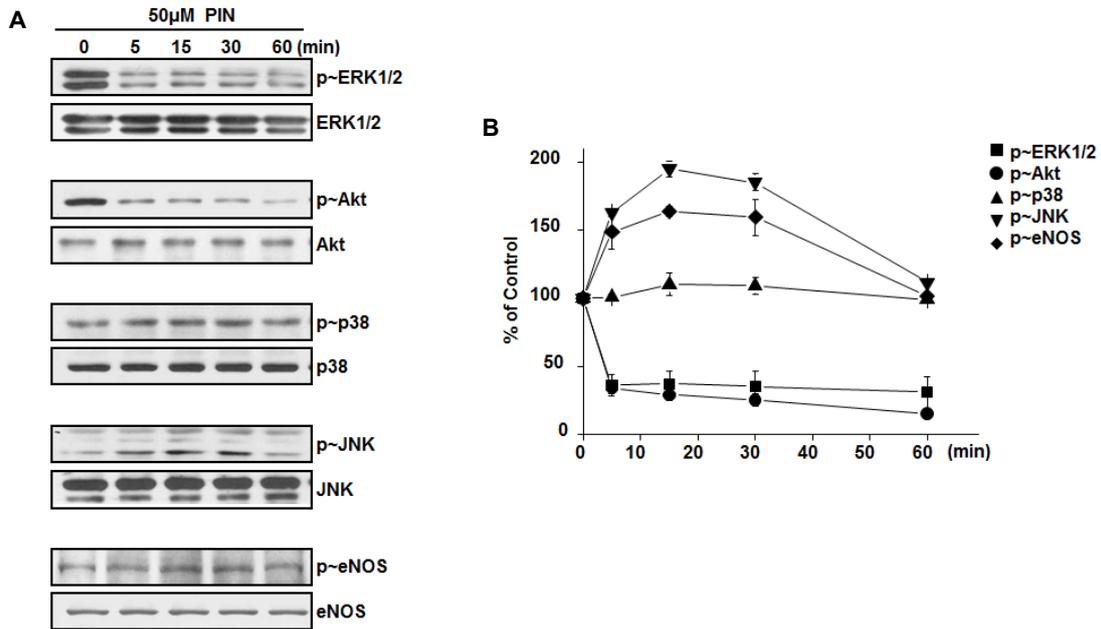


Fig. 3. Pinosylvin at high concentration promotes activations of JNK and eNOS in endothelial cells. BAECs were serum-starved for 12 hr and then were treated with 50 μ M pinosylvin (PIN). Then cells were harvested and lysed. Proteins in the cell lysates were resolved with SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes and immunoblotted with indicated antibodies. (A) Panel A shows representative Western blots. (B) Quantification of Western blots was performed by a densitometry and plotted on the line graph (means \pm SE, n=3). * p <0.05.

후 60분까지는 서서히 감소하였다. 두 신호전달 물질의 최대치는 피노실빈 처리 후 15분에서 나타났다. 한편 그 외의 다른 신호전달 물질들의 경우는 변화가 없거나 인산화 정도가 오히려 감소하였다. 즉, ERK나 Akt는 고농도의 피노실빈에 의하여 오히려 인산화 정도가 시약을 처리하지 않은 음성 대조군에 비하여 감소하는 경향이 나타났고, p38 MAP kinase는 변화가 없었다. 이와 같이 ERK의 인산화가 감소하는 현상은 기존에 stilbene 중의 하나인 resveratrol을 고농도로 처리하였을 때 관찰되었던 현상과 일치하는 현상이다[12]. 이러한 결과는 피노실빈에 의하여 유도되는 세포사멸은 ERK 및 Akt 인산화를 통해 유도되지 않는 것으로 유추할 수 있다.

고농도의 피노실빈에 의하여 유도되는 세포사멸이 JNK의 인산화에 의해 조절되는 현상임을 보여주는 실험결과

고농도의 피노실빈이 eNOS와 JNK의 활성을 유도하고, ERK나 Akt의 활성을 감소시킨다는 것을 위의 실험결과를 통해 알 수 있었다. 따라서 아마도 JNK 혹은 eNOS의 증가된 활성 혹은 ERK나 Akt의 변화된 활성이 고농도의 피노실빈에 의하여 유도되는 세포사멸을 조절한다는 가설을 설정하였다. 이를 증명하기 위하여 BAEC에 각 신호전달물질의 활성을 억제하는 억제자들을 전처리한 후, 고농도의 피노실빈을 처리하여 일어나는 세포사의 변화를 관찰하였다. Fig. 4A에서 보듯이 ERK, Akt, p38 MAP kinase, eNOS의 억제자인 PD-98059 (20 μ M), wortmannin (1 μ M), SB-203580 (10 μ M), L-NAME (2.5

μ M)을 전처리한 경우는 고농도의 피노실빈에 의하여 촉발되는 세포사에는 영향이 없었으나, JNK 인산화 억제자인 SP-600125 (10 μ M)를 처리한 경우에는 세포사가 감소하는 현상이 관찰되었다. SP-600125를 전처리한 후 50 μ M의 피노실빈을 시간별로 처리한 다음 세포사를 관찰한 결과에서도 JNK 억제자가 피노실빈에 의해 촉발되는 세포사를 억제하는 것을 재확인하였다(Fig. 4B). 이와 같은 결과는 피노실빈에 의하여 유도되는 세포사를 JNK가 조절하고 있음을 강력히 암시한다. JNK의 억제 효과가 세포사멸에서도 나타나는 지를 확인하기 위하여, SP-600125를 전처리하고 고농도의 피노실빈을 처리한 후 Hoechst 33258로 핵을 염색하여 핵 분절 현상을 관찰하였다. 그 결과 Fig. 4C에서 보는 바와 같이 SP-600125를 전처리한 경우에는 SP-600125를 처리하지 않은 세포에서 관찰되었던 핵 분절 현상이 사라졌다. 또한 SP-600125가 고농도 피노실빈에 의하여 촉발되는 caspase-3의 절단에 끼치는 영향을 관찰한 결과, SP-600125 전처리가 caspase-3의 절단을 억제하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 4D). 이러한 결과들은 모두 JNK가 고농도의 피노실빈에 의하여 촉발되는 세포사멸에 필수적이면서 또한 세포사멸을 조절하고 있음을 의미한다.

고 찰

낮은 농도의 피노실빈(~nM 이하)은 혈관내피세포에서 세포사멸을 유도하기 보다는 세포증식과 세포이동 그리고 염증

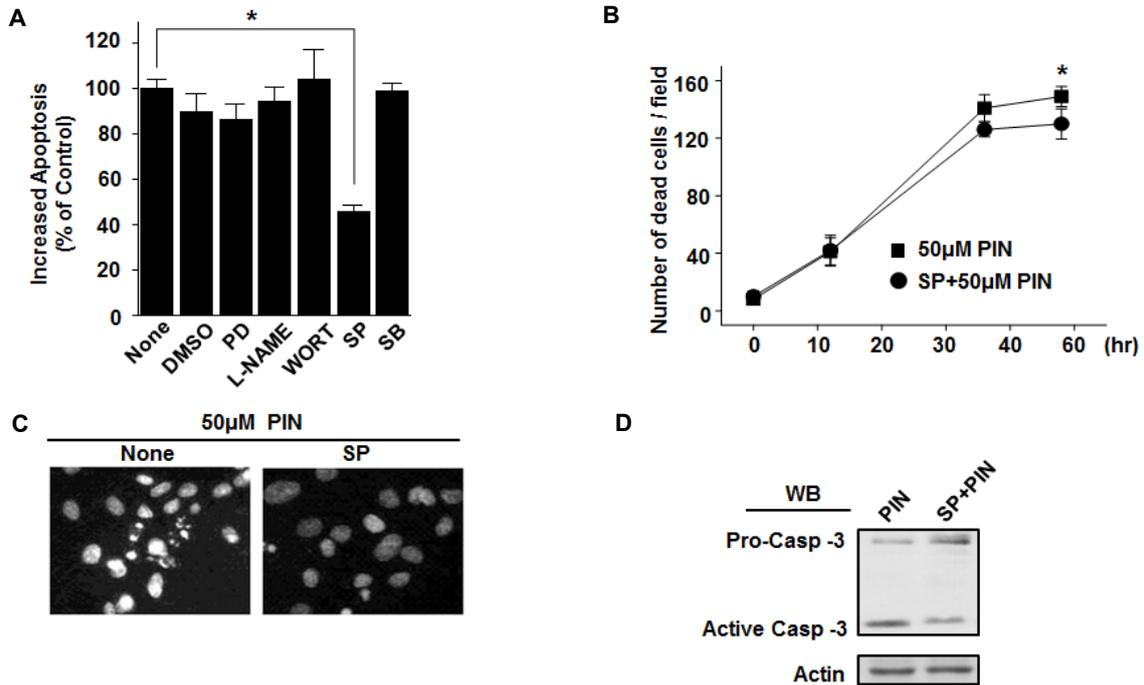


Fig. 4. JNK regulates the pinosylvin-induced apoptosis in endothelial cells. (A) BAECs were pretreated with the following inhibitors 1 hr before treatment of 50 µM pinosylvin with or without 20 µM PD-98059, 2.5 µM L-NAME, 1 µM wortmannin (WORT), 10 µM SP-600125, 10 µM SB-203580. Cell death was observed as described in Fig. 1. Relative cell death was plotted as bar graphs (means ± S.E., n=3). **p*<0.05. (B) Dead cells were observed as described in Fig. 1. The line graph represents the number of dead cells per visual field (means ± S.E., n=3). **p*<0.05. (C) Fragmented nuclei were observed in cells pretreated with vehicle or 10 µM SP and then treated with 50 µM pinosylvin for 24 hr. The arrow indicates the fragmented nuclei. (D) Serum-depleted BAECs were treated with none or 10 µM SP in the presence of 50 µM pinosylvin (PIN). After cells were lysed, proteins in the cell lysates were immunoblotted with an anti-caspase-3 antibody.

반응을 억제하는 효과를 나타낸다[15]. 그런 기능을 가진 피노실빈이 50 µM 이상에서는 세포사를 유발하고 있음이 알려졌다[27]. 피노실빈의 체내의 농도는 아직 피노실빈을 이용한 약물동력학적 연구가 많이 이루어지지 않아 정확하게 알 수 없지만 같은 stilbene의 일종인 resveratrol에 관한 약물동력학적 연구 결과들을 기반으로 추론할 수 있다. Resveratrol의 경우, 세포사를 일으키는 농도는 약 40~400 µM 정도이고, 0.4~4µM에서는 세포증식을 유도하는 것으로 보고되어 있다[12, 18, 32]. 우리가 천연물을 통해 섭취할 수 있는 피노실빈의 체내 최대 농도는 피노실빈과 유사한 구조의 resveratrol의 동물 모델이나 인체시험을 유추해 보면 약 50 nM 정도이다[8, 34]. 따라서 술이나 소나무 목재 등을 통해 섭취하는 피노실빈의 농도는 우리 몸에서 세포사를 유발하는 함량과는 거리가 멀다. 고농도의 피노실빈을 의약학적으로 활용하기 위해 천연물의 구강섭취를 통해서 세포사를 유발할 수 있는 정도의 농도로 체내 피노실빈의 농도가 도달하도록 하는 것은 기존의 연구 결과들을 토대로 유추하면 사실상 불가능하다. 50µM의 혈액 내 농도를 유지하려면 특수한 약물전달시스템을 이용해야만 가능할 것이다. 또한 피노실빈을 고농도로 혈액 내에 유지하여 혈관 내피세포의 세포사멸을 유도하는 것은 경우에

따라서 동맥경화(atherosclerosis)나 동맥류(aneurysm), 허혈(ischemia) 등 악영향을 미칠 수 있기 때문에 [5, 7, 9, 13, 22], 매우 주의하여야 할 것으로 보인다. 본 연구의 실험 결과는 고농도의 피노실빈이 혈관내피세포의 세포사멸을 유발하는 경로를 규명한 것으로도 그 의미가 크다. 고농도의 피노실빈이 세포사를 유발하는 경로가 JNK의 활성화를 통해 이루어 짐을 관찰하였다. JNK 신호전달 물질이 세포사멸에 관여한다는 것은 이미 잘 알려져 있고[3], 본 연구의 실험 결과도 이를 지지한다. 한편 고농도의 피노실빈은 세포증식에 관여하는 것으로 알려진 ERK와 Akt의 활성을 억제하였고, 저농도의 피노실빈이 혈관내피세포에서 ERK와 Akt를 활성화시키는 현상과는 반대로 작용함을 이번 연구의 실험 결과들을 통해 알 수 있었다[15]. 이와 같이 피노실빈의 농도에 따라 그 효과가 반대로 나타나는 이형효과는 아마도 이러한 신호전달 경로의 차이에서 기인한 것으로 보인다. 기존의 보고된 논문[15]에서 보듯이 저농도(~pM)의 피노실빈은 JNK의 인산화에 영향을 미치지 않았으나 이번 연구 결과에서 보듯이 고농도에서는 피노실빈이 JNK의 인산화를 향상시켰다. 이와 같이 JNK를 활성화시키는 피노실빈의 농도 차이가 아마도 농도에 따른 피노실빈의 이형효과를 잘 설명해 주는 단서일 것

으로 보인다.

한편 고농도의 피노실빈에 의하여 유발되는 JNK 활성화의 역할에 관한 해석은 아직 논란의 여지가 많다. 최근의 연구 결과에서도 어떤 논문은 JNK의 활성화가 심혈관계에서 동맥경화 유발과 연관되어 있음을 보여주는 반면[1, 4], 또 다른 논문에서는 JNK의 활성화가 동맥경화발생을 억제하고 있음을 보여주고 있기 때문에[10], 더 많은 연구 결과를 통해 JNK의 심혈관계 역할이 추후에 규명되어야 할 것이다.

또 한가지 주의하여 관찰해 볼 것은 피노실빈에 의한 eNOS의 활성화이다. 저농도의 피노실빈은 혈관내피세포에서 eNOS의 인산화를 크게 향상시켰고 이렇게 증가된 eNOS의 활성화는 혈구세포의 혈관부착을 방해하며 항염증인자로서의 기능과 세포성장 기능에 크게 기여하였다[15]. 한편 고농도의 피노실빈에서도 eNOS의 인산화는 증가하였지만, 아마도 JNK의 활성화가 eNOS의 세포성장 기능을 상쇄시키는 것으로 사료된다.

결과적으로 본 논문은 고농도의 피노실빈에 의해 일어나는 세포사멸 경로의 일부를 규명하였고 동시에 고농도 피노실빈의 혈관기능과 연계된 의약학적 응용성에 관한 가능성을 보여주었으며, 추후에 아직 밝혀지지 않은 혈관 내피층의 세포사에 관한 기전 연구를 위한 기반 자료로 이용될 수 있다.

감사의 글

본 연구는 2014년도 교육과학기술부 수도권대학 특성화사업(CKII) 단국대학교 캠퍼스 바이오 글로벌 전문인력양성 사업의 일환으로 수행되었음.

References

- Amini, N., Boyle, J. J., Moers, B., Warboys, C. M., Malik, T. H., Zakkar, M., Francis, S. E., Mason, J. C., Haskard, D. O. and Evans, P. C. 2014. Requirement of JNK1 for endothelial cell injury in atherosclerosis. *Atherosclerosis* **235**, 613-618.
- Bae, C. S. and Park, S. H. 2009. The involvement of p38 MAPK and JNK activation in palmitic acid-induced apoptosis in rat hepatocytes. *J. Life Sci.* **19**, 1119-1124.
- Chen, F. 2012. JNK-induced apoptosis, compensatory growth, and cancer stem cells. *Cancer Res.* **72**, 379-386.
- Chaudhury, H., Zakkar, M., Boyle, J., Cuhlmann, S., Van der Heiden, K., Luong le, A., Davis, J., Platt, A., Mason, J. C., Krams, R., Haskard, D. O., Clark, A. R. and Evans, P. C. 2010. c-Jun N-terminal kinase primes endothelial cells at atheroprone sites for apoptosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 546-553.
- Clarke, M., Bennett, M. and Littlewood, T. 2007. Cell death in the cardiovascular system. *Heart* **93**, 659-664.
- Fliegmann, J., Schröder, G., Schanz, S., Britsch, L. and Schröder, J. 1992. Molecular analysis of chalcone and dihydropinosylvin synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*), and differential regulation of these and related enzyme activities in stressed plants. *Plant Mol. Biol.* **1**, 489-503.
- Geng, Y. J. and Libby, P. 1995. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma: Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme. *Am. J. Pathol.* **147**, 251-266.
- Goldberg, D. M., Yan, J. and Soleas, G. J. 2003. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin. Biochem.* **36**, 79-87.
- Han, D. K., Haudenschild, C. C., Hong, M. K., Tinkle, B. T., Leon, M. B. and Liao, G. 1995. Evidence for apoptosis in human atherosclerosis and in a rat vascular injury model. *Am. J. Pathol.* **147**, 267-277.
- Hahn, C., Wang, C., Orr, A. W., Coon, B. G. and Schwartz, M. A. 2011. JNK2 promotes endothelial cell alignment under flow. *PLoS One* **6**, e24338.
- He, W., Zhang, M. F., Ye, J., Jiang, T. T., Fang, X. and Song, Y. 2010. Cordycepin induces apoptosis by enhancing JNK and p38 kinase activity and increasing the protein expression of Bcl-2 pro-apoptotic molecules. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **11**, 654-660.
- In, K., Park, J. and Park, H. 2006. Resveratrol at high doses acts as an apoptotic inducer in endothelial cells. *Cancer Res. Treat.* **38**, 48-53.
- Isner, J. M., Kearney, M., Bortman, S. and Passeri, J. 1995. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation* **91**, 2703-2711.
- Ito-Nagahata, T., Kurihara, C., Hasebe, M., Ishii, A., Yamashita, K., Iwabuchi, M., Sonoda, M., Fukuhara, K., Sawada, R., Matsuoka, A. and Fujiwara, Y. 2013. Stilbene analogs of resveratrol improve insulin resistance through activation of AMPK. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 1229-1235.
- Jeong, E. J., Lee, H. R., Pyee, J. and Park, H. 2013. Pinosylvin induces cell survival, migration and anti-adhesiveness of endothelial cells via nitric oxide production. *Phytother. Res.* **27**, 610-617.
- Jin, C. Y., Park, C., Park, S. E., Hong, S. H. and Choi, Y. H. 2011. Enhancement of TRAIL-mediated apoptosis by genistein in human hepatocellular carcinoma Hep3B cells: roles of p38 MAPK signaling pathway. *J. Life Sci.* **21**, 1549-1557.
- Kim, J. M., Ahn, S. Y., Ko, Y. G., Boo, Y. C., Chi, S. G., Ni, C. W., Go, Y. M., Jo, H. and Park, H. 2010. X-linked inhibitor of apoptosis protein controls alpha5-integrin-mediated cell adhesion and migration. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **299**, H300-H309.
- Kim, Y., Choi, B., Lee, Y., Park, D., Rhee, S., Park, K. and Choi, Y. 2004. Resveratrol inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human breast carcinoma MCF-7 cells. *Oncol. Rep.* **11**, 441-446.
- Lee, S. K., Lee, H. J., Min, H. Y., Park, E. J., Lee, K. M., Ahn, Y. H., Cho, Y. J. and Pyee, J. H. 2005. Antibacterial and antifungal activity of pinosylvin, a constituent of pine. *Fitoterapia* **76**, 258-260.
- Li, H. Y., Zhang, J., Sun, L. L., Li, B. H., Gao, H. L., Xie, T., Zhang, N. and Ye, Z. M. 2015. Celastrol induces apoptosis and autophagy via the ROS/JNK signaling pathway in

- human osteosarcoma cells: an *in vitro* and *in vivo* study. *Cell Death Dis.* **6**, e1604.
21. Lim, S. C., Choi, C. H. and Han, S. I. 2009. Heat Shock Induces Necrosis in Cisplatin-resistant Gastric Cancer Cells through Suppressing JNK1/2 Activation and HSP27 Induction. *J. Life Sci.* **19**, 1705-1711.
 22. López-Candales, A., Holmes, D. R., Liao, S., Scott, M. J., Wickline, S. A. and Thompson, R. W. 1997. Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms. *Am. J. Pathol.* **150**, 993-1007.
 23. Park, E. J., Chung, H. J., Park, H. J., Kim, G. D., Ahn, Y. H. and Lee, S. K. 2013. Suppression of Src/ERK and GSK-3/ β -catenin signaling by pinosylvin inhibits the growth of human colorectal cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* **55**, 424-433.
 24. Park, E. J., Park, H. J., Chung, H. J., Shin, Y., Min, H. Y., Hong, J. Y., Kang, Y. J., Ahn, Y. H., Pyee, J. H. and Lee, S. K. 2012. Antimetastatic activity of pinosylvin, a natural stilbenoid, is associated with the suppression of matrix metalloproteinases. *J. Nutr. Biochem.* **23**, 946-952.
 25. Park, E. J., Min, H. Y., Chung, H. J., Ahn, Y. H., Pyee, J. H. and Lee, S. K. 2011. Pinosylvin suppresses LPS-stimulated inducible nitric oxide synthase expression via the MyD88-independent, but TRIF-dependent downregulation of IRF-3 signaling pathway in mouse macrophage cells. *Cell Physiol. Biochem.* **27**, 356-362.
 26. Park, E. J., Min, H. Y., Ahn, Y. H., Bae, C. M., Pyee, J. H. and Lee, S. K. 2004. Synthesis and inhibitory effects of pinosylvin derivatives on prostaglandin E2 production in lipopolysaccharide-induced mouse macrophage cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 5895-5898.
 27. Park, J., Pyee, J. and Park, H. 2014. Pinosylvin at a high concentration induces AMPK-mediated autophagy for preventing necrosis in bovine aortic endothelial cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **92**, 993-999.
 28. Pyda, M., Korybalska, K., Grajek, S., Lesiak, M., Książek, K., Bręborowicz, A. and Witowski, J. 2012. Endothelial cell growth response to stimulation with serum from patients with acute ST-elevation myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* **159**, 235-237.
 29. Raiber, S., Schröder, G. and Schröder, J. 1995. Molecular and enzymatic characterization of two stilbene synthases from Eastern white pine (*Pinus strobus*): A single Arg/His difference determines the activity and the pH dependence of the enzymes. *FEBS Lett.* **361**, 299-302.
 30. Scarabelli, T., Stephanou, A., Rayment, N., Pasini, E., Comini, L., Curello, S., Ferrari, R., Knight, R. and Latchman, D. 2001. Apoptosis of endothelial cells precedes myocyte cell apoptosis in ischemia/reperfusion injury. *Circulation* **104**, 253-256.
 31. Schanz, S., Schröder, G. and Schröder, J. 1992. Stilbene synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*). *FEBS Lett.* **313**, 71-74.
 32. Szende, B., Tyihák, E. and Király-Véghely, Z. 2000. Dose-dependent effect of resveratrol on proliferation and apoptosis in endothelial and tumor cell cultures. *Exp. Mol. Med.* **32**, 88-92.
 33. Taylor, R. C., Cullen, S. P. and Martin, S. J. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 231-241.
 34. Tomé-Carneiro, J., Larrosa, M., González-Sarrías, A., Tomás-Barberán, F. A., García-Conesa, M. T. and Espín, J. C. 2013. Resveratrol and clinical trials: the crossroad from *in vitro* studies to human evidence. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 6064-6093.
 35. Verma, S. and Anderson, T. J. 2002. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation* **105**, 546-549.
 36. Xu, L., Li, Y., Fu, Q. and Ma, S. 2014. Perillaldehyde attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury-triggered overexpression of inflammatory cytokines via modulating Akt/JNK pathway in the rat brain cortex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **454**, 65-70.

초록 : 혈관내피세포에서 c-Jun N-terminal kinase에 의해 조절되는 세포사멸에 고농도의 피노실빈이 미치는 효과

송지나[†] · 박진선[†] · 정은실 · 소아영 · 피재호 · 박현용*

(단국대학교 분자생물학과 · 캠퍼바이오 글로벌 전문인력양성 사업단 · 나노센서바이오텍연구소)

피노실빈은 소나무 등에서 흔히 관찰되는 스틸벤노이드이다. 혈관내피세포에서 ~pM에서 ~nM 정도의 낮은 농도의 피노실빈은 세포성장, 세포이동, 항염증반응을 유도한다. 그러나 최근에 고농도의 피노실빈이 소 대동맥 내 피세포의 세포사를 유발하고 있음이 보고되었으나, 그 자세한 기전이나 경로 연구가 미흡하여 이번 연구에서 고농도 피노실빈의 세포사 유발 경로를 규명하기 위한 실험을 수행하였다. 고농도의 피노실빈은 caspase-3 절단, 포스파티딜 세린의 플립플롭, 핵 분절 등을 유도하는 것으로 보아 세포사멸을 통한 세포사를 유발함을 알았다. 또한 혈청기아나 100 μ M etoposide에 의하여 촉발하는 caspase-3 활성화/핵분절이 추가적으로 증가하는 현상이 관찰되었다. 이는 피노실빈이 일으키는 세포사멸은 혈청기아나 etoposide에 의해 일어나는 세포사멸과는 다른 경로로 진행됨을 의미하므로 고농도의 피노실빈에 의해 촉발되는 세포신호전달을 탐색한 결과, JNK와 eNOS가 관여함을 알았다. 두 신호전달 물질 중에 어느 것이 피노실빈 유도 세포사에 중요한 지를 알기 위한 추가적인 실험을 진행하였다. 그 결과, JNK 억제자인 SP-600125는 피노실빈에 의한 세포사멸을 억제하였으나, eNOS 억제자인 L-NAME은 아무런 영향이 없는 것으로 보아 JNK가 피노실빈에 의해 유발되는 세포사멸에 관여하는 세포신호 전달물질임을 알았다.