

## Rosuvastatin Induces ROS-mediated Apoptosis in Human Prostate Cancer PC-3 Cells

Hyeun Deok Choi<sup>1,3\*</sup>, Jong Jin Baik<sup>2†</sup>, Sang Hun Kim<sup>1</sup>, Sun Nyoung Yu<sup>1,3</sup>, Sung Hak Chun<sup>1</sup>, Young Wook Kim<sup>1</sup>, Hyo Won Nam<sup>1</sup>, Kwang Youn Kim<sup>4</sup> and Soon Cheol Ahn<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology & Immunology, Busan National University School of Medicine, 49 Busandaehak-ro, Yangsan 50612, Korea

<sup>2</sup>Pusan National University School of Medicine, 49 Busandaehak-ro, Yangsan 50612, Korea

<sup>3</sup>Immunoregulatory Therapeutics Group in Brain Busan 21 Project, Pusan National University, 49 Busandaehak-ro, Yangsan 50612, Korea

<sup>4</sup>Department of Herbal Formula, Medical Research Center (MRC-GHF), College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610, Korea

Received December 9, 2015 / Revised January 15, 2016 / Accepted February 2, 2016

Statins, the inhibitors of 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, are widely used in treatments of hypercholesterolemia and newly known as anti-cancer effect of various cancer cells. Recently, several studies suggested that reactive oxygen species (ROS) play a critical role on cell death signaling. However, mechanism of ROS by rosuvastatin is currently unclear. This study aimed to explore the molecular mechanism of apoptosis by rosuvastatin in human prostate cancer PC-3 cells. Cell viability and apoptosis-related protein expression were measured by MTT assay and western blotting, respectively. In addition, the levels of apoptosis and ROS were analyzed. The results showed that rosuvastatin dramatically reduced cell viability in a dose- and time-dependent manner. We confirmed that rosuvastatin induced apoptosis through reduction of procaspase-3 and cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in PC-3 cells. In addition, rosuvastatin stimulated ROS production in a dose-dependent manner and pre-treatment with N-acetylcysteine (NAC), a ROS scavenger, significantly recovered rosuvastatin-induced ROS and apoptosis. Thus, we concluded that rosuvastatin induces apoptosis through generation of ROS in human prostate cancer PC-3 cells and provides a promising approach to improve the efficacy of cancer therapy.

**Key words** : Apoptosis, human prostate cancer PC-3 cells, N-acetylcysteine, reactive oxygen species, rosuvastatin

### 서 론

전립선암은 선진국에서 가장 많이 발생하는 암으로, 2015년 기준으로 미국에서 전체 암환자 중 가장 많은 발병률과 암 관련 사망률 2위를 나타내고 있다[33]. 우리나라에서도 서구화된 식습관과 생활들로 인하여 발생빈도가 증가하고 있는 추세이며, 2013년을 기준으로 암 발병률 5위, 사망률은 7위를 차지하고 있다[15]. 전립선암은 나이, 가족력, 식습관 등으로 발병된다고 알려져 있지만, 정확한 메커니즘은 밝혀져 있지 않다. 이러한 전립선암의 치료방법으로는 호르몬 치료, 방사선 요법, 화학적 치료 등이 사용되고 있으나, 치료효과는 제한적이고 재발 가능성이 높아 근본적인 치료법이라 할 수 없다[19].

† Authors contributed equally.

\*Corresponding author

Tel : +82-51-510-8092, Fax : +82-55-382-8090

E-mail : ahnsc@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.

Apoptosis는 자가세포사멸의 과정으로 programmed cell death 중에 하나이다. Apoptosis는 세포 내외부의 다양한 신호에 의해 진행되어 여러 단계를 거쳐 일어나게 된다. Apoptosis의 특징으로는 세포질과 염색질의 응축, 세포질 수포화, 핵의 단편화 및 apoptotic body 등과 같은 현상을 보여 준다[13, 36]. 이러한 apoptosis는 세포 내의 Bcl-2 family, caspase의 활성화, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)의 조절에 의해 발생하게 된다[20]. 최근에는 apoptosis가 reactive oxygen species (ROS)와 많은 관련이 있다고 보고되고 있다[16]. ROS는 세포 대사 과정에서 생성되고 즉시 불활성화 되지만 산화환원의 균형이 무너지게 되면, 세포손상을 가져오게 된다. 이러한 ROS는 스트레스가 없는 상황에서 세포 내 신호전달에서 중요한 역할을 하지만, 과도한 양의 ROS는 산화적 스트레스를 일으켜 DNA 손상, 노화와 apoptosis 등을 일으키게 된다.

본 연구에 사용된 rosuvastatin은 고지혈증 치료제로 사용되는 statin 계열 중 하나이고 다른 statin 제제에 비해 우수한 지질농도 감소 효과를 가지고 있다[28]. Statin은 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) 환원효소 억제제로 HMG-CoA의 결합을 경쟁적으로 저해하여, 콜레스테롤 합

성과정의 HMG-CoA에서 mevalonate로 전환되는 것을 억제하여 최종적으로 콜레스테롤의 합성을 감소시킨다[14]. Statin은 여러 과정을 거쳐 콜레스테롤의 생합성을 억제할 뿐만 아니라 farnesyl-pyrophosphate, geranylgeranyl-pyrophosphate 같은 중간합성체의 생성에도 관여하게 되는데, 중간합성체에는 small GTP 단백질인 Rho, Rac, Rho, Cdc42의 활성화를 조절한다[34]. Ras는 mitogen-activated protein kinase, Rho kinase 등의 하위단계 단백질을 조절하여 세포증식과 분화, 세포 사멸 등을 조절한다고 알려져 있다[3, 4]. 최근 statin의 사용이 폐암 환자의 생존율을 높인다는 보고가 있지만 항암제로서의 정확한 메커니즘은 알려져 있지 않다[5].

따라서 본 연구에서는 rosuvastatin이 인간 전립선암 세포주인 PC-3 세포에 미치는 항암효과의 분자 생물학적 기전에 대하여 조사하였고, 그 중 ROS가 apoptosis 유발에 어떠한 영향을 미치는지도 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료 및 시약

본 실험에서 사용된 rosuvastatin은 Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해하여 세포에 처리시 50% methanol로 희석하여 사용하였다. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), N-acetylcysteine (NAC) and DMSO는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Annexin V/PI Staining Kit는 BD Bioscience (San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Western blotting에 사용한 Bax, Bcl-2, PARP, caspase-3 and  $\beta$ -actin antibody는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), Cell Signaling Technology (Beverly, MS, USA)에서 구입하였다.

### 세포 배양

인간 전립선암 세포주인 PC-3는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)로부터 분양 받아 10% fetal bovine serum (FBS) (WelGene Inc, Gyeonsan-si, Korea)과 1% penicillin, streptomycin (WelGene Inc.)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, WelGene Inc.) 배지를 사용하여 5%의 CO<sub>2</sub>가 포함된 37°C에서 배양하였다.

### MTT에 의한 세포 생존율 측정 및 세포형태 변화 관찰

PC-3 세포는  $1 \times 10^4$  cells/well로 분주하여 세포 배양용 48-well plate를 이용하여 24시간 동안 안정화시킨 후 10-80  $\mu$ M 농도의 rosuvastatin을 처리하였다. 24시간 반응 후, MTT 시약을 0.5 mg/ml 농도로 250  $\mu$ l씩 분주하여 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 상등액을 제거하고 생성된

보라색의 formazan을 DMSO에 250  $\mu$ l씩 분주하여 96-well plate에 100  $\mu$ l씩 옮겨서 ELISA reader (VERSAMAX microplate reader, Molecular Devices, Toronto, Canada)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포형태 변화를 관찰하기 위하여 OLYPUS CKX41/31 도립 현미경(OLYMPUS, Tokyo, Japan)을 이용하여 각 농도에 따른 세포의 형태변화를 400배 배율로 관찰하였다.

### Flow cytometry 분석에 의한 세포주기 측정

PC-3 세포를  $1 \times 10^5$  cells/well로 세포배양용 6-well plate에 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 후, 다양한 농도(10-80  $\mu$ M)로 처리하였다. 24시간 후, 약물 처리된 PC-3 세포를 회수하여 phosphate-buffered saline (PBS)로 세척하고 70% ethanol을 넣어 4°C에서 12시간 고정 후, RNase A를 37°C에 반응시켰다. 1시간 후, DNA staining dye인 propidium iodide (PI)로 염색하여 flow cytometry (Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 분석하였다.

### Annexin V/PI (Propidium iodide) double staining assay에 의한 apoptosis 측정

Rosuvastatin에 의한 apoptosis 유도를 확인하기 위하여 annexin V/PI detection kit을 이용하여 측정하였다. PC-3세포를  $1 \times 10^5$  cells/well로 6-well plate에 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후, rosuvastatin을 다양한 농도로 PC-3 세포에 처리하여 배양하였다. 24시간 후, 세포를 모은 다음 PBS로 세척하고, cell pellet을 annexin V/PI 시약과 1x binding buffer를 사용하여 20분간 염색시킨 후, 염색된 세포는 flow cytometry를 이용하여 분석하였다.

### 세포 내 reactive oxygen species (ROS) 생성 측정

세포 내 ROS의 변화를 측정하기 위하여 DCFH-DA를 이용하여 측정하였다. PC-3 세포를  $1 \times 10^5$  cells/well로 6-well plate에 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 후, rosuvastatin을 다양한 농도별로 처리하였다. 24시간 후, 세포를 분리하여 PBS로 세척한 뒤, 10  $\mu$ M의 DCFH-DA를 처리하여 37°C에서 30분간 염색 후 flow cytometry를 사용하여 측정하였다. ROS 생성을 억제하기 위하여 ROS scavenger로 알려진 NAC를 1시간 전처리 하였다.

### Western blotting analysis에 의한 단백질 발현 분석

Rosuvastatin에 의한 apoptosis 관련된 단백질의 발현을 확인하기 위해 western blotting analysis를 이용하였다. 먼저 다양한 농도로 처리한 PC-3 세포를 모아 PBS로 세척한 후 lysis buffer [15 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7.4), 5 mM EDTA (pH 8.0), 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 20 mg/ml aprotinin, 50  $\mu$ g/ml leupeptin, 1 mM benzaidine, 1 mg/ml pepstain]를

첨가하여 4°C에 30분간 반응시킨 후, 원심 분리하여 상층액에 있는 총 단백질을 분리하였다. Bradford법을 이용하여 정량한 뒤, 동일한 양의 단백질을 sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 전기영동으로 분리한 후, 분리된 단백질을 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane으로 transfer 하여 5% skim milk가 함유된 TBS-T buffer [20 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20]를 이용하여 실온에서 2시간 blocking 하였다. 1차 antibody는 4°C에서 12시간 반응하였으며, 2차 항체는 상온에서 2시간 반응하여 Enhanced Chemiluminescence (ECL) (iNtRON Biotechnology, Inc., Korea) 시약을 이용하여 발색하고, fluorescence scanner (LAS-3000, Fuji Film, Tokyo, Japan)을 이용하여 확인 하였으며, Multi Gauge V3.0 software를 이용하여 분석하였다.

**통계처리**

모든 실험의 결과는 3번 반복 수행하여 얻어진 것으로, 통계 분석은 ANOVA에 의해 분석하여 mean±S.D로 표시하였고, 통계적 유의성은  $p \leq 0.05$ 로 판정하였다.

**결과 및 고찰**

**Rosuvastatin의 세포독성 및 세포형태 변화 측정**

최근 연구에서 statin 계열 화합물이 여러 종류의 암세포주에 대한 항암효과를 나타낸다는 보고가 있었다[1, 7, 27, 35]. 이에 statin 계열의 rosuvastatin (Fig. 1A)을 이용하여 인간전립선 암세포주인 PC-3 세포에 대한 세포독성 및 세포형태 변화를 측정하였다. Fig. 1B와 같이, PC-3 세포에 rosuvastatin을 처리하였을 때 농도 및 시간 의존적으로 세포 생존율이 감소하였으며, 48시간 처리군의 IC 50값은 63.2 μM을 나타냈다. 또한 PC-3 세포에 미치는 형태변화를 관찰하기 위하여 다양한 농도로 rosuvastatin을 처리하여 48시간 배양한 후 광학현미경으로 관찰한 결과, 농도 의존적으로 형태적인 변형 뿐만 아니라 세포 밀도의 감소와 부착력이 떨어져 부유하는 세포들을 확인 할 수 있었다(Fig. 1C). 따라서 rosuvastatin은 PC-3 세포에서 세포형태의 변화를 통해 농도 의존적으로 세포독성이 나타나는 것을 확인 할 수 있었다.

**Rosuvastatin이 apoptosis 유도와 세포주기에 미치는 영향**

Rosuvastatin에 의한 PC-3 세포증식억제 현상이 세포주기 변화와 관련이 있는지 확인하기 위해, PC-3 세포에 rosuvastatin을 농도별로 처리하여 48시간 후에 PI 염색을 통해 세포주기 변화를 flow cytometry로 측정하였다[11, 30]. Fig. 2A에서와 같이 100 μM의 rosuvastatin을 처리하였을 때 sub G<sub>1</sub>기가 0.9%에서 10.68%로 증가했다. 따라서 rosuvastatin을 처리하

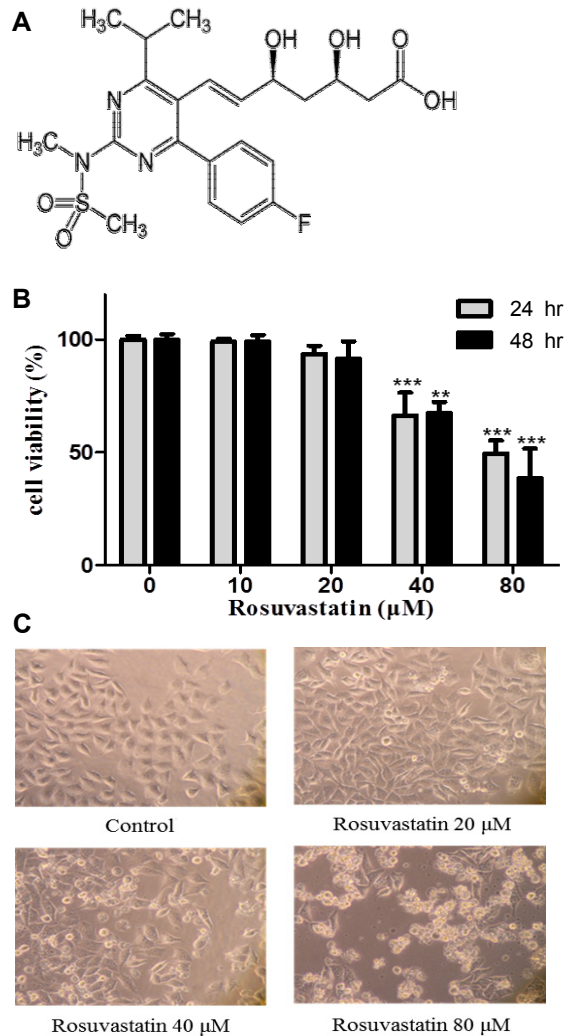


Fig. 1. Rosuvastatin inhibits cell viability and changes the morphology in prostate cancer PC-3 cells. (A) The structure of rosuvastatin. (B) Cell viability. PC-3 cells were treated with rosuvastatin in a dose-dependent manner for 24 hr and 48 hr. (C) Cell morphology. PC-3 cells were treated with rosuvastatin in a dose-dependent manner for 48 h and observed by inverted microscopy at 400x magnification ratio. Data are presented as mean± SD (n=3 in each group). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. the control group.

였을 때 세포주기를 sub G<sub>1</sub>기로 제한함으로써 세포증식을 억제하는 것을 알 수 있었다[12, 21, 26]. 또한, apoptosis 유도를 확인하기 위해 annexin V/PI double staining을 이용하여 flow cytometry로 측정하였다. Rosuvastatin을 농도별로 48시간 처리한 후 apoptosis를 측정한 결과, rosuvastatin을 10 μM 농도로 처리한 시료에서 4.1%였지만 80 μM의 농도로 처리한 시료에서 30.21%로 apoptosis가 증가되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 2B). 따라서 이러한 세포주기가 sub G<sub>1</sub>기로 정체되면서 apoptosis가 유도되는 것을 확인 할 수 있었다[31].

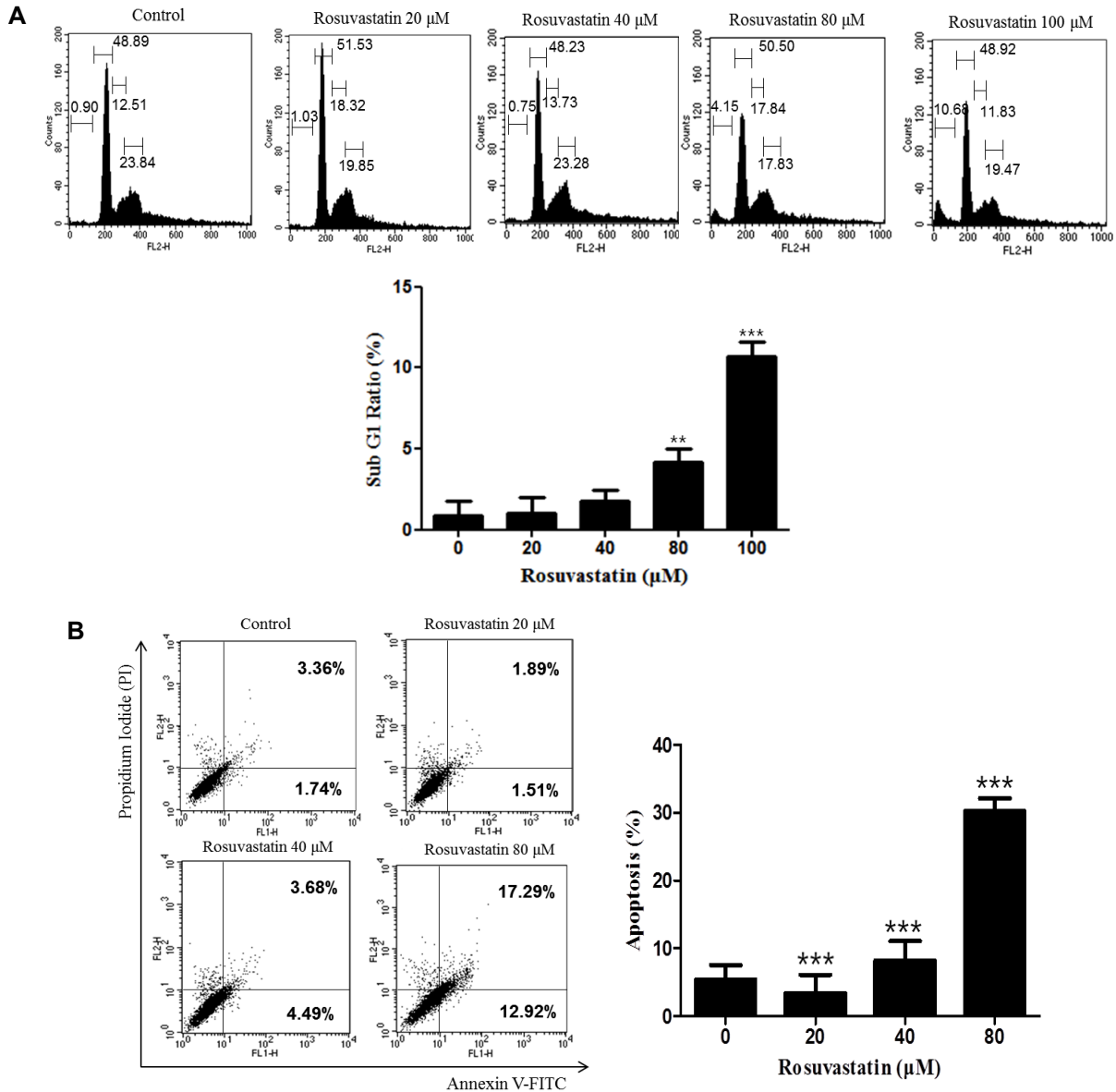


Fig. 2. Rosuvastatin induces cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer PC-3 cells. (A) Cell cycle arrest. PC-3 cells were treated with rosuvastatin in a dose-dependent manner for 48 hr. Cells were stained with propidium iodide (PI) and analyzed by flow cytometry. (B) Apoptosis. Apoptosis was detected by annexin V/PI double staining analysis. Data are presented as mean±SD (n=3 in each group). \**p*<0.05, \*\* *p*<0.01, \*\*\* *p*<0.001 vs. the control group.

**Rosuvastatin에 의한 apoptosis 관련 단백질인 Bcl-2 family와 caspase-3 및 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 발현 변화 분석**

Apoptosis 유도는 Bcl-2 family 중 anti-apoptotic Bcl-2와 pro-apoptotic Bax의 비율(Bax/Bcl-2) 증가로 인해 이들 사이의 균형이 깨어지게 되어 mitochondria가 붕괴되고 이로 인해 cytochrome c가 원형질로 방출되어 caspase의 활성화와 PARP의 분절화가 일어나 apoptosis가 유발된다[8, 32]. Caspase는 단백질 분해효소로서 평소에는 불활성 형태로 존재하지만, apoptosis가 일어날 때 활성화 되어 대표적인 기질 단백질인

PARP 분절화를 통해 apoptosis를 유도한다고 보고되어 있다 [22, 24]. Rosuvastatin이 apoptosis 관련 단백질의 발현을 조절하는지 확인하기 위해서 western blotting assay를 이용하여 분석하였다. Bcl-2 family 중 pro-apoptotic 단백질인 Bax의 발현량은 동일하였지만 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2의 발현량은 감소하였다(Fig. 3). 또한 procaspase-3의 발현감소, 즉 caspase-3의 활성화에 의해 PARP의 분절화가 촉진되는 것을 확인하였다. 따라서 rosuvastatin은 Bcl-2 family 단백질의 불균형을 유도하고, caspase-3 의존적 경로를 통하여 apoptosis를 유도하는 것을 확인할 수 있었다.

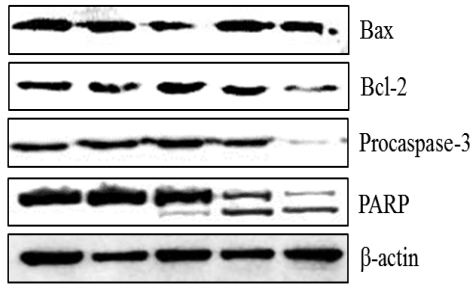


Fig. 3. Effects of rosuvastatin on expression of Bcl-2 family, caspase-3 and PARP protein in prostate cancer PC-3 cells. PC-3 Cells were treated with rosuvastatin in a dose-dependent manner for 48 hr. The expression of proteins was analyzed by western blotting assay.  $\beta$ -Actin was used a loading control.

### Rosuvastatin의 reactive oxygen species (ROS) 생성 유도

Reactive oxygen species (ROS)는 세포에서 증식과 분화와 관련이 있으며 과도한 ROS는 세포사멸을 유도한다[2, 25, 29]. 따라서 rosuvastatin 처리에 따른 PC-3 세포의 세포사멸이 ROS 생성과 관련이 있는지 확인하기 위해서 DCFH-DA를 이용하여 flow cytometry로 분석하였다. DCFH-DA는 세포 안으로 들어가서, ROS와 반응하여 DCF로 전환되어 형광을 나타냄으로써 ROS 생성량을 측정할 수 있다[17]. Fig. 4A와 같이 rosuvastatin을 처리하였을 때 ROS 생성량이 농도 의존적으로 증가한다는 것을 확인할 수 있었다. ROS 생성량은 대조군(8.49%)에 비해 80  $\mu$ M rosuvastatin 처리군(43.72%)은 약 5배 많은 ROS가 생성되었다. 이러한 rosuvastatin에 의한 ROS 생성이 ROS scavenger인 N-acetylcysteine (NAC)에 의해서 억

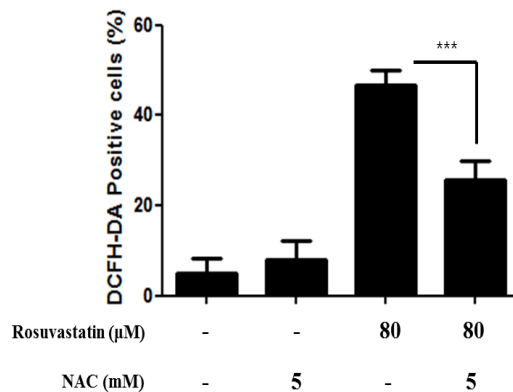
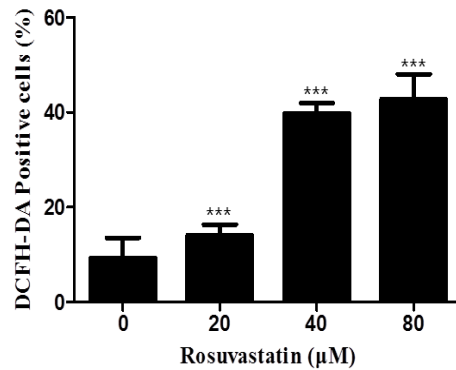
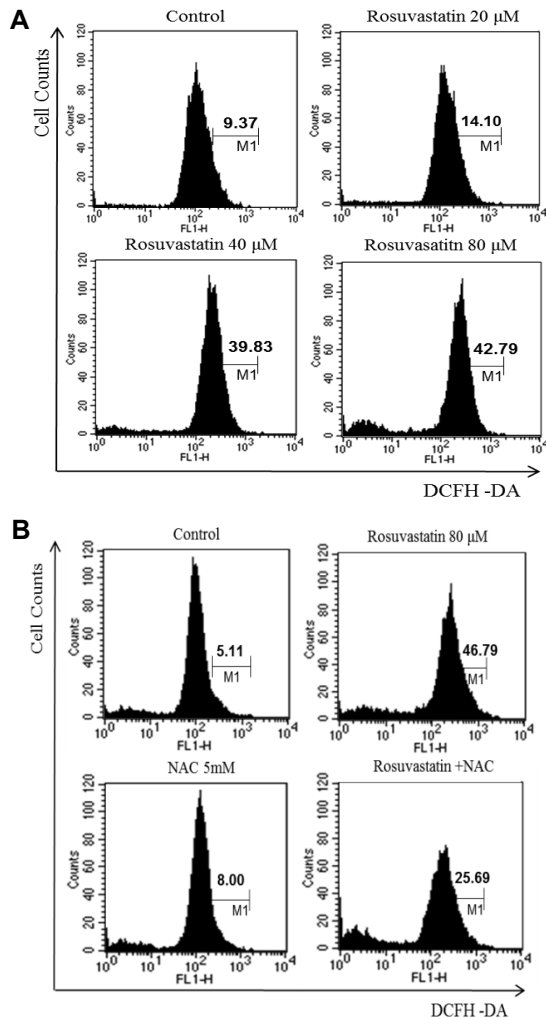


Fig. 4. Rosuvastatin stimulates ROS generation in prostate cancer PC-3 cells. (A) ROS production. (B) Effect of N-acetylcysteine (NAC). PC-3 cells were treated with rosuvastatin in a dose-dependent manner for 48 hr. The ROS generation was detected with staining of the fluorescence of DCFH-DA by flow cytometry. Cells were pre-treated with 5 mM NAC for 1 hr and treated with 80  $\mu$ M rosuvastatin for 48 hr. Data are presented as mean $\pm$ SD (n=3 in each group). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. the control group.

제 되는지 확인하였다[23]. 먼저, NAC를 1시간 전처리 한 후 48시간 동안 80  $\mu$ M rosuvastatin을 처리하였을 때 ROS의 생성이 억제 되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4B). 이전 연구에서도, 암세포에서 ROS의 증가는 apoptosis를 유도한다고 보고

되어[18] rosuvastatin은 ROS를 농도 의존적으로 발생시키고 이후 apoptosis와 관련이 있을 것으로 생각된다.

**Rosuvastatin에 의한 ROS 생성이 apoptosis에 미치는 영향**

Rosuvastatin에 의한 ROS 생성이 apoptosis와 연관이 되어 있는지 확인하기 위하여 ROS scavenger인 NAC를 이용하여 annexin V/PI double staining으로 apoptosis를 확인하였다. 먼저, NAC를 1시간 전처리 한 후 48시간 동안 80  $\mu$ M rosuvastatin을 처리하였을 때, rosuvastatin 단독으로 처리 한 apoptosis의 비율은 30.21%가 나타났으나, NAC와 병행으로 처리 한 결과 21.43%로 감소함으로써, NAC의 처리가 ROS를 억제 시켜 apoptosis를 감소시킨다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5A). 또한, NAC를 전처리하여 apoptosis 관련 단백질 변화를 관찰한 결과, procaspase-3, PARP와 같은 apoptosis 관련 단백질들의 발현량이 회복됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5B). 따라서 이러한 실험 결과를 통해 rosuvastatin이 암세포에서 ROS를 생산함으로써 apoptosis를 유도하는 것을 알 수 있었다[6, 9, 10]. 따라서 고지혈증 치료제로 사용하고 있는 rosuvastatin이 항암효과를 가진 약물로서 사용될 수 있는 기초 자료를 제시할 수 있었다.

**감사의 글**

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음. 이 논문은 2015년도 Brain Busan 21 사업에 의하여 지원되었음.

**Reference**

1. Agarwal, B., Bhendwal, S., Halmos, B., Moss, S. F., Ramey, W. G. and Holt, P. R. 1999. Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **5**, 2223-2229.
2. Buttke, T. M. and Sandstrom, P. A. 1994. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today* **15**, 7-10.
3. Cafforio, P., Dammacco, F., Gernone, A. and Silvestris, F. 2005. Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis* **26**, 883-891.
4. Cardwell, C. R., Mc Menamin, Ú., Hughes, C. M. and Murray, L. J. 2015. Statin use and survival from lung cancer: A population-based cohort study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **24**, 833-841.
5. Corsini, A., Pazzucconi, F., Arnaboldi, L., Pfister, P., Fumagalli, R., Paoletti, R. and Sirtori, C. R. 1998. Direct effects of statins on the vascular wall. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **31**, 773-778.
6. De Backer, G., Ambrosionie, E., Borch-Johnsen, K., Brotons, C., Cifkova, R., Dallongeville, J. and et al. 2003. European

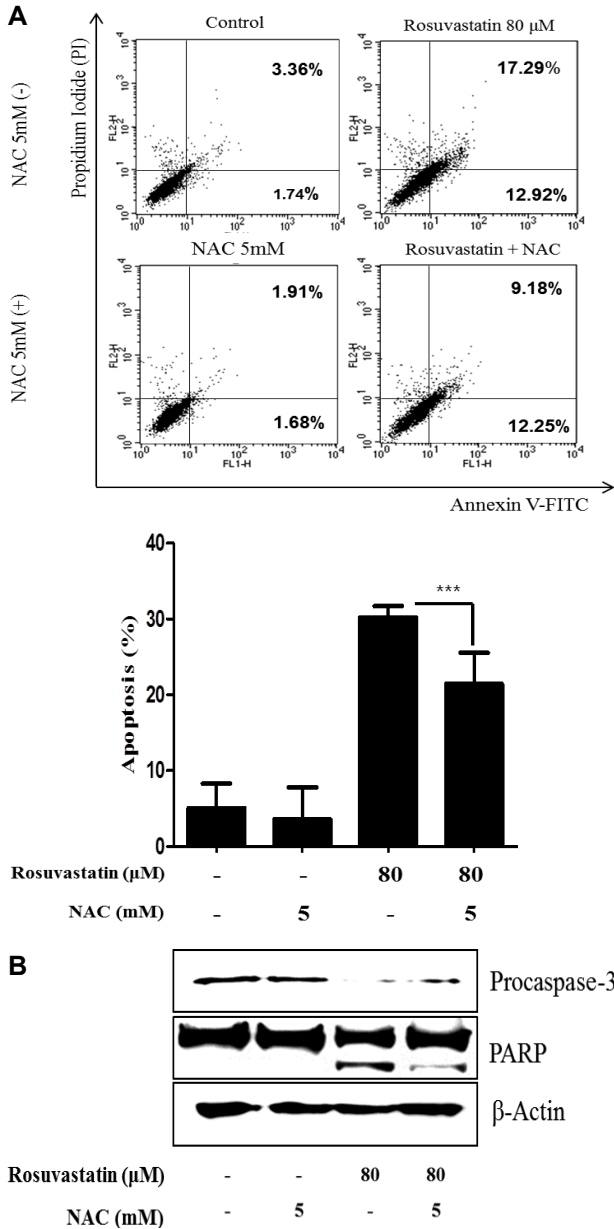


Fig. 5. ROS generation regulates rosuvastatin-induced apoptosis in prostate cancer PC-3 cells. (A) Apoptosis. Cells were pre-treated with 5 mM NAC for 1 hr and treated with 80  $\mu$ M rosuvastatin for 48 hr. Apoptosis was analyzed by annexin V/PI double staining analysis. (B) Protein expression. The protein expression of caspase-3 and PARP was shown by western blotting assay.  $\beta$ -Actin was used as a loading control. Data are presented as mean  $\pm$  SD (n=3 in each group). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001 vs. the control group.

- guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: third joint task force of European and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of eight societies and by invited experts). *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* **10**, S1-S78.
7. Dimitroulakos, J., Thai, S., Wasfy, G. H., Hedley, D. W., Minden, M. D. and Penn, L. Z. 2000. Lovastatin induces a pronounced differentiation response in acute myeloid leukemias. *Leuk. Lymphoma* **40**, 167-178.
  8. 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.
  9. Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. 2001. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *Jama* **285**, 2486.
  10. Grundy, S. M., Cleeman, J. I., Merz, C. N. B., Brewer, H. B., Clark, L. T., Hunninghake, D. B., Pasternak, R. C., Smith, S. C. and Stone, S. N. 2004. Implications of recent clinical trials for the national cholesterol education program adult treatment panel III guidelines. *J. Am. Coll. Cardiol.* **44**, 720-732.
  11. Hartwell, L. H. and Kastan, M. B. 1994. Cell cycle control and cancer. *Science* **266**, 1821-1828.
  12. Herman-Antosiewicz, A. and Singh, S. V. 2004. Signal transduction pathways leading to cell cycle arrest and apoptosis induction in cancer cells by *Allium* vegetable-derived organosulfur compounds: a review. *Mutat. Res.* **555**, 121-131.
  13. Huerta, S., Goulet, E. J. and Livingston, E. H. 2006. Colon cancer and apoptosis. *Am. J. Surg.* **191**, 517-526.
  14. Istvan, E. S. and Deisenhofer, J. 2001. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* **292**, 1160-1164.
  15. Jung, K. W., Won, Y. J., Kong, H. J., Oh, C. M., Seo, H. G. and Lee, J. S. 2013. Prediction of cancer incidence and mortality in Korea, 2013. *Cancer Res. Treat.* **45**, 15.
  16. Kamata, H. and Hirata, H. 1999. Redox regulation of cellular signalling. *Cell. Signal.* **11**, 1-14.
  17. Kawiak, A., Zawacka-Pankau, J., Wasilewska, A., Stasiłojc, G., Bigda, J. and Lojkowska, E. 2012. Induction of apoptosis in HL-60 cells through the ROS-mediated mitochondrial pathway by ramentaceone from *Drosera aliciae*. *J. Nat. Prod.* **75**, 9-14.
  18. Kim, G. H., Lee, M. H., Han, M. H., Park, C., Hong, S. H. and Choi, Y. H. 2013. Induction of apoptosis by *citri pericarpium* methanol extract through reactive oxygen species generation in U937 human leukemia cells. *J. Life Sci.* **23**, 1057-1063.
  19. Klotz, L. 2013. Active surveillance for prostate cancer: Overview and update. *Curr. Treat. Options Oncol.* **14**, 97-108.
  20. Kong, E. H., Kim, Y. J., Kim, Y. J., Cho, H. J., Yu, S. N., Kim, K. Y., Chang, J. H. and Ahn, S. C. 2008. Piplartine induces caspase-mediated apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. *Oncol. Rep.* **20**, 785-792.
  21. Lapenna, S. and Giordano, A. 2009. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat. Rev. Drug Discovery* **8**, 547-566.
  22. Lavrik, I. N., Golks, A. and Krammer, P. H. 2005. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J. Clin. Invest.* **115**, 2665.
  23. Lee, Y. K., Hwang, J. T., Kwon, D. Y., Surh, Y. J. and Park, O. J. 2010. Induction of apoptosis by quercetin is mediated through AMPK $\alpha$ 1/ASK1/p38 pathway. *Cancer Lett.* **292**, 228-236.
  24. Li, X. and Darzynkiewicz, Z. 2000. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase measured in situ in individual cells: relationship to DNA fragmentation and cell cycle position during apoptosis. *Exp. Cell Res.* **255**, 125-132.
  25. Ling, Y. H., Liebes, L., Zou, Y. and Perez-Soler, R. 2003. Reactive oxygen species generation and mitochondrial dysfunction in the apoptotic response to Bortezomib, a novel proteasome inhibitor, in human H460 non-small cell lung cancer cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 33714-33723.
  26. Malumbres, M. and Barbacid, M. 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 153-166.
  27. Marcelli, M., Cunningham, G. R., Haidacher, S. J., Padayatty, S. J., Sturgis, L., Kagan, C. and Denner, L. 1998. Caspase-7 is activated during lovastatin-induced apoptosis of the prostate cancer cell line LNCaP. *Cancer Res.* **58**, 76-83.
  28. Maron, D. J., Fazio, S. and Linton, M. F. 2000. Current perspectives on statins. *Circulation* **101**, 207-213.
  29. Mounjaroen, J., Nimmannit, U., Callery, P. V., Wang, L., Azad, N., Lipipun, V., Chanvorachote, P. and Rojanasakul, Y. 2006. Reactive oxygen species mediate caspase activation and apoptosis induced by lipoic acid in human lung epithelial cancer cells through Bcl-2 down-regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **319**, 1062-1069.
  30. Newman, D. J. and Cragg, G. M. 2007. Natural products as sources of new drugs over the Last 25 Years. *J. Nat. Prod.* **70**, 461-477.
  31. Park, H. J., Jin, S. J., Oh, Y. N., Kim, B. W. and Kwon, H. J. 2015. Induction of apoptosis by methanol extract of *Endlicheria anomala* in human lung and liver cancer cells. *J. Life Sci.* **25**, 441-449.
  32. Rossé, 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.
  33. Siegel, R., Miller, K. and Jemal, A. 2015. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J. Clin.* **65**, 5-29.
  34. Van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C. 1997. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* **11**, 2295-2322.
  35. Wang, I. K., Lin-Shiau, S. Y. and Lin, J. K. 2000. Induction of apoptosis by lovastatin through activation of caspase-3 and DNase II in leukaemia HL-60 cells. *Pharmacol. Toxicol.* **86**, 83-91.
  36. Zimmermann, K. C., Bonzon, C. and Green, D. R. 2001. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther.* **92**, 57-70.

**초록 : Rosuvastatin이 유도하는 ROS가 전립선암 PC-3 세포주의 세포사멸 유도에 미치는 영향**최현덕<sup>1,3</sup> · 백종진<sup>2</sup> · 김상현<sup>1</sup> · 유선녕<sup>1,3</sup> · 천성학<sup>1</sup> · 김영욱<sup>1</sup> · 남효원<sup>1</sup> · 김광연<sup>4</sup> · 안순철<sup>1,3\*</sup>(<sup>1</sup>부산대학교 의학전문대학원 미생물학 및 면역학교실, <sup>2</sup>부산대학교 의학전문대학원, <sup>3</sup>부산대학교 Brain Busan 21 면역조절 치료소재 연구인력양성사업단, <sup>4</sup>대구한의대학교 한의과대학 한의예과 MRC-GHF)

3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A 환원효소의 억제제로 알려진 statin은 고지혈증 치료제로 널리 사용되고 있고, 또한 다양한 암에서 항암효과를 나타낸다고 알려져 있다. 최근 연구에서는 reactive oxygen species (ROS)가 세포사멸 신호에 중요한 역할을 한다고 보고하였지만, rosuvastatin에 의한 ROS 생성의 정확한 기전은 아직 밝혀지지 않았다. 인간 전립선암 세포주인 PC-3 세포를 이용하여 rosuvastatin에 의한 세포사멸 경로를 확인하였다. 세포독성, 세포사멸과 ROS의 생성을 측정하기 위해서 MTT assay, annexin V/PI 염색과 DCFH-DA염색을 통해 flow cytometry에 의해 측정하였다. 본 연구의 결과에서, rosuvastatin은 농도와 시간 의존적으로 세포 생존을 감소와 세포형태변화를 확인할 수 있었다. Flow cytometry 분석을 통해 세포주기와 apoptosis를 확인하였고 Western blotting assay를 통하여 PARP와 procaspase-3가 감소되는 것을 통해 apoptosis를 재확인 할 수 있었다. 또한 rosuvastatin은 농도 의존적으로 ROS 생성을 증가하였고, ROS 생성 저해제인 N-acetylcysteine (NAC) 처리를 통해 ROS와 apoptosis가 회복되었다. 따라서 rosuvastatin이 ROS 생성을 통해 apoptosis를 유도한다는 것을 알 수 있었고, 이는 인간 전립선 암세포에 대한 항암치료제로서의 가능성을 제시한다.