

The Extract from *Artemisia annua* Linné. Induces p53-independent Apoptosis through Mitochondrial Signaling Pathway in A549 Lung Cancer Cells

Bo-Min Kim¹, Guen-Tae Kim¹, Eun-Ji Kim¹, Eun-Gyeong Lim¹, Sang-Yong Kim² and Young-Min Kim^{1*}

¹Department of Biological Science and Biotechnology, College of Life Science and Nanotechnology, Hannam University, Yuseong-dero 1646, Daejeon 305-811, Korea

²Department of Food Science & Bio Technology, Shinansan University, Daehakro Danwon-gu, Ansan-city, Gyeonggi-do 15435, Korea

Received May 9, 2016 / Revised June 3, 2016 / Accepted June 20, 2016

The extract from *Artemisia annua* L.(AAE) is known as a medicinal herb that is effective against cancer. Apoptosis is the process of programmed cell death, and mitochondria are known to play a central role in cell death control. In this study, we evaluated the p53-independent apoptosis of extract of AAE through downregulation of Bcl-2 and the mitochondrial pathway in A549 (lung cancer cells). AAE may exert cancer cell apoptosis through regulating p-Akt, Cox-2, p53 and mitochondria-mediated apoptotic proteins. p-Akt/cox-2 is known to play an important role in cell proliferation and cell survival. The Bcl-2 pro-apoptotic proteins (such as Bax, Bak and Bim) mediate the permeabilization of the mitochondrial outer membrane. Treatment of AAE reduces p-Akt, p-Mdm2, cox-2 and anti-apoptotic proteins (such as Bcl-2), while tumor suppressor p53 and pro-apoptotic proteins. Activation of Bax/Bak releases cytochrome c from mitochondria to the cytosol to activate a caspase. Caspase-3 is the major effector caspase associated with apoptotic pathways. Caspase-3 generally exists in cytoplasm in the form of a pro-enzyme. In the initiation stage of apoptosis, caspase-3 is activated by proteolytic cleavage and activated caspase-3 cleaves poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). We treated Pifithrin- α (p53 inhibitor) and Celecoxib (Cox-2 inhibitor) to learn the relationship between the signal transduction of proteins associated with apoptosis. These results suggest that AAE induces apoptosis through a p53-independent pathway in A549.

Key words : A549 cells, celecoxib, Cox-2, mitochondrial apoptosis, p53

서 론

암은 선진국에서 가장 큰 사망의 원인으로 높은 발병률을 나타내며, 미국 암 협회의 보고에 따르면 폐암은 남녀 전체 암 발생의 2위를 차지하고 있고 다른 암에 비해 사망률이 높은 것으로 나타나고 있다[2]. 암은 비정상적인 세포의 증식과 전이에 의해 발생하는 질병 중 하나로 흡연, 전염성 미생물, 식습관과 같은 외부적 요소와 유전적 돌연변이, 호르몬과 같은 내부적 요소에 의해 유발될 수 있는데, 특히 폐암의 경우 흡연이 가장 중요한 위험 요소로 여겨지고 있다. 폐암은 초기 증상이 없는 편으로 지속적인 기침과 가래, 가슴 통증, 재발성 폐렴, 기관지염이 동반될 수 있다[1].

폐암의 치료법에는 병기에 따라 수술과 항암 화학요법 등

이 있지만, 정상세포에 대한 독성 및 부작용을 초래하는 문제점이 제기되고 있다[4]. 최근에는 인체에 무해한 여러 가지 천연 추출물을 이용한 암 예방 및 치료에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다[12]. 여러 암에서 예방 및 치료 효과를 나타내는 것으로 알려진 대표적인 것으로 개똥쑥(*Artemisia annua* L.)이 있다. 개똥쑥은 국화과(Compositae)의 쑥속(*Artemisia*)에 속하는 일년생 초본으로 높은 항산화 및 항암 활성이 입증됨으로써 세계적으로 주목 받고 있는 생약제이다[18].

따라서 이러한 천연 소재를 이용한 새로운 항암제의 개발이 이루어짐으로써 천연 추출물의 세포주기 조절에 따른 암 세포 증식억제, 암세포의 apoptosis (세포자가사멸)를 유도하는 연구가 진행되고 있다[14]. Apoptosis는 프로그램된 세포 죽음으로 세포 수축, 핵의 응축 및 세포막 기포형성의 특징을 갖는다[15]. 이러한 현상은 몸의 항상성 유지에 중요한 역할을 하고 있지만 사멸해야 세포가 제대로 사멸하지 않으면 몇몇 세포들의 돌연변이가 암으로 진행될 수 있다[16].

Apoptosis의 경로에는 외인성 경로(extrinsic pathway)와 내인성 경로(intrinsic pathway)로 구분되는데 apoptosis가 일어나는 동안 미토콘드리아는 중요한 역할을 하며, 특히 내인성 경로는 Bcl-2 family 단백질에 의해 주로 조절된다[5].

*Corresponding author

Tel : +82-42-629-8753, Fax : +82-42-629-8873

E-mail : kym@hnu.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.

Anti-apoptotic 단백질에는 Bcl-2/Bcl-X_L, pro-apoptotic 단백질에는 Bax, Bak이 있는데 이들은 서로 결합하여 동형이량체(homodimer)와 이형이량체(heterodimer)를 이룬다. 이 단백질들의 상대적 비율은 apoptosis의 억제와 촉진 효과에 영향을 준다[19].

Akt는 serin/threonine kinase로 세포 증식이나 분화, 성장에 관여하고 Bad나 caspase-9과 같은 pro-apoptotic 단백질의 발현을 저해하여 apoptosis를 억제하는 것으로 알려져 있다[17]. Murine Double Minute 2 (Mdm2)는 세포의 성장에 관여하는 것으로 Akt에 의해 ser166위치에서 인산화된다. p-Mdm2는 p53의 전사활성 부위에 결합하여 p53의 ubiquitination을 유도한다[23]. 전사인자(Transcription factor)로서의 p53은 세포 사멸에 관여하는 유전자의 발현을 조절하여 비정상적인 세포의 발생을 효과적으로 차단함으로써 암 발생 억제 기능을 수행한다[10].

Cyclooxygenase-2 (Cox-2)는 염증이거나 종양이 발생한 조직에서 발현이 증가하는 것으로 특히 폐암의 발병과 예후에 깊이 관여한다고 밝혀져 있고 과발현 될 경우 세포사멸에 대한 내성 증가, 혈관 신생의 증가, 암 조직의 전이 증가 등을 초래한다고 알려져 있다[13]. 개똥쑥의 성분 중 하나인 플라보노이드에 의해 Cox-2 신호 경로의 활성을 저해되어 암세포의 증식이 억제되는 것으로 보고됨에 따라 Cox-2 신호 경로의 조절이 암세포의 비정상적인 증식을 억제할 수 있는 중요한 신호분자로 작용할 수 있음을 알 수 있다[9, 22].

따라서 본 연구에서는 A549 폐암 세포에서 AAE를 처리했을 때 apoptosis 효과를 확인하고자 하였고, 이에 관여하는 p53, Cox-2 신호경로의 저해와 Bcl-2 family 단백질간의 상호상관관계를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용된 개똥쑥은 대전 한약재시장에서 구입하여 개똥쑥 분쇄가루 250 g에 95% 에탄올 200 ml을 가하여 72시간 동안 상온에서 환류 추출하였다. 이러한 방법으로 추출된 AAE를 감압농축기를 이용하여 감압 농축과정을 거친 후, DMSO (Dimethyl sulfoxide)로 100 mg/ml stock 으로 만들어 -20°C에 보관하여 사용하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 5 mg/ml stock으로 만들어서 사용하였다. 또한 Pifithrin-a와 Celecoxib은 Sigma Aldrich에서 구입하여 DMSO에 녹인 뒤 각각 20 mM과 100 mM으로 만들어 사용하였다.

세포배양

본 실험에서 사용된 A549 세포주는 American Type Cul-

ture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양 받았다. A549 세포주는 wild-type p53을 가지는 폐암세포이다[7]. A549는 10% FBS (Hyclone, LaboratorisInc, Logan, UT, USA)와 1% antibiotics (Hyclone, LaboratorisInc, Logan, UT, USA)가 포함된 RPMI 1640 배지 (Hyclone, Laboratris Inc., Logan, UT, USA)를 사용하였고 Fibroblast 세포는 ATCC에서 분양 받았으며 10% FBS와 1% antibiotics가 포함된 DMEM (Hyclone, Laboratris Inc., Logan, UT, USA) 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C 조건하에 배양하였다. 매 48시간 마다 Trypsin-EDTA (Hyclone, Laboratories Inc., Logan, UT, USA)를 이용하여 세포를 부유상태로 만든 다음, 세포를 1×10⁶ cells/ml로 분주하고 계대 배양하였다.

MTT assay에 의한 세포 독성 및 생존율 측정

세포배양용 12 well plate에 A549 세포를 1×10⁴ cells/ml로 분주하고 24, 48, 72시간 그리고 Fibroblast 세포를 1×10⁴ cells/ml로 분주하고 24시간 동안 배양시킨 후 AAE를 처리하였다. Pifithrin-a와 Celecoxib 처리시에는 Pifithrin-a, Celecoxib 을 30분 먼저 처리한 후 AAE를 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양하였다. MTT용액을 30μl씩 첨가하여 30분 동안 CO₂ incubator에서 배양한 후, MTT 시약이 들어있는 배지를 제거하고 DMSO 150 μl를 넣어 well에 생성된 formazan을 모두 녹여 96 well plate에 100 μl씩 옮겨서 Microplate Reader (BIORAD Laboratories, Inc, USA)로 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Lactate dehydrogenase (LDH) assay를 의한 세포 독성 측정

Apoptosis 시 세포막의 손상으로 인해 발생하는 LDH의 양을 측정하기 위해 LDH cytotoxicity assay kit (Thermo Scientific, USA)를 사용하여 세포 독성을 확인하였다. 배양된 A549세포를 24-well plate에 1×10⁴ cells/well의 농도로 분주하여 24시간 배양하여 부착 및 안정화 시킨 후, AAE를 처리하였다. Pifithrin-a와 Celecoxib 처리시에는 Pifithrin-a, Celecoxib 을 30분 먼저 처리한 후 AAE를 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 상층액 50 μl 와 LDH reagent 50 μl를 혼합하여 30분간 암 조건에서 반응시킨 다음 stop solution으로 25 μl를 가한 후 490 nm, 655 nm에서 흡광도를 측정하여 LDH 방출량을 측정하였다.

Annexin V-Fluorescein Isothiocyanate (FITC) staining에 의한 apoptosis 측정

Apoptosis을 정량적으로 분석하기 위해 FITC-Annexin V apoptosis detection kit (BD Pharmingen, USA)를 사용하였다. 세포를 모은 다음 3,000 rpm, 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. PBS를 이용하여 2번 세척한 뒤 Annexin V

binding buffer 500 μ l에 부유시켜 Annexin V-FITC 및 propidium iodide (PI)를 처리하여 암 조건에서 30동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 BD FACSCanto II를 사용하여 flow cytometry 방법에 의해 측정된 다음 BD FACSDiva Software를 이용하여 분석하였다.

Mitochondrial membrane potential (MMP, $\Delta\psi_m$)의 분석

미토콘드리아의 막 전위의 변화를 조사하기 위해 Muse™ Mitopotential Kit (MCH100110, Millipore Co., Billerica, MA, USA)를 사용하였다. A549 세포는 1X Assay buffer를 이용하여 1×10^5 cells/ml로 부유시키고 mitopotential working solution 95 μ l를 혼합하여 37°C, CO₂ incubator에서 20분 동안 반응시켰다. 반응 후 Muse Mitopotential 7-AAD reagent 5 μ l를 혼합하여 5분 동안 실온에서 염색하고 Cell Analyzer (PB4455ENEU, Muse™ Cell Analyzer, Millipore Co.)를 이용하여 분석하였다.

Western blotting에 의한 단백질 발현의 분석

6 well plate에 A549 세포를 well 당 1×10^6 cells/ml로 분주하여 24시간 동안 배양한 후 AAE를 농도별로 처리하였다. Pifithrin- α , Celecoxib과 병행 처리시에는 inhibitor를 30분 먼저 처리하였으며, 모든 물질을 최종 처리한 후 48시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양이 끝난 세포에 RIPA lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.4), 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF]를 각 well에 150 μ l씩 첨가하여 단백질을 분리한 후, 14,000 rpm, 4°C에서 20분 동안 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 추출한 단백질을 ELISA-reader를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 그 다음에 8%, 12% acrylamide gel을 이용하여 전기영동을 실시한 후 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 2% Bovine serum albumin (BSA)을 이용해 blocking하고, 1차 항체를 4°C에서 overnight 처리한 다음 2차 항체를 결합시켜 1시간 반 동안 반응시킨 후 Blue X-ray film에 감광하여 실험 결과를 측정하였다.

통계처리

통계 프로그램인 SPSS (Statistical Package for the Social Science) 22.0 프로그램을 사용하였고 실험 설계에 대한 분산 분석은 *t*-test를 실시하여 유의성을 검정하였다. 각 자료는 3번 이상의 반복된 실험을 통하여 얻어진 결과로 검정하였고 $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

AAE가 A549 폐암 세포의 증식에 미치는 효과와 apoptosis 유도 확인

AAE 처리에 따른 A549 폐암세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay와 LDH release assay를 통해 세포 독성과 세포 증식억제 효과를 각각 확인하였다. 정상세포인 fibroblast 세포에 대한 AAE의 세포 독성을 측정된 결과는 Fig. 1A에 나타내었다. AAE를 농도별(40, 60, 80 μ g/ml)로 처리한 후 24시간 동안 반응시켰을 때 정상세포의 생존율이 90% 이상으로 유지되는 것으로 보아, AAE 추출물의 독성이 없음을 확인하였다. Fig. 1B에 나타난 바와 같이, AAE를 농도별(10, 20, 40, 60, 80, 100 μ g/ml)로 처리한 후 24, 48, 72시간 동안 반응시켰을 때 AAE의 농도와 시간 의존적으로 A549 폐암 세포의 생존율이 감소하는 것을 확인하였다. 다음으로 LDH release assay를 실시하였는데, LDH는 세포질에 존재하는 효소로 세포막이 손상을 받으면 세포 외부로 방출하게 된다[24]. 따라서 세포의 손상 정도를 확인하기 위하여 배양액 중에 들어있는 LDH 방출량을 측정된 결과는 Fig. 1C와 같다. AAE를 농도별(20, 40, 60, 80, 100 μ g/ml)로 처리한 후 24, 48, 72시간 동안 반응시켰을 때 LDH 방출량이 AAE의 농도와 시간 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 증식 억제 효과가 apoptosis 유도에 의한 것인지를 알아보기 위해 flow cytometry를 이용한 annexin-V/PI staining 분석을 실시하였다. Fig. 1D에 나타난 바와 같이, AAE를 농도별(40, 60, 80 μ g/ml)로 처리한 후 48시간 동안 반응시켰을 때 정상 배지에서 자란 폐암세포의 자연적 apoptosis의 유발 빈도는 약 5.43%로 매우 낮았으나 AAE 처리 농도가 증가할수록 빈도가 증가하여 80 μ g/ml 처리군에서는 약 21.79%에 해당하는 세포에서 apoptosis가 유도된 것으로 관찰되었다. 따라서 AAE 처리에 의한 A549 폐암세포의 생존율 및 증식 억제는 apoptosis에 의한 현상임을 알 수 있었다.

AAE에 의한 미토콘드리아 막 전위 변화와 관련 단백질 발현 확인

미토콘드리아 경로를 통한 apoptosis가 유도되면 세포질에 존재하는 칼슘 이온 및 apoptosis 조절 단백질이 미토콘드리아로 이동하여 미토콘드리아 단편화(fragmentation)가 일어난다. 이로 인해 미토콘드리아 막의 탈분극화가 투과성 조절 구멍(permeability transition pore)을 열어 apoptosis에 작용하는 단백질들을 밖으로 유출시켜 핵의 응집과 DNA 단편화를 통해 apoptosis를 유도하게 된다[8, 11]. 미토콘드리아 막 전위의 변화를 알아보기 위해 Muse™ Mitopotential Kit를 사용하여 Cell Analyzer로 분석하였다. Fig. 2A에 나타난 바와 같이, AAE를 농도별(40, 60, 80 μ g/ml)로 처리한 후 48시간 동안 반응시켰을 때 정상 배지에서 자란 암세포의 자연적 apoptosis의 유발 빈도는 약 15.36%로 매우 낮았으나 AAE의 처리 농도가 증가할수록 빈도가 증가하여 80 μ g/ml 처리군에서는 약 99.6%에 해당하는 세포에서 apoptosis가 유도된 것으로 관찰되었다. 미토콘드리아의 막전위를 유지하는데 중요

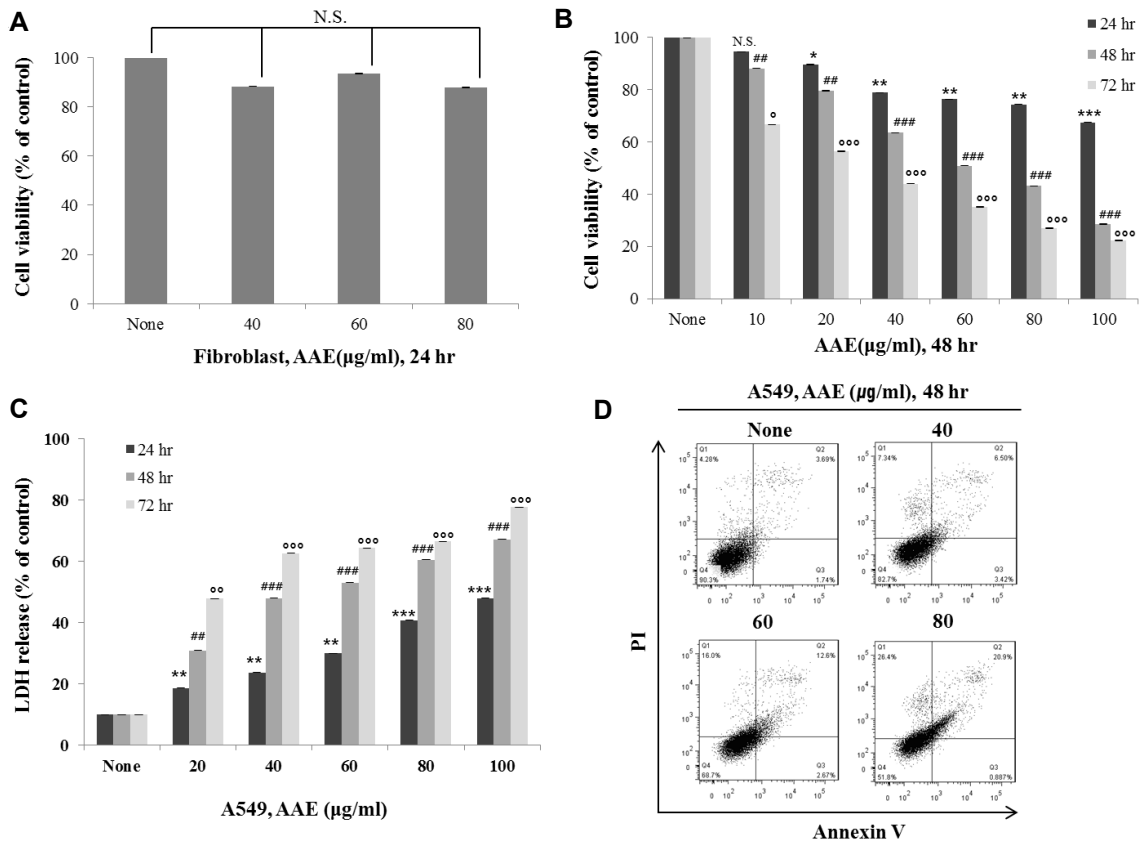


Fig. 1. Artemisia annuain (AAE) inhibits cell proliferation and induces apoptosis in A549 lung cancer cells. (A) Cell proliferation rate was measured by MTT assay. Fibroblast cell was not effected by Artemisia annuain 40-80 µg/ml for 48 hr. The statistical analysis of the data was carried out by use of a t-test. N.S.;not significant (each experiment's, n=3). (B) A549 cells were treated with Artemisia annuain 10-80 µg/ml for 24-72 hr. The statistical analysis of the data was carried out by use of a t-test. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ compared to control. N.S.;not significant (each experiment's, n=3). (C) AAE increased the LDH release in A549 lung cancer cells. Cells were treated with the indicated concentrations of AAE for 24-72 hr. The statistical analysis of the data was carried out by use of a t-test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to control (each experiment's, n=3). (D) Apoptosis was measured by Annexin V-fluorescein isothiocyanate and propidium iodide (PI). Cells were treated with the indicated concentrations of AAE for 48 hr.

한 역할을 하는 단백질로는 Bcl-2 family가 있다[20]. Bcl-2와 Bcl-X_L같은 anti-apoptotic 단백질은 미토콘드리아 막의 안정화를 유지하고 Bax, Bak과 같은 pro-apoptotic 단백질은 미토콘드리아 막으로 이동하여 막 투과성을 증가시키는 역할을 한다[3]. 이러한 apoptosis 과정이 활성화되면 가장 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려진 caspase-3가 활성화되어 PARP 단백질을 분해시킨다. 따라서 본 연구에서는 PARP, p-Mdm2, Cox-2, p-Akt, p53 단백질뿐만 아니라 내인성 경로라 불리는 미토콘드리아 경로를 구성하는 단백질의 발현 정도를 확인하기 위해 Western blotting을 실시하였다. Fig. 2B에 나타난 바와 같이, AAE를 농도별(40, 60, 80 µg/ml)로 처리하였을 때 그 결과 세포증식에 관여하는 p-Akt, p-Mdm2, Cox-2와 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2, Bcl-X_L, pro caspase-3의 감소를 확인할 수 있었고 암 억제유전자인 p53과 pro-apoptotic 단백질인 Bax, Bak, Bim, 그리고 PARP의 불활성화 상태인 cleaved-

PARP의 증가 또한 확인할 수 있다. 가장 하위 단계에 존재하는 caspase-3에 의하여 분해되는 단백질인 PARP는 DNA repair나 유전자 안정성 유지의 핵심인자로 작용하지만 단편으로 잘리게 되면 PARP의 기능을 상실하게 된다. 이러한 PRAP의 단편화는 caspase 활성화에 의존적인 apoptosis 유도의 생화학적 표식자로 사용되고 있다[6]. 이상의 결과를 살펴볼 때, AAE가 A549 폐암세포에서 내인성 경로에 관여함으로써 apoptosis를 유도하는 단백질들의 활성을 유도한다는 것을 알 수 있었다.

p53 및 Cox-2 저해제가 A549 폐암 세포의 증식에 미치는 영향

p53과 Cox-2가 A549 폐암 세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해 p53, Cox-2의 저해제인 Pifithrin-α와 Celecoxib 그리고 AAE 단독 혹은 병행 처리한 후 MTT assay를 통한

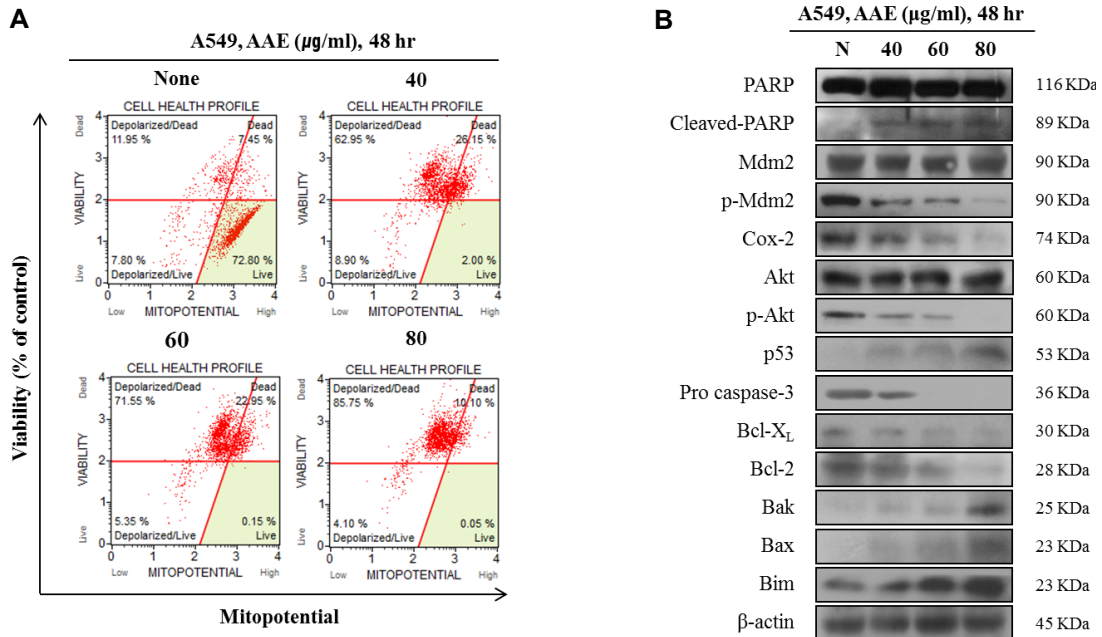


Fig. 2. Evaluation of the effect of AAE on the apoptosis through the mitochondrial signaling pathway. (A) Cells were treated with the indicated concentrations of AAE for 48 hr. Cells stained with Muse™ Mitopotential Kit and analyzed by Muse™ Cell Analyzer. Data shows four cell populations - Live, Depolarized/Live, Depolarized/Dead, and Dead cells. (B) Protein level was measured by Western blotting. Cells were treated with 40-80 µg/ml of AAE for 48 hr. The β-actin probe served as protein-loading control.

세포의 생존율과 세포증식 억제를 확인하였다. Fig. 3A에 나타난 바와 같이, Pifithrin-α 20 mM와 Celecoxib 100 mM, AAE 60 µg/ml을 48시간 동안 단독 혹은 병행처리 했을 때 암세포 증식을 확인하였다. AAE를 단독으로 처리했을 때에는 약 58%, Pifithrin-α를 단독처리 했을 때에는 약 96%, Pifithrin-α와 AAE를 병행처리 했을 때에는 약 68%, Celecoxib 단독으로 처리했을 때에는 약 78%, Celecoxib과 AAE 병행처

리 했을 때에는 약 58%의 생존율을 보였다. Celecoxib을 단독 혹은 AAE와 병행처리 했을 때 생존율이 감소한 것과 달리, Pifithrin-α를 처리한 생존율이 정상 배지에서 자란 암세포의 생존율과 차이가 없는 것을 확인하였다. 다음으로 LDH release assay를 실시하였다. Fig. 3B에 나타난 바와 같이, AAE 단독으로 처리했을 때에는 약 27%, Pifithrin-α와 AAE를 병행처리 했을 때에는 약 34%, Celecoxib을 단독으로 처리했을 때

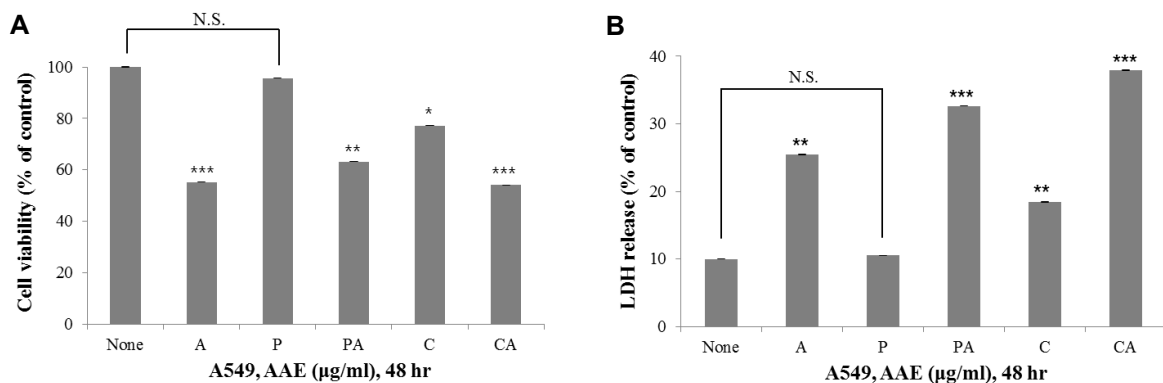


Fig. 3. Effects of Pifithrin-α on p53-independent apoptosis. Co-treatment of Celecoxib and AAE inhibits cell proliferation. Pifithrin-α did not affect apoptosis. (A) Cell proliferation rate was measured by MTT assay. Cells were pre-treated with 20 mM Pifithrin-α or 100 mM Celecoxib for 30 min and co-treated with 60 µg/ml AAE 48 hr. The statistical analysis of the data was carried out by use of a t-test. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 compared to control (each experiment's, n=3). (B) AAE increased the LDH release in A549 lung cancer cells. The statistical analysis of the data was carried out by use of a t-test. ***p*<0.01, ****p*<0.001 compared to control. N.S.;not significant (each experiment's, n=3).

에는 약 18%, Celecoxib과 AAE를 병행 처리했을 때에는 약 48%의 LDH 방출량을 나타냈다. Celecoxib을 단독 혹은 AAE와 병행처리 했을 때 LDH 방출량이 증가한 것과 달리 Pifithrin- α 를 처리했을 때 정상 배지에서의 암세포에서 방출된 LDH 방출량과 차이가 없는 것으로 보아 p53-independent 경로를 통해 apoptosis가 일어나는 것을 확인하였다.

p53 및 Cox-2 저해제에 의한 apoptosis 효과와 관련 단백질의 신호 경로 조절 확인

p53과 Cox-2 경로를 통한 A549 폐암 세포의 apoptosis 효과를 알아보기 위해 flow cytometry를 이용한 annexin-V/PI staining 분석과 미토콘드리아 막 전위의 변화를 확인하였다. Fig. 4A에 나타난 바와 같이, Pifithrin- α 20 mM과 Celecoxib 100 mM, AAE 60 μ g/ml를 48시간 동안 단독 혹은 병행처리 했을 때의 apoptosis 정도를 확인하였다. AAE 단독으로 처리 했을 때에는 약 17.59%, Pifithrin- α 와 AAE를 병행처리 했을

때에는 약 17.93%, Celecoxib을 단독으로 처리했을 때에는 약 10.11%, AAE와 병행처리 했을 때에는 약 12.48%에 해당하는 세포에서 apoptosis가 유도된 것으로 관찰되었다. p53과 Cox-2 저해제를 처리했을 때 미토콘드리아 막 전위의 변화를 알아보기 위해 Muse™ Mitopotential Kit를 사용하여 Cell Analyzer로 분석하였다. Fig. 4B에 나타난 바와 같이, AAE 단독으로 처리했을 때에는 약 80.1%, Pifithrin- α 와 AAE를 병행처리 했을 때에는 약 82.6%, Celecoxib을 단독으로 처리했을 때에는 약 72.95%, AAE와 병행처리 했을 때에는 약 86.85%에 해당하는 세포에서 apoptosis가 유도된 것을 확인할 수 있었다. Celecoxib을 단독 혹은 AAE와 병행처리 했을 때 apoptosis의 빈도가 증가한 것과 달리 Pifithrin- α 를 처리했을 때 정상 배지에서의 빈도와 차이가 없는 것으로 보아 AAE는 A549 폐암 세포에서의 apoptosis를 유도하고 p53-independent 경로를 통해 apoptosis가 일어나는 것을 확인하였다.

다음으로 p53, Cox-2 저해제와 AAE의 처리에 따른 apop-

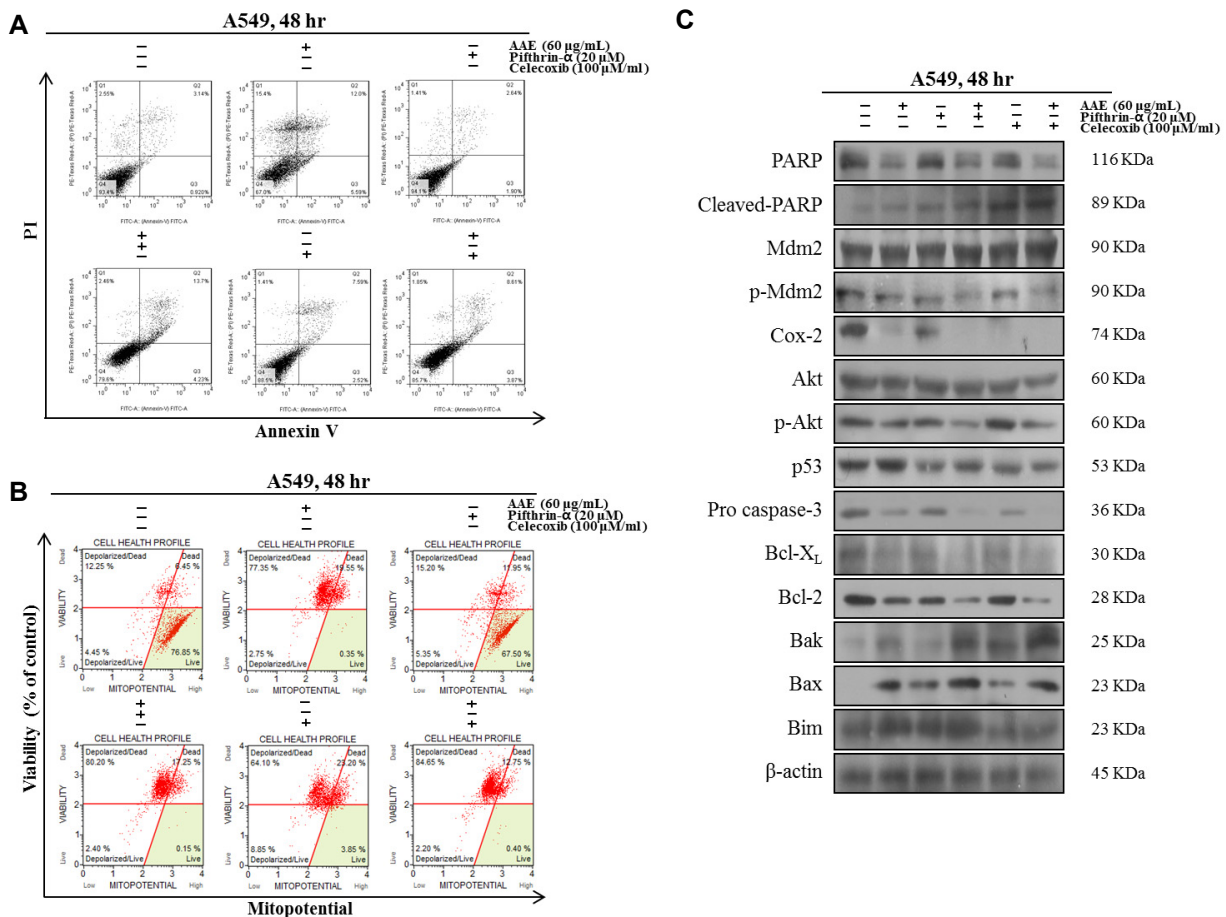


Fig. 4. Co-treatment of Celecoxib and AAE inhibits cell proliferation and induces apoptosis. Pifithrin- α did not affect apoptosis. (A) Cells were pre-treated with 20 mM Pifithrin- α or 100 mM Celecoxib for 30 min and co-treated with 60 μ g/ml AAE 48 hr. Apoptosis was measured by Annexin V-fluorescein isothiocyanate and propidium iodide (PI). (B) Cells stained with Muse™ Mitopotential Kit and analyzed by Muse™ Cell Analyzer. Data shows four cell populations - Live, Depolarized/Live, Depolarized/Dead and Dead cells. (C) Protein level was measured by Western blotting. Cells were treated with 40-80 μ g/ml of AAE for 48 hr. The β -actin probe served as protein-loading control.

osis 관련 신호 단백질들간의 관계를 알아보기 위해 Western blotting을 실시하였다. 선행연구에 의하면 Celecoxib은 암세포에 처리했을 때 apoptosis를 유도하고, AAE는 항산화 및 암세포 증식 억제 활성이 높은 것으로 보고되었다[18, 21]. Fig. 4C에 나타난 바와 같이, Celecoxib과 AAE를 단독 혹은 병행처리 했을 때 p-Akt, p-Mdm2, Cox-2, pro caspase-3 그리고 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2, Bcl-X_L의 감소와 pro-apoptotic 단백질인 Bax, Bak, Bim 그리고 cleaved-PARP의 증가를 확인할 수 있었다. Caspase (cysteine-aspartic proteases)는 정상세포에서 pro-enzyme 형태로 존재하다가 apoptosis와 관련 신호에 의해 활성화되면 세포 내 poly ADP-ribose polymerase (PARP)와 같은 표적 단백질을 분해하는 역할을 한다 [14]. Celecoxib을 단독 혹은 AAE와 병행처리 했을 때 apoptosis와 관련된 단백질이 증가한 것과 달리, Pifithrin- α 를 처리했을 때 p53에 의해 활성이 증가하는 Bax, Bak 단백질에 영향을 주지 않는 것으로 보아 AAE와 Cox-2 저해는 p53-independent 경로를 통해 A549 폐암 세포에서의 apoptosis에 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

결과적으로 본 연구를 통해 AAE 처리에 의하여 유도되는 apoptosis는 내인성 경로에 의하여 조절되며 이러한 효과는 Cox-2의 활성 감소와 p53-independent 경로를 통해 일어나는 것임을 확인하였다. 이 연구를 바탕으로 실제로 폐암 치료제로서의 사용 가능성을 확인하기 위해서는, 앞으로 활성 성분 분석 및 다양한 추가 실험 등이 수행되어야 할 것이다.

References

- ACS. 2012. Cancer facts & figures. *American cancer society*.
- Ahmedin, J., D. V. M., Freddie, B., Melissa, M. Center., Jacques, F., Elizabeth, W. and David, F. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* **61**, 69-90.
- Bae, O. S., Yoo, Y. M. and Lee, S. G. 2005. Pro-apoptotic effect of mori cortex radices in A549 lung cancer cells. *Kor. J. Orient Physiol. Pathol.* **19**, 1563-1567.
- Choi, T. Y., Lee, S. W., Ryu, Y. H., Ban, H. J., Seo, G. H., Kim, Ahn, S. H and Sohn, I. C. 2010. The induction effect of apoptosis in A549 human lung cancer cells by the trichosanthes kirilowii pharmacopuncture solution. *Kor. J. Acupunct.* **27**, 15-23.
- Deying, Z., Zhe, L. and Zhenzhong, L. 2015. Aqueous extract of *huang-lian* induces apoptosis in lung cancer cells via p53-mediated mitochondrial apoptosis. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **58**, 353-357.
- Duriez, P. and Shah, G. 1997. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. *Biochem. Cell Biol.* **75**, 337-349.
- Felicia, D. G. and David, A. O. 1998. p53 status does not determine outcome of E1B 55-kilodaltonmutant adenovirus lytic infection. *ASM* **72**, 9479-9490.
- Gottlieb, E., Armour, S. M., Harris, M. H. and Thompson, C. B. 2003. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. *Cell Death Differ.* **10**, 709-717.
- Jorge, F. S. F., Devanand, L. L., Tomikazu, S. and Arne, H. 2010. Flavonoids from *artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. *MDPI* **15**, 3135-3170.
- Jung, C. R., Lim, J. H., Choi, Y. J, Kim, D. G. Kang, K. J., Noh, S. M. and Im, D. S. 2010. Enigma negatively regulates p53 through MDM2 and promotes tumor cell survival in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 4493-4506.
- Kang, D. Y., Lee, J. Y., Kim, M. S., Kim, C. H., Kim, H. K., Lee, S. M., Kwon, Y. M., Lee, J. W., Baik, H. S., Yu, B. P. and Chung, H. Y. 2008. 4-Hydroxynonenal induces endothelial apoptosis through mitochondrial depolarization. *J. Life Sci.* **18**, 1513-1520.
- Lee, H. N., Jang, H. Y., Kim, H. J., Shin, S. A., Choo, G. S., Park, B. K., Kim, B. S. and Jung, J. Y. 2015. Induction of apoptosis by piceatannol in YD-15 human oral cancer cells. *Prev. Nutr. Food Sci.* **44**, 975-982.
- Lee, K. H. and Yang, S. C. 2009. Relation between cyclooxygenase-2 and polo-like kinase-1 in non-small cell lung cancer. *KATRD* **67**, 303-310.
- 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.
- Park, H., Jin, C. Y., Choi, T. H., Hong, S. H. and Cho, Y. H. Effect of proapoptotic Bcl-2 on naringenin-induced apoptosis in human leukemia U937 cells. *J. Life Sci.* **23**, 1118-2215.
- Park, M. A. and Kang, K. J. 2015. Effect of grape skin extract on apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **25**, 87-98.
- Park, S. Y., Lee, S. H., Park, O. J and Kim, Y. M. 2011. Apoptotic effects of curcumin and EGCG via Akt-p53 signaling pathway in HCT116 colon cancer cells. *J. Life Sci.* **21**, 89-95.
- Ryu, J. H., Lee, S. J., Kim, M. J., Shin, J. H., Kang, S. K., Cho, K. M. and Sung, N. J. 2011. Antioxidant and anticancer activities of *artemisia annua* L. and determination of functional compounds. *Prev. Nutr. Food Sci.* **40**, 509-516.
- Soung, Y. H., Lee, J. W., Kim, S. Y., Nam, S. W. and Park, W. S. 2005. Mutational analysis of proapoptotic bcl-2 Family genes in colon carcinomas. *J. Pathol. Transl. Med.* **39**, 168-171.
- Tohru, Y. and Andrew, T. 2013. Autophagy and cell death. *Essays Biochem.* **55**, 105-117.
- Wu, G. S., Zou, S. Q., Liu, Z. R., Tang, Z. H. and Wang, J. H. 2003. Celecoxib inhibits proliferation and induces apoptosis via prostaglandin E2 pathway in human cholangiocarcinoma cell lines. *World J. Gastroenterol.* **9**, 1302-1306.
- Yewseok, S., Farrukh, A., Jeremy, J. J. and Hasan, M. 2009. A plant flavonoid fisetin induces apoptosis in colon cancer cells by inhibition of COX2 and Wnt/EGFR/NF- κ B-signaling pathways. *Oxford Univ Press.* **30**, 300-307.

23. Yoko, O., Shohei, K., Toshiyuki, O., Yuko, I., Toshiaki, S., Keiji, T., Norihisa, M. and Yukiko, G. 2002. Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J. Biol. Chem.* **277**, 21843-21850.

24. Yoon, M. Y., Kim, J. Y., Hwang, J. H., Cha, M. R., Lee, M.

R., Jo, K. J. and Park, H. R. 2007. Protective effect of methanolic extracts from dendrobium nobile lindl. on H₂O₂-induced neurotoxicity in PC12 cells. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **50**, 63-67.

초록 : A549 폐암세포에서 미토콘드리아 경로를 통한 개똥썩 추출물의 apoptosis 유도 효과

김보민¹ · 김근태¹ · 김은지¹ · 임은경¹ · 김상용² · 김영민^{1*}

(¹한남대학교 생명시스템학과, ²신안산대학교 식품생명과학과)

개똥썩 추출물(AAE)은 암에 효과적인 약초로 알려져 있다. Apoptosis는 프로그램화된 세포사멸로 미토콘드리아는 세포사멸 조절에 중요한 역할을 한다. 이 연구는 A549 폐암세포에서 Bcl-2 하위조절과 미토콘드리아 경로를 통한 AAE의 p53 비의존적인 세포사멸을 보여주고 있다. AAE는 p-Akt, cox-2, p53 그리고 미토콘드리아 조절 단백질을 통해 암세포의 사멸을 촉진한다. p-Akt/cox-2 단백질은 세포 증식과 생존에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. Bax, Bak, Bim과 같이 세포사멸을 촉진하는 Bcl-2 단백질은 미토콘드리아 외막의 투과성을 조절한다. AAE의 처리는 p-Akt, p-Mdm2, cox-2 그리고 anti-apoptotic 단백질과 같이 세포사멸을 억제하는 단백질들의 발현을 감소시키는 반면에 암 억제자인 p53과 pro-apoptotic 단백질을 증가시킨다. Bax/Bak의 활성화는 caspase를 활성화시키기 위해 cytochrome c를 미토콘드리아에서 세포질로 방출하도록 한다. Caspase-3는 apoptosis 과정과 관련된 주요 effector caspase이다. Caspase-3는 일반적으로 pro-enzyme형태로 세포질에 존재한다. Apoptosis의 개시단계에서 caspase-3는 proteolytic cleavage에 의해 활성화되고 활성화된 caspase-3는 PARP를 분해한다. Apoptosis와 관련된 단백질들의 신호전달 사이의 상관관계를 알기 위해 Pifithrin-α (p53 inhibitor)와 Celecoxib (cox-2 inhibitor)을 처리했다. 이러한 결과를 통해 A549 폐암 세포에 AAE를 처리하였을 때 p53-independent 경로를 통해 apoptosis가 유도된다는 것을 확인하였다.