



Original Article / 원저

## H460 인체 폐암세포에서 길경 물 추출물에 의해 유도된 세포사멸에서 자가포식의 역할

홍수현<sup>1,2\*</sup>, 최영현<sup>1,2</sup>

동의대학교 한의과대학 생화학교실

## The Role of Autophagy in Apoptosis Induced by Water Extract of *Platycodonis Radix* in H460 Human Lung Cancer Cells

Su Hyun Hong<sup>1,2\*</sup>, Yung Hyun Choi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Dong-eui University College of Korean Medicine

<sup>2</sup>Anti-Aging Research Center, Dong-eui University

### ABSTRACT

**Objectives** : Recent studies have suggested that *Platycodonis Radix* has various pharmacological effects such as anti-cancer, antioxidant, anti-asthma, anti-diabetes, anti-obesity, hepatoprotective, and cardiovascular protection effects. The aim of this study was to investigate the role of water extract of *Platycodonis Radix* (WPR)-induced autophagy in H460 human lung cancer cells.

**Methods** : H460 cells were treated with WPR and cell viability was calculated by an MTT assay. To evaluate changes in apoptosis- and autophagy-related genes, Western blotting was performed. Two kinds of autophagy inhibitors, 3-Methyladenine (3-MA) and bafilomycin A1, were pretreated to confirm the role of WPR-induced autophagy.

**Results** : WPR reduced the viability of H460 cells in a treatment concentration-dependent manner, which was associated with induction of apoptosis. It was also confirmed that WPR induced autophagy based on the formation of specific intracellular vacuoles and changes in the expression of autophagy-related genes. Interestingly, pretreatment with 3-MA and bafilomycin A1 increased WPR-induced cytotoxicity and apoptosis.

**Conclusions** : WPR induced autophagy at low concentrations and early stages of treatment, but promoted apoptosis at high concentrations and late stages. Moreover, WPR-induced autophagy had a cytoprotective role in H460 cells.

**Key words** : Apoptosis, Autophagy, H460 lung cancer cells, *Platycodonis Radix*.

## I. 서론

길경(桔梗, *Platycodonis Radix*)은 초롱꽃과(길경과: Campanulaceae)에 속하는 도라지(*Platycodon grandiflorum* A. DC)의 뿌리 또는 주피를 제거한 것이다. 길경의 성은 平·無毒하고, 味는 苦辛하고 歸經은 肺이다. 痰을 제거하여 기침을 멎게 하며, 咽喉를 부드럽게 하여 소리를 내게 하고, 肺氣를 잘 펼치게 하는 등의 효능을 가진다<sup>1-3)</sup>. 길경은 platycodins 및 platycosides 등 다양한 사포닌 및 플라보노이드, 페놀산, 폴리아테틸렌, 스테롤 등을 포함한 100가지 이상의 화합물을 함유하고 있다. 최근 많은 연구를 통해 길경 추출물과 생리활성 물질이 항염증, 항알러지, 면역 증강, 항당뇨, 간보호, 체중감소 및 항암 효과 등을 가지고 있음이 밝혀졌다<sup>4-6)</sup>.

폐암은 전 세계적으로 높은 발생률과 사망률을 나타내고 있다. WHO의 보고에 의하면 2020년에 폐암을 새롭게 진단받은 사람은 221만명으로 유방암 다음으로 많았으며, 180만명이 폐암으로 사망하여 전 세계 암 사망 원인 중 1위로 나타났다<sup>7)</sup>. 우리나라에서도 2000년부터는 암 사망률 1위를 계속 차지하고 있다<sup>8)</sup>. 폐암은 임상증상이 뚜렷하지 않아 진단이 늦어지는 경우가 많아 대부분 말기에 발견되어 치료가 쉽지 않다<sup>9)</sup>. 초기에 발견되지 못한 폐암의 경우에는 항암화학요법을 이용하는데 비소세포폐암은 항암화학요법에 잘 반응하지 않거나 내성이 발생하는 문제점으로 새로운 항암제 개발이 필요한 실정이다<sup>10)</sup>.

비소세포폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC)은 썸암종(adenocarcinoma), 편평상피암종(squamous cell carcinoma), 대세포암종(large cell carcinoma)을 포함하며 폐암의 85% 이상을 차지한다<sup>11)</sup>. 이번 연구에서는 H460 비소세포폐암 세포에서 길경 물 추출물은 세포내에 특수한 공포를 형성하면서 세포독성을 나타내었다. 이러한 세포내 공포와 autophagy(자가포식)와의 관계 및 그 역할을 밝히고, 길경 물 추출물의 항암기전 연구를 진행하여 의미 있는 결과를 발견하였기에 이를 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 길경 물 추출물 제조

본 연구에 사용된 건조된 국내산 길경은 옥천당주(울산, 한국)에서 구입하였다. 길경 200 g에 증류수 2 L를 넣어 100°C에서 3시간 동안 추출하여 사용하였다. 이후 물 추출물을 Whatman No.2 filter paper (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로 거른 후 동결 건조하였다. 길경 물 추출물(water extract of *Platycodonis Radix*, WPR) 분말을 증류수로 100 mg/ml의 농도로 녹인 후 고압증기멸균기에서 멸균 처리한 후, 무균실험대에서 Sartorius AG (Weender Landstr, Germany)에서 구입한 Minisart® Syringe filter (0.2 µm)를 사용하여 거른 후 실험에 사용하였다.

### 2. 세포배양

실험에 사용한 인체 비소세포폐암 세포(H460)는 생명공학연구소(KRIBB, 대전, 한국)에서 분양 받았다. H460 세포는 10%의 fetal bovine serum (FBS, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA)과 1% L-Glutamine penicillin streptomycin solution (Gibco-BRL)이 함유된 RPMI-1640 배지(WelGENE Inc., Gyeongsan, Korea)를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 유지되는 incubator에서 배양하였다.

### 3. 실험재료

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), bovine serum albumin (BSA), propidium iodide (PI), carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone (z-VAD-fmk), 3-methyladenin (3-MA), bafilomycin A1, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA)는 Sigma-Aldrich Chemical Co.에서 구입하였다. Autophagy 및 apoptosis (세포사멸) 관련 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였으며, 나머지 1차 및 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Santa Cruz Biotechnology

\*Corresponding author : Su Hyun Hong, Department Molecular Biology, College of Korean Medicine, Dong-eui university, 52-57, Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan, 47227, Republic of Korea

Tel : +82-51-890-3334, Fax : +82-51-890-3319, E-mail : hongsh@deu.ac.kr

•Received : August 3, 2021 / Revised : August 20, 2021 / Accepted : September 11, 2021



Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

#### 4. MTT assay를 이용한 세포 생존율의 측정

세포 배양용 6 well plate에 H460 세포를  $1.5 \times 10^5$  개/ml로 분주하고 안정화시킨 후, 길경 물 추출물을 각 well 당 정해진 농도 및 시간으로 처리하였다. 시약 처리 후 MTT 시약을 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 200  $\mu$ l 씩 분주한 후 2시간 뒤 MTT 시약을 제거하고 DMSO를 2 ml을 각 well에 분주하여 생성된 formazan을 녹인 후 96 well plate에 200  $\mu$ l 씩 주입하여 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)에서 540 nm 흡광도를 측정하였다.

#### 5. 세포의 형태 관찰

세포 배양용 6 well plate에 H460 세포를  $1.5 \times 10^5$  개/ml로 분주한 후, 길경 물 추출물 처리 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하면서 6시간 간격으로 도립 현미경(Carl Zeiss, Jena, Germany)을 이용하여 50배 배율로 세포의 형태 변화를 관찰하여 가장 대표적인 사진을 촬영하였다.

#### 6. DAPI staining에 의한 세포핵의 형태 관찰

Apoptosis가 유발되었을 경우 특이적으로 나타나는 핵의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 길경 물 추출물이 처리된 세포를 모아 원심 분리하여 상층액을 제거하고 fixing solution을 모아진 세포에 500  $\mu$ l 첨가하여 상온에서 10분 동안 고정한 후, 원심 분리하여 fixing solution을 제거하였다. Phosphate-buffered saline (PBS) 200  $\mu$ l에 부유시킨 후 세포가 포함되어있는 PBS 80  $\mu$ l를 slide glass 위에 떨어뜨리고 1,000 rpm에서 5분간 cytospin하여 세포를 slide glass에 부착하였다. 세포가 부착된 slide glass를 PBS로 2~3회 정도 세척한 후 0.2%의 Triton X-100 (Amresco, Solon, OH, USA)을 첨가하여 고정한 후 2.5  $\mu$ g/ml 농도의 DAPI 용액으로 염색하였다. 15분 후 DAPI 용액을 충분히 세척한 후 mounting solution을 처리하여 형광현미경(Carl Zeiss)으로 핵의 형태 변화를 관찰하여 대표적인 사진을 촬영하였다.

#### 7. Apoptosis 유도의 정량적 분석

길경 물 추출물을 적정 농도로 처리한 24시간 뒤 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였

다. PBS로 H460 세포를 2~3회 세척 후, Cycle TEST PLUS DNA REAGENT Kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 고정 및 염색을 하여 4°C에서 빛을 차단하고 30분 동안 반응을 시켰다. 그 후 35 mm mesh를 이용하여 단일세포로 분리한 후 FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 형광반응에 따른 Cellular DNA content 및 histogram을 CellQuest software 및 ModFit LT (Becton Dickinson) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

#### 8. Western blot analysis

모든 세포들에 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM ethylenediamine-tetraacetic acid, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM dithiothreitol]를 첨가하여 용해시켰다. Bio-Rad 단백질 정량 시약 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)을 사용하여 단백질을 정량한 다음 같은 양의 Laemilni sample buffer (Bio-Rad Laboratories, Inc.)를 섞어서 protein sample을 만들었다. Sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel로 전기영동을 한 후, nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 전이시켰다. Blocking을 위해 5% skim milk로 1시간 수세한 후, 1차 항체를 처리하여 상온에서 2시간 이상 또는 4°C에서 over night 시킨 다음 PBS-Tween20 (PBS-T)로 세척하였다. 2차 항체로 상온에서 1시간 반응시킨 다음 PBS-T로 세척한 후, enhanced chemiluminescence solution (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 이용하여 특정 단백질의 발현 정도를 분석하였다.

#### 9. Autophagy 유도 관찰을 위한 면역형광법

Autophagy가 유도된 증거로 사용되는 microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)의 puncta를 측정하기 위해서, 멸균된 multi well plate에 세포를 분주한 뒤에 세포가 완전히 부착하면 길경 물 추출물을 24시간 처리한 후 배지를 깨끗하게 제거하였다. 얼음 위에서 PBS에 희석시킨 3.7% formaldehyde로 30분간 고정하고 0.2% Triton X-100으로 핵에 구멍을 내는 과정을 시행한 후 PBS로 세척하였다. 2% BSA/PBS-T로 1시간 반응시켜 세포의 반응을 억제한 후 실온에서 LC3 항체로 2시간, 2차 항체로 1시간 각각 반응시키고

PBS-T로 세척하였다. 다음으로 DAPI로 핵을 염색한 후 crystal mounting으로 고정하여 형광현미경으로 길경 물 추출물 농도에 따른 LC3 단백질의 발현 양상 변화를 촬영하였다.

### 10. 통계 처리

실험결과는 평균  $\pm$  표준편차로 표시되었으며, 처리군 사이의 통계적 유의성은 SigmaPlot (Systat Software Inc., San Joes, CA, USA)을 이용하여 Student *t*-test로 확인하였다.  $p < 0.05$ 의 값은 통계적으로 유의성이 있음을 의미한다.

## III. 결과

### 1. H460 폐암 세포의 생존율 및 증식에 미치는 길경 물 추출물의 영향

길경 물 추출물의 폐암 세포의 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTT assay를 시행하였다. 길경 물 추출물을 24시간 동안 처리하였을 때, 1 mg/ml 농도에서 세포 성장율이 다소 증가하였으나, 2 mg/ml 농도부터는 농도의존적으로 세포 성장율이 감소하였다(Fig. 1A). 길경 물 추출물 4 mg/ml 농도로 시간별로 처리한 경우에도 시간의존적으로 세포 성장율이 억제되었다(Fig. 1B). 길경 물 추출물 처리 후 세포의 형태를 관찰한 결과, 길경 처리 후 초기부터 세포질 내에 작은 공포가 나타나기 시작하여 6시간 정도부터는 세포질 내의 공포가 뚜렷하게 형성되었다. 세포질 내의 공포의 크기와 수는 시간이 지남에 따라 점점 증가하다가 24시간에는 세포의 수가 많이 감소하면서 전체적인 공포의 수도 감소하였다(Fig. 1C).

### 2. H460 세포에서 apoptosis 유도에 미치는 길경 물 추출물의 영향

대부분의 임상에서 사용되는 다수의 항암제들이 apoptosis 유도를 동반한다<sup>11)</sup>. 이에 길경 물 추출물 처리에 따른 생존율 감소 및 세포사가 apoptosis 유도와 관련이 있는지를 조사하였다. Apoptosis는 type I programmed cell death로 염색질 응축(핵축), 핵 단편화(핵붕괴), apoptosis 조절 관련 유전자들의 발현 변화 등으로 apoptosis가 유도됨을 확인할 수 있다<sup>12)</sup>. Apoptosis를 확인하기 위하여 DNA content의 변화를 유세포분석을 통해 조사하였다. 길경 물 추출물 4 mg/ml을 처리하였을 때, apoptosis

가 일어난 세포에서 증가되는 sub-G1기에 속하는 세포의 빈도가 24시간이 되었을 때 급격하게 증가하였다(Fig. 2A). DAPI 염색을 통해 핵의 형태 변화를 형광현미경으로 관찰한 결과, 길경 물 추출물 4 mg/ml을 처리한 지 24시간째에 apoptosis가 유발된 세포에서 전형적으로 관찰되는 염색질 응축에 의한 핵의 조각집이 증가되었다(Fig. 2B). 다음으로 apoptosis 연관 단백질 발현 변화를 조사하였다. DNA의 복구에 관여하는 apoptosis 과정에서 활성화되는 cysteine 단백질분해효소인 caspase의 기질에 해당하는 poly ADP ribose polymerase (PARP)의 분절이 길경 물 추출물 4 mg/ml을 24시간 처리하였을 때 뚜렷하게 증가되었다. 대표적인 실행 caspase인 caspase-3의 pro-form이 감소하는 것으로 보아 caspase의 cleavage가 증가되면서 caspase-3의 활성이 증가하는 것을 알 수 있었다. 이는 anti-apoptotic protein인 Bcl-2의 감소와 pro-apoptotic protein인 Bid의 활성 증가를 반영하는 분절형성상과도 관련되어 있었다(Fig. 2C). 이러한 결과는 길경 물 추출물이 H460 세포의 성장을 억제시키는데 caspase 의존적 apoptosis가 부분적으로 관여되어 있음을 보여주는 결과이다.

### 3. H460 세포에서 autophagy 유도에 미치는 길경 물 추출물의 영향

Fig. 3A에 보여지는 바와 같이, 길경 물 추출물을 처리한 후 6시간이 경과되면 세포 내에 뚜렷한 공포가 형성되는 것이 관찰되었다. 이러한 세포내 공포가 autophagy에 의한 현상인지를 알아보기 위하여 autophagy가 진행되는 동안 주요하게 작용하는 단백질들의 발현 변화 및 LC3 단백질의 축적을 살펴보았다. LC3 단백질은 autophagosome의 이중막을 형성하는데 핵심적인 역할을 하는 단백질로, LC3II 단백질의 축적은 autophagosome이 형성되고 있음을 의미한다<sup>13)</sup>. 길경 물 추출물 3 mg/ml을 처리하면 LC3II 단백질의 뚜렷하게 증가하였다. Autophagy 진행과정에서 작용하는 autophagy-related genes (ATG) 및 Beclin-1의 발현 역시 길경 물 추출물 처리에 의해 변화하는 것이 관찰되었다(Fig. 3B). 다음으로 LC3 단백질의 직접적인 세포내 축적을 관찰하기 위하여 면역형광법을 시행하였다. 길경 물 추출물을 처리하지 않은 대조군에서 LC3 단백질이 세포질에 고르게 분포되어 있으나, 길경 물 추출물 3 mg/ml을 24시간 처리하였을 때는 LC3 단백질의 높은 발현으로 인한 초록색의 형광 puncta가 뚜렷하게 나타나는 것을 확인



할 수 있었다. LC3 단백질이 뚜렷하게 염색되는 것은 길경 물 추출물에 의해 발생한 세포내 공포가 autophagy 유도로 나타난 것임을 보여준다. 또한, 길경 물 추출물 4 mg/ml을 처리한 경우에는 LC3 단백질의 puncta가 오히려 감소하여 고농도의 길경 물 추출물에 의해서는 autophagy가 감소함을 알 수 있었다(Fig. 3C).

#### 4. 3-MA 선처리를 통한 길경 물 추출물에 의해 유도된 autophagy의 기능 관찰

암세포에서의 유도된 autophagy는 종양의 성장, 암 전이, 항암제에 대한 내성을 조절하는 역할을 한다<sup>14</sup>. 길경 물 추출물에 의해 H460 폐암 세포에서 유도된 autophagy의 기능을 알아보기 위해 autophagy 억제제를 사용하였다. 3-MA는 autophagosome이 형성되는 초기 단계를 억제하는 약물로 널리 사용되고 있다<sup>15</sup>. 3-MA 1 mM을 1시간 선처리한 후 길경 물 추출물 3 mg/ml을 처리하였을 때, 길경 물 추출물 처리에 의해 뚜렷하게 증가되었던 LC3 단백질의 puncta가 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 4A & B). 또한 autophagosome 형성에 중요한 단백질인 Beclin-1의 감소도 확인되었다(Fig. 4C). 또한, 3-MA 선처리는 길경 물 추출물의 세포종식 억제를 증가시켰고, apoptosis 세포의 정량적 지표로 사용되는 sub-G1 세포의 분포를 유의하게 증가시켰다(Fig. 4D & E). 이러한 결과는 3-MA로 autophagosome 형성 초기 단계를 억제한 경우 길경 물 추출물에 의한 apoptosis 유도가 증가하면서 세포종식이 억제되는 것을 보여준다.

#### 5. Bafilomycin A1 선처리를 통한 길경 물 추출물에 의해 유도된 autophagy의 기능 관찰

Bafilomycin A1은 autophagy의 후기 단계에서 autophagosome과 lysosome이 결합하는 억제하는 약물이다<sup>15</sup>. 10 nM 또는 100 nM의 bafilomycin A1 선처리는 길경 물 추출물에 의해 증가되었던 LC3 puncta를 확연하게 감소시켰으며(Fig. 5A & B), Beclin-1의 단백질 발현 역시 감소시켰다(Fig. 5C). 흥미롭게도 bafilomycin A1 선처리 한 경우 PARP의 cleavage가 뚜렷하게 나타났다. 3-MA 처리와 유사하게, bafilomycin A1 선처리를 하였을 때, 길경 물 추출물에 의해 증가되었던 세포 성장 억제와 sub-G1 세포의 분포가 길경 물 추출물 단독 처리에 비해 유의하게 증가되었으며, bafilomycin A1의 농도가 높은 경우에 이러한 경향은 더욱 뚜렷하

게 나타났다(Fig. 5D & E). 이러한 결과는 bafilomycin A1으로 autophagy의 후기 단계를 억제한 경우 길경 물 추출물에 의한 apoptosis 유도가 촉진되면서 H460 세포에 대한 독성이 증가함을 보여준다.

### IV. 고찰

Autophagy는 세포의 항상성 유지를 위해 손상되거나 오래된 단백질, 잘못 접힌 단백질, 비정상적인 세포소기관들을 분해시키고 재활용하는 고도의 과정이다. 또한, autophagy는 영양 결핍, DNA 손상, 저산소증, 화학치료 노출 등의 세포 스트레스 상황에서 세포를 보호하는 역할을 조절하는 것으로 알려져 있다<sup>16-18</sup>. Autophagy는 이런 생리적인 역할 뿐 아니라 여러가지 질병의 발생에도 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다<sup>19-20</sup>. 종양에서의 autophagy는 두 가지 기능을 한다. 초기 종양 발생 단계에서의 autophagy는 손상된 세포와 세포소기관을 제거함으로써 종양의 성장을 억제하는 기능을 한다. 반면, 후기 종양 성장 단계에서의 autophagy는 종양세포의 대사 및 에너지 생산과 관련되어 세포 보호적인 기능을 하여 종양의 성장 및 다른 장기로의 전이를 촉진한다<sup>21-22</sup>. 이러한 autophagy의 상반된 기능으로 인해 autophagy 억제제 및 autophagy 촉진제가 항암제로서 효과가 보고되고 있다<sup>14</sup>. 최근 autophagy 조절을 통한 함암제의 발굴에 전통의약 자원의 효능 및 관련 기전 연구가 활발하게 이루어지고 있다<sup>23</sup>.

Autophagic cell death (자가포식 세포사멸)는 apoptosis와 구별되는 특징을 가지고 있으며 type II programmed cell death로 불린다. 주된 특징으로는 이중막을 가지는 autophagosome과 단일막을 가지는 autolysosome의 형성으로 인해 세포질 내에 수많은 공포가 생기면서 핵의 형태에는 변화가 없는 것이다<sup>15</sup>. 길경 물 추출물을 H460 인체 폐암세포에 처리하면 6시간 이내에 다수의 세포질 내 공포가 형성되었고 면역형광법을 통해 LC3 단백질의 형광 puncta의 위치와 세포질 내의 공포의 위치가 일치함을 확인하였다. Autophagy 유도 과정에서 isolation membrane (격리막)이라고도 불리는 phagophore (식세포)의 형성에 관여하는 Beclin-1과, phagophore의 확장에 관여하는 LC3 I 단백질의 LC3 II 단백질로의 전환 및 ATG 단백질들의 발현 증가를 통해 길경 물 추출물에 의한 세포질 내 공포는 autophagy 유도와 관련이 있음을 알 수 있었다. 또한, autophagy

저해제 처리에 의한 세포질내 공포의 현저한 감소 역시 길경 물 추출물의 autophagy 유도를 보여주는 결과이다.

이번 연구에서 길경 물 추출물로 유도된 autophagy의 기능을 알아보기 위하여 autophagy 저해제인 3-MA와 bafilomycin A1를 선처리하였을 때 세포독성이 증가되는 것은 길경 물 추출물에 의해 유도되는 autophagy가 autophagic cell death가 아닌 protective autophagy (보호 자가포식)임을 의미한다. 또한 autophagy 저해제의 처리는 apoptosis를 유의미하게 증가시켰다. 이러한 결과를 종합해보면, H460 폐암세포에서 길경 물 추출물 처리는 스트레스 상황에서 바로 세포의 죽음으로 진행되는 것이 아니라 autophagy를 유도하여 생존하려고 하는 것으로 보인다. 그러나, 고농도 및 장기간의 길경 물 추출물에 노출되면 apoptosis가 유도되는 것으로 보인다. 흥미롭게도 이전 연구에서 HCT-116 대장암 세포에서 길경 물 추출물에 의해 유도된 autophagy는 autophagic cell death로 보고되었다<sup>24)</sup>. 황금의 주요 생리활성물질인 baicalein의 경우에도 전립선암에서는 autophagic cell death를 유발하지만 간암에서는 protective autophagy를 유발하였고, 교모세포종에서 유도된 autophagy는 apoptosis를 증가시켰지만, 난소암에서 유도된 autophagy는 apoptosis를 감소시켰다<sup>23)</sup>. 종양의 종류에 따라 종양의 성장을 억제하기도 하고 촉진하기도 하는 것은 악성 종양에서 두 가지 기능을 하는 autophagy의 특징을 보여주는 것이다. 이번 연구를 통해 추후 동물실험 및 임상시험에서 길경 물 추출물에 의한 autophagy 유도 및 autophagy에 관한 기능에 대한 연구의 기반을 마련한 것에 의의가 있다.

## V. 결론

1. 길경 물 추출물은 H460 세포에서 처리 초기부터 autophagy를 유도한다.
2. 길경 물 추출물의 고농도 및 장시간 처리는 H460 세포에서 apoptosis를 유도한다.
3. Autophagy 저해제인 3-MA와 bafilomycin A1이 존재하는 조건에서 길경 물추출물에 의한 세포성장 억제 효과가 유의적으로 증가하고, apoptosis 유도 또한 증가한다.
4. H460 폐암세포에서 길경 물 추출물에 의해 유도된 autophagy는 cytoprotective effect를 가진다.

## 감사의 글

이 논문은 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단에서 시행한 기초연구사업(No. 2019R1F1A1A058094) 지원에 의해 수행되었습니다.

## References

1. Hong SH, Han MH, Park C, Park SE, Hong SH, Choi YH. Induction of autophagy and apoptosis by the roots of *Platycodon grandiflorum* on NCI-H460 human non-small lung carcinoma cells. J Int Korean Med. 2014;35(3):314-31.
2. Korean Medicinal Herb. Seo BI, Lee JH, Choi HY, Kwon DR, Bu YM. Yeong-Rim Publishing Co., Ltd. 2000, 460-1.
3. Korean pharmacology, Korean pharmacology Textbook Compilation Committee. 2015, pp. 335-48.
4. Park MS, Park SY, Lee HJ, Kim CE. A Systems-level analysis of mechanisms of *Platycodon grandiflorum* based on a network pharmacological approach. Molecules. 2018;23(11):2841.
5. Zhang L, Wang Y, Yang D, Zhang C, Zhang N, Li M et al. *Platycodon grandiflorum*-an ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review. J Ethnopharmacol. 2015;164:147-61.
6. Nyakudya E, Jeong JH, Lee NK, Jeong YS. Platycosides from the roots of *Platycodon grandiflorum* and their health benefits. Prev Nutr Food Sci. 2014;19(2):59-68.
7. World Health Organization Newsroom Fact sheets Cancer. Available from: URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
8. Shin AS, Oh CM, Kim BW, Woo HT, Won YJ, Lee JS. Lung cancer epidemiology in Korea. Cancer Res Treat. 2017;49(3):616-26.
9. Chen BJ, Yan L, Wenxin R, Luo WX, Li WM. Radiomics: an overview in lung cancer management-a narrative review. Ann Transl Med. 2020;8(18):31191.
10. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei



- AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(5):584-94.
11. Rotinen M, Encio I. Cutting down on lung cancer: Ecliptasaponin A is a novel therapeutic agent. *Ann Transl Med.* 2020;8(14):843.
  12. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018;25(3):486-541.
  13. Sumkhemthong S, Prompetchara E, Chanvorachote P, Chaotham C. Cisplatin-induced hydroxyl radicals mediate pro-survival autophagy in human lung cancer H460 cells. *Biol Res.* 2021;54(1):22.
  14. Yun CW, Jeon J, Go G, Lee JH, Lee SH. The dual role of autophagy in cancer development and a therapeutic strategy for cancer by targeting autophagy. *Int J Mol Sci.* 2021;22(1):179.
  15. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell.* 2010;140(3):313-26.
  16. Kimmelman AC. The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes Dev* 2011;25(19):1999-2010.
  17. Shimizu SG, Yoshida TS, Tsujioka MS, Arakawa SK. Autophagic cell death and cancer. *Int J Mol Sci.* 2014;15(2):3145-53.
  18. Saha S, Panigrahi DP, Patil S, Bhutia S.K. Autophagy in health and disease: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother.* 2018;104:485-95.
  19. Yonekawa T, Thorburn A. Autophagy and cell death. *Essays Biochem.* 2013; 55:105-17.
  20. Yun CW, Lee SH. The roles of autophagy in cancer. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):3466.
  21. Hao Y, Huang Y, Chen JY, Li JD, Yuan YC, Wang MZ et al., Exopolysaccharide from *Cryptococcus heimaeyensis* S20 induces autophagic cell death in non-small cell lung cancer cells *via* ROS/p38 and ROS/ERK signalling. *Cell Prolif.* 2020;53(8):e12869.
  22. Dower CM, Wills CA, Frisch SM, Wang HG. Mechanisms and context underlying the role of autophagy in cancer metastasis. *Autophagy.* 2018;14(7):1110-28.
  23. Pang XN, Zhang XO, Jiang YH, Su QZ, Li Q, Li ZC. Autophagy: Mechanisms and therapeutic potential of flavonoids in cancer. *Biomolecules.* 2021;11(2):135.
  24. Hong SH, Park C, Han MH, Kim HJ, Lee MH, Choi YH. Effects of *Platycodon grandiflorum* on the induction of autophagy and apoptosis in HCT-116 human colon cancer cells. *J Life Sci.* 2014;24(11):1244-51.

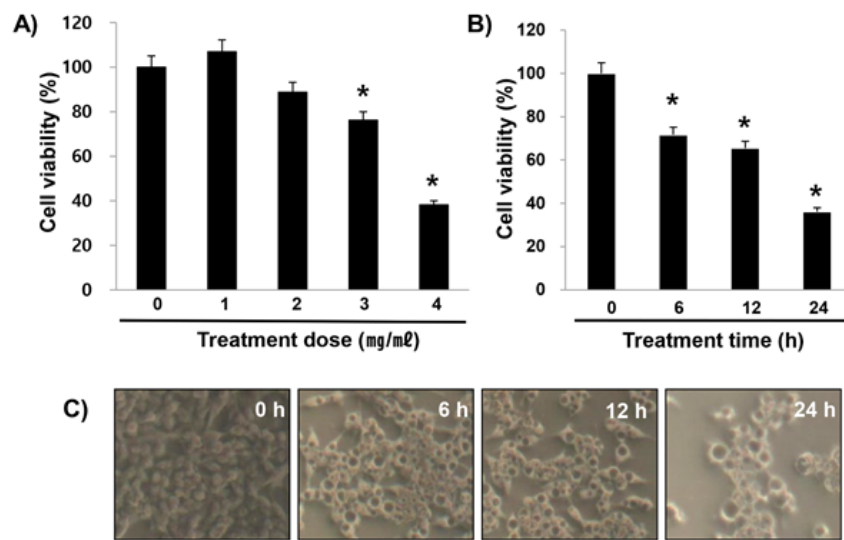


Fig. 1. WPR stimulation attenuated cell growth and proliferation in human large cell lung carcinoma H460 cells. A) H460 cells were seeded at an initial density of  $2.8 \times 10^5$  cells per ml in 6 well plates. After 24 h, cells were treated with the indicated concentrations of WPR for 24 h. Cell viability was measured by an MTT assay. B) Cells were stimulated with WPR 4 mg/ml for the indicated time points. A and B) Each point represents the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three independent experiments. ( $*p < 0.05$ , compared with controls). C) Morphologic changes were photographed under an inverted-microscope. Magnification, X50

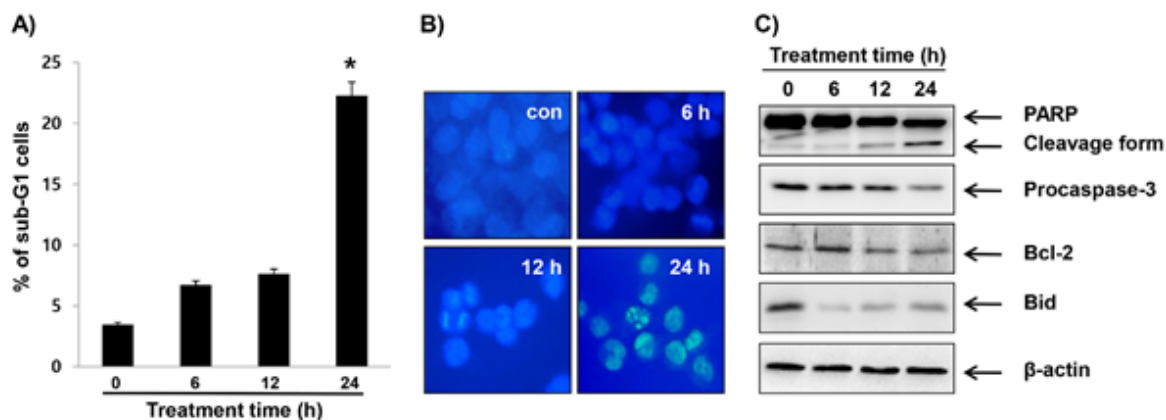


Fig. 2. WPR treatment induced apoptosis which was in part dependent on caspase activation in H460 cells. A) H460 cells were seeded at an initial density of  $2.8 \times 10^5$  cells per ml in 6 well plates. After 24 h, cells were treated with the indicated concentrations of WPR for 24 h. The cells harvested and flow cytometer analysis was performed for analysis of DNA content using flow cytometry. The frequencies of cells in the sub-G1 phase were presented. Each point represents the mean  $\pm$  SD of three independent



experiments. ( $*p < 0.05$ , compared with controls). B) H460 cells were treated by WPR 4 mg/ml for the indicated times. Representative fluorescence microscopy images of nuclei celled with DAPI were presented. Magnification, X200. C) Western blot analysis was performed for the expression of casapas-3, PARP, Bcl-2 and Bid using whole lysates of WPR-treated cells.  $\beta$ -actin was used to ensure the equal protein loading.

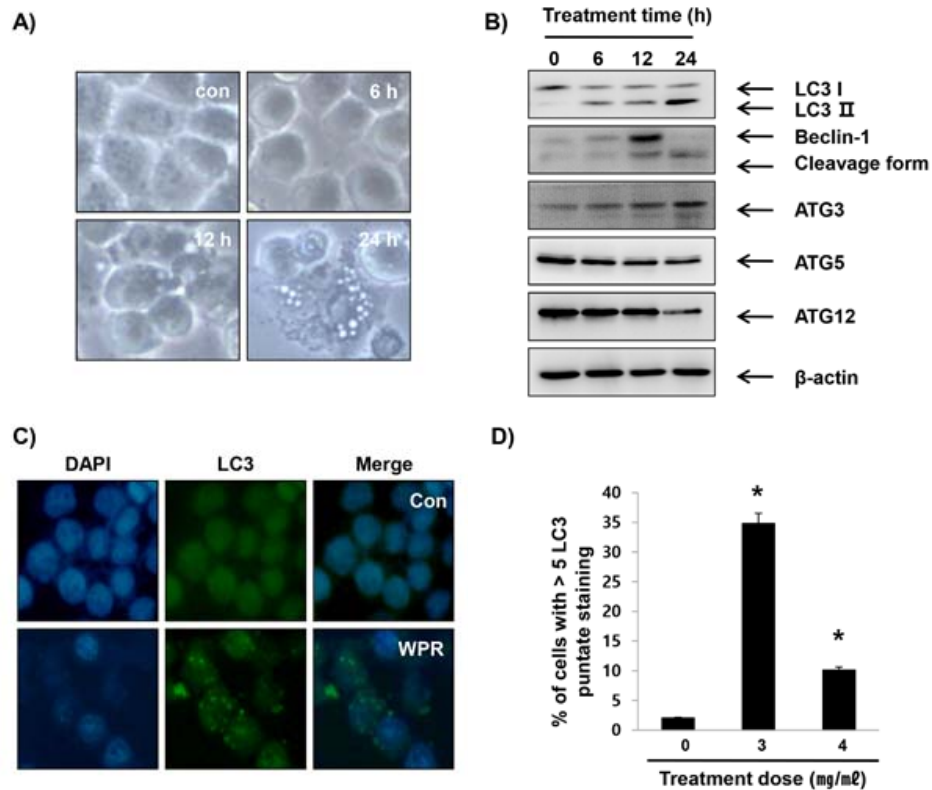


Fig. 3. WPR induced autophagy in H460 cells. A) Creation of vacuoles were observed by an inverted-microscope in cells stimulated with WPR (3 mg/ml) for the indicated times (magnification, X200). B) The expression level of autophagy-related proteins was investigated by immunoblot analysis.  $\beta$ -actin was used as a loading control. C) Immunofluorescence images representing the distribution of the autophagic marker LC3 in 3 mg/ml WPR-treated cells for 24 h were taken with a fluorescence microscope (magnification, X200). D) After WPR treatment (3 or 4 mg/ml) for 24 h, autophagic cells were quantified in three random image fields by counting cells containing >5 LC3 punctate staining and expressed as the mean  $\pm$  SD of three independent ( $*p < 0.05$ , compared with control group).

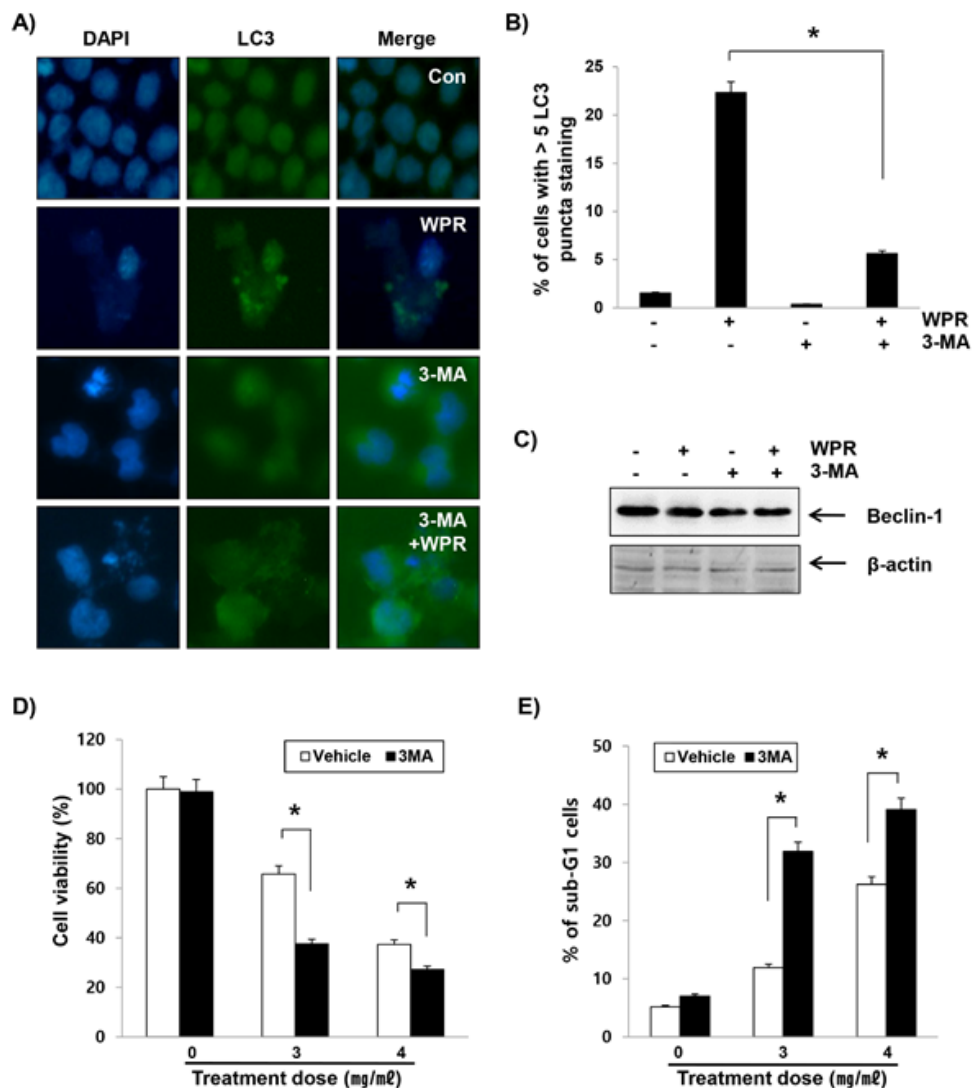


Fig. 4. Attenuation of early phase autophagy inhibited autophagosome formation and enhanced the cytotoxicity and apoptosis in WPR-stimulated H460 cells. A) Immunofluorescence images showing alternative punctate patterns of LC3 localization in cells treated with 3 mg/ml WPR in the presence or absence of 1 mM 3-MA for 24 h were presented (magnification, X 200). B) Autophagic cells were quantified in three random image fields by counting cells containing >5 LC3 punctate staining and expressed as the mean  $\pm$  SD of three independent ( $*p < 0.05$ , compared with WPR-only treated group). C) Changes in Beclin-1 expression in cells cultured under the same conditions were presented.  $\beta$ -actin was used as a loading control. D) Cells were pretreated with the 3-MA for 1 h and then WPR was treated for 24 h. The cell viability was measured by an MTT assay. E) Analysis of DNA content was performed using flow cytometry, and results represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments ( $*p < 0.05$ , compared with WPR-only treated group).

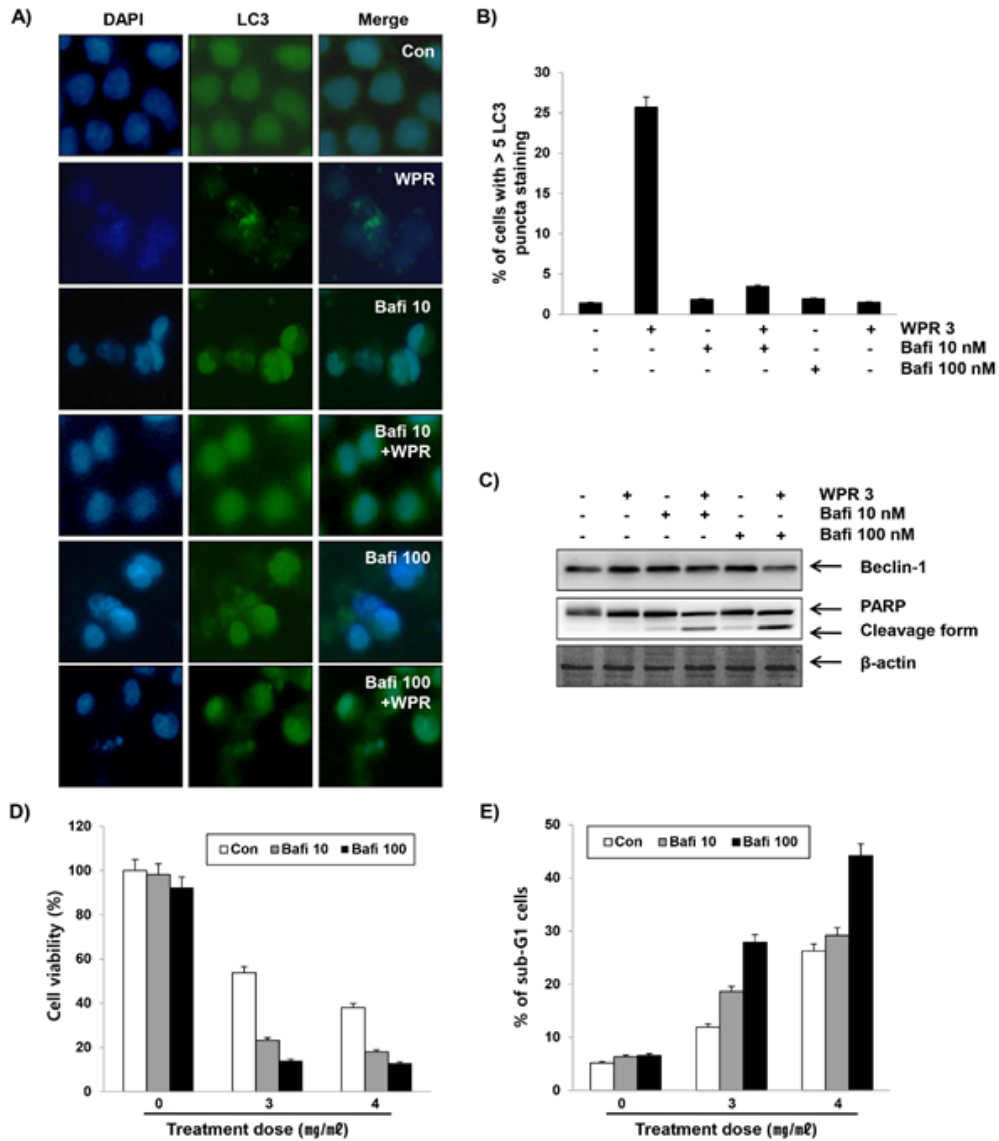


Fig. 5. Reduction of late phase autophagy inhibited autophagosome formation and enhanced WPR-induced cytotoxicity and apoptosis in H460 cells. A) Immunofluorescence images were shown using fluorescence microscopy suggesting changes in the punctate patterns of LC3 localization in H460 cells treated with 3 mg/ml WPR in the presence or absence of bafilomycin A1 for 24 h (magnification, X 200). B) Autophagic cells were quantified in three random image fields by counting cells containing >5 LC3 punctate staining and expressed as the mean  $\pm$  SD of three independent ( $^*p < 0.05$ , compared with WPR-only treated group). C) Changes in Beclin-1 and PARP expression in cells cultured under the same conditions were presented.  $\beta$ -actin was used as a loading control. D) Cells were treated with 3 or 4 mg/ml of WPR in the presence or absence of Bafilomycin A1 for 24 h. Cell viability was measured by an MTT assay. E) Analysis of DNA content was performed using flow cytometry, and results represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments ( $^*p < 0.05$ , compared with WPR-only treated group).