

DNA topoisomerase 억제제인 β -lapachone에 의한 인체 간암 및 방광암세포 증식억제에 관한 연구

최다연¹ · 이재일¹ · 정협섭¹ · 서한결¹ · 우현주 · 최영현*

동의대학교 한의과대학 생화학교실, ¹부산과학고등학교

Received January 11, 2005 / Accepted March 24, 2005

Growth Inhibition of Human Hepatoma and Bladder Carcinoma Cells by DNA Topoisomerase Inhibitor β -lapachone. Da Yean Choi¹, Jae Il Lee¹, Hyun Sup Chung¹, Han Gyeol Seo¹, Hyun Joo Woo and Yung Hyun Choi*. Department of Biochemistry, Dongguk University College of Oriental Medicine Busan 614-052, Korea, ¹R&E Program, Busan Science Academy, Busan 614-103, Korea – The objective of the present study was to investigate the effect of β -lapachone, a quinone obtained from the bark of the lapacho tree (*Tabebuia avellanedae*) in South America, on the cell growth of human hepatoma (HepG2) and bladder (T24) carcinoma cells. Exposure of cancer cells to β -lapachone resulted in growth inhibition, morphological changes and apoptosis in a concentration-dependent manner, which could be proved by MTT assay and flow cytometry analysis. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot analyses revealed that β -lapachone did not affect the levels of tumor suppressor p53 and cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p21 (WAF1/CIP1) expression. However, the transcriptional factor Sp-1 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) protein levels were significantly down-regulated by β -lapachone in both cell lines. Moreover, β -lapachone treatment caused a dose-dependent inhibition of the expression of telomere regulatory gene products such as human telomere reverse transcriptase (hTERT) and telomerase-associated protein-1 (TEP-1). Taken together, these findings suggest that β -lapachone-induced inhibition of human hepatoma and bladder carcinoma cell proliferation is associated with the induction of apoptotic cell death via modulation of several major growth regulatory gene products, and provide important new insights into the additional mechanisms of the anti-cancer activity of β -lapachone.

Key words – β -lapachone, apoptosis, human hepatoma and bladder carcinoma cells

다양한 요인들에 의해 세포 내에서는 암을 일으키는 데 관여하는 유전자와 암의 발생을 억제할 수 있는 유전자 간의 발현 균형 이상으로 세포 성장의 억제 작용이 깨어지면 복잡한 여러 단계의 과정을 거쳐 수년 혹은 수십 년 후에 한 세포 혹은 여러 세포에서 다발성으로 암이 발생할 수 있다. 이러한 관점에서 암은 세포 증식에 이상이 있는, 즉 세포주기 조절에 이상이 있는 세포집단이라고 할 수 있기 때문에 특정 후보 항암물질에 의한 암세포의 세포주기와 연관된 apoptosis (programmed cell death) 유발 해석에 대한 연구는 필연적인 과정이다.

β -lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione)은 남미지역에 자생하는 *Tabebuia avellanedae* 라는 나무의 수피로부터 동정된 quinone계 천연물의 일종으로 DNA topoisomerase 활성을 억제하는 것으로 보고되어진 바 있다[18,29]. DNA topoisomerase는 DNA가 염색체를 이루도록 응축되어 있는 구조를 풀어주는 역할을 하며, DNA 자신이 가지고 있는 유전정보를 바탕으로 한 유전자 발현을 위해서는 반드시 DNA의 응축이 풀려야 한다[25]. 일반적으로 암세포는 정상 세포에 비하여 훨씬 활발하게 성장하고 분열하기 때문에 DNA topoisomerase의 활성 억제는 최근 항암제 개발의 새로운

표적이 되고 있다[15]. β -lapachone은 DNA를 강하게 응축시킴으로써 세포의 유전자 발현을 선택적으로 억제할 수 있으며, 비정상적인 세포의 증식 및 분열을 야기할 수 있는 것으로 보고되어짐에 따라, 이러한 특성을 이용한 항암제로의 개발 가능성이 폭 넓게 제시되어지고 있다[1,24]. 그러나 β -lapachone은 기존에 알려진 camptothecin과 같은 대표적인 DNA topoisomerase 억제제와는 작용기전에 완전히 다르며[18], anti-bacterial, anti-fungal 및 anti-trypanocidal 등과 같은 다양한 약리작용이 있는 것으로도 보고되어지고 있다[12,13,21]. 또한 최근의 연구 보고들에 의하면 다양한 종류의 인체 암세포에서 β -lapachone은 암세포의 증식을 억제시키고 apoptosis를 유발시키는 것으로 알려져 있으나 아직까지 정확한 기전이 해석되어 있지 않은 상태이다[8-10,20,24-26,29,36].

본 연구에서는 β -lapachone의 다양한 암세포에서의 항암작용에 대한 부가적인 자료를 얻기 위하여, 그동안 선행연구가 이루어지지 않은 인체 간암세포(HepG2) 및 방광암세포(T24)의 증식에 미치는 β -lapachone의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

암세포의 배양, β -lapachone의 처리 및 세포형태의 관찰
본 실험에 사용한 HepG2 간암 및 T24 방광암세포는 한국

*Corresponding author

Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

생명공학연구소(KRIBB, 대전)에서 분주 받아 사용하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에 1%의 penicillin 및 streptomycin이 포함된 RPMI-1640 배지(Gibco BRL)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. β-lapachone은 Biomol (Plymouth Meeting, PA, USA)에서 구입하였으며 순수 alcohol에 녹여 10 mM의 stock 용액으로 제조한 뒤 -20°C에 보관하여 적정 농도로 배지에 희석하여 처리하였다. β-lapachone의 처리에 따른 대상 암세포의 전체적인 형태의 변화관찰은 세포배양용 페트리 접시에 암세포를 3×10⁴ 개/ml 정도로 분주하여 24시간동안 안정화시킨 다음 β-lapachone을 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양한 후, 위상차 현미경을 이용하여 200배의 배율로 각 농도에 따른 형태의 변화를 관찰하였다.

MTT assay를 이용한 세포 성장의 측정

준비된 암세포를 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 후, 선행 연구를 통해 설정된 범위 농도로 β-lapachone을 처리한 후 48시간 배양하였다. 그 후 tetrazolium bromide salt (MTT, Amresco, Solon, Ohio, USA)를 0.5 mg/ml 농도가 되게 배지로 희석하여 2 ml씩 분주하고 3시간 동안 배양한 다음 MTT 시약을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Amresco)를 1 ml씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 96 well에 200 μl씩 옮겨서 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다[3]. 측정은 모두 세 번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 구하였다.

DNA flow cytometry에 의한 세포주기의 분석

정상 및 β-lapachone이 처리된 배지에서 48시간 동안 자란 암세포를 PBS로 씻어 내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 1,000 rpm으로 10분간 원심분리를 하여 상층액을 버리고 세포만 모았다. 여기에 다시 PBS를 첨가하여 충분히 씻은 다음 1,000 rpm으로 10분간 원심분리를 한 후 상층액을 버리고 남은 세포에 0.5 ml의 PBS로 잘 부유시키고, 차가운 ethanol 0.5 ml를 첨가하여 4°C에서 한 시간 동안 고정시켰다. 4.5×10⁶개의 고정된 세포를 원추형 시험관에 넣어 1,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후, 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma)이 함유된 PBS로 두 번 정도 세척한 다음 원심분리하였다. 세포 침전물에 1% BSA가 들어간 PBS 0.8 ml로 부유시키고 핵산에 특이적으로 결합하는 DNA intercalating dye인 propidium iodide (PI, 50 μg/ml; Sigma)와 10 kunit의 RNase (Sigma)를 처리하여 4°C 암하에서, 1시간 동안 염색하였다. PBS로 두 번 세척한 후, 부유액을 만들어 35 μm pore size를 가진 nylon mesh에 통과시켜 세포덩어리를 하나씩으로 떼어내고 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 Modifit LT (Becton Dickinson) 프로그램을 사용하여 분석하였다.

RT-PCR을 통한 mRNA 발현 변화의 관찰

상기와 동일한 조건에서 준비된 세포를 PBS로 세척하고 TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 4°C에서 1시간 동안 처리하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase (RT)를 이용하여 2 μg의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 만들어진 RT product (template cDNA)에 2.5 mM dNTP, 10x buffer, DEPC water, premixed primer (GenoTech, Korea) 및 Taq DNA polymerase를 넣고 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였다. RT-PCR을 이용하여 분석을 시도한 유전자의 종류는 Table 1에 나타난 바와 같으며, 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 포함하여 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들의 양적 차이를 확인하기 위하여 1x TAE buffer로 1% agarose gel을 만들고 well 당 각각의 primer에 해당하는 PCR 산물에 DNA gel loading solution (5x, Quality Biological Inc.)을 섞어서 loading 한 후 100 V에서 전기영동을 하였다. 전기영동으로 DNA 분리가 끝난 gel을 ethidium bromide (EtBr, Sigma)를 이용하여 염색한 후, UV 하에서 확인하여 Kodak Picture works' photo enhancer를 이용하여 사진 촬영 하였다.

Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

정상 및 β-lapachone이 처리된 배지에서 자란 암세포들을 PBS로 씻어 내고 0.05% trypsin-EDTA로 부유시킨 다음 원심분리하여 세포를 모았다. 이렇게 모아진 세포에 적당량의 lysis buffer를 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 정량 한 다음 동량의 Laemmli sample buffer (Bio-Rad)를 섞어서 sample을 만들었다. 이렇게 만든 동량의 단백질을 8-12% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)에 전이시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 담구어 상온에서 2시간 정도 incubation하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 PBS-T로 15분 정도 세척하였다. 준비된 membrane에 1차 antibody를 처리하여 상온에서 1시간 이상 또는 4°C에서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 세척하고 처리된 1차 antibody에 맞는 2차 antibody를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 다시 PBS-T로 세척하고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액(Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다. Western blot analysis를 위해 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으

며, 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Life Science에서 구입하였다.

결과 및 고찰

β-lapachone 처리에 의한 암세포의 증식억제, 생존율 저하 및 형태변화

인체 암세포들의 성장에 미치는 β-lapachone의 영향을 조사

하기 위하여 MTT assay를 실시하였는데, 이를 위하여 재료 및 방법에서 서술한 것처럼 인체 간암세포 HepG2 및 방광암세포 T24를 적정 시간 안정화시킨 후 다양한 농도의 β-lapachone이 희석된 배지에서 48시간 배양하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 조사된 2가지 암세포주 HepG2 및 T24 모두에서 β-lapachone 처리 농도 의존적으로 증식이 억제되었으며, LC₅₀의 농도는 약 3.0 μg/ml 전후였다. 이러한 결과는 다른 인체 암세포에서 나타난 선행 연구 결과들과 매우 유사하였다[8-10,20,26]. β-lapachone 처리에 따른 암세포들의 증식억제와 연관된 형태

Table 1. Sequences of primers used for RT-PCR

Gene name		Sequence
GAPDH	Sense	5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'
	Antisense	5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'
p53	Sense	5'-GCT CTG ACT GTA CCA CCA TCC-3'
	Antisense	5'-CTC TCG GAA CAT CTC GAA GCG-3'
p21	Sense	5'-CTC AGA GGA GGC GCC ATG-3'
	Antisense	5'-GGG CGG ATT AGG GCT TCC-3'
COX-1	Sence	5'-TGC-CCA-GCT-CCT-GGC-CCG-CCG-CCT-3'
	Antisence	5'-GTG-CAT-CAA-CAC-AGG-CGC-CTC-TTC-3'
COX-2	Sence	5'-TTC-AAA-TGA-GAT-TGT-GGG-AAA-AT-3'
	Antisence	5'-AGA-TCA-TCT-CTG-CCT-GAG-TAT-CTT-3'
hTERT	Sence	5'-AGC-CAG-TCT-CAC-CTT-CAA-CC-3'
	Antisence	5'-GTT-CTT-CCA-AAC-ITG-CTG-ATG-3'
hTEP-1	Sence	5'-TCA-AGC-CAA-ACC-TGA-ATC-TGA-G-3'
	Antisence	5'-CCC-CGA-GTG-AAT-CTT-TCT-ACG-C-3'
hTR	Sence	5'-TCT-AAC-CCT-AAC-TGA-GAA-GGG-CGT-AG-3'
	Antisence	5'-GTT-IGC-TCT-AGA-ATG-AAC-GGT-GGA-AG-3'
c-myc	Sence	5'-AAG-ACT-CCA-GCG-CCT-TCT-CTC-3'
	Antisence	5'-GTT-TTC-CAA-CTC-CGG-GAT-CTG-3'

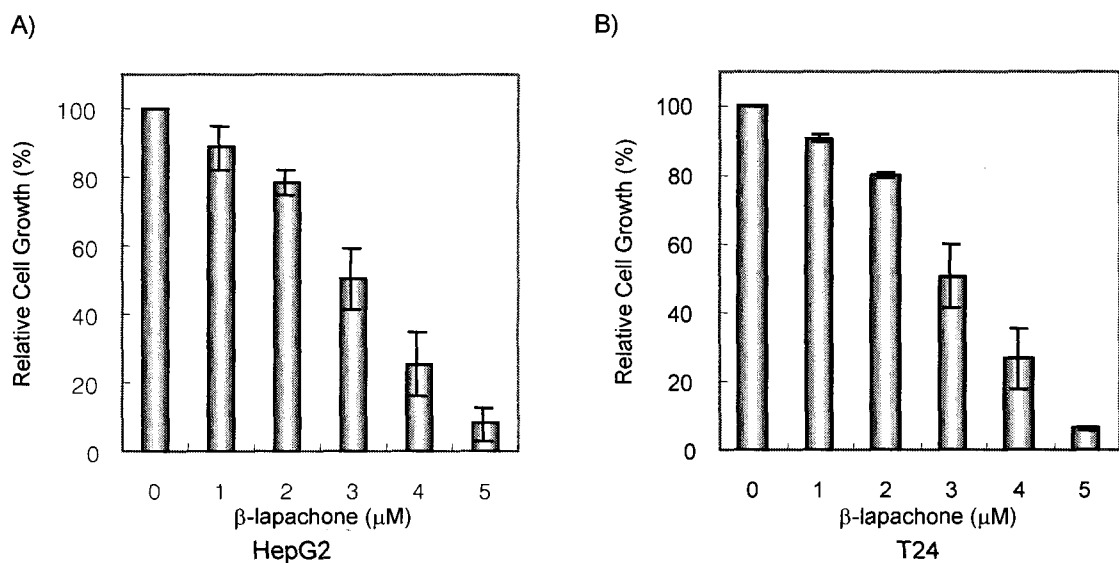


Fig. 1. Proliferative inhibition of human hepatoma (HepG2, A) and bladder (T24, B) carcinoma cells by β-lapachone. Cells were seeded as described in materials and methods, and treated with various concentrations of β-lapachone. After 48 h incubation with β-lapachone, MTT assay was performed. Results are expressed as percentage of the untreated control +/- SD obtained from three separate experiments.

변화를 조사하기 위하여 다양한 농도의 β -lapachone이 희석된 배지에서 48시간 배양 후 위상차 현미경을 이용하여 관찰하였다. Fig. 2에서 나타난 바와 같이 β -lapachone의 처리농도가 증가할수록 정상적으로 부착되어 있는 암세포의 빈도가 감소되면서 membrane shrinking 현상을 관찰할 수 있었으며, 길고 분지를 형성하는 dendrite와 유사한 구조로 바뀌면서 부착력을 상실하여 배지 위로 부유됨을 알 수 있었다. 이러한 현상은 이미 다른 암세포를 대상으로 실시된 연구에서 조사된 현상들과 매우 유사하였다[8,10,20,26].

세포주기 진행에 미치는 β -lapachone의 영향

세포주기의 조절은 각 주기별로 관여하는 다양한 인자들에 의해 조절된다. 그중 가장 기본적으로 세포주기 checkpoint 각 시기에 요구되어지는 양성 조절인자인 cyclins와 cyclin-dependent kinases (Cdks)의 연속적인 활성화와 불활성이 결정되어

진다[31,35]. 세포주기 조절의 관점에서 암세포는 세포주기의 비정상화에 기인된 질병으로 정의 될 수 있으며, 또한 특정 시기의 세포주기 억제는 세포주기 조절 양성인자의 발현 저하 또는 음성 조절 인자의 과발현에 의한 것으로 요약될 수 있다. 따라서 β -lapachone 처리에 의한 암세포의 형태변화와 연관된 증식 억제현상이 세포주기 진행과 어떤 연관성이 있는지를 먼저 조사하였다. 이를 위하여 각 농도별로 β -lapachone을 48 시간 처리한 후 PI 염색 후 flow cytometry 분석을 실시하였다(Fig. 3 and Table 2). 먼저 두 세포주에서 β -lapachone의 처리 농도가 증가할수록 apoptosis가 일어난 세포의 빈도로 추정되는 sub-G1기에 속하는 세포의 빈도가 매우 증가됨을 알 수 있었는데, 동일 조건에서 배양된 두 암세포의 apoptosis 유발 정도는 HepG2 간암세포 보다 T24 방광암세포에서 매우 높게 나타났다. 이러한 현상들은 모두 apoptosis 유발 신호에 의하여 활성화된 endonuclease에 의해 nucleosome의 linker DNA 부분의

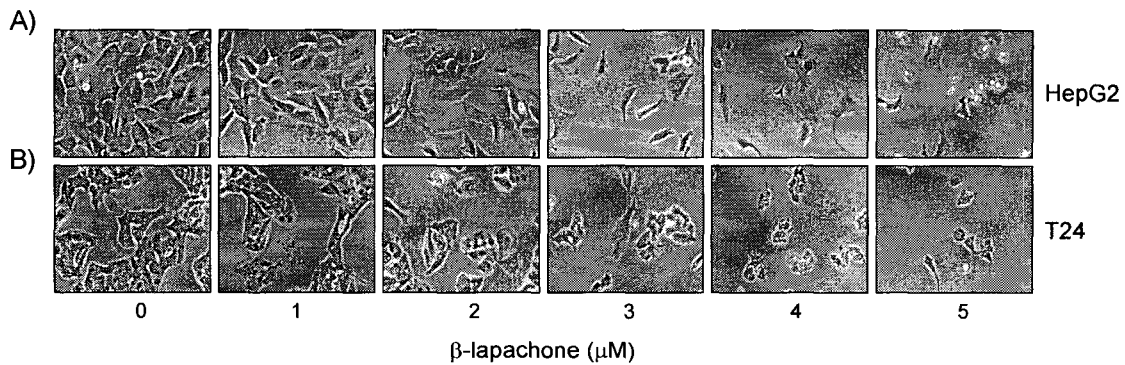


Fig. 2. Morphological changes in HepG2 (A) and T24 (B) cells following treatment with β -lapachone. Exponentially growing cells were incubated with either vehicle alone (0) or β -lapachone for 48 h. Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, $\times 200$.

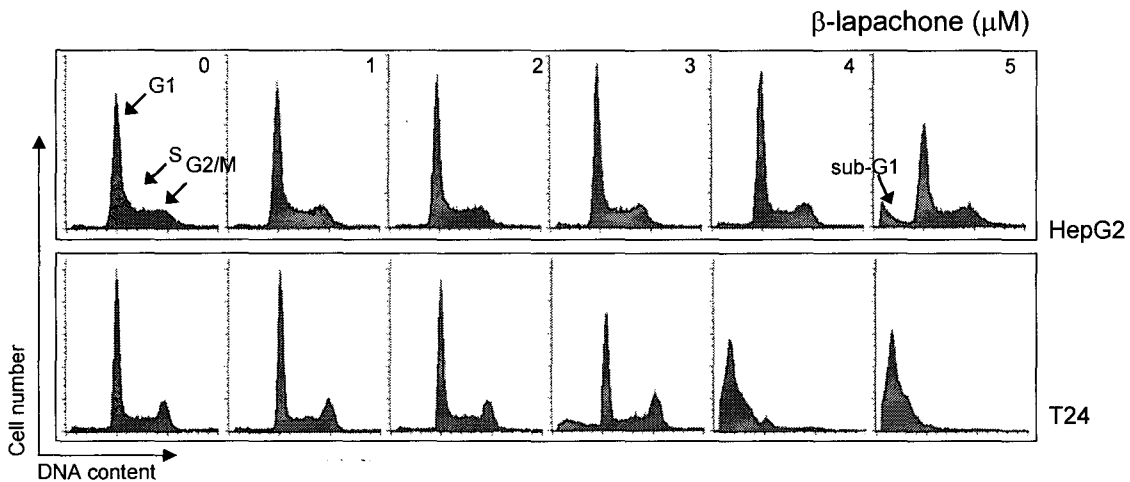


Fig. 3. DNA-fluorescence histogram of HepG2 and T24 cell nuclei after β -lapachone treatment. Exponentially growing cells were treated with various concentrations of β -lapachone for 48 h. Cells were trypsinized and pellets were collected. The cells were fixed and digested with RNase A, and then cellular DNA was stained with PI. DNA flow cytometric analysis was performed comparing untreated control (0) with cells treated with β -lapachone for 48 h.

Table 2. Fractions of each cell cycle phase of human hepatoma HepG2 and bladder carcinoma T24 cells cultured in the presence or absence of various concentrations of β -lapachone. Each phase was analyzed by flow cytometry after 48 h treatment with β -lapachone

Cell line	β -lapachone (μ g/mL)	% of cell			
		Sub G1	G1	S	G2/M
HepG2	0	1.68	63.12	16.57	19.05
	1	1.71	63.44	13.96	21.30
	2	1.81	64.94	11.81	22.12
	3	2.51	65.05	10.62	22.20
	4	7.85	60.52	9.23	22.58
	5	12.53	53.26	9.13	25.19
T24	0	2.25	58.55	16.96	22.43
	1	2.29	56.91	16.65	24.51
	2	2.61	55.95	16.40	25.47
	3	13.40	44.00	12.86	30.20
	4	89.15	5.98	2.52	2.49
	5	94.67	3.26	1.58	0.85

절단에 의한 DNA 단편화 결과[6]이므로 β -lapachone 처리에 의한 암세포의 증식억제 및 형태적 변형이 암세포의 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음을 시사하여 주는 것으로 사료된다.

또한 Table 2의 결과에서 알 수 있듯이 HepG2 간암세포가 정상 배지에서 배양된 경우, G1기에 속하는 세포의 빈도는 약 63.12%였으며, S기 및 G2M기에 해당되는 세포의 빈도는 각각 약 16.57% 및 19.05%였다. 그러나 β -lapachone이 처리된 배지에서 배양된 암세포의 경우는 β -lapachone 처리 농도가 증가할수록 G1기 및 S기에 해당되는 세포의 빈도는 점차 감소된 반면 G2/M기에 속하는 세포의 빈도는 다소 증가되어 3.0 μ g/mL 처리군에서는 22.20%, 5.0 μ g/mL 처리군의 경우는 25.19% 정도를 나타내었다. 방광암세포인 T24세포의 경우도 정상 배지에서 배양된 경우 각 세포주기에 속하는 세포의 빈도가 HepG2 세포에서와 유사하였으며, 3.0 μ g/mL 처리군까지 β -lapachone 처리 농도가 증가할수록 G1기 및 S기의 빈도는 감소된 반면, G2/M기에 속하는 세포의 빈도는 점차 증가되었다. 이는 인체 전립선 암세포에서 관찰된 S기와 연관된 G1 arrest 현상과는 다소 차이가 있는 결과이기 때문에[9,17], 다양한 암세포에 대한 부가적인 연구가 요구되어진다.

증양 억제유전자 p53 및 Cdk inhibitor p21의 발현에 미치는 β -lapachone의 영향

Cdk inhibitor인 p21은 p53의 발현 정도에 의하여 전사 수준이 조절될 수 있으며[11,37], 암세포의 증식 억제, apoptosis 및 분화 유도에 중요한 역할을 하는 세포증식 전반에 걸친 조절인자로서 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [31,35,37]. 따라서 β -lapachone의 처리에 의한 HepG2 및 T24 세포의 증식억제가 두 유전자의 발현 변화와 상관성이 있는지

의 여부를 RT-PCR 및 Western blot analysis로 조사하였다. Fig. 4A 및 B의 결과에서 볼 수 있듯이 p53 및 p21 mRNA 발현에 β -lapachone의 처리는 큰 변화를 주지 못하였으며, 단백질 발현 역시 약간의 증감은 있었지만 큰 유의적인 변화는 없었다. 이는 인체 신경교종세포나 전립선 암세포의 β -lapachone 처리에 의한 증식억제 과정에서 p21의 발현이 매우 증가했다는 선행연구 결과와는[8,10,36] 차이가 있지만, 망막상피세포에서 β -lapachone 처리에 의한 apoptosis 유발과정에 p53이나 p21이 관여하지 않았다는 것과는 일치된 결과였다[16]. 따라서 β -lapachone의 처리에 의한 HepG2 간암 및 T24 방광암세포의 증식억제에서는 p53이나 p21의 유전자가 크게 관여하지 않을 것으로 추정되어진다.

전사조절인자 Sp-1 및 PCNA의 발현에 미치는 β -lapachone의 영향

Zinc-finger 단백질인 전사조절인자 Sp family 중 Sp-1은 Sp-3처럼 포유동물 대부분의 조직에서 일정하게 발현되고 있으며, GC box와의 작용을 통하여 다양한 표적 유전자의 발현을 조절한다[19,32]. 특히 Cdk inhibitor p21의 promoter 상에는 6개의 Sp-1 결합자리를 가지고 있으며, p53 비의존적인 p21 유도에 중요한 조절인자로서 작용을 한다[4,7,43]. 선행연구에 의하면 p53 유전자가 결손된 인체 전립선 암세포에서 β -lapachone 처리에 의한 p53 비의존적 p21의 유도에 Sp-1이 관여할 가능성이 제시된바 있기 때문에[8], HepG2 및 T24 세포에서 Sp-1의 발현에 미치는 β -lapachone의 영향을 조사한 결과, 조사된 두 세포주에서 모두 β -lapachone 처리 농도 의존적으로 Sp-1 단백질의 발현이 감소되었음을 알 수 있었다. 한편 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 단백질은 세포주기 중 G1 전반기와 S기를 거치면서 합성되기 시작하며, 전체적인 세포주기의 진행에 양성 조절인자로서 중요한 역할을 수행한다 [22]. 특히 PCNA 단백질은 세포증식의 유무를 판단할 수 있는 중요한 표적 단백질로 인정되어지고 있으며, Sp-1 단백질처럼 세포주기 교란이나 apoptosis가 일어난 세포에서 활성화된 caspase라는 효소의 기질로 이용되기 때문에[28,30], PCNA 단백질의 발현에 미치는 β -lapachone의 영향을 부가적으로 조사하였다. Fig. 5의 결과에서 알 수 있듯이 Sp-1 단백질처럼 PCNA 역시 β -lapachone 처리 농도 의존적으로 발현이 감소됨을 알 수 있었다. 따라서 β -lapachone 처리에 의한 HepG2 및 T24 세포의 증식억제는 두 단백질의 발현 저하 또는 단백질 분해 촉진과 연관성이 있음을 알 수 있었다.

COXs의 발현에 미치는 β -lapachone의 영향

한편 최근 염증을 포함한 다양한 생체 반응에서 prostaglandin 계열 물질들은 세포분열이나 증식에 영향을 줌으로서 각종 인체 질병의 유발과 진행에 중요한 역할을 담당하고 있음이 보고되어지고 있다[33]. Prostaglandin의 합성에서 2가지의

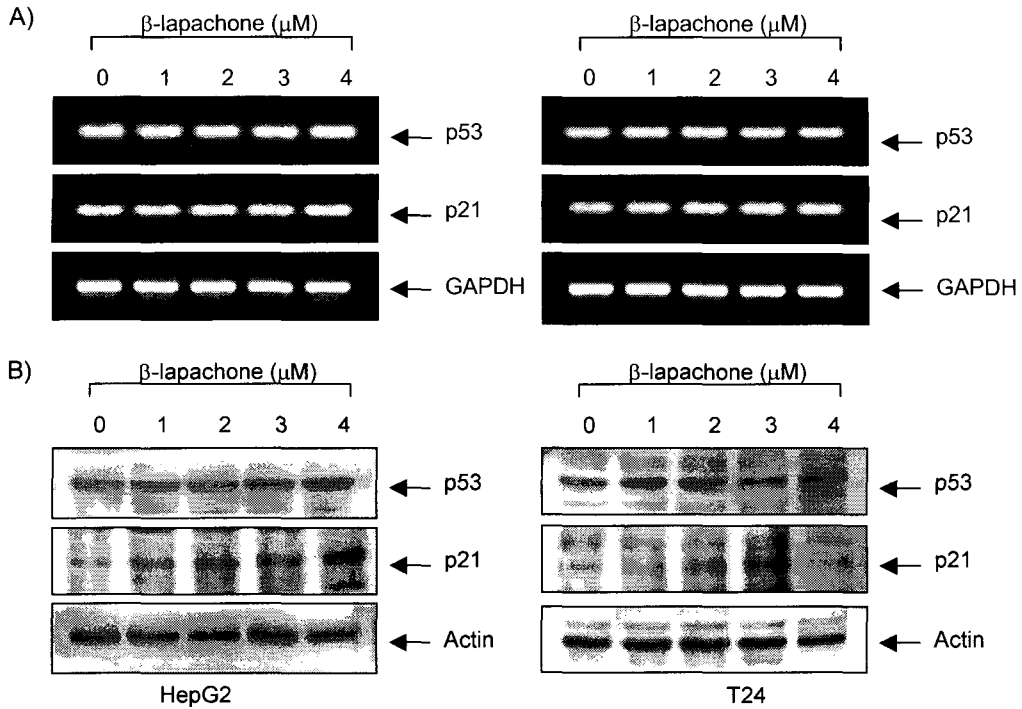


Fig. 4. Effect of β -lapachone on the levels of tumor suppressor p53 and Cdk inhibitor p21 in HepG2 and T24 cells. (A) Cells were incubated with β -lapachone for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using indicated primers described in materials and methods. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) After 48 h treatment with β -lapachone, cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with anti-p53 and anti-p21 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

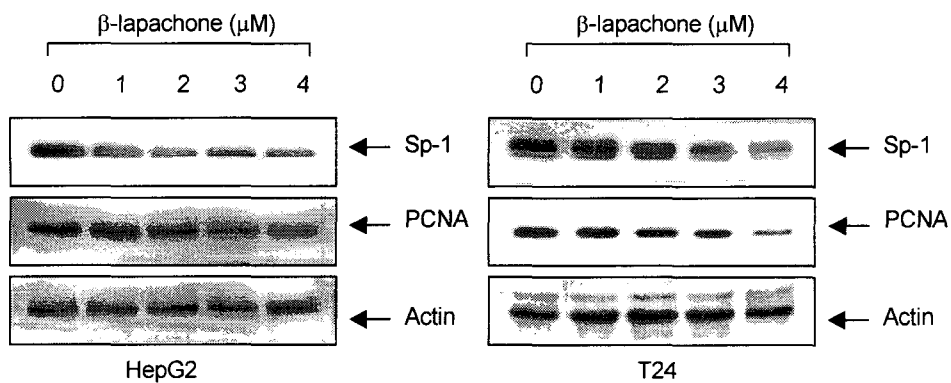


Fig. 5. Down-regulation of Sp-1 and PCNA protein by β -lapachone treatment in HepG2 and T24 cells. Cells were incubated with β -lapachone, lysed and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with anti-Sp-1 and anti-PCNA antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

cyclooxygenases (COXs) isoform이 관여하고 있는데, 대부분의 조직에서 일정한 수준으로 발현되는 COX-1의 경우 인체의 항상성 유지와 연관된 기능에 관여한다. 반면 COX-2는 성장인자, cytokines, 종양 촉진인자 등의 자극에 의한 유도성 isoform으로서 COX-2의 활성화는 세포성장 촉진을 유발하고 apoptosis를 억제하며 세포의 유동성 및 부착성을 강화시키는 것으로

알려져 있다[33]. 또한 COX-2의 과발현에 의해 암조직에서의 혈관신생 및 전이능이 높아지고 apoptosis를 제어한다는 점과 COX-2 저해제에 의한 angiogenesis와 종양형성 억제 등의 결과에서 이 유전자의 선택적 조절에 의한 암 예방전략이 대두되고 있다[33]. 따라서 본 연구에서는 β -lapachone 처리에 의한 인체 암세포의 증식억제와 COX-2의 선택적 발현 억제의 관련성에

대해 조사하였다. 상기와 동일 조건에서 얻어진 암세포들을 대상으로 COX-1 및 COX-2의 발현에 미치는 β -lapachone의 영향을 조사한 결과, Fig. 6에서 알 수 있듯이 HepG2 세포에서 COX-1 및 COX-2의 전사수준과 단백질 발현 양쪽에서 변화가 없었지만, T24 세포에서는 두 유전자의 단백질 수준이 β -lapachone 처리 농도가 증가될수록 다소 감소되었다. 즉 본 연구에서 조사된 두 종류의 암세포에서는 β -lapachone 처리에 따른 COX-1 및 COX-2의 선택적 발현 저하 현상을 관찰할 수 없었다. 그러나 본 연구실의 선행연구에서 β -lapachone은 인체 폐암세포에서 매우 선택적으로 COX-2의 발현을 저하시켰으며, 그에 따른 prostaglandin E2의 세포의 유리도 촉진 시킨 점을 미루어(data not shown), 세포주에 따른 β -lapachone의 작용이 다소 차이가 있음을 알 수 있었다.

Telomere 조절관련 유전자의 발현에 미치는 β -lapachone의 영향

Telomere는 모든 진핵세포의 염색체 말단에 존재하는 간단한 DNA 절편으로서 인간의 경우에는(TTAGGG) n 의 염기서열이 계속 반복된 구조로 구성되어 있으며, 비정상적인 DNA 재조합을 억제하며 염색체가 핵막으로 부착되는 것을 돕고, mitotic clock으로서의 기능을 할 것이라는 사실이 밝혀짐에

따라 종양 형성의 이해와 그 예방에 이용될 가능성을 제시해 주고 있다[23,27]. 정상 체세포에서는 telomere의 반복구조의 형성 및 유지에 관여하는 효소인 telomerase의 활성이 없거나 매우 낮기 때문에 세포가 분열할수록 telomere의 길이는 짧아지게 되지만, 암세포의 90% 이상에서는 telomerase의 catalytic subunit 단백질을 coding하는 human telomere reverse transcriptase (hTERT)가 과발현되어 있고 이로 인해 높은 telomerase의 활성을 나타내고 있다[27]. 또한 telomere의 손실은 p53의 발현과 세포주기 교란에도 관여 하는 것으로 알려져 있다[14]. 이러한 중요성을 고려하여 β -lapachone의 처리에 의한 암세포의 증식 억제가 telomere의 조절 및 연관된 유전자의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 조사한 결과, Fig. 7에서 나타낸 바와 같이 telomere 조절에 직접적으로 관여하는 인자들[hTERT, human telomerase RNA (hTR) 및 telomerase-associated protein (TEP1)] 모두가 β -lapachone의 처리에 의해 mRNA 수준이 다소 감소하는 것으로 나타났다. 특히 hTERT의 발현이 다른 유전자들에 비하여 상대적으로 매우 감소되었으나, hTERT의 promoter 영역의 가장 중요한 조절인자에 해당하는 c-myc [15]의 발현에는 큰 변화가 없었다. 이상의 결과는 β -lapachone의 처리에 의한 암세포의 증식억제 과정에서 telomere 조절 관련 유전자들의 발현을 유의적으로 조절할 수 있을 가능성을 제시하여

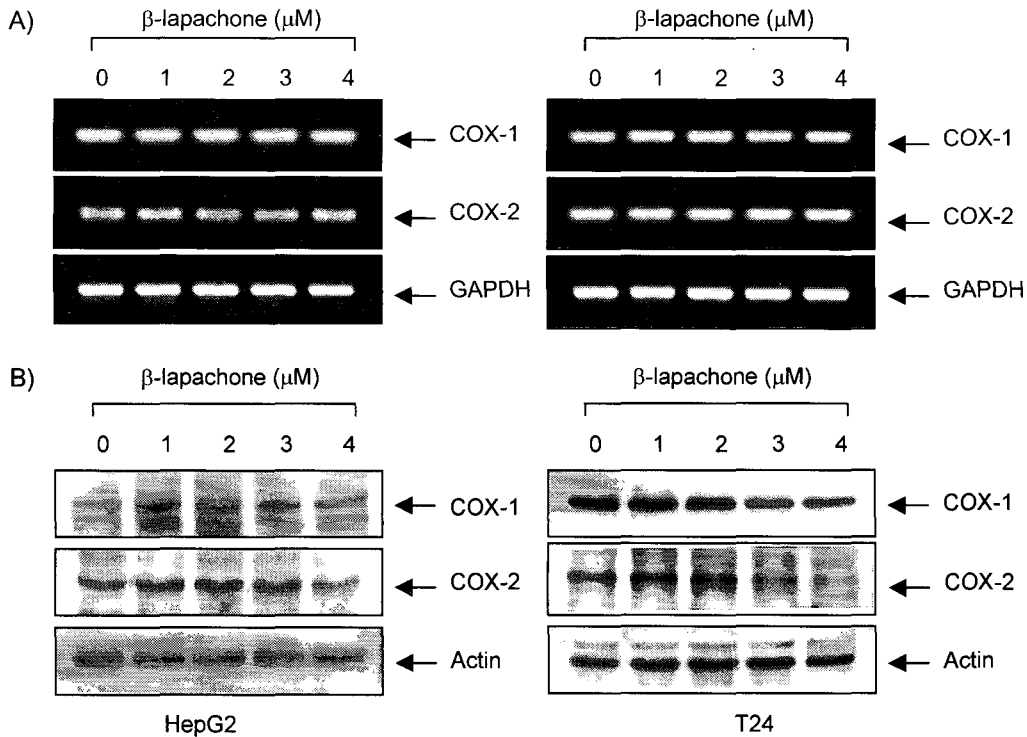


Fig. 6. Effects of β -lapachone treatment on the levels of COXs in HepG2 and T24 cells. (A) Cells were incubated with β -lapachone for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using indicated primers described in materials and methods. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) After 48 h treatment with β -lapachone, cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

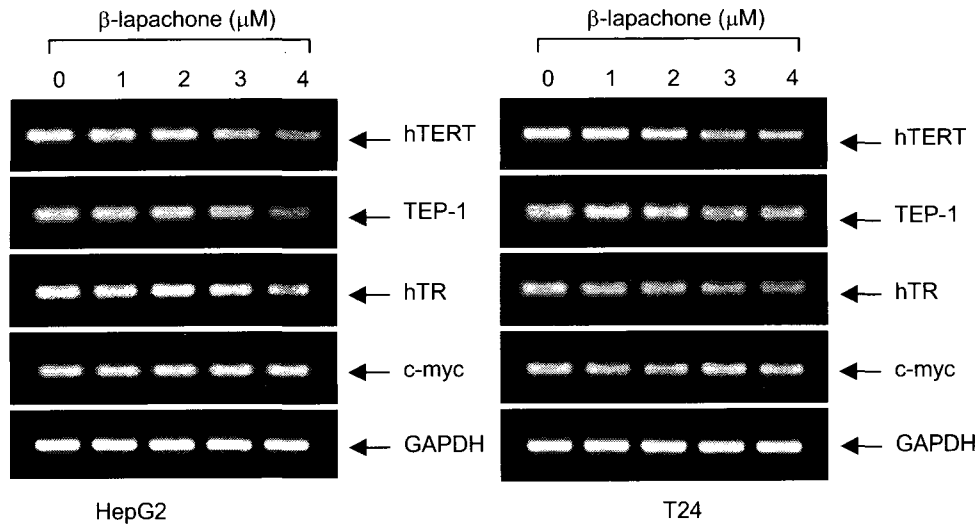


Fig. 7. Effect of β -lapachone on the levels of telomere regulatory gene products in HepG2 and T24 cells. Cells were treated with various concentrations of β -lapachone. After 48 h incubation, total RNAs were isolated, and RT-PCR was performed using indicated primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

주는 결과로서 이에 관한 후속 연구의 실시가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

남미지역에서 자생하는 *Tabebuia avellaneda*라는 나무의 수피에서 동정된 quinone계 물질이며, DNA topoisomeras 억제제로 알려진 β -lapachone의 항암작용에 관한 부가적인 자료를 얻기 위하여 인체 간암(HepG2) 및 방광암(T24)세포를 대상으로 조사한 결과 다음과 같은 결과를 얻게 되었다. MTT assay 및 flow cytometry 분석 등의 결과에서, β -lapachone의 처리에 따라 조사된 두 가지 암세포에서 β -lapachone 처리 농도의존적으로 암세포의 심한 형태적 변형이 동반되면서 암세포의 증식이 억제되었으며, 생존율이 저하되었고 이는 apoptosis 유발과 상관성이 있음을 알 수 있었다. β -lapachone 처리에 의한 두 암세포의 증식억제는 종양억제 유전자 p53 및 Cdk inhibitor p21의 발현과는 큰 연관성이 없음을 RT-PCR 및 Western blot analysis를 통하여 확인하였다. 그러나 전사조절인자 Sp-1 및 세포증식 주요조절인자인 PCNA의 단백질 발현은 β -lapachone 처리에 따라 매우 감소되었으며, telomere 조절에 중요한 인자들의 선택적 발현 저하 현상도 관찰되었다. 이상의 결과들은 인체 암세포에서 β -lapachone의 항암작용을 이해하는 중요한 자료가 될 것이며, β -lapachone과 유사한 화학적 구조 및 성질을 가지는 항암제 후보물질들의 항암기전 비교 및 항암제 개발을 위한 기초 자료로서 응용될 것이다.

참 고 문 헌

- Bailly, C. 2000. Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. *Curr. Med. Chem.* 7, 39-58.
- Bakshi, R. P. and T. A. Shapiro. 2003. DNA topoisomerases as targets for antiprotozoal therapy. *Mini Rev. Med. Chem.* 3, 597-608.
- Bellamy, W. T. 1992. Prediction of response to drug therapy of cancer. A review of in vitro assays. *Drugs* 44, 690-708.
- Biggs, J. R., J. E. Kudlow and A. S. Kraft. 1996. The role of the transcription factor Sp1 in regulating the expression of the WAF1/CIP1 gene in U937 leukemic cells. *J. Biol. Chem.* 271, 901-906.
- Capranico, G., G. Zagotto and M. Palumbo. 2004. Development of DNA topoisomerase-related therapeutics: a short perspective of new challenges. *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents* 4, 335-345.
- Chiarugi, V., L. Magnelli and G. Basi. 1994. Apoptosis and the cell cycle. *Cell. Mol. Biol. Res.* 40, 603-612.
- Choi, Y. H., W. H. Lee, K. Y. Park and L. Zhang. 2000. p53-independent induction of p21 (WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 91, 164-173.
- Choi, Y. H., H. S. Kang and M. A. Yoo. 2003. Suppression of human prostate cancer cell growth by β -lapachone via down-regulation of pRB phosphorylation and induction of Cdk inhibitor p21(WAF1/CIP1). *J. Biochem. Mol. Biol.* 36, 223-229.
- Choi, B. T., J. Cheong and Y. H. Choi. β -lapachone-induced apoptosis is associated with activation of caspase-3 and inactivation of NF- κ B in human colon cancer HCT-116 cells. *Anticancer Drugs* 14, 845-850.
- Don, M. J., Y. H. Chang, K. K. Chen, L. K. Ho and Y. P. Chau. 2001. Induction of CDK inhibitors (p21(WAF1) and p27(Kip1)) and Bak in the β -lapachone-induced apoptosis of human prostate cancer cells. *Mol. Pharmacol.* 59, 784-794.
- El-Deiry, W. S., T. Tokino, V. E. Velculesco, D. B. Levy, R.

- Parsons, J. M. Trent, D. Lin, E. W. Mercer, K. W. Kinzler and B. Vogelstein. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817-825.
12. Goijman, S. G. and A. O. Stoppani. 1985. Effects of β -lapachone, a peroxide-generating quinone, on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. *Arch. Biochem. Biophys.* **240**, 273-280.
 13. Guiraud, P., R. Steiman, G. M. Campos-Takaki, F. Seigle-Murandi and M. Simeon de Buochberg. 1994. Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and β -lapachone. *Planta Med.* **60**, 373-374.
 14. Homayoun, V. and B. Sam. 1996. From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: The telomere loss/DNA damage model of cell aging. *Exp. Gerontol.* **31**, 295-301.
 15. Horikawa, I. and J. C. Barrett. 2003. Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms. *Carcinogenesis* **24**, 1167-1176.
 16. Hueber, A., P. Esser, K. Heimann, N. Kociok, S. Winter and M. Weller. 1998. The topoisomerase I inhibitors, camptothecin and β -lapachone, induce apoptosis of human retinal pigment epithelial cells. *Exp. Eye Res.* **67**, 525-530.
 17. Kumi-Diaka, J. 2002. Chemosensitivity of human prostate cancer cells PC3 and LNCaP to genistein isoflavone and β -lapachone. *Biol. Cell* **94**, 37-44.
 18. Li, C. J., L. Averboukh and A. B. Pardee. 1993. β -Lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. *J. Biol. Chem.* **268**, 22463-22468.
 19. Li, L., S. He, J. M. Sun and J. R. Davie. 2004. Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem. Cell Biol.* **82**, 460-471.
 20. Liu, T. J., S. Y. Lin and Y. P. Chau. 2002. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase activation attenuates β -lapachone-induced necrotic cell death in human osteosarcoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **182**, 116-125.
 21. Lopes, J. N., F. S. Cruz, R. Docampo, M. S. Vasconcelos, M. C. Sampaio, A.V. Pinto and B. Gilbert. 1978. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the toxicity of 1,4-naphthoquinone and 1,2-naphthoquinone derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **72**, 523-531.
 22. Maga, G. and U. Hubscher. 2003. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J. Cell Sci.* **116**, 3051-3060.
 23. Mathieu, N., L. Pirzio, M. A. Freulet-Marriere, C. Desmaze and L. Sabatier. 2004. Telomeres and chromosomal instability. *Cell Mol. Life Sci.* **61**, 641-656.
 24. Pardee, A. B., Y. Z. Li and C. J. Li. 2002. Cancer therapy with β -lapachone. *Curr. Cancer. Drug Targets* **2**, 227-242.
 25. Planchon, S. M., S. M. Wuerzberger-Davis, J. J. Pink, K. A. Robertson, W. G. Bornmann and D. A. Boothman. 1999. Bcl-2 protects against β -lapachone-mediated caspase 3 activation and apoptosis in human myeloid leukemia (HL-60) cells. *Oncol. Rep.* **6**, 485-492.
 26. Planchon, S. M., J. J. Pink, C. Tagliarino, W. G. Bornmann, M.E. Varnes and D. A. Boothman. 2001. β -lapachone-induced apoptosis in human prostate cancer cells: involvement of NQO1/xip3. *Exp. Cell. Res.* **267**, 95-106.
 27. Rezler, E. M., D. J. Bearss and L. H. Hurley. 2002. Telomeres and telomerases as drug targets. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2**, 415-423.
 28. Rickers, A., N. Peters, V. Badock, R. Beyaert, P. Vandenabeele, B. Dorken and K. Bommert. 1999. Cleavage of transcription factor SP1 by caspases during anti-IgM-induced B-cell apoptosis. *Eur. J. Biochem.* **261**, 269-274.
 29. Schaffner-Sabba, K., K. H. Schmidt-Ruppin, W. Wehrli, A.R. Schuerch and J.W. Wasley. 1984. β -lapachone: synthesis of derivatives and activities in tumor models. *J. Med. Chem.* **27**, 990-994.
 30. She, Q.B., A.M. Bode, W.Y. Ma, N.Y. Chen and Z. Dong. 2001. Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase. *Cancer Res.* **61**, 1604-1610.
 31. Sherr, C.J. 2000. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* **60**, 3689-3695.
 32. Song, J., H. Ugai, H. Nakata-Tsutsui, S. Kishikawa, E. Suzuki, T. Murata and K.K. Yokoyama. 2003. Transcriptional regulation by zinc-finger proteins Sp1 and MAZ involves interactions with the same cis-elements. *Int. J. Mol. Med.* **11**, 547-553.
 33. Surh, Y.J., K.S. Chun, H.H. Cha, S.S. Han, Y.S. Keum, K.K. Park and S.S. Lee. 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutat. Res.* **480-481**, 243-268.
 34. Wang, C.H., Y.P. Tsao, H.J. Chen, H.L. Chen, H.W. Wang and S.L. Chen. 2000. Transcriptional repression of p21(Waf1/Cip1/Sdi1) gene by c-jun through Sp1 site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 303-310.
 35. Weinberg, R.A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330.
 36. Weller, M, S. Winter, C. Schmidt, P. Esser, A. Fontana, J. Dichgans and P. Groscurth. 1997. Topoisomerase-I inhibitors for human malignant glioma: differential modulation of p53, p21, bax and bcl-2 expression and of CD95-mediated apoptosis by camptothecin and β -lapachone. *Int. J. Cancer.* **73**, 707-714.
 37. Xiong, Y., G. Hannon, H. Zhang, D. Casso, R. Kobayashi and D. Beach. 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**, 701-704.