

# 길경 수용액 추출물에 의한 NCI-H460 인체 폐암세포의 p53 및 pRB의 발현에 미치는 영향

박봉규 · 감철우 · 허태율 · 박동일\*

동의대학교 한방내과학교실

## Effects of an Extract from the Roots of Platycodon Grandiflorum on the Levels of p53 and pRB in NCI-H460 Human Lung Carcinoma Cells

Bong Kyu Park, Chul Woo Gam, Tae Yool Heo, Dong Il Park\*

Department of Oriental Medicine, Graduate School, Dong-Eui University

Platycodi Radix, the root of *Platycodon grandiflorum* A. DC (Campanulaceae), commonly known as Doraji in Korea (Chinese name, 'Jiegeng', and Japanese name, 'Kikyo') has been used as an expectorant in traditional Oriental medicine. Extracts from the roots of *P. grandiflorum* have been reported to have wide ranging health benefits. In Korea, Platycodi Radix is also used as a food and employed as a folk remedy for adult diseases, such as bronchitis, asthma and pulmonary tuberculosis, hyperlipidemia, diabetes, and inflammatory diseases, and as a sedative. Several studies on its chemical and immunopharmacological effects including immunostimulation and antitumor activity have been performed. However, the relevant molecular mechanisms are poorly understood. Platycodi Radix, the root of *Platycodon grandiflorum* A. DC (Campanulaceae), commonly known as Doraji in Korea (Chinese name, 'Jiegeng', and Japanese name, 'Kikyo') has been used as an expectorant in traditional Oriental medicine. Extracts from the roots of *P. grandiflorum* have been reported to have wide ranging health benefits. In Korea, Platycodi Radix is also used as a food and employed as a folk remedy for adult diseases, such as bronchitis, asthma and pulmonary tuberculosis, hyperlipidemia, diabetes, and inflammatory diseases, and as a sedative. Several studies on its chemical and immunopharmacological effects including immunostimulation and antitumor activity have been performed. However, the relevant molecular mechanisms are poorly understood. In the present study, we investigated the effects of an aqueous extract from the roots of *P. grandiflorum* (AEPG) on the cell growth of human lung adenocarcinoma NCI-H460 cells in order to understand its anti-proliferative mechanism. AEPG treatment down-regulated the cyclin D1 expression in both transcriptional and translational levels without alteration of cyclin E. In AEPG-treated cells, the levels of cyclin-dependent kinase (Cdk) 6 mRNA and protein were significantly inhibited, but the levels of Cdk2 and Cdk4 were slightly inhibited by treatment of AEPG. AEPG treatment induced a marked accumulation of Cdk inhibitors, p16 and p27. However, AEPG treatment did not affect not only retinoblastoma protein (pRB) but also tumor suppressor p53 protein expression. The present results indicated that AEPG-induced inhibition of lung cancer cell proliferation is associated with the blockage of G1 phase progression through induction of Cdk inhibitors such as p16 and p27, and inhibition of cyclin D1 and Cdk6. AEPG exposure, as offered by this study, provides clues for the mechanism of AEPG action. Taken together, these findings suggest that *P. grandiflorum* has strong potential for development as an agent for prevention and treatment against human lung cancer.

Key words : Platycodi radix(桔梗), NCI-H460 human lung carcinoma cell, p53 and pRB

### 서 론

桔梗은 性質이 微溫하고 味가 辛苦하며 有毒하고 氣血을 昇

\* 교신저자 : 박동일, 부산사 진구 양정2동 산45-1, 동의대학교 한의과대학

· E-mail : dipark@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-8650

· 접수 : 2006/09/25 · 수정 : 2006/10/21 · 채택 : 2006/12/01

提하는 작용이 있어 肺熱로 인해 頭·目·鼻·咽喉 등에 병이 생긴 것과 氣血凝滯로 말미암아 胸·脇·腹·腸管 등에 발생한 痰飲으로 유발된 肺癰·肺痿·頭目不清·鼻塞·喉痺·咽腫·胸脇痛·積塊 등을 치료한다고 하였으며<sup>1,2)</sup>, 破癥瘕血積 治噎膈嘔吐反胃의 효능이 있어 암종의 치료에도 응용이 가능하다고 하였다<sup>3)</sup>. 세포의 apoptosis의 유발에 p53이나 Bcl-2 및 Bax와 같은 유

전자가 관여한다는 사실이 알려지면서 apoptosis와 연관된 분자적 기전이 최근 많이 밝혀지고 있는데, Bcl-2 유전자 산물은 apoptosis를 억제하는 반면, Bax의 과발현이 이루어졌을 때는 apoptosis를 유발시킨다고 알려져 있다<sup>4)</sup>. 그의 apoptosis를 유발시키는데 관여하는 많은 인자들이 존재하며, 그 인자들의 상호작용을 통하여 세포 내의 apoptosis가 유발된다고 알려져 있다. 그 중 caspase라고 이름 붙여진 ICE/CED-like protease family 역시 apoptosis 유발에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, 이들은 proenzyme 형태로 존재하다가 apoptosis 유도를 활성화시키는 신호에 의해 활성화된 cysteine-related proteases로 되어 직접 또는 간접으로 세포 내에 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여하게 된다<sup>5,6)</sup>. 그리고 이 인자들에 관한 내용은 아직도 많은 연구가 진행되고 있는 실정이며, 특히 암세포의 생장, 증식의 억제와 암세포 제거의 한 방법으로써 널리 연구되고 있다<sup>7)</sup>.

또한, 세포의 성장과 생존에서 세포주기에 관한 개념은 20세기 이전에 광학 현미경의 관찰을 통한 간기세포와 유사 분열기 세포들의 구별이 가능해진 후, 1950년대에 Swift 및 Howard에 의해 G1, S, G2 및 M기에 대한 정의가 내려지면서 성립되었다<sup>8)</sup>. 그 후 생화학 및 분자생물학적 실험방법들의 폭발적인 성장과 더불어 1983년 세포주기조절의 양성인자라 할 수 있는 cyclin들이 동정되었으며, 많은 선행 연구자들은 cyclins의 합성, 인산화 및 분해 과정 등의 연구를 통해서 이들이 전 세포주기에 걸쳐 매우 다양하게 존재한다는 것을 발견해내었다<sup>9)</sup>. 먼저 D-type cyclin은 세포가 G1기로 접어들면서 발현이 증가되어지기 시작하여 cyclin-dependent kinase (Cdk)4 및 Cdk6와 복합체를 형성하면서 G1기 조절을 담당하고 있다<sup>10,11)</sup>. 또한 cyclin E는 Cdk2와 복합체를 이루면서 S기로의 전이에 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 알려져 있다<sup>12,13)</sup>. Cyclin A는 G1 후기에 발현을 시작하여 S기와 G2기 동안 발현이 증가되며 cyclin B1은 G2기에서 M기로의 전이를 조절하며, 각각은 Cdk2 및 Cdc2의 kinase 활성을 위한 양성 조절자로서 중요한 역할을 한다<sup>14-17)</sup>. 한편 Cdk는 다양한 세포증식 억제 신호들에 의해 유도되는 Cdk inhibitor에 의하여 그 활성이 억제되어지는데, 크게 두 가지의 family로 분류(INK4 및 CIP/KIP family)되고 있다<sup>18,19)</sup>. 그 중 Cdk2와 결합하면서 그들의 활성을 저해하는 것으로 알려진 CIP/KIP family에 속하는 p21 및 p27은 DNA 손상에 의한 종양 억제인자인 p53에 의해 조절을 받는다고 알려져 있다<sup>20,21)</sup>. 이런 세포주기 조절 인자와 그 외의 분자들의 상호 작용에 의해 그 주기가 조절되며 또한 그 인자들의 변화에 의해 억제 또는 증폭 되는 것이다. 따라서 세포주기에 대한 연구는 암세포의 과다한 증식과 성장억제에 대한 연구에 필연적인 것으로 사료된다.

길경(*Platycodi radix*)은 한국, 중국 및 일본 등지에 널리 자생하는 다년생 초본인 초롱꽃목 초롱꽃과(Campanulaceae)에 속하는 도라지(*Platycodon grandiflorum* A. DC)의 뿌리껍질을 벗기거나 또는 그대로 말린 것을 말하며, 전통적으로 염증성 호흡기 질환 및 식용으로 많이 사용되어져 오고 있다<sup>22-26)</sup>. 특히 한의학에서는 배농, 거담, 편도선염, 최유, 진해, 화농성종기, 천식 및 폐결핵의 거담제로서, 그리고 녹막염 등에도 효과가 있는 것으로

알려져 있다<sup>24,27)</sup>.

그 외 길경에 함유된 다양한 약리 성분의 분석에 관한 보고는 이미 다수의 연구자들에 의해 수행되었으며, 각종 생리활성의 기능 향상에 관한 연구가 꾸준히 진행되어져 오고 있다. 그중 최근에 보고 되어지는 항암 작용의 가능성은 매우 주목을 받고 있으나 대부분 현상의 관찰에 지나지 않으며, 정확한 항암기전을 제시한 예는 거의 없다<sup>28,29)</sup>. 특히 한의학처방의 형태로 섭취하는 길경의 성분이 수용성 성분인 점을 고려할 때, 항암에 관한 기전 연구는 거의 전무한 실정이었다.

길경에 관한 최근의 암에 대한 실험적 연구로 A549 인체 폐암 세포를 이용한 실험은 많았으나<sup>30-34)</sup>, NCI-H460 인체 폐암 세포를 이용한 실험적 연구는 없었다.

이에 저자는 길경에 대한 NCI-H460 인체 폐암 세포를 이용하여 cyclin발현, Cdk의 발현, p53 및 pRB의 발현 및 Cdk inhibitors의 발현을 살펴보고 이에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 암세포의 배양

본 실험에 사용한 NCI-H460 인체 폐암세포 세포(NCI-H460 human lung carcinoma cell line)는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 분주 받아 사용하였다. 암세포의 배양을 위해서는 선행연구 방법<sup>35)</sup>에 준하여 90%의 RPMI-1640 배지 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10%의 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS), 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 성장배지를 사용하여 배양하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였으며, 성장배지의 교환은 매 48시간마다 해주었고, 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-EDTA (Gibco BRL)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 세포배양용 페트리 접시로 옮겨 배양하였다.

### 2. 길경 수용액의 추출 및 처리

본 연구에 사용된 길경은 동의대학교 한의과대학 부속 한방병원에서 공급받았으며 100 g을 1,000 ml의 증류수에 3시간 이상 끓인 후, 3,000 rpm으로 20분간 원심 분리시켜 침전물을 제거하였다. 이를 다시 0.45 μm의 여과지를 이용하여 부유 성분을 걸러낸 후 수용성분을 동결 건조하여 사용하였다. 길경 수용액 추출물의 처리를 위하여 세포를 0.05% trypsin-EDTA를 이용하여 세포배양용 페트리 접시로부터 부유시킨 다음 새로운 세포배양용 페트리 접시에 6 × 10<sup>5</sup> 개/ml 정도로 분주하여 24시간 동안 안정화 시켰다. 길경 추출물을 세포에 처리하기 직전 적정 농도로 성장배지에 첨가하여 녹인 다음, 0.22 μm의 pore size를 가진 주사기용 필터유닛을 사용하거나 1회용 펌프 필터 유닛을 사용하여 미생물 및 불순물을 걸러낸 다음, 세포의 성장배지를 갈아주면서 직접 처리하였다<sup>35)</sup>.

### 3. RT-PCR을 이용한 mRNA 발현의 분석

정상 및 길경 수층액 추출물이 들어 있는 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. 24시간 후 세포를 disposable cell lifter (Fisher scientific)로 긁어서 50 ml tube에 옮긴 후 1,000 rpm에서 5분 동안 원심분리를 하였다. Pellet에 PBS를 첨가하여 현탁한 다음 1,000 rpm에서 5분간 원심분리를 한 후 pellet에 RNazol B 1ml을 첨가하여 약하게 현탁을 하고 e-tube에 옮겨서 4℃에서 1시간 동안 세포를 용해시켰다. 여기에 chloroform 200  $\mu$ l를 넣고 inverting을 반복하여 고르게 섞은 다음 4℃에서 5분 동안 방치시키고 14,000 rpm에서 15분 동안 원심분리(4℃)하여 무색의 상층액만을 400  $\mu$ l 취한 뒤 동량의 isopropanol을 넣고 inverting을 반복하여 고르게 섞은 다음 4℃에서 15분 동안 방치시키고 14,000 rpm에서 15분 동안 원심분리(4℃)하여 얻은 pellet (RNA)에 75% ethanol (25% DEPC treated water, Nalgene) 500  $\mu$ l를 넣어 15,000 g에서 15분 동안 원심분리(4℃)하고 ethanol을 완전히 날린 후에 DEPC water 50  $\mu$ l를 넣어서 RNA를 용해하여 A260 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA 함량을 계산하였다.

분리한 RNA에 oligo dT primer와 DEPC water를 넣고 65℃에서 10분 동안 반응시킨 후 실온에서 3분 동안 방치한 다음 10x buffer, 10 mM dNTP, RNasin, AMV Reverse transcriptase, 50 mM MgCl<sub>2</sub> 및 DEPC treated water를 넣고 42℃에서 1시간 동안 반응시켜서 reverse transcription (RT) product를 만들었다(반응에 필요한 각각의 시약은 Table 1 참조). 만들어진 RT product (template cDNA)에 2.5 mM dNTP, 10x buffer, DEPC water, premixed primer (GenoTech, Korea) 및 Taq DNA polymerase를 넣고 polymerase chain reaction (PCR)을 행하였다(반응에 필요한 각각의 시약 사용 및 PCR의 조건은 Table 2 및 3 참조). 또 One-step RT-PCR PreMix (iNtRON Biotechnology, Korea)를 사용하여 실험하였을 경우에는 분리한 RNA에 iNtRON ONE-STEP RT-PCR PreMix, premixed primer 및 DEPC treated water를 넣고 RT-PCR을 행하였다(반응에 필요한 각각의 시약의 조성과 사용 및 RT-PCR의 조건은 Table 4 및 5 참조). PCR을 행하여 만들어진 DNA의 양을 확인하기 위하여 1x TAE buffer으로 1% agarose gel을 만들고 well에 각각의 primer에 해당하는 PCR 산물에 DNA gel loading solution (5x, QUALITY BIOLOGICAL, INC.)을 섞어서 loading 한 후 100 V에서 전기영동으로 분리한 후 EtBr 염색하였다. 이를 ultra violet (UV) 하에서 확인한 후 Picture works' photo enhancer를 이용하여 사진 촬영을 하였다<sup>36)</sup>. 이때 사용된 primer들의 서열은 Table 6에 나열된 바와 같으며 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 포함하여 internal control로 사용하였다.

#### 4. SDS-polyacrylamide gel 전기영동

세포배양용 패트리 접시에  $6 \times 10^5$ 개/ml 정도로 폐암세포를 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 다음 길경 추출물을 처리하였다. 48시간까지 배양한 후, 세포를 PBS로 씻어 내고 0.05%

trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 원심분리를 하여 세포를 모았다. 이렇게 모아진 세포에 적당량의 lysis buffer (250 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM ethylenediamine-tetraacetic acid : EDTA pH 8.0, 1% NP-40, 0.1 M phenylmethylsulfonyl fluoride ; PMSF, 1 M 1,4-dithio-DL-threitol ; DTT, protease inhibitor cocktail, DW)를 첨가하여 4℃에서 30분간 반응시킨 후, 13,500 rpm으로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 동량으로 맞춘 다음 동량의 Laemml sample buffer ( $\beta$ -mercaptoethanol 5%, Laemml sample buffer 95%, Bio-Rad)을 섞어서 sample을 만들었다. 이렇게 만든 sample 동량을 sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다<sup>37)</sup>.

Table 1. Reaction components for RT

Separated RNA	2 $\mu$ g (x, $\mu$ l)
Oligo dT primer	2 $\mu$ l
DEPC treated water	8 $\mu$ l-x $\mu$ l
total 10 $\mu$ l	
65℃, 10 min reaction	
10x buffer	5 $\mu$ l
10 mM dNTP	5 $\mu$ l
RNasin	1 $\mu$ l
AMV Reverse transcriptase	1 $\mu$ l
50 mM MgCl <sub>2</sub>	5 $\mu$ l
DEPC treated water	23 $\mu$ l
Total 50 $\mu$ l	
42℃, 1 h reaction (RT product)	

Table 2. Reaction components for PCR

Template cDNA	8 $\mu$ l
10x buffer	4 $\mu$ l
10 mM dNTP	0.25 $\mu$ l
Taq DNA polymerase	0.2 $\mu$ l
Premixed primer	1 $\mu$ l
DEPC treated water	26.55 $\mu$ l
Total 40 $\mu$ l	

Table 3. Condition for PCR

Temperature (℃)	Time	No. of cycle
45	30 min	1
94	15 min	1
94	5 min	1
94	30 sec	
58	30 sec	50
72	30 sec	
72	5 min	1
22	hold	-

Table 4. Components of ONE-STEP RT-PCR PreMix

Components of ONE-STEP RT-PCR PreMix	
AMV Reverse transcriptase	
RT-PCR duffer (10x)	
dNTPs	
Taq DNA polymerase	
Stabilizing buffer	

Table 5. Reaction components for RT-PCR

INIRON ONE-STEP RT-PCR PreMix	8 $\mu$ l
Separated RNA	2 $\mu$ g ( $\times$ $\mu$ l)
premixed primer	1 $\mu$ l
DEPC treated water	20-x $\mu$ l
Total 20 $\mu$ l	

Table 6. Gene-specific Primers for RT-PCR

Gene name		Sequence
Cyclin D1	Sence	5'-TGG-ATG-CTG-GAG-GTC-TGC-GAG-GAA-3'
	Antisence	5'-GGC-TTC-GAT-CTG-CTC-CTG-GCA-GGC-3'
Cyclin E	Sence	5'-AGT-TCT-CGG-CTC-GCT-CCA-GGA-AGA-3'
	Antisence	5'-TCT-TGT-GTC-GCC-ATA-TAC-CGG-TCA-3'
Cdk2	Sence	5'-GCT-TTC-TGC-CAT-TCT-CAT-CG-3'
	Antisence	5'-GTC-CCC-AGA-GTC-CGA-AAG-AT-3'
Cdk4	Sence	5'-ACG-GGT-GTA-AGT-GCC-ATC-TG-3'
	Antisence	5'-TGG-TGT-CGG-TGC-CTA-TGG-GA-3'
Cdk6	Sence	5'-CGA-ATG-CGT-GGC-GGA-GAT-C-3'
	Antisence	5'-CCA-CTG-AGG-TTA-GAG-CCA-TC-3'
p53	Sence	5'-GCT-CTG-ACT-GTA-CCA-CCA-TCC-3'
	Antisence	5'-CTC-TCG-GAA-CAT-CTC-GAA-GCG-3'
p16	Sence	5'-CGG-AAG-GTC-CCT-CAG-ACA-TC-3'
	Antisence	5'-TCA-TGA-AGT-CGA-CAG-CTT-CCG-3'
p21	Sence	5'-CTC-AGA-GGA-GGC-GCC-ATG-3'
	Antisence	5'-GGG-CGG-ATT-AGG-GCT-TCC-3'
p27	Sence	5'-AAG-CAC-TGC-CGG-GAT-ATG-GA-3'
	Antisence	5'-AAC-CCA-GCC-TGA-TTG-TCT-GAC-3'
GAPDH	Sence	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TGG-TAT-3'
	Antisence	5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

5. Western blot analysis

Western blot analysis를 위하여 SDS-polyacrylamide gel 전 기영동으로 단백질을 분리한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBST (0.1% Tween 20 in PBS) 용액을 이용하여 상온에서 1시간 이상 incubation하면서 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고, PBS-T 용액을 이용하여 5분 간격으로 최소 3회 이상 세척하였다. 세척 후 특정 단백질에 대한 항체(PBS-T로 1:500 또는 1:1000으로 희석하여 사용)를 membrane에 적용시켜 상온에서 1시간 이상 항원 항체 반응을 일으킨 후, PBS-T로 씻어내고 3회 이상 수세한 후, 특정 항체에 대한 이차 항체(PBS-T로 1:1500으로 희석하여 사용)를 적용시켜 상온에서 1시간 이상 반응시켰다. 다시 PBS-T로 세척 (10분간 3번, 5분간 3번)하고 enhanced ChemiLuminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다<sup>38-39</sup>. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며 (Table 7), 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다.

Table 7. Antibodies used in the present study

Antibody	Origin	Company
cyclin D1	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
cyclin E	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
Actin	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
Cdk2	mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology
Cdk4	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
Cdk6	mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology
p16	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
p21	mouse monoclonal	Calbiochem
p27	rabbit polyclonal	Calbiochem
p53	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
pRB	mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology

결과 및 고찰

1. NCI-H460 폐암세포에서 cyclins의 발현에 미치는 길경 추출물의 영향

다음은 세포증식의 세포주기 조절관점과 연관된 길경 추출물의 암세포 증식억제 현상 해석을 위하여 정상 및 길경 추출물이 함유된 배지에서 배양한 NCI-H460 폐암세포들을 대상으로 현재까지 밝혀진 cyclin들 중에서 특히 세포주기 G1기에서 S기로의 진입 조절에 중요한 역할을 하는 cyclin들의 발현 정도를 비교 조사하였다. 이를 위하여 조사된 cyclin은 cyclin D1 및 cyclin E로서, 정상 및 길경 추출물이 함유된 배지에서 48시간 동안 배양된 NCI-H460 폐암세포를 대상으로 RNA 및 단백질을 추출하여 RT-PCR 및 Western blot analysis를 통하여 두 유전자의 전사 및 번역 수준에 미치는 길경 추출물의 영향을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다.

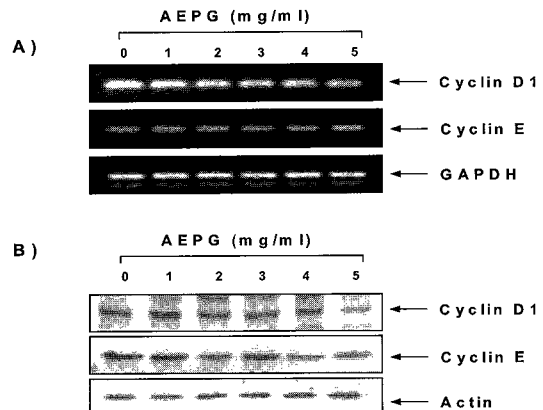


Fig. 1. Effect of AEPG treatment on the levels of cyclins in NCI-H460 human lung carcinoma cells. (A) Cells were incubated with AEPG for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using cyclin D1 and cyclin E primers described in materials and methods. The amplified PCR products were run in a 1% agarose gel and visualized by EIBr staining. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) After AEPG treatment for 48 h, cells were lysed and cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-cyclin D1 and anti-cyclin E. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

Fig. 1에 나타난 바와 같이 cyclin D1의 경우, 급격한 변화는 아니지만 정상 배지에서 배양된 암세포에 비하여 길경 추출물의

처리에 의하여 전사 및 번역 수준에서 다소 감소되는 경향성을 보여 주었다. 그러나 cyclin E의 경우, 길경 추출물의 처리에 mRNA 및 단백질 발현 수준 모두에서 큰 영향을 미치지 못한 것으로 나타났다. 즉 NCI-H460 폐암세포에서 길경 추출물 처리에 의한 증식억제 효과는 cyclin D1의 발현 감소와 어느 정도 연관성은 있는 듯하지만 cyclin D1의 발현 변화가 그다지 크지 않은 것으로 미루어 또 다른 세포주기 조절인자가 작용할 것으로 추정된다.

Kang et al. (2003)<sup>34)</sup>에 의한 A549 폐암세포에서의 경우에는 cyclin D1 단백질의 발현이 길경 추출물 처리 농도의 증가에 따라 점차 감소한 반면, cyclin A, cyclin B1 및 cyclin E의 발현에는 큰 영향이 주지 못하였다. 따라서 이러한 세포주에 종류에 따른 세포주기 조절에 관여하는 주요 유전자의 발현 차이에 의하여 세포주기 교란의 효과도 다소 상이하게 나타날 수 있을 것으로 추정된다.

2. NCI-H460 폐암세포에서 Cdk의 발현에 미치는 길경 추출물의 영향

Fig. 1의 결과에서 알 수 있듯이 길경 추출물의 처리에 의한 세포주기 G1기 arrest 현상은 G1기 조절에 중요한 cyclin의 급격한 발현 변화와는 상관성이 없는 것 같았다. 따라서 cyclin과 complex를 형성함으로써 세포주기 진행에 매우 중요한 kinase 활성을 지니는 Cdk의 발현에 미치는 길경 추출물의 영향을 조사하였다. 이를 위하여 G1기의 조절에 중요한 역할을 하는 cyclin D1과 complex를 이루는 Cdk4 및 Cdk6, 그리고 cyclin E와의 complex를 형성하는 Cdk2의 발현 변화 여부를 RT-PCR 및 Western blot analysis로 전사 및 번역 수준에서 조사하였다.

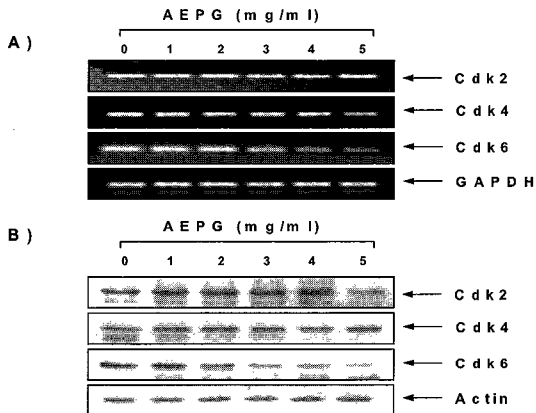


Fig. 2. Effect of AEPG treatment on the levels of Cdk in NCI-H460 human lung carcinoma cells. (A) Cells were incubated with AEPG for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using indicated primers described in materials and methods. The amplified PCR products were run in a 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) After AEPG treatment for 48 h, cells were lysed and cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

Fig. 2A의 결과에서 알 수 있듯이 RT-PCR에 의한 결과에서 길경 추출물의 처리에 따라 Cdk6 mRNA의 발현은 처리 농도의

존적으로 감소되었으나, Cdk2 및 Cdk4 발현에 길경 추출물은 큰 영향을 미치지 못하였다. Western blot analysis에 의한 Cdk의 단백질 발현에 미치는 길경 추출물의 영향을 조사한 결과, Cdk6의 경우 전사 수준에서의 경우와 유사하게 길경 추출물 처리 농도 증가에 따라 단백질의 발현도 매우 감소되었으나, Cdk4 단백질은 아무런 변화가 없었으며, Cdk2는 최고 농도인 5.0 mg/ml 처리군에서만 발현이 억제되었다(Fig. 2B).

이상의 결과로 미루어 길경 추출물 처리에 의한 NCI-H460 인체 폐암세포의 증식억제에는 Cdk의 전사 및 번역 발현 수준에서는 Cdk6의 변화가 가장 심하게 억제되었음을 알 수 있었다. 그러나 A549 폐암세포에서 Cdk2 및 Cdk4는 길경 추출물의 농도 증가에 따라 단백질 수준에서의 발현이 다소 감소되었으나 Cdk6의 경우는 대조군에 비하여 유의적인 변화가 없었다<sup>34)</sup>. 따라서 주요 Cdk의 kinase 활성 비교를 통한 두 세포주 사이의 차이점에 관한 보다 구체적인 추가 연구가 수행되어야 할 것이다.

3. NCI-H460 폐암세포의 p53 및 pRB의 발현에 미치는 길경 추출물의 영향

다음은 종양 억제유전자로서 세포의 증식과 사멸에 중요한 역할을 하는 p53 및 pRB 유전자의 발현에 미치는 길경 추출물의 영향을 조사하였다.

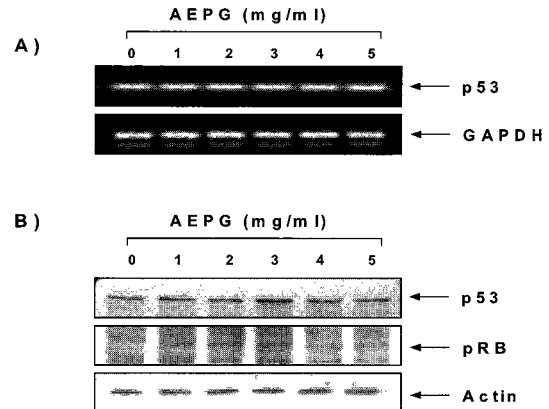


Fig. 3. Effect of AEPG treatment on the levels of p53 and pRB in NCI-H460 human lung carcinoma cells. (A) Cells were incubated with AEPG for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using p53 primer described in materials and methods. The amplified PCR products were run in a 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) After AEPG treatment for 48 h, cells were lysed and cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with anti-p53 and anti-pRB antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

전술한 바와 같이 동일 조건에서 배양된 암세포를 대상으로 조사한 결과, Fig. 3에 나타낸 바와 같이 길경 추출물이 처리된 암세포에서 p53 단백질의 발현이 다소 증가하는 경향성을 보여 주었으나 전사 수준에서는 큰 차이가 없었다. 그리고 세포주기 G1기 진입에 중요한 역할을 하는 pRB 단백질의 발현은 본 실험 조건에서 검출이 잘 되지는 않았으며, 인산화의 변화 여부도 뚜렷하게 구분되지 않았다. 따라서 길경 추출물 처리에 의한 암세포

의 증식억제에 p53 및 pRB 유전자는 크게 관여하지 않는 것으로 추정되어진다. 그러나 pRB와 선택적인 결합을 통하여 세포주기 조절에 중요한 역할을 하는 전사조절인자 E2F family의 발현이나 pRB와의 상관성은 아직 조사하지 못한 단계이므로 이에 대한 길경 추출물의 영향과 pRB family에 속하는 단백질들과의 complex 형성 가능성들에 관하여서는 추후 더 연구되어야할 것이다.

#### 4. NCI-H460 폐암세포의 Cdk inhibitors의 발현에 미치는 길경 추출물의 영향

이상의 결과에서 길경 추출물 처리에 의한 NCI-H460 인체 폐암세포의 성장억제 효과에 Cdk의 활성을 조절하는 cyclins의 발현 감소효과는 비교적 강하게 나타나지 않았다. 따라서 이들 양성조절인자 외 다른 유전자 산물에 의한 조절 가능성이 매우 크기 때문에 길경 추출물의 처리에 의한 암세포의 증식억제가 Cdk inhibitor의 발현과 상관성이 있는지의 여부를 조사하였다. 이를 위해 위하여 현재까지 알려진 Cdk inhibitor 중 가장 많은 연구가 이루어져있는 p16, p21 및 p27의 발현에 미치는 길경 추출물의 영향을 Western blotting 및 RT-PCR법으로 조사하였다.

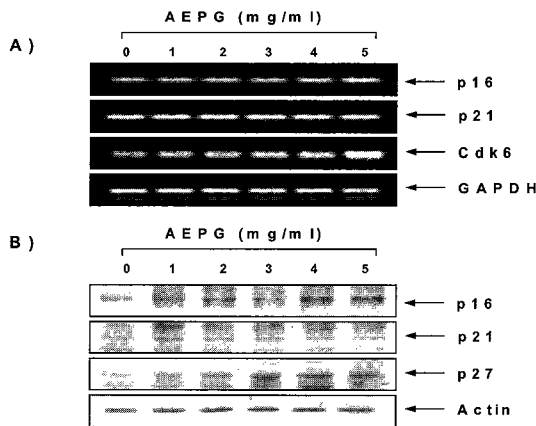


Fig. 4. Effect of AEPG treatment on the mRNA and protein levels of Cdk inhibitors, p16, p21 and p27, in NCI-H460 human lung carcinoma cells. (A) Cells were incubated with AEPG for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using p16, p21 and p27 primers described in materials and methods. The amplified PCR products were run in a 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with various concentrations of AEPG for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 13% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-p16, anti-p21 and anti-p27 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

Fig. 4A의 결과에서 알 수 있듯이 RT-PCR에 의하여 조사된 3가지 Cdk inhibitor의 전사 수준에 미치는 길경 추출물의 영향을 조사해 본 결과 p16 및 p21의 발현은 큰 변화가 없었으나, p27의 발현은 길경 추출물 처리 농도가 증가될수록 점차 증가되었다. 그러나 Fig. 4B의 Western blot analysis의 결과에서 p16의 단백질 발현은 길경 추출물의 처리 농도가 증가될수록 점차 발현의 양이 증가되어 전사 조절 단계에서 단백질의 축적이 증가된 것으로 추정된다. 그리고 p21 단백질의 발현은 길경 추출물의 처리에 의하여 큰 변화가 없었으나, p27 단백질은 길경 추출물 처리 농도

가 증가할수록 점차 발현의 양이 증가되었음을 알 수 있었다. 따라서 길경 추출물 처리에 의한 NCI-H460 폐암세포의 증식억제는 p21 보다는 p16이나 p27의 발현 증가와 연관성이 있는 것으로 생각되어지며, 이로 인한 cyclin/Cdk complex의 형성을 방해하여 그들의 kinase 활성 자체를 감소시켰을 것으로 추정되어진다.

그러나 Kang et al. (2003)<sup>34)</sup>의 결과에 의하면 A549 인체 폐암세포에서 길경 추출물의 처리에 의하여 농도에 따른 반응에서 다소의 차이는 보이지만 Cdk inhibitor p21의 발현을 조절하는 종양억제 유전자 p53 뿐만 아니라 p21 및 p27의 발현이 모두 증가되었다. 그러나 특히 p53의 경우 길경 추출물의 처리에 의하여 전사 및 번역 수준에서 모두 발현이 증가되었지만, p21의 경우는 단백질의 발현만이 증가되었다고 보고한 바 있다. 따라서 길경 추출물의 처리에 의한 p21 단백질의 발현 증가가 전사수준과는 무관한 단백질 자체의 half-life 증가에 의한 p53 비의존적인 단백질 축적 현상 가능성도 있을 것으로 추측되어진다. 그러나 Kang et al. (2003)<sup>34)</sup>이 사용한 A549 폐암세포는 정상 p53 유전자를 가지는 세포주이기 때문에 이에 관한 연구는 추가적으로 p53 null 또는 mutant 세포주를 사용한 검증이 필요할 것으로 생각되어지며, 특히 A549 세포는 p16 유전자가 존재하지 않는 세포주이므로 본 연구에 사용된 NCI-H460 세포주와는 genetic background에서 다소 차이가 나기 때문에 직접적인 비교는 어려웠다. 따라서 동일 길경 추출물 처리에 의한 암세포의 증식억제 효과라 하더라도 세포주의 종류에 따라 세포주기 교란의 차이가 나는 것은 충분히 가능한 현상이므로 다양한 세포주들에 의한 효과를 더 검증해야할 필요가 있을 것으로 생각된다.

## 결론

본 연구에서는 길경의 암세포 증식억제 현상과 연관된 기전 해석을 위하여 인체 폐암세포 NCI-H460의 성장에 미치는 길경 수용액 추출물[aqueous extract from the roots of *P. grandiflorum* (AEPG)]의 영향을 조사하였다. AEPG의 처리에 의한 암세포 증식억제가 apoptosis 유발과 연관성이 있음을 apoptotic body의 형성과 sub-G1기에 속하는 세포의 빈도 증가로 확인하였다. AEPG 처리는 cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor인 p16 및 p27 유전자의 mRNA 및 단백질의 발현 증가를 유발하였다. AEPG가 처리된 암세포에서 특히 cyclin D1 및 Cdk6의 발현이 전사 및 번역 수준에서 선택적으로 억제되었다. 종양억제 유전자 retinoblastoma protein (pRB) 및 p53 단백질의 발현에는 AEPG가 큰 영향을 미치지 못하였다.

이러한 결과는 길경 추출물을 이용한 인체 폐암세포의 성장억제제의 개발 가능성이 매우 높음을 시사하여 준다. 따라서 이에 관한 지속적인 연구의 필요성이 있을 것으로 생각되며 유전자의 기능적 분석에 관한 더 많은 연구도 필요할 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. 許浚, 東醫寶鑑, 법인문화사, 서울, p 1904, 1999.

2. 李栴 國譯篇註醫學入門 本草 上, 南山堂, 서울, pp 323-326, 1974.
3. 윤길영, 東醫臨床方劑學, 成輔社, 서울, p 437, 439, 1994.
4. Chiarugi, V., Magnelli, L., Cinelli, and Basi, G. Apoptosis and the cell cycle. *Cell. Mol. Biol. Res.*, 40:603-612, 1994.
5. Evans, V.G. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol. Int.*, 17:461-476, 1993.
6. Nagata S., Apoptosis by death factor. *Cell*, 88:355-365, 1997.
7. Schultz, D.R. and Harrington Jr., W.J. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin. Arthritis Rheum.*, 32:345-369, 2003.
8. Howard, A. and Pelc, S.R. Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity*, 6:261, 1953.
9. Minshull J., Pines J., Golsteyn R., Standart N., Mackie S., Colman A., Blow J., Ruderman J. V., Wu M. and Hunt T. The role of cyclin synthesis, modification and destruction in the control of cell division. *J. Cell Sci. Suppl.*, 12:77-97, 1989.
10. Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C.J. and Kato, J.Y. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, 14:2066-2076, 1994.
11. Meyerson, M. and Harlow, E. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol. Cell. Biol.*, 14:2077-2086, 1994.
12. Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J.W., Elledge, S., Nishimoto, T., Morgan, D.O., Franza, B.R. and Roberts, J.M. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science*, 257:1689-1694, 1992.
13. Ohtsubo, M. and Roberts, J.M. Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science*, 259:1908-1912, 1993.
14. Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A. and Lamb, N.J. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell*, 67:1169-1179, 1991.
15. Guadagno, T.M., Ohtsubo, M., Roberts, J.M. and Assoian, R.K. A link between cyclin A expression and adhesion-dependent cell cycle progression. *Science*, 262:1572-1575, 1993.
16. Walker, D.H. and Maller, J.L. Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication. *Nature*, 354:314-317, 1991.
17. Brandeis, M. and Hunt, T. The proteolysis of mitotic cyclins in mammalian cells persists from the end of mitosis until the onset of S phase. *EMBO J.*, 15:5280-5289, 1996.
18. Elledge, S.J. and Harper, J.W. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6:847-852, 1994.
19. Morgan, D.O. Principles of CDK regulation. *Nature*, 374:131-134, 1995.
20. Gu, Y., Truck, C. W. and Morgan D. O. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature*, 366:707-710, 1993.
21. Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S.J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 75:805-816, 1993.
22. Takagi, K. and Lee, E.B. Pharmacological studies on Platycodon grandiflorum A. DC. *Yakugaku Zasshi*, 92:51-973, 1972.
23. Lee, E.B. Pharmacological activities of crude platycodin. *J. Pharm. Soc. Korea*, 19:164-176, 1975
24. Ozaki, Y. Studies on antiinflammatory effect of Japanese Oriental medicines (kampo medicines) used to treat inflammatory diseases. *Biol. Pharm. Bull.*, 18:59-562, 1995.
25. Saeki, T., Koike, K. and Nikaido, T. A comparative study on commercial, botanical gardens and wild samples of the roots of Platycodon grandiflorum by HPLC analysis. *Planta Med.*, 65:428-431, 1999.
26. Chung, J.H., Shin, P.G., Ryu, J.C., Jang, D.S. and Cho, S.H. Pharmaceutical substances of Platycodon grandiflorum (jacquin) A, De Candolle, *Arg. Chem. Biotech.*, 40:152-156, 1997.
27. Tada, A., Kaneiwa, Y., Shoji, J. and Shibata, S. Studies on the saponins of the root of Platycodon grandiflorum A. De Candolle. I. Isolation and the structure of platycodin-D. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 23:2965-2972, 1975.
28. Kim, Y.P., Lee, E.B., Kim, S.Y., Li, D., Ban, H.S., Lim, S.S., Shin, K.H. and Ohuchi, K. Inhibition of prostaglandin E2 production by platycodin D isolated from the root of Platycodon grandiflorum. *Planta Med.*, 67:362-364, 2001.
29. Lee, J.Y., Hwang, W.I. and Lim, S.T. Effect of Platycodon grandiflorum DC extract on the growth of cancer cell lines. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 30:13-21, 1998.
30. Lee, J.H., Kang, G.H., Kim, K.C., Kim, K.M., Park, D.I., Choi, B.T., Kang, H.S., Lee, Y.T. and Choi, Y.H., Tetrandrine-induces cell cycle arrest and apoptosis in A549 human lung carcinoma cells. *International journal of oncology* 21:1239-1244, 2002.
31. 강윤경, 박동일, 이준혁, 최영현, 潤肺散에 의한 폐암세포 증식억제기전에 관한 연구, *동의생리병리학회지* 16(4):745-755, 2002.
32. 강병령, 오창선, 이재훈, 최영현, 박동일, 瀉白散에 의한 인체 폐암세포의 G1기 성장억제기전에 관한 연구, *동의생리병리학회지* 16(6):1123-1127, 2002.
33. 이성열, 이재훈, 김원일, 배송자, 박동일, 최영현, 길경 수용액 추출물에 의한 인체 폐암세포의 APOPTOSIS 유발에 관한 연구, *생명과학회지* 13(2), 2003.
34. 강락원, 이재훈, 감철우, 최병태, 최영현, 박동일, 길경 수용액 추출물에 의한 인체 폐암세포의 성장억제 기전 연구, *동의생리병리학회지* 17(1):183-189, 2003.

35. Lee, S.Y., Lee, J.H., Kim, W.I., Park, D.I. and Choi, Y.H. Apoptotic Cell Death of Human Lung Carcinoma A549 Cells by an Aqueous Extract from the Roots of *Platycodon grandiflorum*. *Kor. J. Life Sci.*, 17:451-456, 2003.
36. Choi, Y.H. Research technics for the cell cycle study. *Exp. Mol. Med.*, 33:S15-36, 2001.
37. Choi, Y.H., Lee, S.J., Nguyen, P., Jang, J.S., Lee, J., Wu, M.L., Takano, E., Maki, M., Henkart, P.A. and Trepel, J.B. Regulation of cyclin D1 by calpain protease. *J. Biol. Chem.*, 272:28479-28484, 1997.
38. Lee, J.H., Choi, Y.H., Kang, H.S. and Choi, B.T. An aqueous extract of *Platycodi radix* inhibits LPS-induced NF-kappaB nuclear translocation in human cultured airway epithelial cells. *Int. J. Mol. Med.*, 13:843-847, 2004.