

桔梗에 의한 NCI-H460 인체 비소세포폐암 세포에서의 autophagy 및 apoptosis 유발 효과

홍수현¹, 한민호¹, 박 철², 박상은³, 홍상훈³, 최영현^{1,4}

¹동의대학교 한의과대학 생화학교실, ²동의대학교 자연생활과학대학 분자생물학과
³동의대학교 한의과대학 한방내과, ⁴동의대학교 항노화연구소 및 블루바이오소재개발센터

Induction of Autophagy and Apoptosis by the Roots of *Platycodon grandiflorum* on NCI-H460 Human Non-small Lung Carcinoma Cells

Su-hyun Hong¹, Min-ho Han¹, Cheol Park², Sang-eun Park³, Sang-hoon Hong³, Yung-hyun Choi^{1,4}

¹Dept. of Biochemistry, College of Korean Medicine, Dong-eui University

²Dept. of Molecular Biology, College of Natural Science and Human Ecology, Dong-eui University

³Dept. of Korean Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dong-eui University

⁴Anti-Aging Research Center & Blue-Bio Industry RIC, Dong-eui University

ABSTRACT

Objectives: The root of *Platycodon grandiflorum* (PG) has been known to possess a range of pharmacological activities including anti-cancer, anti-inflammatory, and anti-oxidant effects. The present study was designed to investigate whether or not PG-induced cell death was connected with autophagy and apoptosis in NCI-H460 human lung cancer cells.

Methods: Effects on the cell viability and apoptotic activity were quantified using MTT assays and flow cytometry analysis, respectively. Protein activation was measured by immunoblotting. Autophagy was measured by LC3 immunofluorescence and immunoblotting. ROS production and loss of mitochondria membrane potential (MMP) were checked with flow cytometry analysis.

Results: Following exposure to PG, NCI-H460 cell proliferation decreased simultaneously inducing autophagic vacuoles and up-regulation of microtubule-associated protein 1 light chain 3 and beclin-1 protein expressions. Interestingly, pre-treated with autophagy inhibitors, 3-methyladenin or bafilomycin A1 further triggered reduction of cell viability. PG treatment also induced apoptosis that was related modulation of Bcl-2 family proteins, death receptors and activation of caspases. In addition, PG stimulation clearly enhanced loss of MMP and reactive oxygen species (ROS) generation.

Conclusions: Our results suggest that PG elicited both autophagy and apoptosis by increasing loss of MMP and ROS production. PG induced-autophagy may play a cell protective role. [This research was supported by Basic Science Research Program through the NRF grant funded by the Korea government(No.2013R1A1A2065537).]

Key words: *Platycodon grandiflorum*, Autophagy, Apoptosis, ROS, MMP

1. 서론

· 교신저자: 홍수현 부산시 부산진구 양정2동 산45-1
동의대학교 한의과대학 생화학교실
TEL: 051-850-8644 FAX: 051-853-4036
E-mail: hongsh@deu.ac.kr

폐암은 전 세계적으로 남녀 모두에서 사망률과 사망자수가 가장 많아 암으로 사망하는 사람의 약 30%에 이른다^{1,2}. 폐암은 임상적인 경과와 치료 방

법에 따라 소세포폐암과 비소세포폐암으로 대별되고 폐암 환자의 약 85%가 비소세포폐암에 해당된다. 폐암 환자의 대부분은 말기에 진단을 받기 때문에 나쁜 경과를 가지는 경우가 많다. 최근 수십 년간 말기 비소세포폐암 환자에 대한 항암치료제가 개발되어 시술되었지만 소수의 환자만이 효과를 보았으며 항암제의 독성으로 인해 많은 환자들이 부작용을 경험하는 문제점이 있다^{3,4}. 그러므로 적은 부작용과 높은 효과를 가진 새로운 항암 치료제의 발견하여 개발하는 것이 절실하다.

한의학에서 폐암이라는 병명이 직접적으로 기재되어 있지는 않지만 『東醫寶鑑』, 『難經』, 『濟生方』 등에서 언급된 咳嗽, 胸痛, 咯血, 發熱, 胸悶, 氣短, 氣逆 등의 주요증상에 근거하여 그 발생과정 및 증상에 따라 肺癰, 肺積, 肺疽, 息賁 등에서 그 유사점을 찾을 수 있다^{5,6}. 폐암에 대한 한방 연구로는 폐암 환자에 대한 증례 보고가 주로 발표되었고, 처방을 이용한 실험적인 연구로는 歸脾湯의 항암 및 면역 활성⁷, 參芪補肺湯에 길경이 가미된 처방의 항암⁵, 補中益氣湯의 apoptosis 유도⁸, 葶藶大棗瀉肺湯 및 葶藶湯의 apoptosis 유도⁹ 등에 대한 기존 연구가 보고되었다.

길경의 항암 작용에 대한 여러 연구는 대부분 A549 사람 폐암세포에서의 apoptosis 유발에 관한 연구가 수행되었지만¹⁰⁻¹², 길경의 autophagy 유도에 관한 국내·외 연구는 없으며, 미토콘드리아 기능에 미치는 영향 및 ROS 발생에 관한 연구는 미미하였다. 또한, 본 실험에 사용된 NCI-H460 세포에서의 길경에 유도된 apoptosis 관련 유전자 발현 조절에 관한 연구는 적은 편이었다. NCI-H460 세포는 A549 세포와 같이 비소세포폐암 세포이기는 하나 유래한 환자가 다르기 때문에 유전적 변이가 존재하므로 길경에 의해 유도되는 autophagy 및 apoptosis에 관한 추가 연구가 필요하다.

이에 저자는 길경의 폐암세포에 대한 세포 성장 억제 효과를 확인하기 위하여 사람의 비소세포 폐암으로부터 유래된 NCI-H460 세포에 처리하여 세포

성장을 감소, autophagy 유도, apoptosis 유도, MMP 감소 및 ROS 생성 증가 등에 관한 연구를 수행하여 유의한 효과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 시료준비

본 연구에 사용된 길경은 옥천당(췌(울산, 한국)에서 건조된 국산을 구입하여, 추출에 적합하도록 세절된 후 약재 무게의 10배에 해당하는 증류수로 100 °C에서 3시간 동안 추출하여 사용하였다. 이후 열수추출액을 Whatman No.2 filter paper(Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로 거른 후 동결건조기를 사용하여 분말로 만들어 증류수에 100 mg/ml의 농도로 녹인 후 고압증기멸균기에서 멸균 처리하였다. 이 준비된 길경 추출물은 무균실험대안에서 Sartorius AG(Weender Landstr, Germany)에서 구입한 Minisart® Syringe filter(0.2 µm)를 사용하여 거른 후 사용하였다.

2. 시약 및 항체

세포배양을 위한 Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS), RPMI-1640 배지, 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Gibco BRL(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide(MTT), 4', 6-diamidino-2-phenylindole(DAPI), propidium iodide(PI), 3-methyladenin(3-MA), bafilomycin A1, H₂DCFDA 및 JC-1은 Sigma-Aldrich Chemical Co(St. Louis, MO, USA)에서 구하였다. Autophagy 관련 항체는 Cell Signaling(Beverly, MA, USA)에서 구입하였고, 나머지 1차 및 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc.(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

3. 세포배양

실험에 사용한 인체 비소세포폐암 세포(NCI-H460)는 생명공학연구소(KRIBB, 대전, 한국)에서 분양

받았으며, 암세포의 배양을 위해 RPMI-1640 배지와 10%의 FBS에 100 U/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin(Gibco-BRL)이 포함된 배지를 사용하여 37 °C 및 5% CO₂조건에서 배양하였다.

4. MTT assay를 이용한 세포 생존율의 측정

세포 배양용 6 well plate에 1.5×10⁵개/ml로 세포를 분주하고 24시간동안 안정화 시킨 후, 길경을 각 well 당 적정 농도로 처리하였다. 약물 처리 24시간 후 MTT 시약을 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 200 µl씩 분주하고 37 °C에서 2시간 동안 다시 배양하였다. 배양이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 DMSO를 2 ml씩 각 well에 분주하여 생성된 formazan을 모두 녹인 후 96 well plate에 200 µl씩 옮겨서 ELISA reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 세포의 형태 관찰

세포 배양용 6 well plate에 1.5×10⁵개/ml로 세포를 분주한 후, 다양한 농도의 길경을 처리하여 37 °C, 5% CO₂조건 하에서 48시간 동안 배양시켰다. 도립 현미경을 이용하여 50배 및 200배의 배율로 각 농도에 따른 암세포의 형태 변화를 관찰하여 가장 대표적인 사진을 촬영하였다.

6. DAPI staining에 의한 세포핵의 형태 관찰

Apoptosis가 유발되었을 경우 특이적으로 나타나는 핵의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 길경이 처리된 세포를 모은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 37% formaldehyde 용액과 PBS를 1:9의 비율로 섞어 만든 fixing solution을 모아진 세포에 500 µl 첨가하여 충분히 섞은 후, 상온에서 10분 동안 고정하였다. 고정된 세포를 2,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 fixing solution을 제거하고 PBS 200 µl에 부유시킨 후 세포가 포함되어 있는 PBS 80 µl를 slide glass 위에 떨어뜨리고 1,000 rpm에서 5분간 cytospin하여 세포를 slide glass

에 부착하였다. 세포가 부착된 slide glass를 PBS로 2~3회 정도 세척하고 PBS가 마르기 전에 0.2%의 Triton X-100(Amresco, Solon, OH, USA)을 첨가하여 상온에서 10분간 고정한 후 2.5 µg/ml 농도의 DAPI 용액을 처리하여 상온에서 15분간 염색하였다. 염색이 끝난 후 DAPI 용액을 충분히 세척하고 mounting solution을 처리한 후 형광 현미경을 이용하여 400배의 배율로 각 농도에 따른 암세포의 핵의 형태 변화를 관찰한 다음 Axio Vision 프로그램을 이용하여 사진 촬영을 하였다.

7. Apoptosis 유발의 정량적 분석

NCI-H460 세포에서 길경이 유발하는 apoptosis 정도를 정량적으로 분석하기 위하여 다양한 농도의 길경을 48시간 동안 처리하여 세포들을 모은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 PBS를 이용하여 2~3회 정도 세척하였다. 준비된 세포는 Cycle TEST PLUS DNA REAGENT Kit(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 고정 및 염색을 하여 4 °C, 암실에서 30분 동안 반응을 시켰다. 반응시킨 세포를 35-mm mesh를 이용하여 단일세포로 분리한 후 FACSCalibur(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 적용시켜 형광반응에 따른 Cellular DNA content 및 histogram을 CellQuest software 및 Modifit LT(Becton Dickinson) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

8. Western blot analysis

길경 처리에 따른 번역 수준에서의 유전자 발현 변화 관찰을 위하여 준비된 세포들을 모은 다음, 적당량의 lysis buffer[25 mM Tris-Cl(pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]를 첨가하여 용해시켰다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 정량 한 다음 동량의 Laemli sample buffer(Bio-Rad)를 섞어서

protein sample을 만들었다. 정량한 후, 동일한 양의 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후, nitrocellulose membrane(Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 전이시켰다. 분리된 단백질이 전이된 nitrocellulose membrane을 5% skim milk를 1시간 처리하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 1차 antibody를 처리하여 상온에서 2시간 이상 또는 4 °C에서 over night 시킨 다음 PBS-T로 세척하고 처리된 1차 antibody에 맞는 2차 antibody(PBS-T로 1:1500으로 희석하여 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시킨 후, enhanced chemiluminescence solution(Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 이용하여 특정 단백질의 발현 정도를 분석하였다.

9. 면역형광법

Autophagosome이 형성된 증거로 사용되는 microtubule-associated protein 1 light chain 3(LC3)의 puncta를 측정하기 위해서, 멸균된 multi well plate에 세포를 분주한 뒤에 세포가 완전히 부착하면 길경을 24시간 처리한 후 배지를 깨끗하게 제거하였다. 얼음위에서 각 30분간 PBS에 희석시킨 3.7% formaldehyde로 고정, 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 단백질으로 2시간, 2차 항체로 1시간 각각 반응시키고 PBS-T로 세척하였다. 그 후 DAPI로 핵을 염색한 후 crystal mounting으로 고정하여 형광 현미경을 이용하여 400배의 배율로 각 농도에 따른 LC3 단백질의 발현 양상 변화를 관찰한 다음 Axio Vision 프로그램을 이용하여 사진 촬영을 하였다.

10. Mitochondrial membrane potential(MMP)의 분석

길경 처리에 의한 apoptosis 및 autophagy 유발에서 미토콘드리아의 관련성 여부를 확인하기 위하여 준비된 세포를 모은 다음 500 μ l의 PBS에 부

유시키고 10 μ M의 JC-1 용액을 첨가하여 암상태에서 37 °C에서 20분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 원심분리를 이용하여 상층액을 제거한 다음 차가운 PBS를 첨가하고 35 mm mesh를 이용하여 단일세포로 분리한 후 유세포분석기에 적용시켜 MMP의 변화를 분석하였다.

11. 세포내 Reactive oxygen species(ROS)의 생성 분석

길경 처리에 의한 apoptosis 및 autophagy 유발에서 세포내의 활성산소종(ROS)과의 관련성 여부를 확인하기 위하여 준비된 세포를 모은 다음 500 μ l의 PBS에 부유시키고 10 mM의 H₂DCFDA 용액을 첨가하여 암상태에서 37 °C에서 20분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 원심분리를 이용하여 상층액을 제거한 다음 PBS를 첨가하고 35 mm mesh를 이용하여 단일세포로 분리한 후 유세포분석기에 적용시켜 ROS의 생성 정도를 분석하였다.

12. 통계 처리

모든 실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하였고, SigmaPlot(systat Software Inc., San Joes, CA, UA)을 이용하여 Student *t*-test를 이용하여 통계적 유의성을 얻었다.

III. 결 과

1. 길경에 의한 NCI-H460 폐암 세포 증식 억제 효과

길경의 폐암 세포 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 NCI-H460 세포에 길경을 24 시간동안 0-4 mg/ml의 농도로 처리한 후 MTT assay를 시행하였다. Fig. 1A의 결과에서 보이듯이, 길경 농도가 1 mg/ml에서는 오히려 세포의 증식의 다소 증가하였다가 2 mg/ml에서 세포의 성장이 차차 감소하여 4 mg/ml에서는 40%이하로 감소하였다. 길경 처리에 의한 세포의 밀도 감소가 MTT assay결과와 유사한 정도로 관찰되었다(Fig. 1B).

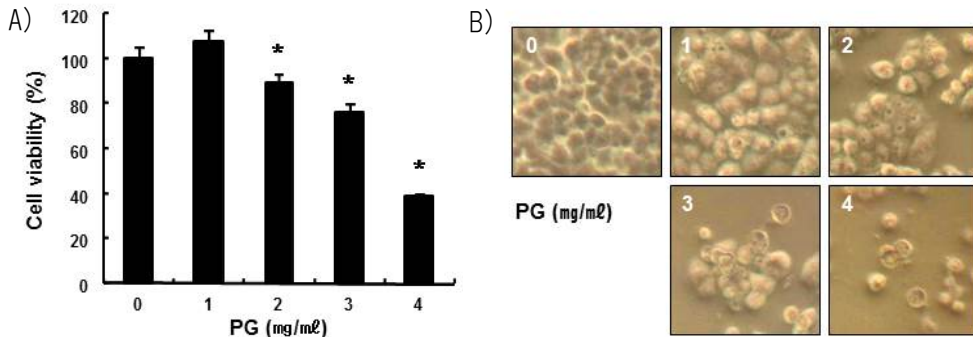


Fig. 1. PG (*Platycodon grandiflorum*) stimulation attenuated the level of cell growth and proliferation in human non-small cell lung carcinoma (NSCLC) NCI-H460 cells.

(A) NCI-H460 cells were seeded at an initial density of 2.8×10^5 cells per ml in 6 well plates. After 24 h, cells were treated with the indicated concentrations of PG for 24 h. Cell viability was measured by MTT assay. The data is reported as a mean \pm S.D. of three independent experiments (*, $p < 0.05$ versus untreated control). (B) Morphologic changes were directly photographed using optical microscope (magnification, $\times 50$).

2. 길경에 의한 autophagy 유도 효과

Fig. 2A와 같이 길경 처리한 경우, 정상 세포군에서는 보이지 않는 세포의 크기가 커지고 다양한 크기의 공포가 생기는 특징적인 세포의 형태 변화가 보여, 이러한 형태 변화가 세포예정사의 한 가지 형태인 autophagy 유도와 관련이 있는 지를 살펴보기 위해 LC3 단백질을 이용한 면역형광법을 실시하였다. Autophagy는 세포질 내 물질들을 재사용 및 분해를 위해 autophagosome을 형성한 후 라이소좀과 결합하여 autolysosome을 만드는 다단계로 진행되며, 각 단계에는 여러 가지 autophagy-related gene (Atg)들이 면밀하게 조화를 이루는 것으로 알려져 있다. 이 과정에 중요한 LC3 단백질은 autophagosome의 막에 부착하고 LC3 I이 LC II로 변환됨으로서 autophagy가 진행되는 것으로 알려져 있다^{13,14}. 2 mg/ml의 길경을 24시간 처리하였을 때 LC3 단백질이 대조군과는 달리 다수의 뚜렷한 punta를 형성하는 것이 관찰되었다(Fig. 2B). 또한 autophagy 관련 단백질인 LC3, beclin-1 및 Atg7의 발현이 증

가되는 것을 Western blotting으로 확인하였다(Fig. 2C).

3. 3-MA를 이용한 초기 autophagy 억제에 의한 세포 증식 억제 효과

길경에 의해 유도된 autophagy와 apoptosis의 상관관계를 조사하기 위해서 autophagosome이 생성되기 전인 autophagy 초기에 작용하는 autophagy 억제제인 3-MA¹⁵를 이용하여, 2 mM의 3-MA 선처리 후 세포 성장 정도의 변화를 MTT assay로 측정하였다. Fig. 3A에서 나타난 바와 같이 길경의 농도를 1 mg/ml까지 처리한 경우에는 3-MA 처리 유무에 따른 유의성이 없었지만, 2 및 3 mg/ml의 길경의 농도에서는 3-MA를 처리한 경우 유의성 있는 세포 성장 억제를 보였다. 이 때, 세포의 형태 변화를 도립 현미경으로 관찰한 결과 3 mg/ml의 길경 처리에 의해 다수 생성되었던 세포 내의 공포가 3-MA 처리에 의해서는 눈에 띄게 감소함을 알 수 있었다(Fig. 3B)

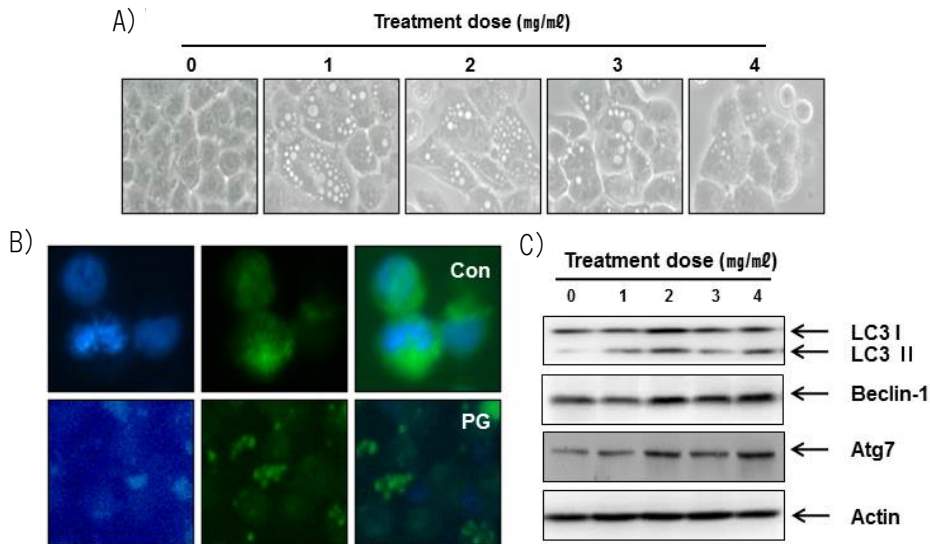


Fig. 2. PG also induces autophagy in NSCLC NCI-H460 cells.

(A) Cells were treated with the indicated concentration of PG for 24 h and then morphologic changes were directly photographed using optical microscope (magnification, $\times 200$). (B) After PG treatment (2 mg/ml) for 24 h, cells were fixed on slides, blocked and sequentially stained with primary and secondary antibody or DAPI. Images of representing distribution of the autophagic marker LC3 were then recorded using an immunofluorescence microscope (magnification, $\times 200$). (C) Immunoblot analysis of LC3, beclin-1 and Atg7 expression levels were noted. Similar results were revealed in at least two independent blots. β -actin was a loading control.

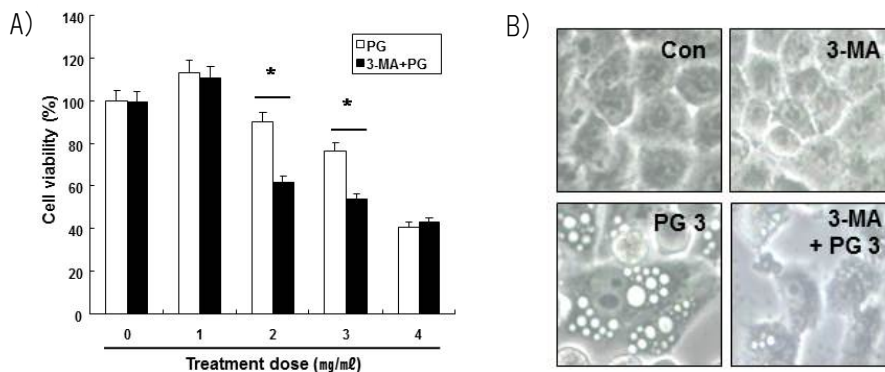


Fig. 3. Attenuation of early phase autophagy enhances the cytotoxicity and inhibits autophagosome formation by PG in NCI-H460 cells.

(A) Cells were pretreated with or without 3-methyladenin (3-MA, known to early phase autophagy inhibitors) for 1 h, and then stimulated in serum including noted doses of PG for additional 24 h. Effect of 3-MA and PG treatment on proliferation and cell viability of NCI-H460 cells assessed by the MTT assay. Bars denote S.D. ($n=3$). *, $p<0.05$, significantly different compared with control. Similar results were observed in replicate experiments. (B) Representative morphologic changes were directly photographed (magnification, $\times 200$).

4. Bafilomycin A1을 이용한 후기 autophagy 억제에 의한 세포 증식 억제 효과

다음으로 autophagosome이 라이소좀과 결합하여 autolysosome이 되는 것을 억제하는 bafilomycin A1을 처리하여 후기 autophagy 과정을 억제하였을 때의 세포 성장에 관한 영향을 조사해 보았다. 이를 위하여 bafilomycin A1을 100 nM의 농도로 1시간 선처리 한 후, 길경을 농도별로 처리하였다. Fig.

4A와 같이 길경의 농도를 2 mg/ml까지 처리하였을 때는 오히려 세포 성장이 약간 촉진되는 것으로 보였으나 유의성은 없었고, 3 mg/ml의 농도부터는 bafilomycin A1을 처리한 군이 대조군보다 유의성 있는 세포 성장 억제를 보였다. 세포의 형태 변화에서도 길경에 의해서 뚜렷하게 보였던 공포가 bafilomycin A1에 처리에 의해서는 감소하면서 세포의 응축이 동반되는 것을 알 수 있었다(Fig. 4B).

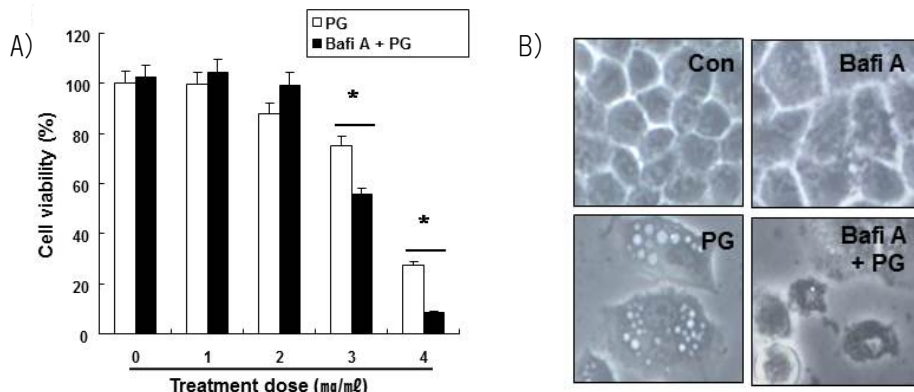


Fig. 4. Reduce of late phase autophagy significantly enhances the cytotoxicity and inhibits autophagosome formation by PG in NCI-H460 cells.

(A) NCI-H460 cells were treated with the noted concentration of PG in the presence or absence of Bafilomycin A1 (known to late phase autophagy inhibitors). Cell viability was measured by MTT assay. Bars denote S.D. (n=3). *, $p < 0.05$, significantly different compared with control. Similar results were observed in replicate experiments. (B) Representative morphologic changes were directly photographed (magnification, $\times 200$).

5. 길경 처리에 의한 apoptosis 유도 효과

Apoptosis는 autophagy와 더불어 세포예정사 (programmed cell death)의 한 종류로 정상적인 발생 과정에서 뿐 아니라 항암제에 의한 암세포의 사멸 기전으로 알려져 있다¹⁶. 따라서 길경의 세포 성장 억제 효과 및 세포사 유발 효과가 apoptosis 유도와 관련이 있는지를 알아보기 위해 유세포분석을 통한 DNA content의 변화와 핵의 형태적 변화 및 apoptosis와 관련이 있는 주요 단백질의 발현 변화를 조사하였다. PI 염색을 후 유세포분석기를 통한 세포주기를 분석한 결과, 길경을 농도별로

24시간 동안 처리하였을 때 2 mg/ml의 농도부터 sub-G1기에 속하는 세포의 빈도가 유의적으로 증가하였다(Fig. 5A and 5B). 또한 DAPI 염색을 통한 핵을 형태를 형광현미경으로 관찰한 결과, Fig. 5C에서 보이는 바와 같이 정상 세포의 핵은 전체적으로 뚜렷하게 염색이 되었으나 길경이 처리된 암세포의 경우 apoptosis가 일어나 세포에서 전형적으로 관찰되는 염색질 응축(chromatin condensation)에 의한 apoptotic body의 출현¹⁷이 증가함을 확인할 수 있었다.

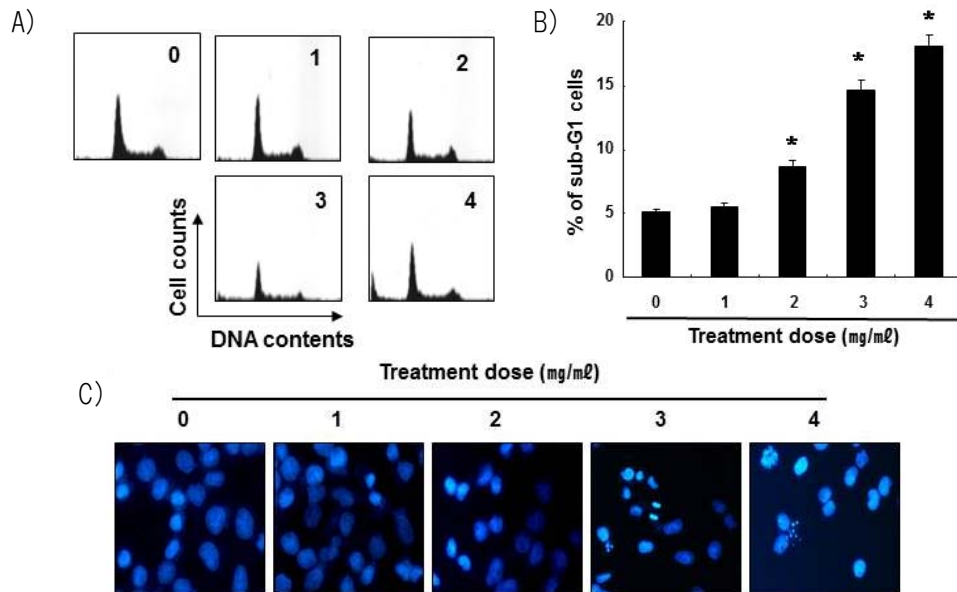


Fig. 5. PG treatment induced apoptosis which was partially dependent on the caspases activities in NCI-H460 cells.

(A) NCI-H460 cells were seeded at an initial density of 2.8×10^5 cells per ml in 6 well plates. After 24 h, cells were treated with the indicated concentrations of PG for 24 h. The cells harvested and flow cytometer analysis was performed for analysis of DNA content. (B) The population of sub-G1 were presented by histogram. Columns represents the mean \pm S.D. of three independent experiments (*, $p < 0.05$ vs. untreated control). (C) Representative fluorescence micrographs were showed staining cells with DAPI. Note the abundance of nuclei changes in PG-stimulated for the noted times (magnification, $\times 200$).

6. 길경 처리에 의한 apoptosis와 연관된 단백질의 발현 변화

길경에 의한 apoptosis 연관 단백질의 발현을 살펴 보기 위해 Western blotting을 시행하였다. 우선 Bcl-2 family 단백질의 발현을 관찰 한 결과, apoptosis를 억제하는 단백질인 Bcl-2 단백질의 발현은 감소하고 apoptosis를 촉진하는 단백질인 Bax 단백질의 발현 증가 및 Bid 단백질의 단편화를 통한 활성 증가가 나타났다. 또한 세포사멸수용체(death receptor, DR)인 DR4와 DR5 단백질의 발현도 확연히 증가함을 알 수 있었다(Fig. 6A). 다음은 많은 apoptosis가 시스테인 단백질분해효소의 무리인 caspase의 단계적

인 활성화에 의해 일어나는 것으로 잘 알려져 있기에¹⁸, 길경에 의한 apoptosis에도 caspase의 활성증가가 관여하는지를 조사하여 보았다. 그림 3B에서 보여 지는 바와 같이 caspase-8의 발현은 큰 변화가 없었으나, caspase-9과 실행 caspase로 알려진 caspase-3의 단백질은 전구체의 형태로 존재하고 있던 것이 길경의 처리에 의해 활성화 되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 caspase의 기질이면서 DNA의 복구에 관여하는 poly ADP ribose polymerase(PARP)의 감소 및 뚜렷한 분절 및 발암유전자인 β -catenin의 발현 감소도 관찰되었다(Fig. 6B).

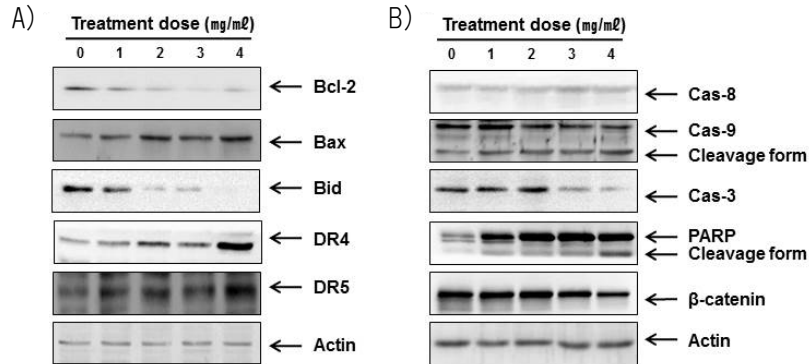


Fig. 6. PG exposure modulates apoptosis-related genes in NSCLC NCI-H460 cells.

(A) NCI-H460 cells were treated by PG up to 4 mg/ml for 24 h. Whole lysates from PG-treated NCI-H460 cells analyzed the expressions of Bcl-2 family proteins and death receptor proteins by Western blotting. β -actin was used to ensure equal protein loading. (B) In the same way as (A), the change of three caspases, PARP and β -catenin were probed. Data are representative of at least two separate experiments.

7. 길경의 미토콘드리아 기능 손상에 미치는 영향
 길경 처리에 따른 세포 증식 억제 효과가 미토콘드리아 기능 손상과 연관성이 있는지를 알아보기 위하여 JC-1 염색법을 이용한 MMP 변화 여부

를 유세포분석기로 조사하여 보았다. Fig. 7에서 보여 지듯이 길경 처리에 의해 MMP가 농도 의존적으로 소실되는 것이 나타났으며, 4 mg/ml 농도의 길경은 약 7배 정도의 MMP 소실을 나타내었다.

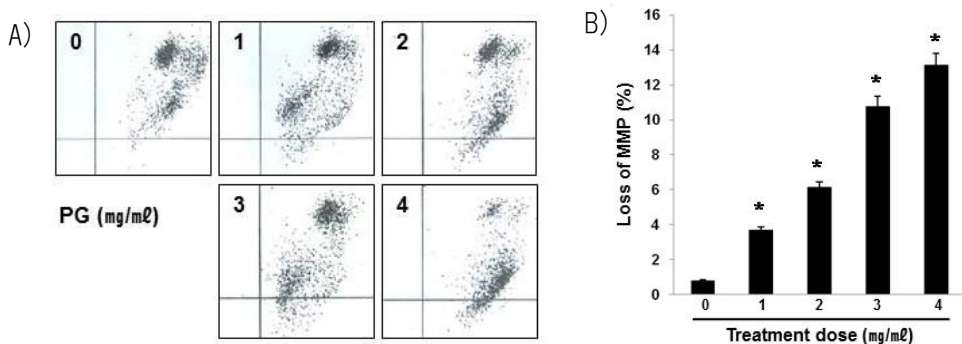


Fig. 7. Loss of MMP was showed in PG stimulated NCI-H460 cells.

(A) Cells were treated with the indicated concentration of PG for 24 h and harvested. Then, mitochondrial dysfunction was detected with lipophilic cationic probe JC-1 by a flow cytometer. (B) Loss of MMP percentage are presented. The significance was determined using Student's *t*-test (*, $p < 0.05$ versus untreated control).

8. 길경의 활성산소종(ROS) 발생에 미치는 영향
 길경의 처리에 의한 NCI-H460 세포의 성장 억제 효과가 ROS의 생성과 연관성이 있는지의 여부

를 조사한 결과, 4 mg/ml의 길경 처리 30분에서 ROS의 생성량이 길경 처리 전에 비하여 3배 이상으로 최고로 증가하였다가 서서히 감소되는 경향

성을 보여 주었다(Fig. 8A). 길경을 농도별로 24시간 처리하였을 때는 1 mg/ml의 농도부터 서서히 증가하였다가 3 mg/ml의 농도에서 약 6배 정도까

지 증가하였다가 다소 감소하는 경향을 보여 주었다(Fig. 8B).

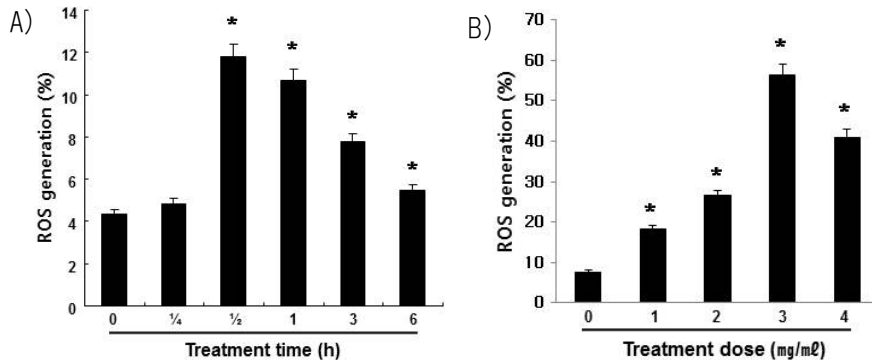


Fig. 8. Reactive oxygen species (ROS) was induced by PG treatment in NCI-H460 cells.

(A) and (B) Cells were seeded and stabilized for 24 h, cells were challenged with 4 mg/ml of PG for the various periods or indicated dose of PG for 24 h, respectively. ROS levels were detected with flow cytometry using H₂DCFDA probes. Bar graphs represent DCF fluorescence intensities. The data is reported as a mean±S.D. of three independent experiments (*, $p < 0.05$ versus untreated control).

IV. 고찰

한의학적으로 폐암은 咳嗽, 胸痛, 咯血, 體重減少, 發熱, 胸悶, 氣短 등의 증상이 나타나며, 발병의 원인으로는 正氣가 傷하여 肺氣가 虛해지면 폐의 고유한 기능인 宣發肅降 機能失調로 熱毒, 濕, 痰 등의 邪氣가 相結하여 오래되면 氣滯, 血滯를 거쳐 結毒 積을 이루어 발생한다. 이 때 환자의 正氣 상태에 따라 病症의 輕重과 豫後가 다르게 나타난다¹⁹. 治療法으로는 환자의 임상 증상에 따라 辨證論治를 행하는데 초기에는 주로 陰虛毒熱, 肺熱傷陰, 肺燥傷絡하므로 子音潤肺抗癌으로 치료를 하며, 중기에는 痰濁壅滯, 氣滯血瘀하므로 化痰消瘀, 行氣活血으로 치료를 하고, 말기에는 正氣虛衰, 毒熱傷肺, 氣陰陽虛하므로 益氣陽陰救肺를 위주로 치료한다²⁰.

본 실험에 사용된 길경은 길경과에 속한 다년생 초본인 도라지(*Platycodon grandiflorum*)의 뿌리를

건조한 것으로 性은 平, 無毒하고, 味는 苦辛하다. 肺로 歸經하여 宣肺利咽, 祛痰排膿, 治咳嗽痰多, 肺癰吐膿, 瘡瘍膿成不潰 등이 主治·效能으로 알려져 있어 폐암을 비롯한 각종 폐의 질환에 유용하게 사용됨을 알 수 있다²¹. 길경과 길경의 주요 구성 성분인 platycodin D나 paltycodin D3 등은 폐의 질환 외에도 항염증 및 항알러지 효과, 면역 증강 효과, 항비만 및 고지혈증 개선 효과, 산화적 간독성에 대한 보호 효과 등의 약리학적 활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다²².

길경의 폐암 세포에서의 항암 작용에 대한 국내 연구는 대부분 apoptosis 유발에 관한 연구가 수행되었는데, A549 사람 폐암세포에서 세포 주기 조절에 연관된 apoptosis 유발¹², A549 세포에서 apoptosis 관련 단백질의 발현 조절¹³, NCI-H460 세포에서의 p53과 pRB의 발현에 미치는 효과¹⁴ 등에 대한 연구가 선행되어 있다. 폐암과 관련된 길경의 국외 연구는 대부분 길경의 사포닌에 대한 연구가 대부

분으로 길경 사포닌의 화학적 폐암 생성 보호²³, 길경 사포닌의 A549 세포에서 상피중간엽세포이행(EMT)을 억제²⁴ 및 길경의 조사포닌의 HT-29 폐암 세포에서 apoptosis를 유발²⁵ 등이 있으며, 길경의 열수 추출물에 대한 연구로는 A549 세포에서 apoptosis 유도 및 telomerase 활성 억제에 관한 연구가 보고되었다. 하지만 국내·외 연구에서 길경 및 길경 사포닌에 의한 autophagy 유도 효과에 대한 보고는 없으며, NCI-H460 세포에서의 길경에 의해 유도된 apoptosis 관련 유전자 발현 조절, 미토콘드리아 기능 저하 유도 및 ROS 생성에 관한 대한 내용은 미미한 실정이다.

본 연구에서 NCI-H460 세포에 길경을 처리하였을 때 autophagy에서 나타나는 특이적인 세포 형태 변화가 관찰되었다. Autophagy는 1963년 de Duve가 그리스어의 'self'와 'eating'을 의미하는 'auto'와 'phagy'로 소개한 용어로 정상적인 세포에서 항상성 유지 및 세포 본연의 성질을 유지하는데 중요한 역할을 할 뿐 아니라 병리적인 과정에도 다양하게 관여하고 있는 것으로 밝혀졌다^{26,27}. Autophagy의 조절 장애는 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병과 같은 퇴행성 뇌질환, 유전성 또는 α -1 항트립신 결핍에 의한 간질환, X-연관 근육병증, 폐폐병과 같은 선천성 근육질환, 선천성 심장질환 및 여러 종류의 암 등 다양한 질병의 발생에 관계가 깊다²⁸. 최근 악성 종양의 발생, 성장 및 치료의 관점에 있어서 중요한 조절자로서의 그 역할에 대해 관심이 증가하고 있다.

Autophagy 중 가장 널리 알려져 있는 macroautophagy는 lysosome에 의한 대량 분해를 위해 세포내 소기관 및 오래되거나 손상된 단백질과 같은 물질을 autophagosome 내로 격리시키는 특징이 있다. Autophagosome은 전자현미경에 의해 이중막의 구조로 되어 있는 것으로 구별되며 lysosome과 결합하면 단일막 구조로 되었다가 산성의 라이소좀 효소에 의해 분해되는데 이러한 대사과정을 autophagic pathway라고 한다¹⁶. 이 과정을 과학적으로 확인하

는 방법으로 가장 널리 사용되는 방법은 초록색 형광 파장을 가진 LC3 단백질이 autophagy에 의해 유도되는 공포(autophagosome 또는 autolysosome)와 결합하여 재배치되는 것을 관찰하는 것이다²⁹.

그러므로 길경에 의해 유도된 세포내 공포가 autophagy 과정과 관련이 있는지를 알아보기 위하여 LC3 단백질을 이용한 면역형광법을 실시하였을 때 길경이 처리되지 않은 대조군에서는 LC3 단백질이 세포질에 고르게 넓게 퍼져있는 반면에 길경을 처리하면 LC3 단백질이 응집되면서 초록색 형광이 밝아지고 이러한 형광이 하나의 세포에서 여러 군데에서 발견되는 것을 확인할 수 있었다. 이와 더불어 LC3 단백질의 변화를 관찰하였을 때 autophagy가 유도되었을 때 나타나는 현상인 LC3의 단백질의 I 형태가 분절되면서 지질화되어 II 형태로 변하는 것도 확인할 수 있었다. 또한 autophagosome의 확장에 관여하는 beclin-1 단백질과 autophagosome이 autolysosome과 결합하는데 작용하는 Atg7 단백질의 발현 증가도 보였다. 이상의 결과들로 보아 길경에 의해 세포내에 형성된 공포는 autophagy 유도에 의한 것임을 확인할 수 있었다.

암에서의 autophagy의 역할이 많은 주목을 받고 있지만 아직까지 autophagy의 역할에 대해 autophagy가 종양의 성장을 촉진하는지 억제하는지에 대한 논란이 분분하다. Autophagy는 스트레스 상황에서 암세포의 성장을 유지시키기도 하고 종양 성장을 억제하기도 하므로, autophagy를 이용한 항암치료라는 소기의 목적을 달성하기 위해서는 상황에 따른 선택적으로 이용하는 것이 필요하다고 알려져 있다³⁰.

따라서 길경에 의해 유도된 autophagy의 NCI-H460 폐암 세포에서의 작용에 대해 알아보기 위해 autophagy를 억제하는 것으로 알려진 두 가지 물질(3-MA와 bafilomycin A1)을 처리하여 세포의 성장 억제 및 형태 변화를 관찰하였다. 3-MA와 bafilomycin A1을 각각 1시간 선처리한 후 길경을 3 mg/ml의 농

도로 처리했을 때 3-MA와 bafilomycin A1을 처리하지 않은 군에 비하여 세포의 공포는 적어지면서 세포 성장 억제가 더욱 뚜렷하게 증가되는 것을 알 수 있었다. 흥미롭게도 bafilomycin A1과 길경을 같이 처리한 경우에 세포가 응축되면서 분절이 일어나는 apoptotic body를 형성하는 것처럼 보이는데 이것이 autophagy 억제에 의한 apoptosis 유도 촉진으로 인한 세포 성장 억제가 작용한 것인지에 대해서는 추후 연구가 더욱 필요하다고 생각된다. 이상의 결과는 길경에 의해 유도된 autophagy는 autophagic cell death가 아닌 세포 보호적인 효과를 갖는 것으로 볼 수 있고 추후 연구가 진행된다면 길경에 의해 유도된 autophagy와 apoptosis의 상관관계를 밝힐 수 있는 단초가 될 수 있을 것으로 보인다.

다음으로 길경에 의해 나타난 세포 성장 억제와 apoptosis의 유도 여부 관계를 조사한 결과 sub-G1 주기의 세포 수 증가, 핵의 단편화, apoptosis 억제 단백질인 Bcl-2 단백질의 발현 감소, apoptosis 촉진 단백질인 Bax와 Bid의 활성화 증가, death receptors의 발현 증가가 관찰되어 길경이 NCI-H460 세포에서 apoptosis도 유발함을 알 수 있었다. Caspase는 cysteine-related protease로 DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절하는 것으로 알려져 있는데³¹, 길경에 의한 apoptosis 유발에서는 내인성 기전에 작용하는 caspase-8의 변화는 뚜렷하지 않았으나, 외인성 기전에 작용하는 caspase-9의 활성화형태(cleavage form)가 증가하였고, 실행 caspase인 caspase-3의 profrom이 확연히 감소하는 형태를 보였다. PARP는 DNA repair나 genomic stability의 유지에 매우 중요한 역할을 하는데 apoptosis의 과정 중 caspase의 활성화에 의해 단백질의 분해가 일어나면 PARP의 기능 상실로 인하여 정상적인 DNA repair 과정이 억제되어 진다¹¹. 한편 β -catenin은 세포내 골격의 유지와 다양한 부착성 세포의 전사 조절에 중요하며 세포 유착과 관계된 apoptosis 조절과 연관성을 가지고 있으며, β -catenin 역시

apoptosis가 일어난 세포에서 caspase의 활성화에 의하여 분해되는 단백질이다³¹. Fig. 6에서 보이는 바와 같이 길경 처리에 의해서 caspase-3의 활성화 증가와 기질인 PARP 및 β -catenin 단백질의 분해가 동반되는 것을 보였는데 이는 기존의 길경에 apoptosis 유도에 관한 다른 선행 연구 결과와 유사하였다.

다음으로 길경에 의해 유도된 세포 성장 억제 기전에 대한 연구를 위해 미토콘드리아와의 관련성에 대해 조사하였다. 우선 미토콘드리아 막의 손상 정도를 조사하였는데, Fig. 7에서 나타난 바와 같이 미토콘드리아의 탈분극(mitochondrial depolarization)에 의한 MMP 소실이 나타났다. 또한 최근 많은 연구에서 손상된 미토콘드리아에서 생성된 ROS가 암세포의 증식 조절 신호계에 영향을 미쳐 세포 성장을 억제하기도 하고 촉진하기도 하는 중요한 매개자로 보고하고 있다. 또한 ROS의 발생은 Bax 단백질을 미토콘드리아로 이동시키고 cytochrome c를 분비하는 역할을 하면서 autophagy 및 apoptosis 유도에 다 관여하는 것으로 알려져 있다³². Fig. 8의 결과와 같이 길경은 ROS의 발생을 촉진시키는 작용을 하기는 하나, 이러한 ROS 발생이 autophagy 및 apoptosis 유도에 직접적인 관련이 있는지 어느 세포사를 더욱 촉진하는지에 대한 연구는 추가되어야 할 것으로 보인다.

이상의 결과로 길경은 apoptosis를 유발하기도 하지만 소량의 길경을 처리하기만 해도 autophagy 공포가 뚜렷하게 보이는 것으로 보아 autophagy를 강력하게 유발하는 한약재로 보인다. Autophagy의 과정이 손상당하거나 잘못된 물질을 제거하기 위한 과정이라는 것과 길경이 祛痰排膿, 宣肺利咽 등을 주요 效能으로 가지는 것을 생각해 보면, 길경에 의해 발생된 autophagy는 病的인 痰을 제거하는 역할을 할 수 있을 것으로 보인다. 또한 길경은 세포호흡을 주관하는 미토콘드리아와도 관련성이 있어 MMP loss와 ROS 발생을 촉진시키는 결과를 나타냈는데, 이는 길경의 歸經이 肺인 것과도 관계가 있는 것으로 보인다. 한의학적인 길경의 특성을

본 실험 결과와 연결시키기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 보이나 길경이 한약재의 autophagy 유도에 관한 실험적 연구에 선도적인 역할을 할 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

V. 결 론

길경에 의해 발생하는 autophagy와 apoptosis에 대한 추가적인 기전 연구가 필요하겠지만 본 연구의 결과는 길경이 autophagy와 apoptosis를 동시에 유도함으로써 NCI-H460 폐암 세포의 증식을 억제시킬 수 있다는 것을 보여준다. 따라서 이 결과는 길경의 새로운 폐암 치료제로써의 가능성을 보인 기초적인 증거로써 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

1. 길경은 농도의존적으로 NCI-H460 인체 비소세포폐암 세포의 증식을 억제하였다.
2. 길경은 autophagy 과정에서 일어나는 세포내 공포형성, LC3 단백질의 축적, LC3 단백질의 형태변환, beclin-1 단백질의 활성화 증가를 유도하였다.
3. Autophagy를 억제하는 시약인 3-MA와 bafilomycin A1을 처리한 경우 길경에 의해 유도되었던 autophagy 공포는 줄어들면서, 세포의 증식 억제가 더욱 뚜렷해지는 것을 알 수 있었다. 이는 길경에 의해 유발된 autophagy가 세포보호적인 역할을 하는 것으로 볼 수 있다.
4. 길경은 또한 apoptosis를 유발하였으며 Bcl-2 무리 단백질의 발현 조절, DR의 발현 증가 및 caspase의 활성화 증가가 동반되었다.
5. 길경 처리는 미토콘드리아와 관련하여 MMP loss를 촉진하며 ROS를 발생시켰다.

감사의 글

이 논문은 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No.

2013R1A1A2065537)

참고문헌

1. Jin CY, Yu HY, Park C, Han MH, Hong SH, Kim KS, et al., Oleifolioside B-mediated autophagy promotes apoptosis in A549 human non-small cell lung cancer cells. *Int J Oncol* 2013;43(6): 1943-50.
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012;62(1): 10-29.
3. Gridelli C, Maione P, Ferrara ML, Rossi A. Cetuximab and other anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in the treatment of non-small cell lung cancer. *Oncologist* 2009; 14(6):601-11.
4. Kapp FG, Sommer A, Kiefer T, Dölken G, Haendler B. 5-alpha-reductase type I (SRD5A1) is up-regulated in non-small cell lung cancer but does not impact proliferation, cell cycle distribution or apoptosis. *Cancer Cell Int* 2012;12(1):1.
5. 김진영, 김현중, 정광식, 박 철, 최영현, 감철우, 등. A539 및 NCI-H460 인체 폐암세포의 증식 및 apoptosis 유도에 미치는 가미삼기보폐탕의 영향. *대한한방내과학회지* 2008;29(1):130-48.
6. 박재석 김희철. 丹蔘 추출액이 Urethane으로 유발된 생쥐의 폐암에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 2008;29(3):595-607.
7. 손지영, 최해윤, 김종대. 歸脾湯이 비소세포 폐암 세포(NCI-H520) 이식 마우스에서 항암 및 면역 활성화에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 2012; 33(4):387-404.
8. 이승연, 홍재의, 이시형, 신조영, 노승석. 폐암세포주 H460에 대한 보중익기탕의 세포고사효과 및 기전연구. *대한한방내과학회지* 2004;25(4): 274-88.

9. 유병길, 김명동, 황태준, 유영민, 이선구. A549 폐암 세포주에 대한 정력대조사폐탕(葶藶大棗瀉肺湯) 및 정력탕(葶藶湯)의 Apoptosis 효과. 동의생리병리학회지 2005;19(5):1204-12.
10. 강락원, 이재훈, 감철우, 최병태, 최영현, 박동일, 길경 수용액 추출물에 의한 인체 폐암세포의 성장억제 기전 연구. 동의생리병리학회지 2003;17(1):183-9.
11. 이성열, 김원일, 박동일. 桔梗이 人體 肺癌細胞에 미치는 영향에 대한 실험적 연구. 동의생리병리학회지 2003;17(4):1019-30.
12. 박봉규, 감철우, 허태율, 박동일. 길경 수용액 추출물에 의한 NCI-H460 인체 폐암세포의 p53 및 pRB의 발현에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 2006;20(6):1530-7.
13. Kimmelman AC. The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes Dev* 2011;25(19):1999-2010.
14. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 2010;140(3):313-26.
15. Xi G, Hu X, Wu B, Jiang H, Young CY, Pang Y, Yuan H. Autophagy inhibition promotes paclitaxel-induced apoptosis in cancer cells. *Cancer Lett* 2011;307(2):141-8.
16. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 2009;16(1):3-11.
17. Kim YA, Lim SY, Rhee SH, Park KY, Lee WH, Choi YH. Induction of Cdk inhibitor p21 and inhibition of cyclooxygenase-2 by resveratrol in human lung carcinoma A549 cells. *Journal of Life Science* 2004;14(5):800-8.
18. Lee HH, Kim SO, Kim GY, Moon SK, Kim WJ, Jeong YK, et al. Involvement of autophagy in cordycepin-induced apoptosis in human prostate carcinoma LNCaP cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 2014;38(1):239-50.
19. 전종철, 강필구, 박동일, 최원철. 수종의 한약처방이 폐암세포에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2000;21(4):621-31.
20. 黃忠淵, 肺癌의 東西醫結合治療에 關한 文獻의 考察. 대한한의학회지 1995;16(2):177-94.
21. 한의과대학 본초학 편찬위원회. 本草學. 서울: 圖書出版 永林社; 2000, p. 460-1.
22. 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.
23. Lee KJ, Shin DW, Chung YC, Jeong HG. Chemopreventive effect of saponins derived from roots of *Platycodon grandiflorum* on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butane-induced lung tumorigenesis in A/J mice. *Arch Pharm Res* 2006;29(8):651-6.
24. Choi JH, Hwang YP, Kim HG, Khanal T, Do MT, Jin SW, Han HJ, et al. Saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum* suppresses TGFβ1-induced epithelial-mesenchymal transition via repression of PI3K/Akt, ERK1/2 and Smad2/3 pathway in human lung carcinoma A549 cells. *Nutr Cancer* 2014;66(1):140-51.
25. Kim JY, Park KW, Moon KD, Lee MK, Choi J, Yee ST, et al. Induction of apoptosis in HT-29 colon cancer cells by crude saponin from *Platycodi Radix*. *Food Chem Toxicol* 2008;46(12):3753-8.
26. Hong SH, Choi YH. The Dynamic Roles of Autophagy in Cancer. *Cancer Prevention Research* 2011;16(4):281-7.
27. Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* 2010;12:814-22.

28. Levine B and Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008;132:27-42.
29. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 2012;8(4):445-544.
30. Rosenfeldt MT, Ryan KM. The role of autophagy in tumour development and cancer therapy. *Expert Rev Mol Med* 2009;11:e36.
31. Fukuda, K. Apoptosis-associated cleavage of β -catenin in human colon cancer and rat hepatoma cells. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:519-29.
32. Zhan Y, Gong K, Chen C, Wang H, Li W. P38 MAP kinase functions as a switch in MS-275-induced reactive oxygen species-dependent autophagy and apoptosis in human colon cancer cells. *Free Radic Biol Med* 2012;53(3):532-43.