

2013년 2월

박사학위 논문

A549 세포에서
5-nitro-5'-hydroxy-indirubinoxime
의 apoptosis과 autophagy 유도
효과

조선대학교 대학원

치의생명공학과

백종필

A549 세포에서
5-nitro-5'-hydroxy-indirubinoxime
의 apoptosis과 autophagy 유도
효과

Induction of apoptosis and autophagy by
5-nitro-5'-hydroxy-indirubinoxime in human lung cancer A549
cells

2013년 02월 25일

조선대학교 대학원

치의생명공학과

백 종 필

A549 세포에서
5-nitro-5'-hydroxy-indirubinoxime
의 apoptosis과 autophagy 유도
효과

지도교수 안 상 건

이 논문을 치의학박사 학위신청 논문으로 제출함






2012년 10월

조선대학교 대학원

치의생명공학과

백 종 필

백종필의 박사학위 논문을 인준함

위원장	광주과학기술원	교수	김재일	 (인)
위원	원광대학교	교수	윤정훈	 (인)
위원	서울대학교	교수	강건욱	 (인)
위원	원광대학교	교수	이준	 (인)
위원	조선대학교	교수	안상건	 (인)

2012년 12월

조선대학교 대학원

목 차

목 차	i
도목차	iii
ABSTRACT	
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 재료 및 항체	4
2. 세포 배양	4
3. MTT 분석	4
4. Flow cytometry를 이용한 세포주기 분석	5
5. Flow cytometry를 이용한 세포 사멸 분석	5
6. DAPI 염색	5
7. Western blot 분석	5
8. Monodansylcadaverine (MDC) 염색	6
9. Acidic vesicular organelles (AVOs) 측정	6
10. 자료 분석	6
III. 결과	8
1. 5-OH-NIO가 A549 폐암 세포 증식에 미치는 효과	8
2. 5-OH-NIO가 A549 폐암 세포 주기에 미치는 효과	11
3. A549세포에서 5-OH-NIO에 의한 세포사멸 조사 및 그 기전 연구	15
4. A549세포에서 5-OH-NIO에 의한 세포자식작용 유도효과	22

5. A549세포에서 세포 자식작용의 역할	27
IV. 고찰	31
V. 참고문헌	34

도목차

Figure 1. The effect of 5-OH-NIO on cell proliferation measured by MTT assay	9
Figure 2. Morphological changes by 5-OH-NIO	10
Figure 3. Cell cycle analysis by flow cytometry	12
Figure 4. G2/M phase cell cycle regulators expression in A549 cells ...	14
Figure 5. Apoptotic proportion by flow cytometry	16
Figure 6. Apoptosis analysis of 5-OH-NIO treated cells by DAPI stain	19
Figure 7. Apoptosis regulators expression in A549 cells	21
Figure 8. Autophagy regulators expression in A549 cells	23
Figure 9. Autophagy analysis of 5-OH-NIO treated cells by Monodansylcadaverine (MDC) staining	24
Figure 10. Induction of autophagy by 5-OH-NIO using acidic vesicular organelles (AVOs) in A549 cells	25

Figure 11. The effect of 5-OH-NIO and chloroquine (CQ) on the proliferation measured by MTT assay	28
Figure 12. Inhibition of autophagy by chloroquine (CQ) in 5-OH-NIO-treated A549 cells	29

ABSTRACT

Induction of apoptosis and autophagy by 5-nitro-5'-hydroxy-indirubinoxime in human lung cancer A549 cells

Jong Pil Baek

Advisor : Prof. Sang-Gun Ahn, Ph.D.

Department of Dental Bioengineering,

Graduate School of Chosun University

BACKGROUND: Our group recently demonstrated that 5-nitro-5'-hydroxy-indirubin-3'-oxime (5-OH-NIO), a novel Indirubin-3'-oxime derivative as potent CDK inhibitors. In this study, the effect of 5-OH-NIO was examined in A549 human non-small lung cancer cells.

METHODS: Cell viability was examined by MTT assay. Cell cycle were examined by Flow cytometry and apoptosis was measured using annexin V/PI staining and immunoblot. Autophagy was characterized by the increase in LC3B-II and the formation of autophagosome and acidic vesicular organelles (AVOs).

RESULTS: 5-OH-NIO inhibited the proliferation of A549 cells in a

dose-dependent manner. Cell cycle analysis showed the G2/M arrest in 5-OH-NIO-treated cells. 5-OH-NIO increased the number of apoptotic cells by intrinsic apoptotic pathway. 5-OH-NIO also induced autophagy in A549 cells evidenced by the increased levels of LC3 type II expression and the accumulation of AVOs. The inhibition of autophagy enhanced 5-OH-NIO-mediated apoptosis.

CONCLUSIONS: These results suggest that 5-OH-NIO exerts anti-tumor effects by inducing apoptosis and autophagy, and autophagy inhibition enhances 5-OH-NIO-mediated apoptosis in A549 cells.

I. 서론

폐암은 현재 남성과 여성 암 사망률의 주요 원인으로 알려져 있고, 미국에서는 년 간 165,000명 이상 폐암에 걸린다고 알려져 있다. 대략 폐암의 85 %가 non-small cell lung cancer (NSCLC)로 진단되고 있고, 치료받지 않은 NSCLC 환자의 1년 생존율은 약 10-15 %로 알려져 있다. 폐암은 조기 발견과 치료가 환자의 예후를 향상시킬 수 있으나, 폐암 환자의 15 %정도만 초기 단계에서 진단이 가능하다 (1-3). NSCLC를 포함한 대부분의 환자는 수술이나 방사선 치료법으로 제한된 방법을 사용하고 있다. 그럼에도 불구하고, NSCLC 환자의 80 % 이상은 질병 기간 동안 화학 요법을 병행하는 경우가 많은데 Cisplatin을 포함한 여러 항암 치료 방법은 20년 이상 NSCLC의 치료 방법으로 이용되고 있다 (3-5). 암 치료를 위해 현재 사용할 수 있는 가장 중요한 화학요법치료 물질 중 하나로 알려진 Cisplatin의 경우도 NSCLC 환자에서 생존 속도를 향상뿐 아니라 증상을 완화시킨다고 알려져 있다 (5-9). 불행히도, 가장 큰 효능에도 불구하고, Cisplatin은 여러 부작용과 약물에 대한 내성이 생기는 점을 포함한 여러 문제점을 가지고 있다 (5, 8, 10-12). 이러한 문제점을 해결하기 위해서 독성이 없는 새로운 약물에 대한 연구 또는 NSCLC의 치료에 필요한 우수한 약물의 개발이 필요한 실정이다.

여러 세포 독성 물질과 DNA를 손상시키는 물질은 세포 주기 중 G1, S 또는 G2/M기의 축적을 유도하고, apoptotic cell death를 유도한다 (13-15). 이러한 과정은 cyclin 단백질의 조절에 관여하는 cyclin-dependent protein kinases (CDKs)의 복합적인 활동으로 조절된다 (16, 17). 세포 주기의 G2/M기로 전사될 때, cyclin A/B와 함께 CDK1/2의 복합체의 활성화가 필요하다 (18, 19). 게다가, caspase의 활성화는 inhibitor of apoptosis (IAP) 또는 Bcl-2 families를 포함한 여러 세포내 단백질을 조절함으로써 세포사멸을 유

도된다 (20-22). 이전의 연구에서 Bax, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-2, Bid와 같은 Bcl-1 family 구성 요소가 mitochondrial membrane에 존재하고, apoptotic cell death로 유도하는 caspase의 활성화를 개시한다는 보고가 있다 (21-23). 그러므로, 여러 메카니즘을 통한 세포 성장과 생존에서 CDKs는 중요한 작용을 하며, 이러한 CDK 활성도의 조절이 중요하다. Cyclin D와 E와 같은 cyclin의 비정상적으로 높은 발현이나 유전자 변이를 통한 CDKs의 조절이 여러 종양에서 관찰되고 있다 (24). 예를 들어, CDK2/cyclin E 복합체의 발현과 촉매활동이 대장, 난소, 유방, 전립선 암에서 증가하고, 유방암 환자에서 낮은 생존률을 나타내는 종양에서 cyclin E의 발현이 증가한다는 보고가 있고, 비정상적인 CDK1/cyclin B 복합체의 발현은 전립선 암과 폐암환자에서 관찰되었다 (25-28).

세포 예정 사멸은 다시 세포사멸과 세포자식작용으로 세분하는데, 세포사멸은 세포사를 억제하는 단백질, 혹은 반대로 세포사를 유발하는 단백질들의 활성도 조합으로 결정이 되고 (29), caspase 효소에 의해 세포사멸을 유도한다고 알려져 있다. 세포사멸의 외형적 특징으로는 초기 염색사 응축과 더불어 긴장한 세포의 경우 세포막 안쪽으로 노출되는 phosphatidylserine (PS) 막지질이 세포막 바깥쪽으로 노출이 된다. 또한 세포막의 blebbing 현상과 함께 DNase 활성에 의해 조각난 DNA와 세포질 일부를 포함하는 vesicle (apoptotic body)로 분열된다. Apoptotic body는 주변의 phagocyte 면역 세포에 의해 제거되어 세포 내 항원 물질이 세포 밖으로 새어나오지 않기 때문에 염증반응에 의한 주변 세포의 피해를 최소화 시킨다 (30). 세포자식작용은 lipid bilayer로 구성된 membranous vacuole이 제거 대상의 세포질과 함께 미토콘드리아나 소포체, 골지체와 같은 세포 소기관을 둘러싸으로써 autophagosome을 형성하고 연이어 lysosome과 합쳐져 autolysosome을 형성한다. Autolysosome에 의해 둘러싸인 내부 물질은 lysosome에 존재하는 산

성 가수분해 효소에 의하여 분해되고 부산물은 세포 구성 물질로 재사용된다. 결국 불필요하게 소모되는 세포 영양분을 세포 구성 성분의 합성과 분해, recycling을 통해 줄이고 이를 다시 세포 성장에 필요한 process에 재배치시키는 역할을 한다 (31).

이전의 연구에서 당귀 룡휘 완(Danggui Longhui Wan)의 성분인 인디루빈(indirubin) 유도체가 암세포를 억제한다는 결과가 발표되었다. 이러한 인디루빈은 CDK에 ATP가 접근하지 못하도록 한다 (32). ATP는 대부분의 생화학 반응을 유도하는 에너지원으로 ATP가 없으면 CDK 효소는 작용하지 않아서, 세포 분열은 중단되게 된다. 암 세포에서는 정상 세포에 비해 세포 분열이 많이 일어나기 때문에 인디루빈이 항암제로 이용되고 있다. 그러나 인디루빈은 지용성이고 체내에 흡수가 되지 않기 때문에 이러한 단점을 보완한 인디루빈 유도체의 연구가 필요하다. 본 연구에서, 새로운 인디루빈 유도체인 5-nitro-5'-hydroxy-indirubinoxime (5-OH-NIO)를 합성하여 실험에 사용하였다.

본 연구를 통해 CDK 억제효과가 있는 새로운 인디루빈 유도체인 5-OH-NIO가 폐암 A549 세포의 증식 및 세포 주기에 미치는 영향과, 세포사멸 뿐만 아니라 세포자식작용에 어떤 영향을 미치는지 조사하였고, 이를 통해 폐암 치료의 새로운 치료제로의 가능성을 제시하고자 한다.

II. 실험 재료 및 방법

1) 재료 및 항체

5-OH-NIO은 애니젠(주)에서 합성하여 실험에 사용하였다. 일차 항체는 Cyclin B1, pro-caspase 3, Cleaved caspase 7/9, Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), LC3B, Phospho-mTOR, Beclin-1, ATG 3/5/7/12 (Cell signaling, Danvers, MA)와 Bax, Bcl-2, Cytochrome c, Actin (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)을 사용하였다.

2) 세포배양

사람 폐암 세포주인 A549 세포는 10 % fetal bovine serum, 1 x MEM non-essential amino acid, 100 U/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin이 포함된 DMEM에서 37 °C, 5 % CO₂의 조건하에 계대 배양하였다.

3) MTT 분석

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 시약은 최종 농도 5 mg/ml가 되도록 PBS에 녹인 후 빛을 차단하고 4 °C에 보관하였다. A549 세포를 계수하여 12 well 배양접시에 1×10^5 개씩 분주하여 배양 후, 5-OH-NIO를 처리하였다. 48 시간 후, MTT 용액을 처리하여 37 °C에서 3 시간동안 반응시켰다. 세포 배양액을 제거한 후, acid-isopropanol (0.04 mol/L HCL in isopropanol)에 dark blue crystals을 용해시켜 Microplate Autoreader ELISA를 사용하여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

4) Flow cytometry를 이용한 세포주기 분석

A549 세포를 60 mm 배양접시에 1×10^5 /mL 개의 세포수가 되도록 분주하여 배양한 후 5-OH-NIO를 농도별로 48 시간 동안 처리하였다. 세포를 모아 70 % 에탄올에 고정하여 PI (50 μ g/mL)로 염색 후, Cell Lab QuantaTM SC flow cytometer (Beckman Coulter Inc, Miami, FL)를 이용하여 측정하였다.

5) Flow cytometry를 이용한 세포 사멸 분석

A549 세포에 5-OH-NIO를 농도별로 처리하고 48 시간 배양 후, 세포를 배양액과 함께 모아 Alexa Fluor 488 Annexin V 와 propidium iodide (Vybrant Apoptosis Assay kit, Molecular Probes)로 염색 후, Cell Lab QuantaTM SC flow cytometer (Beckman Coulter Inc, Miami, FL)를 이용하여 측정하였다.

6) DAPI 염색

A549 세포를 chamber slide에 1×10^5 개/well로 계수하여 배양 후, 5-OH-NIO를 농도별로 처리하고 48 시간 배양하였다. 세포를 PBS로 세척하여 4 % paraformaldehyde에 고정하고, DAPI solution (2 μ g/ml)을 15 분 동안 반응시킨 후, Axiovert S 100 형광현미경 (Carl Zeiss, Inc., USA)으로 확인하였다.

7) Western blot 분석

Lysis buffer (1 % Triton X-100, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA와 protease inhibitors)를 사용하여 단백질을 추출하여 정량 후, 20-50 µg의 단백질을 7.5-12 % SDS-PAGE gel을 사용하여 전기영동 하여, PVDF membrane에 transfer 하였다. 5 % skim milk에 2시간 동안 Blocking하고, 일차항체 (1:1000)와 overnight으로 4 °C에서 반응시켰다. TBST buffer로 세척 후, 실온에서 1 시간동안 이차 항체 (1:5000)와 반응시켰다. 최종적으로 WEST ZOL PLUS reagent를 사용하여 LAS-1000 (Fuji film, Japan)으로 단백질 발현 정도를 확인하였다.

8) Monodansylcadaverine (MDC) 염색

MDC (Sigma)를 사용하여 autophagic vacuoles을 측정하였다. 세포에 0.05 mM의 MDC 용액을 처리하여 37 °C에서 10분간 배양하였고, 세포를 PBS로 세척 후, Axiovert S 100 형광현미경 (Carl Zeiss, Inc., USA)으로 확인하였다.

9) Acidic vesicular organelles (AVOs) 측정

Autophagy가 유도되면 AVO 형성 및 증가가 나타난다. AVOs의 측정은 acridine orange 시약을 사용하여 세포를 염색하여 관찰 가능하다 (33). Acridine orange 염색된 세포에서 세포질은 밝은 녹색의 형광을 띠는 반면, AVO 형성으로 산성화 되면 밝은 붉은 색의 형광을 띤다. 1 µg/mL의 acridine orange (Sigma)용액으로 15분 염색하였다. PBS로 세척 후 형광현미경으로 관찰하였고, FACScan flow cytometer (Beckman Coulter Inc.)와 CellQuest software (Beckman Coulter Inc.)를 사용하여 분석하였다.

10) 자료 분석

모든 통계학적 분석은 Microsoft Excel을 사용하였다. 각각 시료에 대한 t-test를 사용하여 유의성 검정을 한 결과 p-value <0.05, 0.01, 0.001로 통계적으로 유의하게 정의하였다.

III. 결과

1) 5-OH-NIO가 A549 폐암 세포 증식에 미치는 효과

세포 증식 억제에 대한 5-OH-NIO의 효과를 조사하기 위해 MTT 실험법을 이용하여 세포의 생존율을 조사하였다. 그 결과, 5-OH-NIO를 처리한 A549 폐암 세포에서 세포 손상이 관찰되었고, 농도와 시간 의존적으로 세포의 성장이 저해됨을 확인하였다. 기존에 가장 효과가 높은 것으로 알려져 있는 indirubin-3-monoxime과 비교 시 현저히 5-OH-NIO가 A549 폐암 세포주의 증식을 더 강하게 억제 시키는 것을 확인하였다 (Fig. 1). 또한, A549 폐암 세포에서 5-OH-NIO를 처리하고 48 시간 후에 세포 모양 변화를 관찰한 결과, 대조군에 비해 5-OH-NIO 농도 의존적으로 세포가 다각형 모양 또는 뾰족한 모양으로 변형됨을 확인하였다 (Fig 2).

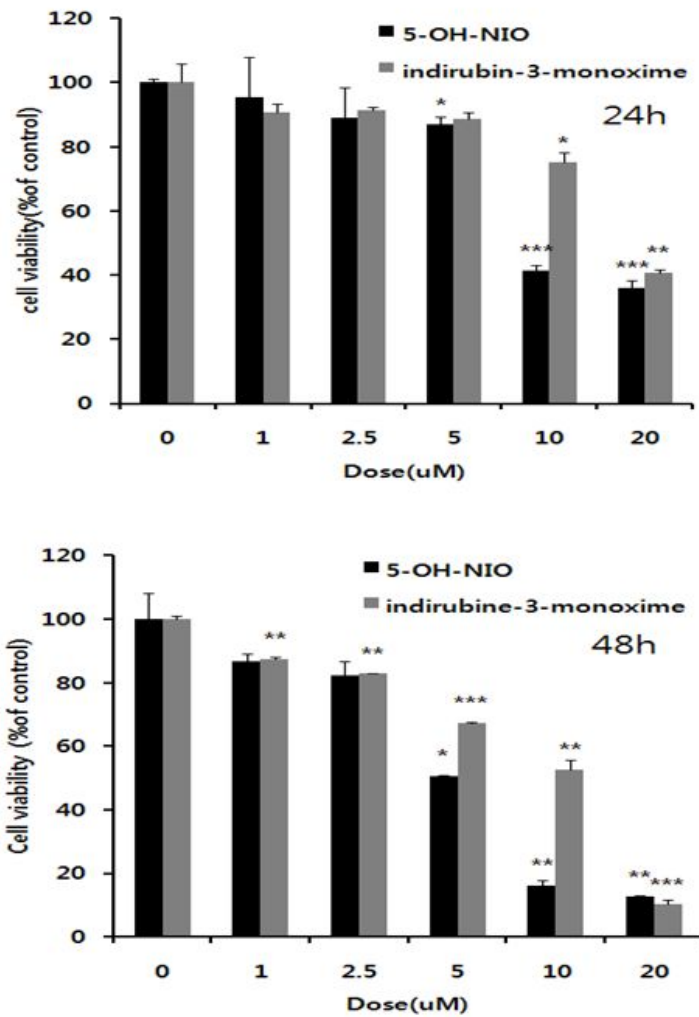


Figure 1. The effect of 5-OH-NIO on cell proliferation measured by MTT assay.

A549 cells were incubated with 1, 2.5, 5, 10, 20 μ M of 5-OH-NIO for 24 or 48 h. Cell proliferation was analyzed by MTT assay.

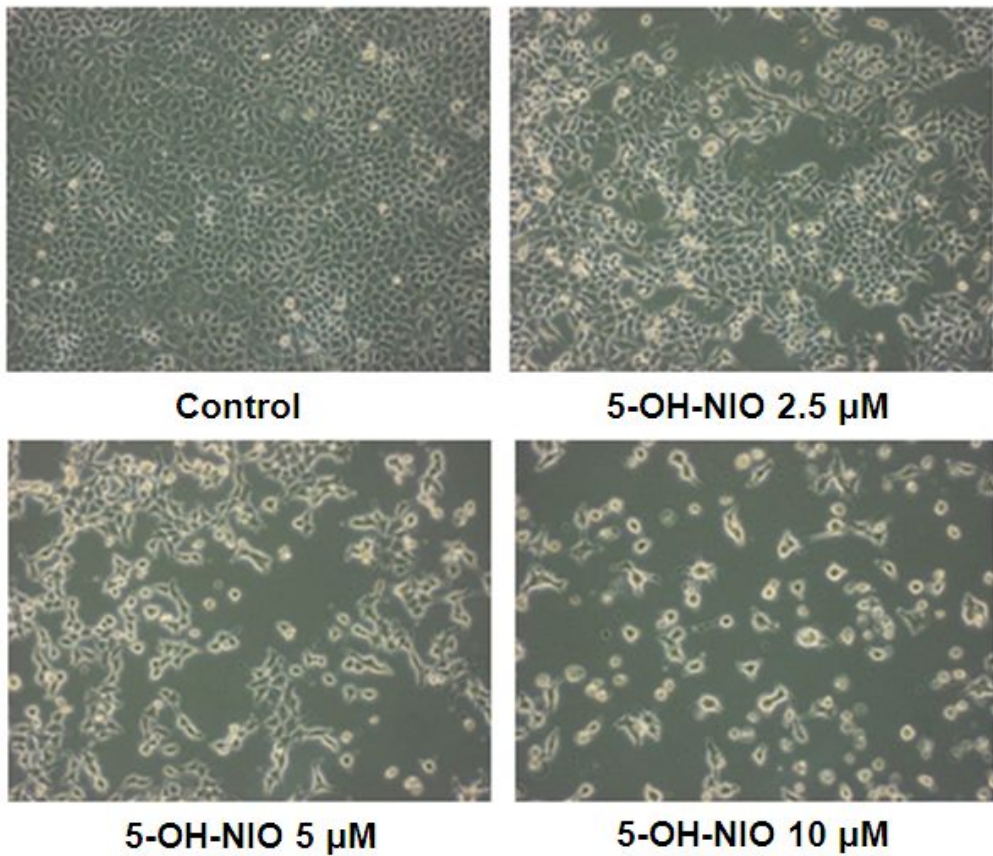


Figure 2. Morphological changes by 5-OH-NIO.

A549 cells were treated for 48 h with the indicated concentrations of 5-OH-NIO. The magnification is 100X.

2) 5-OH-NIO가 A549 폐암 세포 주기에 미치는 효과

5-OH-NIO에 의한 세포주기 조절 효과를 확인하기 위해 flow cytometry 분석법으로 세포 주기를 조사하였다. 그 결과, 5-OH-NIO 처리한 군에서 G1기가 감소하면서 G2/M기가 증가하는 것이 관찰되었다 (Fig. 3A, B). 또한 western blot을 통해 G2/M기에 관여하는 CDK2, cyclin B1과 phospho-cdc2의 발현이 현저히 감소하는 것으로 나타나 5-OH-NIO 처리시 A549 세포에서 G2/M기의 축적이 유도됨을 확인하였다 (Fig. 4). 이 결과를 통해 5-OH-NIO가 cyclin B1의 억제를 통해 폐암 A549 세포의 G2/M기의 축적 효과를 확인하였다.

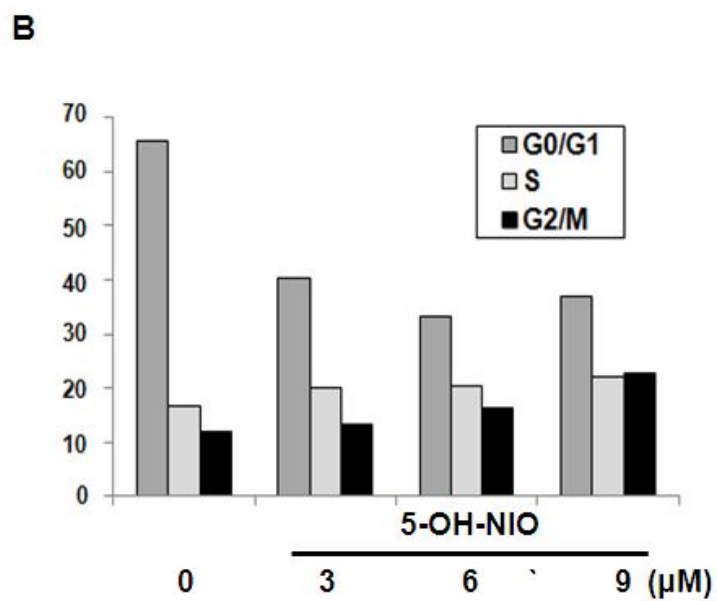
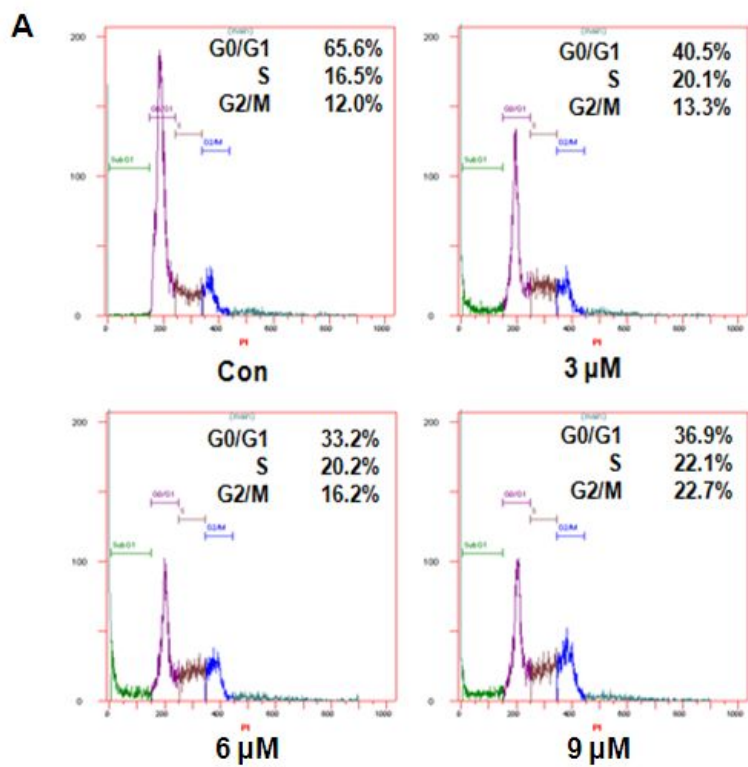


Figure 3. Cell cycle analysis by flow cytometry.

(A) A549 cells cycle arrest induced by 5-OH-NIO (3, 6, 9 μ M) was measured by PI stain. (B) The graph represents the relative number of cells from three separated experiments.

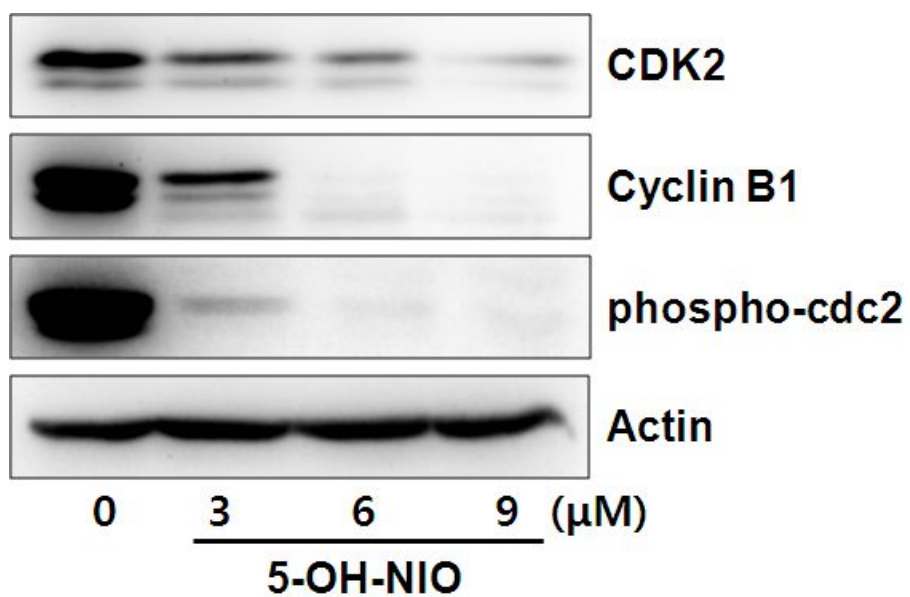


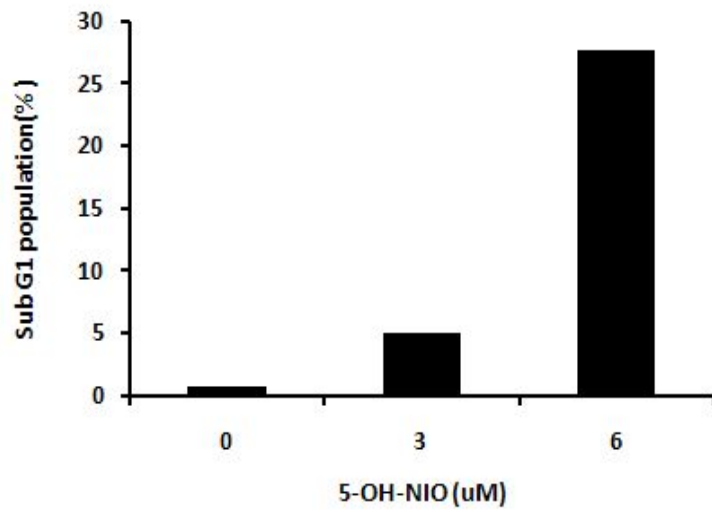
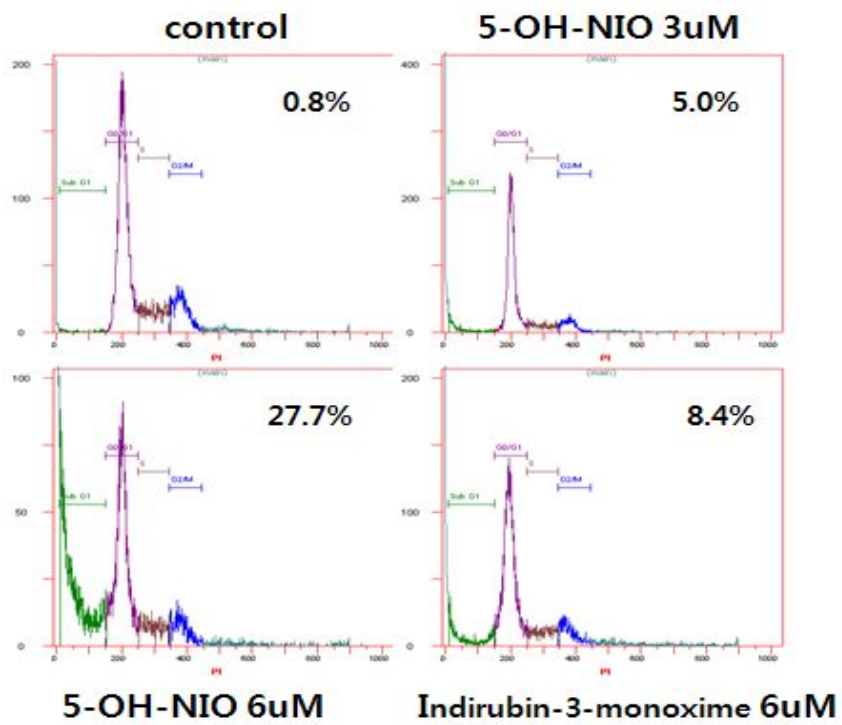
Figure 4. G2/M phase cell cycle regulators expression in A549 cells. A549 cells were treated with 3, 6, 9 μM of 5-OH-NIO for 48 h. Western blot analysis of CDK2, Cyclin B1, phospho-cdc2 and Actin.

3) A549세포에서 5-OH-NIO에 의한 세포사멸 조사 및 그 기전 연구

5-OH-NIO에 의한 세포 증식 억제 효과가 세포 사멸에 의한 것인가를 조사하기 위해 먼저 flow cytometry 분석법으로 세포 주기를 조사하였다. 그 결과, 5-OH-NIO 처리한 군에서 sub-G1기가 증가하는 것이 확인 되었고 (Fig. 5A), 이는 동일한 농도의 indirubin-3-monoxime를 처리한 군에 비해 3 배 이상 높은 세포사멸이 유도되는 것으로 확인되었다. 또한 Annexin V/PI 염색에서도 Annexin V에 염색된 apoptotic cell이 농도 의존적으로 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5B). 5-OH-NIO에 의한 세포사멸 유도효과는 DAPI 염색을 통한 apoptotic body 증가를 형광현미경을 이용해 관찰함으로써 다시 한 번 확인할 수 있었다 (Fig. 6).

5-OH-NIO에 의한 세포사멸 기전을 알아보기 위해 세포사멸에 관여하는 것으로 알려진 단백질들의 발현을 western blot을 통해 조사하였다. 5-OH-NIO 처리 시 Bcl-2 level은 감소하고 Bax level이 증가하였으며 cytochrom c의 세포질내로의 유출이 관찰되었다. 또한 caspase 3, 7, 9이 활성화되고 caspase3/7의 하위 신호인 PARP의 cleavage가 5-OH-NIO를 처리한 세포에서 증가되는 것으로 나타나, 5-OH-NIO가 미토콘드리아 의존적 세포사멸 기전을 통해 세포의 증식을 강하게 억제함을 확인하였다 (Fig. 7).

A



B

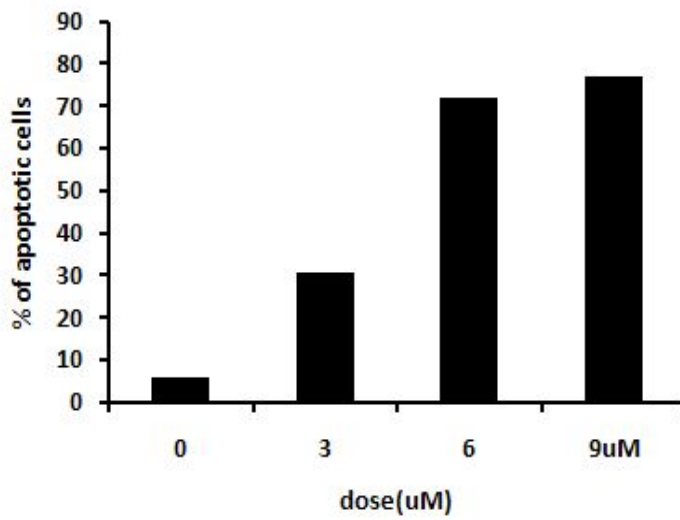
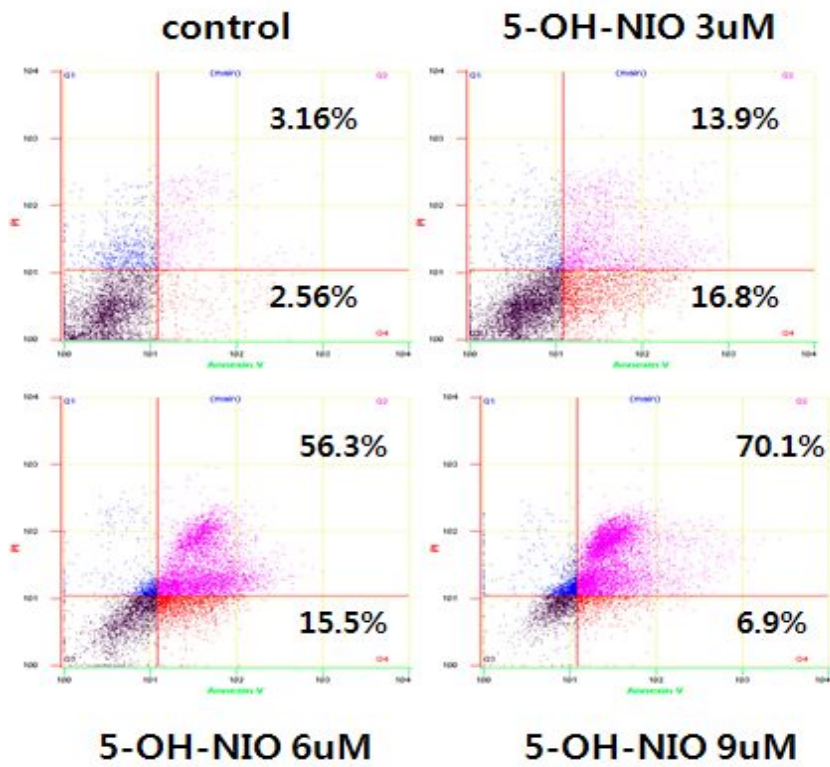


Figure 5. Apoptotic proportion by flow cytometry.

(A) The cells treated with indicated concentrations of 5-OH-NIO for 48 h. Cells stained with propidium iodide (PI) and sub-G1 DNA contents were evaluated by flow cytometric analysis. (B) A549 cells induced apoptosis by 5-OH-NIO (3, 6, 9 μ M) was measured by flow cytometry. The graph represents the relative number of cells from three separated experiments.

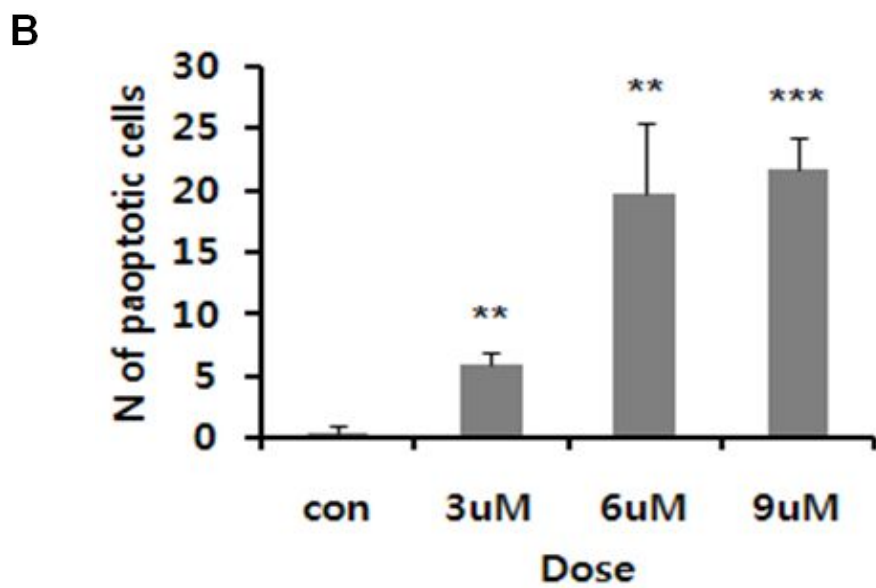
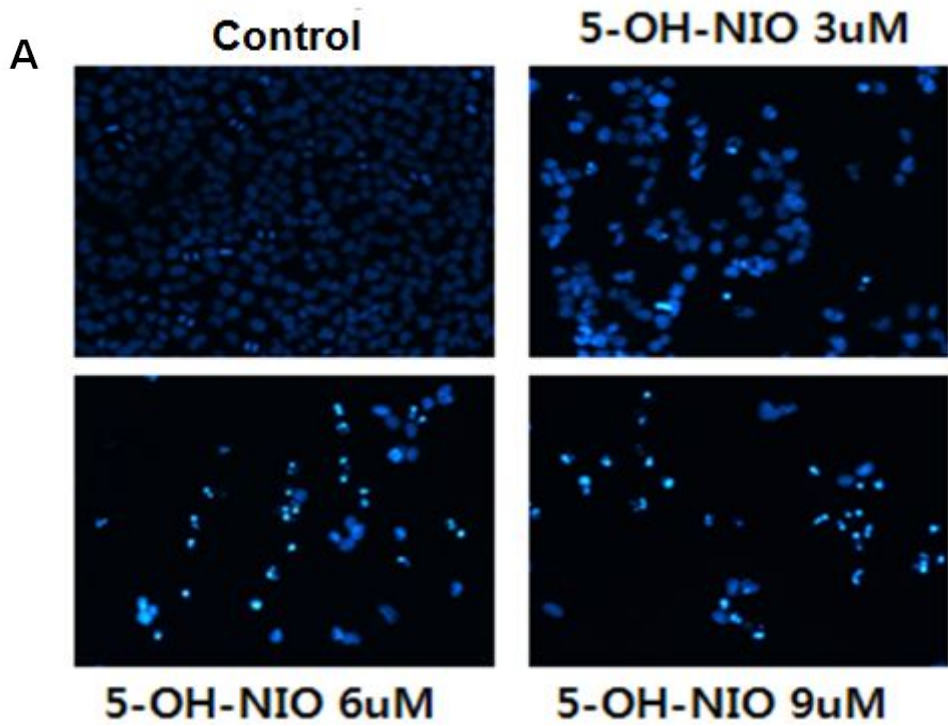


Figure 6. Apoptosis analysis of 5-OH-NIO treated cells by DAPI stain.

Effect of 5-OH-NIO on apoptotic features in A549 cells by DAPI staining. Apoptotic bodies were observed in 5-OH-NIO treated A549 cells for 48 h by DAPI staining. (A) Morphological patterns of apoptosis in A549 cells exposed to 5-OH-NIO. (B) Numbers of DAPI stained apoptotic bodies. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ statistically significant when compared with the control.

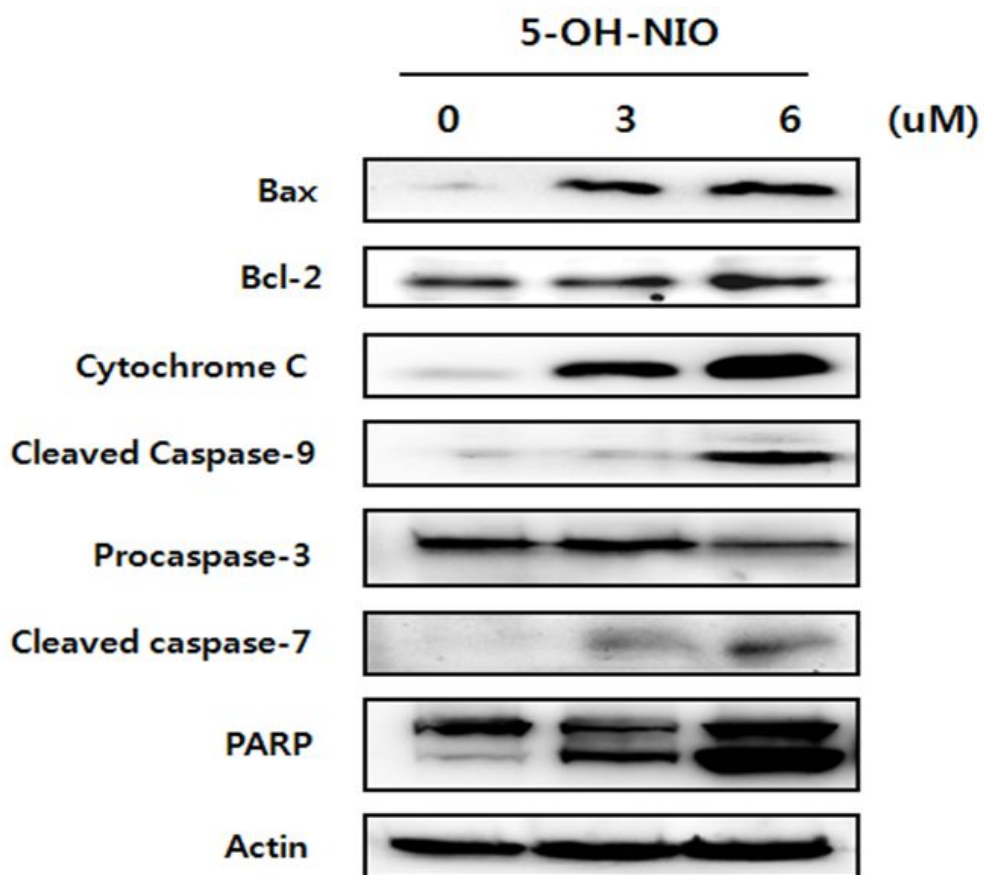


Figure 7. Apoptosis regulators expression in A549 cells.

Cells were treated with 3, 6, 9 μM of 5-OH-NIO for 24 h. Western blot analysis of Bax, Bcl-2, Cytochrome c, cleaved caspase 7/9, pro-caspase 3, PARP and Actin.

4) A549세포에서 5-OH-NIO에 의한 세포자식작용 유도효과

5-OH-NIO가 A549세포에서 세포사멸 뿐만 아니라 세포자식작용 또한 유도하는지를 알아보기 위해 세포자식작용유도 단백질인 LC3B의 발현 변화를 조사하였다. 실험 결과, A549 세포에서 5-OH-NIO를 처리한 군에서 LC3B의 활성형인 LC3B type II 단백질의 발현이 대조군에 비해 현저히 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 자식작용 초기에 관여하는 단백질인 mTOR, Beclin-1, ATG들의 발현이 처리 1 시간에서 증가되는 결과를 보여 5-OH-NIO가 세포자식작용을 유도하는 것을 확인하였다 (Fig. 8). 세포자식작용을 확인하기 위해 자식작용 시 나타나는 autophagosome 형성을 MDC 염색을 통해 관찰하였고 (Fig. 9), acridine orange 염색법으로 acidic vascular organelle 형성을 flow cytometry와 형광현미경을 통해 관찰함으로써 5-OH-NIO가 세포사멸 뿐만 아니라 세포자식작용을 유도함을 확인 하였다 (Fig. 10).

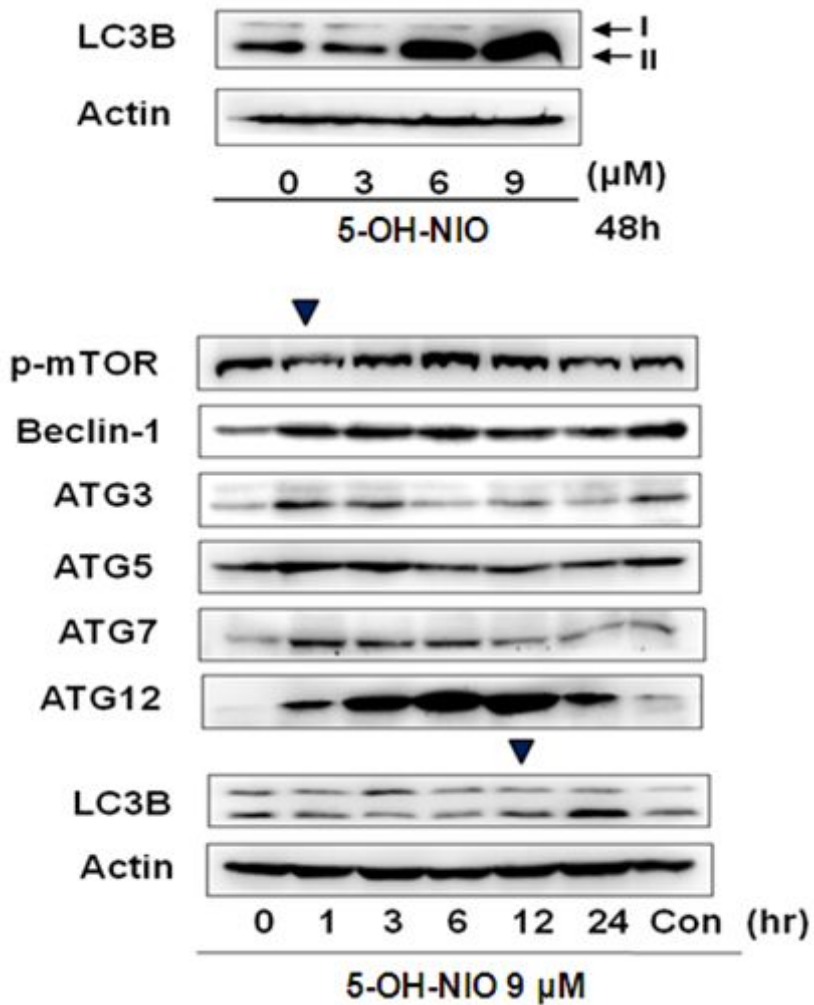


Figure 8. Autophagy regulators expression in A549 cells.

A549 cells were treated with 3, 6, 9 μM of 5-OH-NIO for 24 h. Western blot analysis of LC3B, phospho-mTOR, Beclin-1, ATG3/5/7/12, and Actin.

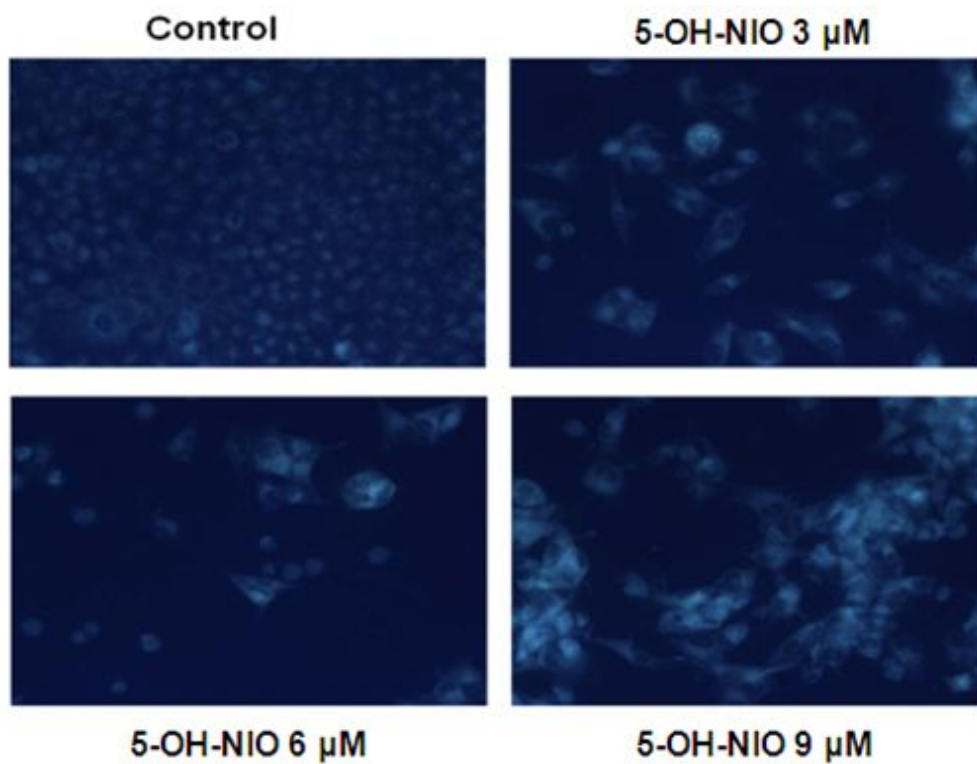
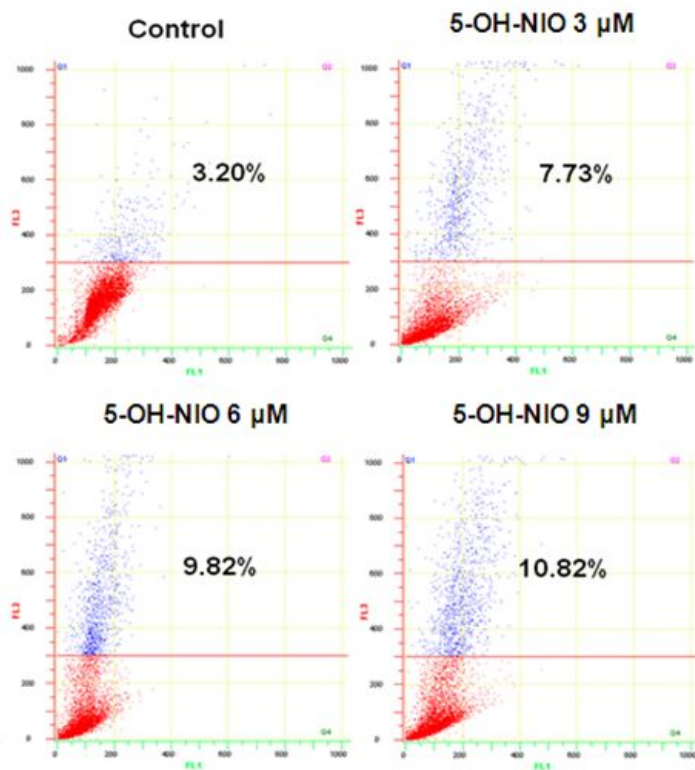


Figure 9. Autophagy analysis of 5-OH-NIO treated cells by Monodansylcadaverine (MDC) staining.

The cells were incubated with MDC (0.05 mM) for 10 min and observed under a fluorescence microscopy.

A



B

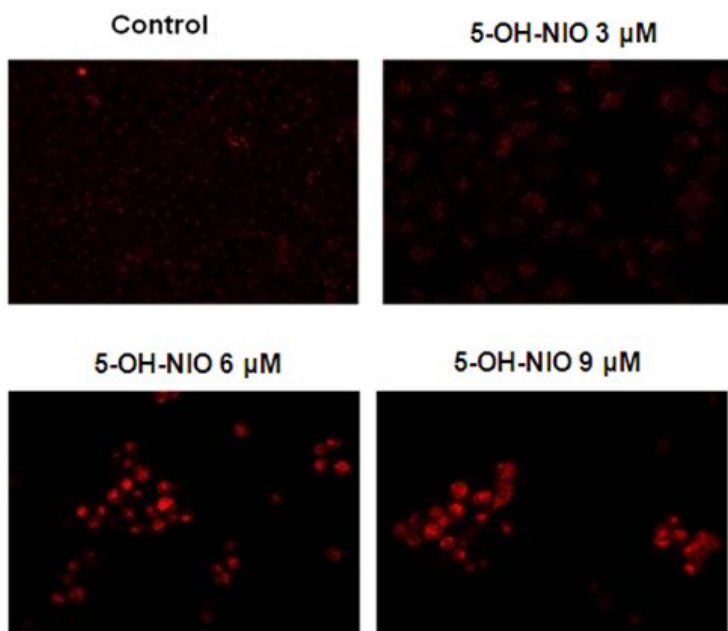


Figure 10. Induction of autophagy by 5-OH-NIO using acidic vesicular organelles (AVOs) in A549 cells.

Fluorescence-activated cell sorting analysis using acridine orange. (A) The cells were stained with acridine orange (1 $\mu\text{g/ml}$) and then subjected to flow cytometry analysis. FL1-H, green color intensity; FL3-H, red color intensity. Top of the grid was considered as acidic vesicular organelles. The representative results from three independent experiments are shown. (B) Morphological patterns of autophagy in A549 cells exposed to 5-OH-NIO. The cells were observed under a fluorescence microscopy.

5) A549세포에서 세포 자식작용의 역할

5-OH-NIO에 의한 세포자식작용이 세포사 기능을 하는지 세포보호 작용을 하는지 알아보기 위해, 자식작용의 저해제인 chloroquine을 동시에 처리하여 세포의 생존율을 조사해본 결과, 5-OH-NIO에 의해 유도되는 자식작용을 chloroquine으로 억제 시 세포 증식능이 유의성 있게 감소하는 것으로 관찰되었고, 5-OH-NIO에 의해 유도되는 자식작용은 세포보호의 기능을 하는 것을 확인하였다 (Fig. 11). 또한, 자식작용 저해로 나타나는 세포죽음은 PARP cleavage 증가와 Annexin V/PI 염색을 통한 FACS 결과에서 세포사멸에 의해 일어남을 확인하였다 (Fig. 12A, B). 이 결과를 통해 폐암 치료를 위해 5-OH-NIO 처리 시 자식작용 저해제와 같이 사용하면 더 효과적인 폐암 세포사멸을 유도할 수 있을 것으로 생각되어진다.

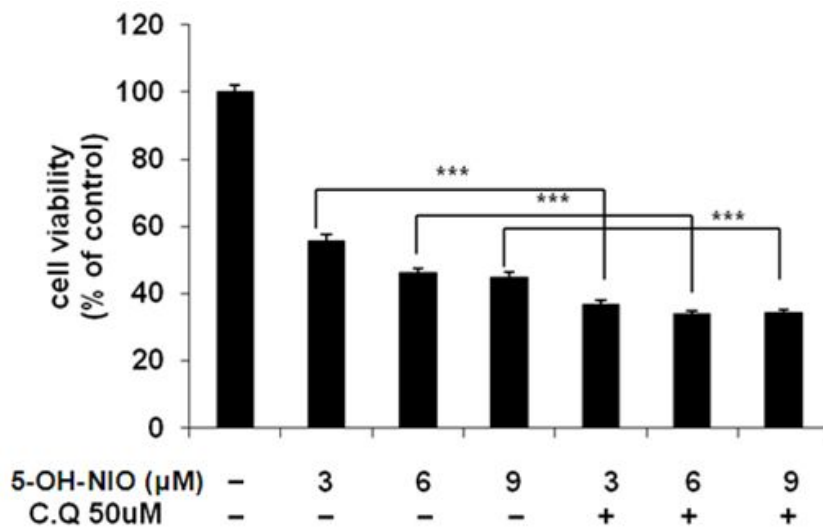
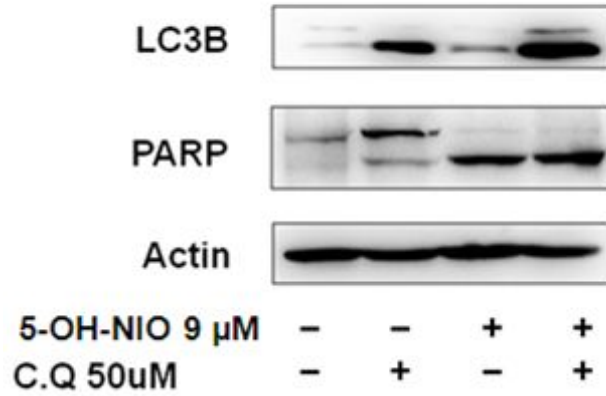


Figure 11. The effect of 5-OH-NIO and chloroquine (CQ) on the proliferation measured by MTT assay.

The cells were treated with 5-OH-NIO for 48 h in the presence or absence of CQ (50 μM). Cell viability was determined by MTT assay after co-treated with 5-OH-NIO and CQ. *** p < 0.001 statistically significant when compared with the 5-OH-NIO-alone-treated cells.

A



B

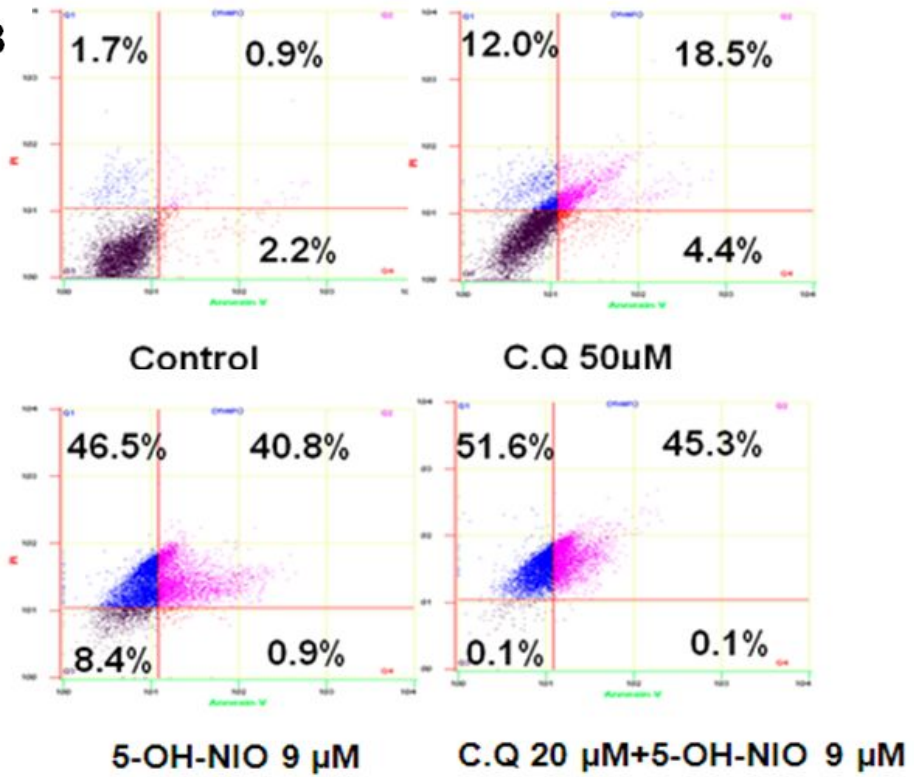


Figure 12. Inhibition of autophagy by chloroquine (CQ) in 5-OH-NIO-treated A549 cells.

The cells were treated with 5-OH-NIO for 48 h in the presence or absence of CQ (50 μ M). (A) Western blot analyses of LC3B and PARP expressions from total cell lysates. The protein levels were normalized by a comparison with the actin levels. (B) A549 cells induced apoptosis by 5-OH-NIO and CQ was measured by flow cytometry. The population of apoptotic cell was calculated.

IV. 고찰

이전의 연구에서, CDK 억제물질인 인디루빈 유도체, 5'-NIO를 사용하여 구강암 세포의 성장을 억제하고 세포 사멸을 유도하는 것을 확인하였다 (32). 본 연구에서는, 인디루빈의 단점을 보완한 새로운 인디루빈 유도체인 5-OH-NIO를 사용하여 폐암 A549 세포에서의 세포 성장 억제와 세포 주기 억제 및 세포사멸과 세포자식작용이 유도됨을 확인하였다.

CDKs는 serine/threonine kinases group에 속해 세포주기의 조절, 신경 기능, 분화, 세포사멸에서 증가한다고 알려져 있다 (34). 그들의 활동성은 세포 주기의 다른 단계에서 발현하는 해당 cyclins에 결합을 포함한 여러 메커니즘을 조절한다고 알려져 있다 (35). 따라서, 다른 CDK/cyclin 복합체는 G1, S, G2/M 단계를 통해 각각의 세포주기 단계에서 활성화된다. 5-OH-NIO 처리 군에서 농도 의존적으로 A549 세포의 G2/M기 축적을 확인하였다 (Fig. 3A, B). 또한, western blot 분석을 통하여 G2/M기에 관여한 단백질인 CDK2, Cyclin B1, phospho-cdc2의 감소를 확인하였다 (Fig. 4).

Subramaniam 등은 췌장암 세포에서 CDK4 억제제인 P276이 세포증식억제 효과를 나타냈고, G0/G1기의 축적을 확인하였다 (36). 또한, Dickson등은 CDK2/4/6를 억제하는 억제제로 알려진 Flavopiridol이 in vitro에서 세포 증식을 억제하였고, G1/S기와 G2/M기를 모두 축적한다고 보고하였다 (37). Gamet-Payrastre 등은 Sulforaphane가 cdc2/cyclin B 복합체의 활성을 억제함으로써 위암 세포의 G2/M기 억제를 유도하고, 세포 성장을 억제한다고 보고하였고 (15), 이전의 5'-NIO를 이용한 연구에서도 phospho-cdc2의 활성을 억제함으로써 구강암 세포의 G2/M기 축적을 유도하는 것으로 보고되어 본 연구와 동일한 결과를 보고하였다 (38).

세포사멸은 우리 몸 안에 입력되어 있는 생체 프로그램으로 비정상 세포,

손상된 세포 및 노화된 세포가 스스로 자살해 사멸함으로써 전체적인 우리 몸의 균형을 유지시켜주는 메커니즘으로 알려져 있다. 여러 가지 요인이 세포사멸에 관여하지만, 크게 세포사 수용체 (death receptor)가 관여하는 외부 요인 경로 (extrinsic apoptotic pathway)와 미토콘드리아 의존적인 내재적 고유 경로 (intrinsic apoptotic pathway)의 두 가지 메커니즘에 의해 apoptosis가 유도될 수 있다. 외부요인 경로는 주로 Fas ligand 등 tumor necrosis factor 계열의 리간드가 세포 표면의 세포사 수용체에 결합한 후 Fas-associated death domain (FADD) 단백질 등 연결기 단백질을 경유하여 caspase 8을 활성화시켜 세포사멸을 유발한다 (39, 40). 특히, 내재적 고유 경로는 Bcl-2 family가 cytoplasmic protein members의 종류로 세포 사멸을 조절한다. Bcl-2 family는 크게 Bcl-2와 Bax 단백질로 구분되고, Bcl-2는 세포사멸을 억제하고, 반면에 Bax는 이러한 효과를 유지시키면서 서로 반대 작용을 한다 (22). 또한, Caspases는 세포사멸을 조절하는 중요한 인자로 이 중에 caspase 3는 세포내 중요 단백질 중에서 세포사멸을 촉매하는 작용을 한다는 보고가 있다 (23). 이전의 보고에서 Cartee 등은 CDK 억제제인 flavopiridol이 골수성 백혈병 세포인 U937 세포에서 외부요인 경로를 통해 세포사멸을 유도하는 것을 보고하였다 (41). 반면, Subramaniam 등은 CDK4 억제제인 P276에 의해 Bax의 증가와 Bcl-2의 감소를 보였고, caspase 3의 활성을 통해 내재적 고유 경로를 통해 세포사멸이 유도됨을 확인하였다 (36). 본 연구에서도 A549 세포에서 5-OH-NIO가 Sub G1의 증가와 DAPI 염색을 통한 apoptotic body의 증가, flow cytometry 및 western blot을 통해 내재적 고유 경로를 통해 세포사멸이 유도됨을 확인하였다 (Fig. 5-7).

세포자식작용은 세포 재생 메커니즘이고, programmed cell death type II로 지정됨으로써 최근 암 연구 분야의 높은 관심을 나타내었다 (42, 43). 본 연구에서 A549 세포에서 5-OH-NIO가 세포자식작용을 유도하는 것을 세포질

에서 MDC 염색과 LC3-II의 증가, acridine orange 염색을 통해 확인하였다 (Fig. 8-10). 이러한 결과는 5-OH-NIO가 A549 세포에서 세포사멸 뿐만 아니라, 세포자식작용 또한 유도함을 나타낸다. 5-OH-NIO에 의해 유도된 세포자식작용은 세포를 보호하는 역할을 한다는 사실을 확인하였다 (Fig. 11, 12).

결론적으로, 본 연구를 통해 5-OH-NIO가 폐암 A549 세포 성장을 억제하고, 세포 G2/M 주기를 축적하는 것을 확인하였다. 또한, 미토콘드리아 의존적 신호를 통해 세포사멸을 유도하는 것과, 5-OH-NIO가 세포자식작용 또한 유도하는 것을 확인하였다. 이 결과를 바탕으로 인디루빈 유도체, 5-OH-NIO의 분자 생물학적 메커니즘을 통해 폐암 치료제로서의 가능성을 제시하였고, 폐암 뿐만 아니라 여러 종양 치료에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 참고문헌

1. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafour A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ and Thun MJ: Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 54: 8-29, 2004.
2. Beadsmoore CJ and Screatton NJ: Classification, staging and prognosis of lung cancer. *Eur J Radiol* 45: 8-17, 2003.
3. Cortes-Funes H: New treatment approaches for lung cancer and impact on survival. *Semin Oncol* 29: S26-S29, 2002.
4. Bonomi P, Kim K, Fairclough D, Cella D, Kugler J, Rowinsky E, Jiroutek M and Johnson D: Comparison of survival and quality of life in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with two dose levels of paclitaxel combined with cisplatin versus etoposide with cisplatin: results of an Eastern Cooperative Oncology Group trial. *J Clin Oncol* 18: 623-631, 2000.
5. Ramalingam S and Belani CP: State-of-the-art chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer. *Semin Oncol* 31: S68-S74, 2004.
6. Loehrer PJ and Einhorn LH: Drugs five years later, cisplatin. *Ann Intern Med* 100: 704-713, 1984.
7. Johnson DH: Evolution of cisplatin-based chemotherapy in nonsmall cell lung cancer: a historical perspective and the eastern cooperative oncology group experience. *Chest* 117: S133-S137, 2000.
8. Wang G, Reed E and Li QQ: Molecular basis of cellular response to cisplatin chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 12: 955-965, 2004.

9. Fossella FV, Lynch T and Shepherd FA: Second line chemotherapy for NSCLC: establishing a gold standard. *Lung Cancer* 38: S5-S12, 2002.
10. Kelland LR: New platinum antitumor complexes. *Crit Rev Oncol Hematol* 15: 191-219, 1993.
11. Gridelli C, Rossi A and Maione P: Treatment of non-small cell lung cancer: state of the art and development of new biologic agents. *Oncogene* 22: 6629-6638, 2003.
12. Rom WN, Hay JG, Lee TC, Jiang Y and Tchou-Wong KM: Molecular and genetic aspects of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1355-1367, 2000.
13. Orren DK, Petersen LN, Bohr VA. Persistent DNA damage inhibits S-phase and G2 progression, and results in apoptosis. *Molecular Biology of the Cell* 8, 1129-1142, 1997.
14. Fujimoto K, Hosotani R, Doi R, Wada M, Lee JU, Koshiha T, Miyamoto Y, Tsuji S, Nakajima S, Imamura M. Induction of cell-cycle arrest and apoptosis by a novel retinobenzoic-acid derivative, TAC-101, in human pancreatic-cancer cell. *International Journal of Cancer* 81, 637-644, 1999.
15. Gamet-Payraastre L, Li P, Lumeau S, Cassar G, Dupont MA, Chevolleau S, Gasc N, Tulliez J, Terce F. Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells. *Cancer Research* 60, 1426-1433, 2000.
16. Torres K, Horwitz SB. Mechanisms of taxol-induced cell death are concentration dependent. *Cancer Research* 58, 3620-3626, 1998.
17. Murray AW. Revisiting the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116,

- 221-234, 2004.
18. Lewin B. Driving the cell cycle: M phase kinases, its partners, and substrates. *Cell* 61, 743-752, 1990.
 19. Doree M, Galas S. The cyclin-dependent protein kinases and the control of cell division. *FASEB* 8, 1114-1121, 1994.
 20. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins: suppressors of apoptosis. *Genes and Development* 13, 239-252, 1999.
 21. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326, 1998.
 22. Antonsson B, Martinou JC. The Bcl-2 protein family. *Experimental Cell Research* 256, 50-57, 2000.
 23. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91, 443-446, 1997.
 24. Malumbres, M.; Barbacid, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 222-231, 2001.
 25. Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, Alexander GM, Gatti LA, Firpo EJ, Daling JR, Roberts JM. Expression of cell-cycle regulators p27 (Kip1) and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nat Med* 3, 222-225, 1997.
 26. Schraml P, Bucher C, Bissig H, Nocito A, Haas P, Wilber K, Seelig S, Kononen J, Mihatsch MJ, Dirnhofer S, Sauter G. Cyclin E overexpression and amplification in human tumours. *J Pathol* 200, 375-382, 2003.
 27. Soria JC, Se Jin J, Khuri FR, Hassan K, Liu D, Waun Ki H, Mao L. Overexpression of cyclin B1 in early-stage non-small cell lung

- cancer and its clinical implication. *Cancer Res.* 60, 4000–4004, 2000.
28. Takeno S, Noguchi T, Kikuchi R, Uchida Y, Yokoyama S, Muller W. Prognostic value of cyclin B1 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 94, 2874–2881, 2002.
 29. Lorenzo HK, Susin SA. Therapeutic potential of AIF-mediated caspase-independent programmed cell death. *Drug Resist Updat.* 10, 235–255, 2007.
 30. Koh DW, Dawson TM, Dawson VL. Mediation of cell death by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Pharmacol Res* 52, 5–14, 2005.
 31. Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 2, 1542–1552, 2005.
 32. Kim SA, Kim SW, Chang S, Yoon JH, Ahn SG. 5'-nitro-indirubinoxime induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human KB oral carcinoma cells. *Cancer Lett* 274, 72–77, 2009.
 33. Kanematsu S, Uehara N, Miki H, Yoshizawa K, Kawanaka A, Yuri T, Tsubura A. Autophagy inhibition enhances sulforaphane-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Anticancer Res* 30,3381–3390, 2010.
 34. Harper JW, Adams PD. Cyclin-dependent kinases. *Chem Rev* 101, 2511–2526, 2001.
 35. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131–134, 1995.
 36. Subramaniam D, Periyasamy G, Ponnurangam S, Chakrabarti D, Sugumar A, Padigaru M, Weir SJ, Balakrishnan A, Sharma S, Anant S. CDK-4 inhibitor P276 sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther.* 2012

Jul;11(7):1598-1608.

37. Dickson MA, Schwartz GK. Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy. *Curr Oncol.* 2009 Mar;16(2):36-43.
38. Kim SA, Kim SW, Chang S, Yoon JH, Ahn SG. 5'-nitro-indirubinoxime induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human KB oral carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2009 Feb 274(1):72-77.
39. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene.* 25, 4798-4811, 2006.
40. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene.* 26, 1324-1337, 2007.
41. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6, 99-104, 1999.
42. Janku F, McConkey DJ, Hong DS, Kurzrock R. Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 8, 528-539, 2011.
43. Bursch W, Ellinger A, Gerner C, Frohwein U, Schulte-Hermann R. Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? *Ann N Y Acad Sci* 926, 1-12, 2000.

저작물 이용 허락서

학 과	치의생명공학과	학 번	20107243	과정	박사
성 명	한글:백 종 필 한문:白鍾必 영문:Baek Jong Pil				
주 소	강원 춘천시 석사동 807-3 서진빌딩 3층				
연락처	e-mail : implantbaek@hotmail.com				
논문 제목	한글 : A549 세포에서 5-nitro-5' -hydroxy-indirubinoxime의 apoptosis과 autophagy 유도 효과				
	영문 : Induction of apoptosis and autophagy by 5-nitro-5' -hydroxy-indirubinoxime in human lung cancer A549 cells				
<p>본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 - 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.</p> <p style="text-align: center;">- 다 음 -</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함 2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함(다만, 저작물의 내용변경은 금지함) 3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함 4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함 5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함 6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음 7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함 <p style="text-align: center;">동의여부 : 동의(○) 반대()</p> <p style="text-align: center;">2013년 월 일</p> <p style="text-align: right;">저작자: 백 종 필 (인)</p>					
조선대학교 총장 귀하					