

Piplartine과 전립선암 세포사멸

공은희¹ · 김광연² · 유선녕² · 이선이³ · 안순철²

¹고신대학교 의과대학 가정의학교실, ²부산대학교 의학전문대학원 미생물학 및 면역학교실,
³국립원예특작과학원 감귤연구소

Regulation of Piplartine on Apoptotic Death of Human Prostate Cancer Cells: Based on Microarray

Eun-Hee Kong¹ · Kwang-Youn Kim² · Sun-Nyoung Yu² · Sun-Yi Lee³ · Soon-Cheol Ann²

¹Department of Family Medicine, Kosin University, College of Medicine, Busan, Korea

²Department of Microbiology and Immunology, Pusan National University School of Medicine, Yangsan, Korea

³Citrus Research Station, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Jeju, Korea

Abstract

Background: Prostate cancer is one of the leading causes of cancer-related deaths in men worldwide. *Piper* species have known anti-proliferation and anti-cancer activity. This study was to examine the anti-proliferation effects of piplartine on human prostate cancer cell.

Methods: PC-3 human prostate cancer cells received piplartine 15 uM for 24 hours. Microarray was performed on piplartine-treated PC-3 cells.

Results: Among 253 genes which were altered by piplartine-treated PC-3 cells (>3-4 folds), 143 genes were up-regulated and 110 genes were down-regulated by piplartine in microarray. Most of genes which were up-regulated by piplartine were functionally classified as apoptosis, immune response related genes. Genes which were down-regulated by piplartine were functionally classified as transcription, cell cycle related genes.

Conclusion: Piplartine may induce anti-tumor activity for human prostate cancer along with regulated of cell cycle and apoptotic genes in piplartine-induced PC-cells.

Key words : Apoptosis, PC-cells, Piplartine

서론

전립선암은 미국에서 남성암 중 가장 발생빈도가 높고, 암관련 사망의 두번째 원인이 되는 종양으로 국내에서도 서구화된 식습관과 생활양식으로 그 발생빈도와 사망률이 증가하고 있는 추세이다. 국내에서 전립선암은 비뇨기계에서 발생하는 암 중에서 두번째로 빈발하는 암이었으나, 유병율이 점차로 증가하면서 현재는 비뇨기계 암 중에서 가장 흔한 암이 되었다.¹⁾ 우리나라도

식생활 서구화, 인구 노령화 등 미국, 유럽과 비슷한 경향을 보이고 있어 전립선암의 발생빈도는 점점 증가하고 있다. 이러한 전립선암을 예방하기 위해 합성화학물이나 천연물 유래 화합물을 이용한 화학예방요법은 향후 전립선암의 발생빈도와 사망률을 낮추기 위해 전망이 좋은 것으로 높은 관심을 갖고 있다.²⁾ 최근에 전립선암에 대해 보완대체의학에 의한 예방과 치료에 대한 관심이 증가하면서 여러 가지 약물제제에 대한 연구가 진행되고 있는데, 그 중 전립선암 예방효과를 가지는 가능성이 있는 후추에서 분리된 다양한 phytochemical들은 여러 생리활성을 나타내는 것으로 알려지고 있으며, 그 중에서 alkaloid-amide 성분인 piplartine은 항혈소관 응고작용, 항진균 성질 뿐 아니라 종양세포에 대한 세포독

교신저자 : 안 순 철

주소 : 경상남도 양산시 물금읍 범어리

부산대학교 의학전문대학원,

미생물학 및 면역학 교실 (626-870)

TEL : 051-510-8092 FAX: 051-510-8090

E-mail: ahnsc@pusan.ac.kr

성효과로 잘 알려져 있다.³⁻⁵⁾저자들은 이전 실험에서 piplartine을 전립선암 세포주인 PC-3 세포에 처리하여 caspase-3 활성화와 세포주기에서 G2/M 이 억제되는 것을 통해 piplartine이 PC-3 세포에서 항증식과 항암효과가 나타나는 것을 증명하였다.⁶⁾ 최근 다양한 유전자 연구방법들 중 microarray을 통해 유전자들이 어떠한 양식으로 서로 상호작용을 하는지 밝혀 각종 질병의 원인을 빠르고 쉽게 알아내어 조기발견이 가능하고 조기치료에 유용하게 활용하고 있다.

이번 연구는 microarray분석법을 이용하여 piplartine 처리가 전립선암 세포주인 PC-3 세포사멸에서 어떠한 유전자 변화를 보여주는지를 분석하고자 한다.

연구대상 및 방법

1. 재료

실험에 사용된piplartine [5,6-dihydro-1-[1-oxo-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2-propenyl]-2-(1H)-pyridinone] ($C_{17}H_{19}NO_5$, MW 317.3)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여methanol (MeOH) 에 녹여 신선한 배지에 희석하여 사용하였다.

2. 세포 배양

사람 전립선암에서 유래한 암세포인 PC-3세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 세포배양에 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Hyclone Co., Logan, UT, USA)와RPMI 1640 medium (Hyclone Co.) 배지에 penicillin 100 units/ml (Hyclone Co.)와 streptomycin 100 ug/ml (Hyclone Co.)을 첨가한 배양액을 사용하여 37°C 습윤한 CO₂ 배양기 (5% CO₂/95% air)에서 배양하였다. 시험에 사용된 세포는 배양접시에 세포가 70-80% 되었을 때, piplartine 15 uM을 24시간 동안 처리한 실험군과 처리하지 않은 대조군으로 나누어 다음 실험을 진행하였다.

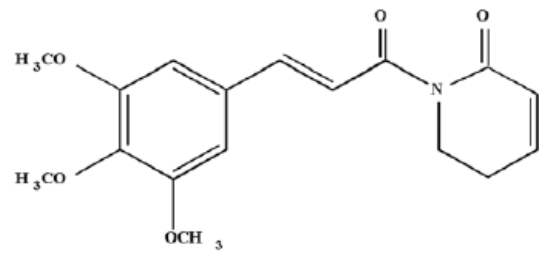


Fig. 1. Chemical structure of piplartine (piperlongumine) from *Piper* species.

3. Microarray 실험 및 데이터 분석 (Fig. 2)

PC-3 전립선암 세포사멸에서 piplartine 처리에 의해 차별적으로 발현되는 유전자 군을 선별하기 위하여 microarray 실험은 GenomicTree, Inc. (Korea)에 위탁하여 수행하였다. DNA microarray는 Agilent사의 Human whole genome 44K (USA)를 사용하였다. 간단하게 실험방법을 설명하면, 세포주에서 RiboEx total RNA purification kit (GeneAll, Korea)를 사용하여total RNA를 추출하였으며, 추출된 RNA는 Agilent's 2100 Bioanalyzer System을 이용하여 total RNA의 질을 측정하였다. 분리한 total RNA를 주형으로 형광표지된 cDNA를 얻기 위해 역전사 과정을 진행하였다. 역전사 반응 과정 동안 total RNA 18 ug에 oligo dT primer를 annealing 한 후, 대조군의 total RNA는 Cy3-dUTP를, 실험군의 total RNA는 Cy5-dUTP를 이용하여 각각 표식을 붙였다. RNA의 증폭과 표식 과정을 위해 Agilent's Low RNA Input Linear Amplification kit PLUS를 이용하였다. 일련의 합성과정과 정제과정을 통해 만들어진 두 개의 probe를 섞어서, microarray에 적용하였다. Microarray hybridization을 위해 Agilent's Gene

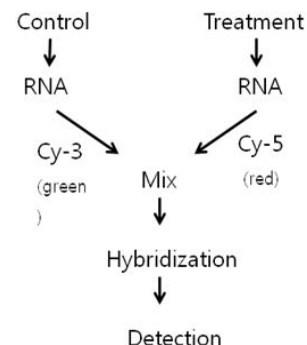


Fig. 2. Flow chart of microarray.

Expression Hybridization Kit를 사용하여 16시간 동안 hybridization한 후, Agilent's Gene Expression Wash Buffer Kit를 이용하여 microarray의 세척과정을 거친 후 원심분리하여 DNA microarray를 건조하여 스캐닝에 사용하였다. Microarray에서 결합된 형광 강도를 Agilent's DNA microarray scanner로 측정하였고, 수집한 이미지들을 Feature Extraction Software를 이용하여 분석하였다. 신호 강도는 각 점들의 강도 중간값에서 배경 중간값을 제하여 결정하였다. LOWESS normalization 방법을 이용해 기술적 변이를 제거하였고, 유전자의 생리학적 분자학적 기능을 분류하기 위해서는 DAVID database (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)를 이용하였다. 실험의 유의성을 위해 3번 반복실험 후 biological process (BP)를 통해 clustering하였으며, 유전자의 평균 값이 대조군보다 4배 이상 과발현을 보이거나 3배 이상 저발현을 보이는 유전자를 대상으로 분석하였다. Pipltartine 처리된 실험군과 Pipltartine 처리하지 않은 대조군의 유전자의 비교는 윈도우용 SPSS version 17.0을 사용하여 *t*-test를 시행하였으며, 유의수준은 0.05미만으로 하였다.

결 과

DNA microarray 분석을 통해 총 2,260개의 유전자를 검출하였으며, Pipltartine 처리에 의해 과발현 된 유전자 845개 중 4배 이상 과발현을 나타낸 유전자는 143개, 저발현된 유전자 1,415개 중 3배 이상 저발현 된 유전자 110개를 대상으로 분석하였다.

4배 이상 과발현을 나타낸 143개의 유전자들 중 BP에 의한 clustering에서 유의한 수준으로 더욱 과발현 된 유전자가 48개로 세포사멸 조절, 세포증식 조절, 면역반응에 관여하는 유전자였으며, (Table 1) 3배 이상 저발현을 나타낸 110개의 유전자들 중 BP에 의한 clustering에서 유의한 수준으로 더욱 저발현 된 54개는 전사, 세포주기에 관여하는 유전자였다. (Table 2) 세포사멸과 성장에 10배 이상 과발현 된 유전자는 KIAA1967, TRIB3, TP73L, KCNMA1이며, 이 중 KIAA1967 유전자가 33.15로 가장 큰 변화를 나타냈다. (Table 3) 10배 이상 저발

Table 1. Genetic clustering on 4-folds up-regulated genes modulations among pipltartine-treated PC-3 cells by analysis of DAVID database.

Category	Term	Count	List Total	%	P-value	Fold change
GOTERM_BP_FAT	GO:0042981 ~ apoptosis	17	143	8.72	0.01	15.61
GOTERM_BP_FAT	GO:0042127 ~ cell proliferation	16	143	8.21	0.018	26.25
GOTERM_BP_FAT	GO:0006955 ~ immune response	15	143	7.69	0.014	20.39

Table 2. Genetic clustering on 3-folds down-regulated genes modulations among pipltartine-treated PC-3 cells by analysis of DAVID database.

Category	Term	Count	List Total	%	P-value	Fold change
GOTERM_BP_FAT	GO:0006350 ~transcription	25	110	15.82	0.045	51.15
GOTERM_BP_FAT	GO:0007049 ~cell cycle	16	110	10.13	0.001	2.11
GOTERM_BP_FAT	GO:0022402 ~cell cycle process	13	110	8.23	0.002	2.99

현 된 유전자 중에서는 전사에 관여하는 SSX9 유전자가 -16.42로 가장 큰 변화를 보였으며, 세포주기에 관여하는 DCTN1 유전자가 -11.90의 변화를 보였다. (Table 4)

고 찰

이번 연구에서는 microarray를 이용하여 pipltartine 처리된 전립선암 세포주인 PC-3 세포사멸에서의 유전자 변화를 분석하였으며, 연구 결과 pipltartine 처리로 PC-3 세포에 다양한 유전자 발현 변화를 일으켜 PC-3 세포사멸에 영향을 주었다.

세포사멸은 정상세포 뿐 아니라 종양세포의 소실과 죽음에 분명한 역할을 한다.⁷⁻⁸⁾ 전립선에서 세포사멸신호는 안드로겐 소퇴 (androgen withdrawal) 후에 생기며 안드로겐은 전립선 상피세포의 증식, 전립선 분비세포의 분화, 전립선 세포사멸 억제에 작용한다.⁹⁾ 세포사멸은 죽음수용체 경로 (외인적 경로)와 미토콘드리아 경로 (내인적 경로)의 2가지 유전적 경로를 통해 조절 받는다.¹⁰⁾ DNA손상 같은 특별한 신호반응에 cytochrome C 방출, apoptosome형성, Apaf-1과 caspase-9 단백질복합체를 통해 미토콘드리아 경로가 작용한다. caspase-9 활성

Table 3. Lists of 4-folds up-regulated genes modulations on piplartine-treated PC-3 cells.

Gene Symbol	Description	GeneBank no.	Fold change
Apoptosis/growth			
KIAA1967	KIAA1967	NM_021174	33.15
TRIB3	tribbles homolog 3 (Drosophila)	NM_021158	11.32
TP73L	tumor protein p73-like	NM_003722	11.01
KCNMA1	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member	1NM_002247	10.91
C8orf4	chromosome 8 open reading frame 4	NM_020130	9.95
MX1	myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	NM_002462	8.60
ASNS	asparagine synthetase	NM_001673	8.13
BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3	NM_001165	6.24
	XIAP associated factor-1	NM_017523	6.09
STK3	serine/threonine kinase 3 (STE20 homolog, yeast)	NM_006281	5.81
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	NM_001025366	5.51
IFNG	interferon, gamma	NM_000619	5.32
KNG1	kininogen 1	NM_000893	5.08
DDIT4	DNA-damage-inducible transcript 4	NM_019058	4.85
INDO	indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase	NM_002164	4.79
F3	coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	NM_001993	4.78
	nuclear protein 1	NM_001042483	4.59
ERN1	endoplasmic reticulum to nucleus signalling 1	NM_001433	4.47
RXR2	ryanodine receptor 2 (cardiac)	NM_001035	4.30
	signal peptide peptidase 3	NM_139015	4.27
NKX2-5	NK2 transcription factor related, locus 5 (Drosophila)	NM_004387	4.23
ARHGEF2	rho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	NM_004723	4.19
Cell proliferation			
ATF3	activating transcription factor 3	NM_001040619	9.25
ACVRL1	activin A receptor type II-like 1	NM_000020	8.90
CDKN2B	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)	NM_078487	6.08
PROX1	prospero homeobox 1	NM_002763	5.49
MXD4	MAX dimerization protein 4	NM_006454	5.19
TRIB1	tribbles homolog 1 (Drosophila)	NM_025195	5.11
IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	NM_003641	4.29
EVI1	ecotropic viral integration site 1	NM_005241	4.12

은 일련의 연계된 caspase 활성을 유발하고 세포사멸을 초래한다. 현재 이용되고 있는 세포독성 항암치료제들은 종양세포의 세포사멸을 통해 약효를 나타낸다.^{8,11)} 생약이나 식물들은 생리활성 성분이 풍부하기 때문에 항암제 대체 물질로 사용될 수 있다. 저자들의 이전 연구에서 Piplartine을 PC-3 세포에 처리함으로써 성장억제, 형태변화, 세포주기 억제, 세포사멸, DNA 단편화 등을 관찰하였으며 piplartine 처리한 PC-3 세포의 세포 성장 억제가 세포주기의 G2/M 억제, sub-G1 축적을 통해

PC-3 세포의 항증식과 항암효과를 나타냈다.⁶⁾ Piplartine이 PC-3 세포에서 G2기가 억제되는 것은 명확히 세포사멸 신호경로와 미토콘드리아 경로 그리고 죽음 수용체 경로와 연관되는 것을 보여 준다. 이번 microarray를 이용한 연구에서 piplartine에 의해 가장 많이 발현되는 항암유전자중에서 세포사멸과 성장에 관여하는 KIAA1967 유전자의 발현이 가장 높게 확인되었고 전사에 관여하는 SSX9 유전자변화가 가장 저발현 되었다. 이러한 결과는 piplartine의 항증식과 항암효과가 세포사

Table 4. Lists of 3-folds down-regulated genes modulations on piplartine-treated PC-3 cells.

Gene Symbol	Description	GeneBank no.	Fold change
transcription			
SSX9	synovial sarcoma, X breakpoint 9	NM_174962	-16.42
	zinc finger protein 320	NM_207333	-10.94
FOXE1	forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2)	NM_004473	-5.93
PAX9	paired box gene 9	NM_006194	-5.75
ING2	inhibitor of growth family, member 2	NM_001564	-5.14
MYBL1	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 1	X66087	-5.07
TBX2	T-box 2	NM_005994	-5.00
SAP30	Sin3A-associated protein, 30kDa	NM_003864	-4.83
PAX1	paired box gene 1	NM_006192	-4.43
DEAF1	deformed epidermal autoregulatory factor 1 (Drosophila)	NM_021008	-4.27
SP5	Sp5 transcription factor	NM_001003845	-4.12
MLF1IP	MLF1 interacting protein	NM_024629	-3.97
REST	RE1-silencing transcription factor	NM_005612	-3.90
HEY2	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 2	NM_012259	-3.90
ZNF367	zinc finger protein 367	ENST00000375256	-3.89
BARHL1	BarH-like 1 (Drosophila)	NM_020064	-3.78
MLL3	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 3	NM_170606	-3.75
NARG1	NMDA receptor regulated 1	NM_057175	-3.61
NR1H4	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4	NM_005123	-3.60
CREB5	cAMP responsive element binding protein 5	NM_182898	-3.59
CDCA7	cell division cycle associated 7	NM_031942	-3.59
ZNF588	zinc finger protein 588	NM_016220	-3.56
PRDM15	PR domain containing 15	AY063456	-3.41
LCORL	ligand dependent nuclear receptor corepressor-like	AL133031	-3.37
GATA3	GATA binding protein 3	NM_001002295	-3.36
Cell cycle			
DCTN1	dynactin 1 (p150, glued homolog, Drosophila)	U73799	-11.90
	FLJ20105 protein	NM_001009954	-5.96
DBF4B	DBF4 homolog B (S. cerevisiae)	NM_145663	-5.30
GAS2	growth arrest-specific 2	NM_005256	-5.09
	defective in sister chromatid cohesion homolog 1 (S. cerevisiae)	NM_024094	-4.33
LRRCC1	leucine rich repeat and coiled-coil domain containing 1	NM_033402	-4.02
KNTC1	kinetochore associated 1	NM_014708	-4.00
CLSPN	claspin homolog (Xenopus laevis)	NM_022111	-3.89
CDCA2	cell division cycle associated 2	NM_152562	-3.81
TEX15	testis expressed 15	NM_031271	-3.75
CDC6	cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)	NM_001254	-3.72
BARD1	BRCA1 associated RING domain 1	NM_000465	-3.49
	sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK	NM_016653	-3.42
C4orf15	chromosome 4 open reading frame 15	NM_024511	-3.38
MAP2K6	mitogen-activated protein kinase kinase 6	NM_002758	-3.35
CKS1B	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B	NM_001826	-3.37

멸과 전사에 관여하는 유전자의 발현변화를 통해서 나타남을 강하게 시사하며, 이는 이전 저자들의 연구와 일치된 결과를 보였다.

세포사멸과 성장에 10배 이상 과발현 된 유전자는 KIAA1967, TRIB3, TP73L, KCNMA1 이며, KIAA1967, tribbles homolog 3 (Drosophila), tumor protein p73-like, potassium large conductance calcium-activated channel

(subfamily M, alpha member 1)은 KIAA1967, TRIB3, TP73L, KCNMA1 유전자들의 산물로 세포사멸과 성장에 중요한 역할을 하는 것으로 관찰되었다. 10배 이상 저발현 된 유전자 중에서는 전사에 관여하는 SSX9 유전자와 세포주기에 관여하는 DCTN1 유전자가 큰 변화를 보였다. 또한, Piplartine 처리에 의해 저발현 된 세포주기 관련 유전자인 DCTN1, DBF4B, GAS2이 발견되었다.

이 중 X breakpoint 9 와zinc finger protein 320은 SSX9 유전자의 산물로 G2/M의 전사를 촉진하며, dynactin 1 은 DCTN1 유전자의 산물로 세포주기에서 중요한 역할을 하는 것으로 관찰하였다. 이 결과들을 종합해 볼 때 piplartine이 전립선 암에 대한 화학적 치료제로서의 가능성이 있음을 알 수 있었다

저자들은 이번 연구에서 microarray분석법을 이용하여piplartine 처리가 전립선암 세포주인 PC-3 세포사멸에서 어떠한 유전자 변화를 보여주는지를 분석하였으며, 가장 많이 과발현 된KIAA1967 유전자와 직접적인 세포사멸과의 관련성, 가장 많이 저발현 된 SSX9 유전자와 전사에 대한 직접적인 관련성을 확인하기 위해서는 추가적인 실험이 필요하다고 생각된다.

결 론

Piplartine의 항증식과 항암효과는 세포사멸에 관여하는 KIAA1967 유전자의 발현변화와 전사에 관여하는 SSX9 유전자의 발현변화를 통해서 나타날 가능성이 높고, piplartine 이 전립선 암에 대한 화학적 암치료제로서의 가능성이 있음을 알 수 있었다.

참고문헌

- 1) Kim WJ, Chung JI, Hong JH, Kim CS, Jung SI, Yoon DK : Epidemiological Study for Urologic Cancer in Korea (1998-2002). Kor J Urology 45:1081-1088, 2004
- 2) Klein EA, Thompson IM : Update on chemoprevention of prostate cancer. Curr Opin Urol 14:143-149, 2004
- 3) Mittal R, Gupta RL : In vitro antioxidant activity of piperine. Methods Find Exp Clin Pharmacol 22:271-274, 2000
- 4) Pradeep CR, Kuttan G : Piperine is a potent inhibitor of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB), c-Fos, CREB, ATF-2 and proinflammatory cytokine gene expression in B16F-10 melanoma cells. Int Immunopharmacol 4:1795-1803, 2004
- 5) Selvendiran K, Banu SM, Sakthisekaran D : Protective effect of piperine on benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. Clin Chim Acta 350:73-78, 2004
- 6) Kong EH, Kim YJ, Cho HJ, Yu SN, Kim KY, Chang JH,

- Ahn SC : Piplartine induces caspase-mediated apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. Oncol Rep 20:785-792, 2008
- 7) Rossi D, Gaidano G : Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. Haematologica 88:212-218, 2003
- 8) Gurumurthy S, Vasudevan KM, Rangnekar VM : Regulation of apoptosis in prostate cancer. Cancer Metastasis Rev 20:225-243, 2001
- 9) Lu S, Tsai SY, Tsai MJ : Molecular mechanisms of androgen-independent growth of human prostate cancer LNCaP-AI cells. Endocrinology 140:5054-5059, 1999
- 10) Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X : Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. Annu Rev Cell Dev Biol 15:269-290, 1999
- 11) Lowe SW, Lin AW : Apoptosis in cancer. Carcinogenesis 21:485-495, 2000