

암세포에서 송엽의 AP-1(c-fos/c-jun)에 미치는 영향

박건구[#] · 장혜숙^{*} · 이정교^{*} · 최승훈^{**}

아산생명과학연구소 분자유전연구실, *울산대학교 의과대학, **경희대학교 한의과대학

(Received November 10, 1998)

Effect of Pini Folium Extract on AP-1 (c-fos/c-jun) in Cancer Cells

Kun-Koo Park[#], Hye Sook Chang^{*}, Jung-Kyo Lee^{*} and Seung-Hoon Choi^{**}

Department of Molecular Genetics, Asan Institute for Life Sciences,

*University of Ulsan, College of Medicine, Seoul 138-736, Korea,

**University of Kyunghee, College of Oriental Medicine, Seoul 130-701, Korea

Abstract—Phorbol ester, growth factors activities are mediated by nuclear transcription factors, the c-Fos and c-Jun, which can regulate transcriptional activation through specific DNA sites and by forming the transcription factor AP-1, which usually mediates cell proliferation and differentiation signals. We explored effects of Pini Folium extract (API-1) on AP-1 activity. Western blot analysis confirmed that API-1 decreased levels of c-Fos or c-Jun protein induced by the tumor promoter Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 200 nM). Transient transfection assays with a c-fos promoter reporter construct showed that API-1 decreased transcription activity by more than 50~60%. However, treatment of API-1 did not reduce the abundance of nuclear proteins binding to an consensus AP-1 binding site. Partition of the API-1 extract in organic solvents yielded semi-purified fractions whose anti-AP-1 activity studied further. The main substances were fractionated into dichloromethane layer. Furthermore, API-1 extract repressed the [³H]-thymidine uptake in C6 glioma cells, indicating that this extract could be included in a new type of modulator in the mitogenesis.

Keywords □ Pini Folium, c-fos, c-jun, AP-1, TRE (TPA Responsive Element).

c-fos, c-jun gene은 암virus의 oncogene인 v-fos, v-jun에 대응하는 cellular proto-oncogene으로 그 발현 산물은 AP-1의 주요 구성 성분이다.¹⁾ AP-1은 transcription factor로 특이적으로 일련의 gene들의 expression 조절에 관여하며^{2,3)} AP-1에 의하여 induction 되는 중요 유전자로는 collagenase가 있다.⁴⁾ AP-1은 multi-functional한 기능중에서도 proto-oncogene으로서의 function이 가장 중요하여, 세포의 성장과 분화의 조절에 직접 관여한다.^{5,6)} 세포핵 밖에 있는 많은 암 유전자 산물인 ras, src, raf, mos, sis, erbB 등이나⁴⁾ growth factor, growth factor receptor signal, 암 마이

리스에^{7,8)} 의하여 activation된다. 반대로 pRB, p53 같은 anti-oncogene product는 c-fos의 expression을 억제함이 보고 되었고,⁹⁾ 이 작용이 pRB, p53의 항암작용의 한가지 기전으로 가정되고 있다. 일단 activation된 AP-1은 암세포에서 결정적인 역할을 수행하게 된다. 예컨대 c-fos를 knockout시킨 mouse는 cancer의 발생률과 암의 크기가 현격하게 감소한다.¹⁰⁾

Jonat등¹¹⁾은 glucocorticoid hormone의 anti-tumor promotion작용이 AP-1의 down modulation에 의한 것이라는 증명을 제시한 이래 유사한 연구의 논문이 계속 발표되고 있다.¹²⁾ 즉 retinoic acid와 dexamethasone이 breast 및 ovarian carcinoma cell의 성장을 inhibition하고¹³⁾ 이는 이 두 물질이 모두 AP-1의 activity를 inhibition해서 나타난다.^{14,15,16)} 이 성질

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-2224-4144 (팩스) 02-2224-4182

을 이용하여 새로운 형태의 항암제 개발이 이루어지고 있다.^{15,17)} 이러한 사실에 근거하여 본 실험실에서는 천연물에서 AP-1 modulator들을 screening하던 중 송엽 추출물의 AP-1의 억제 작용이 발견되어 이에 보고하고자 한다. 송엽은 상록교목인 소나무의 잎이며, 침형으로 2개가 한몸으로 되어 있고 비교적 굵고 단단하며 길이는 10~15 cm이다. 성분으로는 flavonoid류인 quercetin, kaempferol과 정유성분으로 α -pinene, β -pinene, camphene등이 알려지고 있으며, 거풍, 가려움을 멈추게 하는 효능과 타박상, 부종등을 치료하며 무독하다고 기재 되어 있다.¹⁸⁾

실험방법

시약 및 기구

DMEM, fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin solution은 GIBCO BRL사로부터 구입하였고, PMA, n-butyryl Coenzyme A는 Sigma사, Protein assay시약은 Bio-Rad사로부터 구입하였다. [³H-methyl]-thymidine, [r-³²P]-ATP(3000 Ci/mmmole)는 Amersham사, ¹⁴C-Chloramphenicol은 NEN사로부터 구입하였다. T4 polynucleotide kinase는 Takara, polyclonal c-Fos antibody, c-Jun antibody, HRP-conjugated secondary antibody는 Santa Cruz사에서 구입하였고, 기타 다른 시약은 분자생물학 grade인 최상품을 사용하였다.

세포 배양

Hela(human cervical carcinoma), C6(rat glioma), SK-HEP-1(human hepato carcinoma) 세포주는 한국세포주 은행에서 분양 받았다. 이들은 10% FBS, 1% penicillin 및 streptomycin이 첨가된 DMEM 배지로, 5% CO₂, 37°C 조건에서 포화된 습도가 유지되는 세포배양기(NUAIR, CO₂ water jacket incubator)로 배양하였다.

API-1의 제조 및 분획

송엽은 충청남도 수목원에서 채취하여 깨끗이 씻은 후 세절하여, 80% 메탄올 용액으로 수욕상에서 환류냉각하에 3시간동안 3회 추출하여 감압농축 및 동결건조하여 엑스를 제조하고 이를 API-1이라 하였다. API-1 26 g을 물 250 ml에 현탁시킨 후, 동량의 핵산, 디칼로

르메탄(DMF), 에틸아세테이트(EAF), 부타놀(BUF) 순으로 3~4회 추출하고 마지막 물층(WAF) 등을 완전히 감압 농축하고 동결건조 하였다. 분획된 양은 용매 순서에 따라 1.68 g, 0.34 g, 1.32 g, 4.56 g 이었고 마지막으로 물층에 13.7 g을 얻었다. 위 시료들은 실험에 사용할때까지 -20°C의 냉장고에 보관하였다.

Transfection and CAT assay

c-fos gene의 transcription regulation 연구를 위한 system으로는 rat의 c-fos gene의 5' flanking region (-454/+40)을 cloning하여 reporter gene인 CAT (chloramphenicol acetyl transferase) gene과 연결한 것을 사용하였다.¹⁹⁾

세포를 transfecton 하루전에 10 cm dish에 8×10⁵개의 세포를 plating하고 Schontal등의 방법에 따라 10 μg의 Plasmid를 Calcium Phosphate방법에 따라 transfection하였다.⁴⁾ Cell culture상의 세포에 plasmid를 transfection시키고, 처치한 세포를 4°C PBS로 2번 씻고, 0.25 M Tris buffer(pH 7.8)에 수확한 후, dry ice/ethanol bath에서 세포를 3번 얼리고 녹이는 과정을 반복한 후, 13000×g로 원심분리하고, 상등액을 취하여 protein extract를 만들었다. 단백질의 농도를 Bradford 방법으로 측정하고 100 μg의 단백질을 사용하여 CAT assay를 시행하였다. Protein 100 μg과 1.6 μl의 ¹⁴C-chloramphenicol, 6 μl 5 mg/ml butyryl-coenzyme A를 가해 반응을 시작시키고, 2시간후 250 μl Xylene으로 추출한 후 원심분리하여 Xylene층을 취하고, 이 층을 동량의 물로 추출하여 버리고 Xylene층을 liquid scintillation counter에 counting하였다.

Western Blot Analysis

Hela 세포를 4°C PBS로 씻고 RIPA buffer(50 mM Tris HCl, pH7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 100 μg/ml PMSF, 1 μg/ml aprotinin)에 lysis시켜 total protein을 제조하였다. Bradford방법을 이용하여 총 단백질의 농도를 측정하고, 각 lane마다 50 μg의 단백질을 loading하여, 8% SDS-PAGE를 행하였다. 이 gel의 protein을 PVDF filter에 transfer하고, c-Fos 또는 c-Jun rabbit polyclonal antibody와 HRP-conjugated secondary antibody를 붙이고, ECL system을 사

용하여 detection하였다.

[³H-methyl]-thymidine Uptake 측정

C6 세포를 24-well plate에 5×10^4 cells/well의 농도로 희석하여 seeding하고, 24시간이 지난 후에 $1 \mu\text{Ci/well}$ 의 [³H-methyl]-thymidine과 추출물을 가하고 24시간 더 배양하였다. 배지를 제거하고, methanol로 10분간 고정한 후 PBS로 2회 세척하였다. 10% trichloroacetic acid(TCA)로 2회 씻고, 0.2N NaOH 용액으로 가수분해 하여, Liquid scintillation counter로 측정하였다.

Nuclear Extract Preparation 및 electrophoretic mobility-shift assay

Hela 세포의 nuclear extract 준비 및 electrophoretic mobility-shift assay는 Jonat등¹²⁾의 방법에 따라 실험하였다. 4°C PBS로 2번 씻고 cell-lysis buffer(10 mM Hepes.KOH pH 7.9, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) 100 μl 를 가하고 얼음에 5분 방치 하였다. $1000 \times g$ 로 원심분리후, 핵을 NP-40이 없는 위의 cell-lysis buffer로 씻고, 100 μl 의 nuclear buffer(250 mM Tris pH 7.5, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF)를 가한 후, dry ice/ethanol bath에 3번 얼리고 녹이는 과정을 반복하여 핵을 쪼갬다. 그 후 $13000 \times g$ 로 15분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. TRE oligonucleotide(CGCTTGA-TGAGTCAGCCGAA)를 T4-polynucleotide kinase와 γ -(³²P)-ATP를 사용하여 labelling 하고, 40,000 cpm의 표지된 TRE oligonucleotide와 5 μg 의 nuclear extract를 가하여 상온에서 20분간 반응 시켰다. 이 반응물을 4% polyacrylamide gel에 loading하고 0.25 \times TBE buffer로 전기영동하고, autoradiography하였다.

결과 및 고찰

c-Fos protein 발현의 억제

PMA는 PKC activator로 c-fos gene의 강력한 expression inducer이다.²⁰⁾ API-1이 PMA에 의한 c-Fos 발현의 억제 가능성을 실험하기 위하여 API-1을 농도별로 Hela 세포에 가하고 16시간 동안 전처리 하

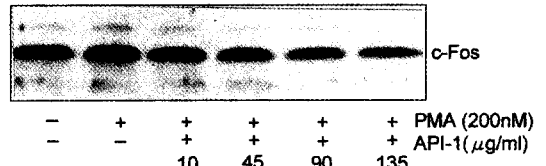


Fig. 1— Effect of API-1 on PMA-induced c-Fos expression. Hela cells were incubated for 24h with or without the various indicated concentration of API-1 and then in indicated lane PMA (200 nM) was added and followed by additional 3h incubation. The cells were harvested and performed Western blot analysis on whole cell lysates (50 $\mu\text{g/lane}$) with polyclonal c-Fos antibody.

였다. 여기에 PMA를 200 nM로 가하고 3시간 후에 cell extract를 만들어 50 μg 의 단백질을 loading하고, c-Fos antibody를 사용하여 western blotting하였다 (Fig. 1). PMA만을 처리하였을 경우 c-Fos의 발현이 증가하였다. API-1의 농도를 10, 45, 90, 135 $\mu\text{g/ml}$ 로 증가함에 따라 c-Fos의 PMA에 의한 induction이 점차적으로 줄어들었다. 뿐만 아니라 45 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서는 PMA에 의하여 induction된 c-Fos뿐만 아니라 basal level도 inhibition되는 결과를 보여주었다. 그러나 일반적으로 암 세포에서는 AP-1 activity가 높다고 보고되고 있고, 세포분열이 느린 정상 세포에서는 c-fos의 expression이 매우 낮다는 보고가 있다. 따라서 API-1이 암세포에서만 c-fos의 발현을 억제한다고 볼 수는 없고 다만 정상세포에서는 억제의 정도가 낮을 것이라고 추측된다.

c-fos gene transcription 억제

API-1이 c-fos gene의 transcription inhibition 여부를 실험하기 위하여 pfosCAT을 사용하여 실험하였다. 이를 Hela cell에 transfection시키고, API-1을 15, 30, 60 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 24시간동안 처리하였다. 100 μg 의 단백질로 CAT assay를 시행하여 상대적인 CAT activity를 Fig. 2에 나타내었다. 15 $\mu\text{g/ml}$ 에서 CAT activity가 억제되기 시작하여 60 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 거의 empty vector level까지 activity가 억제 되어 ID₅₀는 약 22 $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 이러한 억제 작용이 API-1의 세포 독성에 의한 결과인지는 분명하지 않다. Doxorubicin같은 항암제들은 세포 독성이 있음에도 불구하고 오히려 Hela cell에서 c-fos transcription을 induction한다는 보고²²⁾가 있음을 고려하면 세포독성

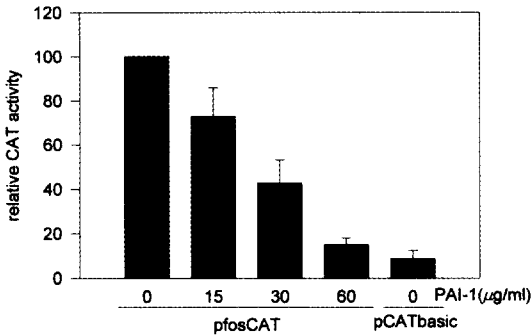


Fig. 2—Dose dependent effect of API-1 on *c-fos* transcription. Hela cells were transfected with 10 μg/dish pfosCAT reporter plasmid and then incubated for 24h with or without the various concentration of API-1. The cells were harvested and analysed for CAT activity with 100 μg total protein. pCAT basic indicates a empty vector for pfosCAT lasmid.

이 반드시 *c-fos* transcription 억제를 유도하지는 않는 것으로 보여진다.

API-1 추출물의 분획물에 의한 효과

API-1의 성분들을 용매의 극성에 따라 분획한, 디클로르메탄 (DMF), 에틸아세테이트 (EAF), 부타놀 (BUF), 물층 (WAF)의 *c-fos* transcription에 미치는 영향을 측정 하였다. pfosCAT를 SK-HEP-1 cell에

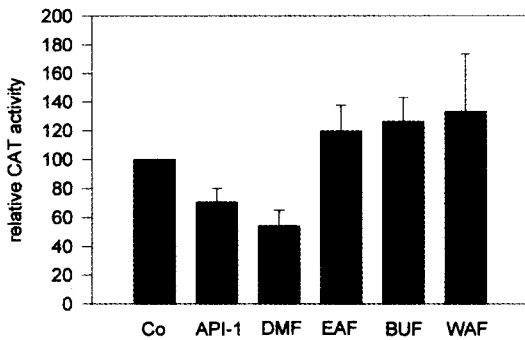


Fig. 3—Effect of fractions of Pini Folium extract on *c-fos* transcription in SK-HEP-1 cells. SK-HEP-1 cells were transfected with 10 μg/dish pfosCAT reporter plasmid and then incubated for 24h with or without Pini Folium fractions. The cells were harvested and analysed for CAT activity with 100 μg total protein prepared as described in materials and methods. Abbreviation: Co: control, DMF: dichloromethane fraction, EAF: ethylacetate fraction, BUF: buthanol fraction, WAF: water fraction.

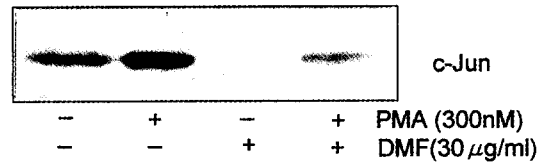


Fig. 4—Effect of DMF on PMA-induced *c-Jun* expression. Hela cells were incubated for 24h with or without 30 μg/ml DMF and then in indicated lane PMA (300 nM) was added and followed by additional 3h incubation. The cells were harvested and performed Western blot analysis on whole cell lysates (50 μg/lane) with polyclonal *c-Jun* antibody.

transfection시키고, 각각 30 μg/ml의 농도로 24시간 처치한 후, CAT assay를 시행 하였다(Fig. 3). Hela 세포와 같이 SK-HEP-1세포에서도 API-1이 억제 작용을 보였다. 디클로르메탄 분획(DMF)이 *c-fos* CAT activity를 억제한 반면 에틸아세테이트층, 부타놀층, 물층 분획은 오히려 약간의 induction 작용을 나타냈다. 이 결과에 상보적으로 Hela cell에 디클로르메탄 분획물 (DMF)을 30 μg/ml 농도로 24시간 전처리 하고, PMA(300 nM)로 3시간 induction한 후, *c-Jun* antibody를 사용하여 western blotting한 경우에도 basal level뿐만 아니라 PMA-induced level도 억제 되었다 (Fig. 4).

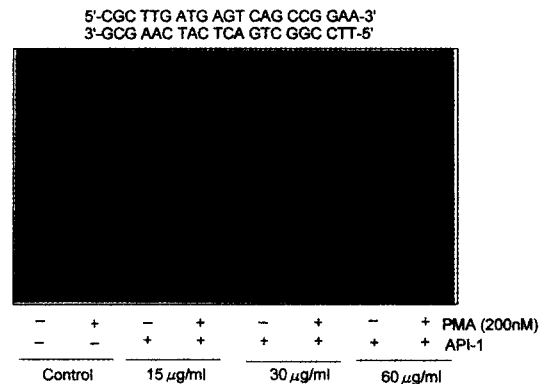


Fig. 5—Effect of API-1 on binding activity to TRE. Hela cells were incubated with or without indicated concentration of API-1 for 24h and then in indicated lane PMA (200 nM) was added and followed by additional 2h incubation. Nuclear extracts were analysed by electrophoretic mobility-shift assay using the (³²P)-labelled TRE as the probe. The TRE sequence was shown at the top of the figure.

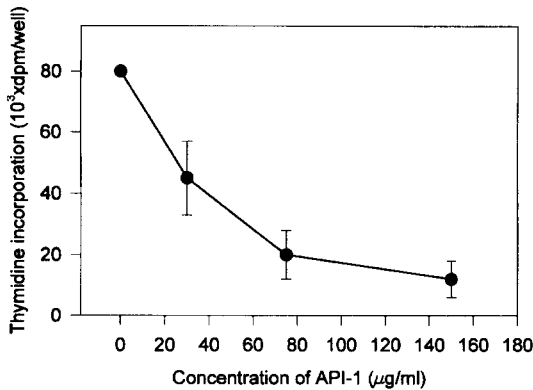


Fig. 6— Effect of API-1 on [³H-methyl]-thymidine uptake. C6 cells were incubated for 24h with or without indicated concentration of API-1 in the presence of 1 µCi/ml [³H-methyl]-thymidine and followed by additional 24h incubation. The cells were harvested and analysed for the incorporated radioactivity into TCA-insoluble materials.

TRE binding activity에 대한 효과

Hela cell에 15, 30, 60 µg/ml의 농도로 24시간 전 처치한 후, 2시간 동안 PMA 200 nM를 가한 후, nuclear extract를 만들었다. nuclear extract 5 µg과 20,000 cpm의 ³²P로 표지된 TRE oligonucleotide를 같이 반응 시킨 후에 4% polyacrylamide gel에 전기 영동한 후, autoradiography한 결과를 Fig. 5에 나타 내었다. basal level에 비하여 PMA를 가한 경우 binding activity가 증가하였다. 그리고 API-1을 15, 30, 60 µg/ml로 가한 경우 basal level의 binding activity를 증가시켰다. 그러나 PMA-induced level에는 별 영향이 없었다. API-1을 60 µg/ml로 24시간 처리 하여도 여전히 PMA에 의한 binding activity가 유도 되는 현상은 API-1이 PKC를 depletion시켜서 작용하는 것 같지는 않다.

[³H-methyl]-thymidine Uptake억제 효과

c-Fos와 c-Jun은 세포의 proliferation에 중요한 역할을 수행한다.^{5,6)} C6 rat glioma 세포주에 API-1을 50, 75, 150 µg/ml 농도로 [³H-methyl]-thymidine과 동시에 가하고 24시간 배양한 후, [³H-methyl]-thymidine의 incorporation 정도를 측정하였다. 30 µg/ml의 농도에서 약 50%정도 억제하였고, 70 µg/ml에서는 거의 100%에 가까운 activity억제를 나타 내었다. 이 결과는 API-1에 의한 AP-1의 억제에 의한 결

과일 가능성이 높다.

결 론

1. API-1은 TPA에 의한 c-Fos protein의 발현을 억제 하였다.
2. API-1은 c-fos gene의 transcription을 억제 하였다.
3. API-1 분획중 dichloromethane층이 c-fos 전사를 억제 하였고, 또한 이 분획층이 c-Jun protein의 발현을 억제 하였다.
4. API-1은 TRE binding activity는 억제하지 않았다.
5. API-1은 [³H-methyl]-thymidine uptake를 억제 하였다.

감사의 말씀

이 논문은 1997년도 아산생명과학연구소 연구비의 지원에 의하여 이루어 졌으며 이에 감사 드립니다.

문 헌

- 1) Schuermann M., Neuberger M., Hunter J. B., Jenuwein T., Ryseck R. P., Bravo R. and Muller R. : The leucine repeat motif in fos protein mediates complex formation with Jun/AP-1 and is required for transformation. *Cell* **56**, 507 (1989).
- 2) Chiu R., Boyle W. J., Meek J., Smeal T., Hunter T. and Karin M. : The c-fos protein interacts with c-jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* **54**, 541 (1988).
- 3) Morgan I. M., Ransone L. J., Bos T. J., Verma I. M. and Vogt P. K. : Transformation by Jun: requirement for leucine zipper, basic region and transactivation domain and enhancement by Fos. *Oncogene* **7**, 1119 (1992).
- 4) Schonthal A., Herrlich P., Rahmsdorf H. J. and Ponta H. : Requirement for fos gene expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phobol esters. *Cell* **54**, 325 (1988).
- 5) Murakami Y., Satake M., Yamaguchi-Iwai Y.,

- Sakai M., Muramatsu M. and Ito Y. : The nuclear protooncogenes *c-jun* and *c-fos* as regulators of DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3947 (1991).
- 6) Kovary K. and Bravo R. : The Jun and Fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblast. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 4466 (1991).
- 7) Hagemeyer B. M., Angel P. and van Dam H. : Modulation of AP-1/ATF transcription factor activity by the adenovirus-E1A oncogene products. *Bioessays* **17**, 621 (1995).
- 8) Schonthal A., Srinivas S. and Eckhart W. : Induction of *c-jun* protooncogene expression and transcription factor AP-1 activity by the polyoma virus middle-sized tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4972 (1992).
- 9) Robbins P. D., Horowitz J. M. and Mulligan R. C. : Negative regulation of human *c-fos* expression by the retinoblastoma gene product. *Nature* **346**, 668 (1990).
- 10) Saez, E., Rutberg, S. E., Mueller, E., Oppenheim, H., Smoluk, J., Yuspa, S. H. and Spiegelman B. M. : *c-fos* is required for malignant progression of skin tumors. *Cell* **82**, 721 (1995).
- 11) Jonat, C., Rahmsdorf, H., Park, K.-K., Cato, A. B. C., Gebel, S., Ponta, H. and Herrlich, P. : Antitumor promotion and anti-inflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* **62**, 1189 (1990).
- 12) Kerppola T. K., Luk D. and Curran T. (1993) Fos is a preferential target of glucocorticoid receptor inhibition of AP-1 activity in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 3782 (1993).
- 13) Soprano D. R., Chen L. X., Wu, S., Donigan A. M., Borghaei R. C. and Soprano K. J. : Overexpression of both RAR and RXR restores AP-1 repression in ovarian adenocarcinoma cells resistant to retinoic acid-dependent growth inhibition. *Oncogene* **12**, 577 (1996).
- 14) Allenby G. : The ying-yang of RAR and AP-1: cancer treatment without overt toxicity. *Human & Exp. Toxic.* **14**(2), 226 (1995).
- 15) Saunders D. E., Christensen C., Williams J. R., Wappler N. L., Lawrence W. D., Malone J. M., Malviya V. K., and Deppe G. : Inhibition of breast and ovarian carcinoma cell growth by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 combined with retinoic acid or dexamethasone. *Anti-Cancer Drugs* **6**, 562 (1995).
- 16) Talmage D. A. and Listerud M. : Retinoic acid suppresses polyoma virus transformation by inhibiting transcription of the *c-fos* proto-oncogene. *Oncogene* **9**, 3557 (1994).
- 17) Li J. J., Dong Z., Dawson M. I. and Colburn N. H. : Inhibition of tumor promoter-induced transformation by retinoids that transrepress AP-1 without transactivating retinoic acid response element. *Cancer Res.* **56**, 483 (1996).
- 18) 정보섭외 : 향약(생약)대사전, 영림사, 서울, p 106 (1989).
- 19) Park, K.-K, unpublished results.
- 20) Janknecht R. Cahill M. A. and Nordheim A. : Signal integration at the *c-fos* promoter. *Carcinogenesis* **16**, 443 (1995).
- 21) Lamph W. W., Wamsley P., Sassone-Corse P. and Verma I. M. : Induction of proto-oncogene Jun/AP-1 by serum and TPA. *Nature* **334**, 629 (1988).
- 22) Doxorubicine-induced Id2A gene transcription is targeted at an activating transcription factor/cyclic AMP response element motif through novel mechanism involving protein kinases distinct from protein kinase C and protein kinase A. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 6386 (1995).