

# 乾漆이 위암세포의 활성, 세포사멸 및 세포주기 관련 유전자 발현에 미치는 영향

안진영 · 고성규<sup>1</sup> · 고 흥\*

세명대학교 한의과대학 내과학교실, 1: 경희대학교 한의과대학 예방의학교실

## Effects of *Rhus verniciflua Stokes* Extract on Cell Viability, Cell Cycle Progression and Apoptosis of AGS Cell

Jin Yeong An, Seong Gyu Ko<sup>1</sup>, Heung Ko\*

*Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Semyung University.  
1: Department of Preventive Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University*

The *Rhus verniciflua Stokes* (乾漆-RVS) has been used in traditional East Asia medicine for the therapy of gastritis, stomach cancer, although the mechanism for the biological activity is unclear. In the present study aims to investigate RVS extract contributes to growth inhibitory effect and it's the molecular mechanism on the human gastric cancer cells. AGS (gastric cancer cells) and RIE1 (normal cells) were treated to different concentrations and periods of RVS extract (10 ~ 100 ug/ml). Growth inhibitory effect was analyzed by measuring FACS study and MTS assay. Cell cycle inhibition was confirmed by measuring CDK2 kinase activity by immunoprecipitation and kinase assay. And apoptosis was confirmed by surveying caspase cascades activation using a pan caspase inhibitor. Exposure to RVS extract (50 ug/ml) resulted in a synergistic inhibitory effect on cell growth in AGS cells. Growth inhibition was related with the inhibition of proliferation and induction of apoptosis. The extract induces G1-cell cycle arrest through the regulation of cyclins, the induction of p27Kip1, and the decrease CDK2 kinase activity. And upregulated p27Kip1 level is caused by protein stability increment by the reduction of S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2), a key molecule related with p27Kip1 ubiquitination and degradation, and de novo protein synthesis. Besides, 乾漆 extract induces apoptosis through the expression of Bax, poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and activation of caspase-3. RVS extract induces G1-cell cycle arrest via accumulation of p27Kip1 and apoptosis in human gastric cancer cells but not in normal cells, therefore we suggest that the extract can be used as a novel class of anti-cancer drugs.

**Key words :** 乾漆(*Rhus verniciflua Stokes*-RVS), apoptosis, cell cycle, G1 arrest, p27kip

### 서 론

우리나라 2004년 통계청 보고에 따르면 사망원인의 첫 번째는 암이며, 전체 암중에서 위암은 10년 전에 비하여 감소되고 있지만 폐암 다음으로 가장 많이 발생한 것으로 보고되었다<sup>1)</sup>. 암 환자에서 한방치료는 항암작용을 목적으로 사용하기보다는 扶正祛邪에 중점을 두어 환자의 증후를 개선시키고 면역기능을 강화시키며 암의 전이를 차단하는 방향으로 접근되고 있다<sup>2-5)</sup>. 따라

서 항후에는 부작용은 적으면서 항암작용을 나타내는 한약물을 검색하고 개발할 필요가 있다.

乾漆(*Rhus verniciflua Stokes*)은 胃腸障礙, 난소 혹은 자궁 종양, 痛經, 瘰血과 부인의 經脈不通 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다<sup>6,7)</sup>. 최근 乾漆의 생물학적 활성효과로 항산화효과<sup>8,9)</sup>와 세포주기 억제<sup>10)</sup> 및 apoptosis를 유발<sup>11,12)</sup>한다는 보고가 있다. 그러나 乾漆이 human 세포에서 cell growth와 세포사멸을 유도하였다는 보고는 있지만, 구체적으로 어떠한 메커니즘을 통하여 일어나는지에 대해서는 아직 밝혀진 바가 없다.

본 연구에서는 乾漆이 위암세포에서도 세포성장 억제와 apoptosis를 유발하는지를 살펴보고 그 기전을 밝혀 보고자 하였

\* 교신저자 : 고 흥, 충북 제천시 신월동 산21-1 세명대학교 한의과대학

· E-mail : yurie99@hanmail.net, · Tel : 043-649-1876

· 접수 : 2006/02/17 · 수정 : 2006/05/25 · 채택 : 2006/06/12

다. 위암 세포주는 Gastric Cancer Cell( AGS)를 이용하였고 대조 세포로는 쥐의 장세포주 RIE1(Rat intestinal epithelial I)을 이용하였다. 위암세포의 세포성장 억제와 apoptosis를 유발시키는 현상은 MTS assay와 FACS Study 통하여 확인하였다. 乾漆의 세포 주기 억제효과와 apoptosis 유발 작용의 기전을 탐색하기 위하여 세포주기와 관련된 유전자 및 apoptosis와 연관된 유전자를 SDS-PAGE 와 Western Blotting을 통하여 확인하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 乾漆 에탄올 추출물 준비

乾漆(*Rhus verniciflua Stokes*)은 음니허브 (Youncheon, Korea)를 통하여 구입하였다. 乾漆은 총 200 g의 고운 가루 상태로 만들었다. 가루 상태인 건물을 ultra-sonicator (Branson, U.S.A.)를 이용하여 약 30분간 3번, 80% ethanol (Technical reagent, 18L, Duksan pharmaceutical Co. Ltd. Korea) (v/v)로 추출하였다. 이 알코올 용액상태인 추출물을 60°C에서 농축시키고 동결건조를 하였다. 수율은 14.87g (7.41 %)이었다. 동결건조 시켜 얻은 추출물은 RPMI 1640 medium에 100 mg/ml로 녹인 후, 1분간 vortexing하고, 37°C shaking incubator에서 over night 시킨다. 그 다음 12,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 insoluble ingredients를 제거한다. supernatant는 0.22 uM filter로 여과하여 최종 처리 농도로 RPMI 1640 medium에 희석시켰다.

### 2. 세포주 준비와 시약 처리

인간 위암 세포주 AGS와 쥐의 장세포주 RIE1는 미국 세포 주은행 (American Type Culture Collection)을 통하여 구입하였으며, AGS는 RPMI 1640 배지에 RIE1는 DMEM (Gibco)배지에 10% (v/v) 혈청 (heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco BRL)) 과 1% 항생제 (penicillin-streptomycin, (Gibco BRL))를 넣어 5% CO<sub>2</sub> 가 든 37°C humidified incubator에 키웠다. 각 실험에 사용된 세포는 80% 정도의 밀도로 준비하였다.

### 3. 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정 실험을 하기 위해서 AGS 세포(104 cell/100 µl)를 96-well tissue culture plate에 분주한 다음 24시간 동안 안정화시켰다. 원하는 시간만큼 乾漆을 처리한 다음 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS가 든 용액을 20 µl/100 µl 첨가하였다. 37°C에서 2시간 동안 반응을 시킨 다음 생성된 formazan을 ELISA reader (Molecular devices Palo Alto, CA)를 이용하여 490nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### 4. Flow cytometric cell cycle과 DNA content analysis

AGS 세포를 (5 X 10<sup>5</sup> cells ) 60 mm dishes에 깐 다음 24시간 동안 안정화시켰다. 다양한 농도의 乾漆을 처리한 다음 0, 48시간 후에 detached 와 adherent cells 을 모두 모아 3 ml of 95%

ethanol (0.5% BSA 첨가)로 고정시켰다. 72시간까지 샘플이 모아질 때까지 샘플은 -20°C에 보관하였다. Cells pellet을 ice-cold PBS로 두 번 wash 한 다음 10 mg/ml RNase A (Sigma)를 처리하고 37°C incubator에서 15 분간 반응시켰다. 마지막으로 10 mg/ml propidium iodide (PI)로 염색한 다음 어두운 상태로 보관한다. 세포 주기는 FACStar flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA)와 ModFit LT V2.0 software를 이용하여 분석하였다.

### 5. SDS-PAGE와 Western blot analysis

AGS 세포를 (1.5X10<sup>6</sup> cells ) 100 mm dishes에 깐 다음 24시간 동안 안정화시켰다. 다양한 농도의 乾漆을 처리한 다음 24, 48, 72 시간 후에 detached 와 adherent cells 을 모두 모은 후 ice-cold PBS로 두 번 세척하였다. 각 시간별로 모아진 cell pellet을 lysis buffer를 이용하여 단백질만을 분리하였다. 단백질 정량은 Bio-Rad protein assay kit을 사용하였으며, SDS-PAGE 시 동량의 단백질을 loading하여 분리한 후 nitrocellulose membrane으로 옮겼다. 그 후 phosphate - buffered saline(PBS)-0.1% tween 20 containing 1% skim milk로 blocking 1시간 후 membrane을 다양한 1차 항체 - PARP, procaspase-3, cleaved-caspase-3, procaspase-9, pRb/p105, p107, cyclin A, cyclin B1, cyclin D1, cyclin E, Bcl-Xs/l, Bax, Bcl-2, p27, p16, Skp2, p53, p21 (santa-cruz)을 4°C overnight으로 반응시켰다. 0.1% Tween 200 포함된 PBS로 세척하고 1차 항체를 HRP-conjugated secondary antibodies와 1:1,000으로 1시간 정도 반응시켰다. Chemiluminescence detection system (Amersham - Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)을 사용하여 X-ray film으로 결과를 확인하였다.

실험에 사용한 억제제(inhibitors) cycloheximide (CHX, 10ug/ml, Sigma), z-VAD-fmk (50 µM, Calbiochem)는 1시간 전에 전 처리한 다음 乾漆 추출물을 처리하여 SDS-PAGE와 Western blot analysis를 수행하였다.

### 6. RNA extraction과 Northern blot analysis

Total RNA는 kit를 이용하여 분리하였다. AGS 세포를 (1.5 X 10<sup>6</sup> cells ) 100 mm dishes에 분주한 다음 24시간 동안 안정화시켰다. 다양한 농도의 乾漆 추출물을 처리한 다음 24, 48, 72 시간 후에 detached 와 adherent cells 을 모두 모은 후, ice-cold PBS로 두 번 세척하였다. 각 시간별로 모아진 cell pellet을 용해시켰다. RNA 정량은 spectrophotometer를 이용하여 260 nm (A260)로 읽었다. 동량의 RNA를 1.2% agarose-6% formaldehyde gel에 loading하고 분리시킨 후, nylon membrane (S & S)으로 RNA를 transfer하였다. 그 후 radiolabeled p27Kip1 cDNA fragment probes와 hybridization 시켰다.

### 7. Immunoprecipitation과 Kinase assays

CDK2 와 cyclin E-associated H1 histone kinase activity는 다음과 같이 측정하였다. 200ug의 단백질과 2ug CDK2 항체와

immunoprecipitation을 통하여 immune complex를 형성시킨 다음 protein A 또는 G beads와 반응시켰다. CDK2 와 cyclin E - associated H1 histone kinase는 immune complex beads에 30 $\mu$ l 의 kinase reaction [3  $\mu$ l (3 ug) of histone H1, 0.6  $\mu$ l (5 uCi) of  $\gamma$ -[32P]ATP, 0.6  $\mu$ l of 20 uM ATP and 25.5  $\mu$ l of kinase buffer] buffer를 넣어 30°C에서 20분간 반응시켰다. 5X sample buffer를 넣어 반응을 종결시키고, 12% SDS-PAGE로 분리하였다. 젤을 건조시킨 다음, X-ray film으로 감광시켜 결과를 확인하였다.

## 결 과

### 1. 위암세포주 AGS의 세포증식에 미치는 영향.

MTS assay를 수행한 결과 乾漆 추출물은 농도 의존적으로 세포증식을 감소시켰으며, IC 50 농도는 50  $\mu$ g/ml이었다(Fig. 1). 대조군인 RIE1 세포에서는 세포증식 감소가 나타나지 않았다.

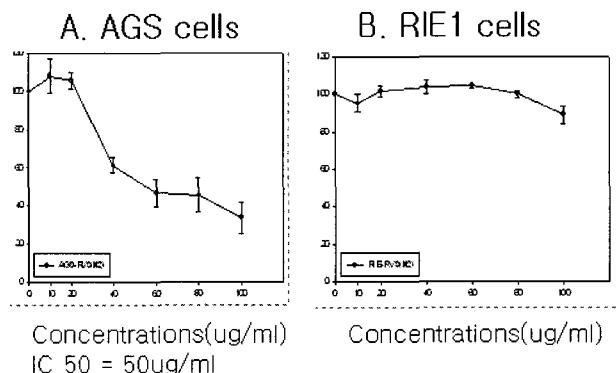
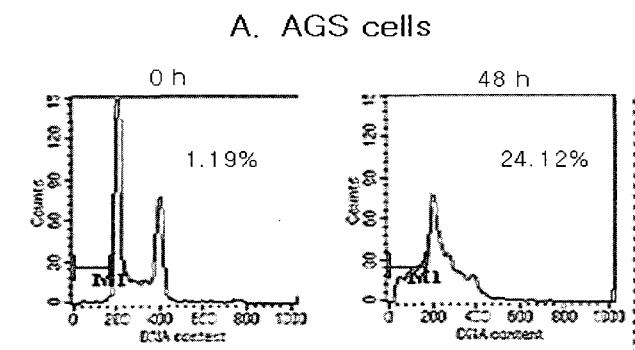


Fig. 1. Effects by treatment of *Rhus verniciflua Stokes* (RVS) on gastric cancer AGS cells. Cell growth inhibition of AGS cells by the RVS extract. AGS and RIE1 cells were treated with 10 ~ 100  $\mu$ g/ml the RVS extract for 72 hours. And cell viability was measured by the MTS assay. Data were shown as the mean of three independent experiments (error bars were shown in mean  $\pm$  standard deviation (SD)).

### 2. AGS의 apoptosis에 미치는 영향.

乾漆 추출물 50  $\mu$ g/ml 농도로 위암 세포 AGS에 0, 48시간 동안 처리한 후, DNA contents를 분석한 결과 0 시간(1.19 %)에 비하여 24.12 %의 apoptotic sub-G1 fraction이 나타났다. 대조군으로 설정한 RIE1에서는 3.2 %의 apoptotic sub-G1 fraction이 나타났다(Fig. 2).



### B. RIE1 cells

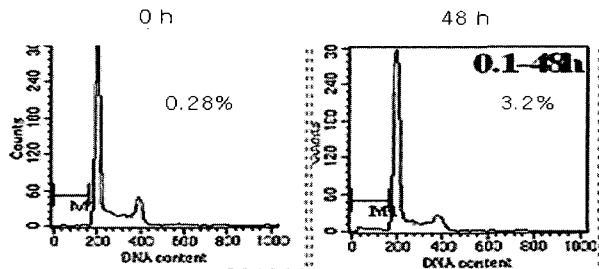


Fig. 2. *Rhus verniciflua Stokes* (RVS) extract induces apoptosis in gastric cancer AGS cells. RVS extract induced sub-G1 population. Cell cycle distribution was analyzed using a FACStar flow cytometer (Becton Dickinson). percentages of sub-G1 phase cells which were determined based on DNA content histogram

### 3. Caspase 3를 통하여 apoptosis에 미치는 영향.

乾漆 추출물에 의해 procaspase-3의 cleavage와 caspase-3 activation이 증가하였으며, caspase-3의 기질인 PARP가 degradation 되었는데 72시간에서 가장 두드러졌다. Bcl-2 와 Bcl-XL는 시간 의존적으로 서서히 감소하였고, Bax 발현은 시간 의존적으로 두드러지게 증가하였다(Fig. 3).

Caspase inhibitor인 z-VAD-fmk 를 1시간 전 처리한 후 乾漆 추출물을 처리하였을 때 PARP degradation, caspase-3 activation이 억제되었다(Fig. 4).

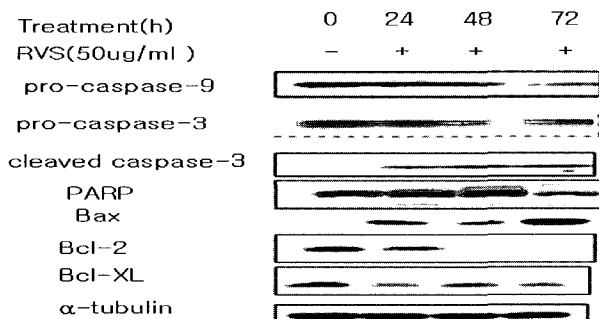


Fig. 3. Determination of apoptotic population via apoptotic markers detection. AGS cells were treated with 50  $\mu$ g/ml RVS extract for indicated periods and the resulting cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with anti-pro-caspase-9, -pro-caspase-3, -cleaved caspase-3, -PARP, -Bax, -Bcl-2, -Bcl-XL, - $\alpha$ -tubulin

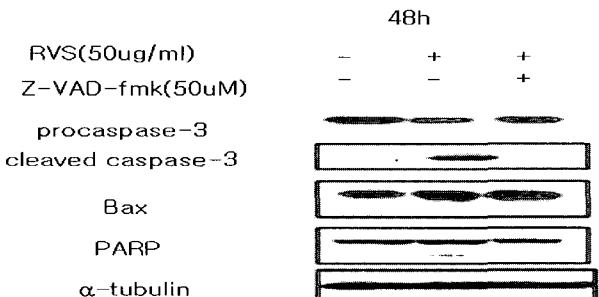


Fig. 4. Involvement of caspase-3 in RVS extract-induced apoptosis. AGS cells were pretreated with z-VAD-fmk (50  $\mu$ M) for 1 hour and then exposed to 50  $\mu$ g/ml RVS extract for 48 hours. The cellular proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with anti-pro-caspase-3, -cleaved caspase-3, -Bax, -PARP, - $\alpha$ -tubulin

#### 4. G1 cell cycle에 미치는 영향.

DNA contents를 확인하여 세포 주기를 분석한 결과, 乾漆 추출물을 처리하지 않은 세포에 비하여 처리한 세포에서는 점진적으로 G1 phase가 증가하였고 S과 G2/M phase는 급격하게 감소하였다(Fig. 5). 이러한 G1 cell cycle arrest 현상은 농도 의존적으로 나타났다.

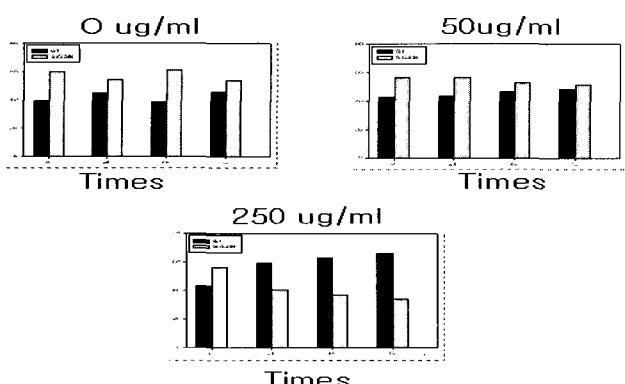


Fig. 5. *Rhus verniciflua Stokes (RVS)* extract induces G1-arrest in gastric cancer AGS cells. The population percentage of G1 and S phase from cell cycle phases were determined using DNA contents in (Fig. 1.) with viable non-sub-G1 DNA contents

#### 5. Cyclin에 미치는 영향.

乾漆 추출물을 처리하였을 때 S phase와 G2/M phase에 관련된 cyclin A, B1 단백질 발현은 시간 의존적으로 모두 점진적으로 감소하였다. 반면 G1 phase와 관련 있는 cyclin D1과 cyclin E 발현은 지속되었다(Fig. 6).

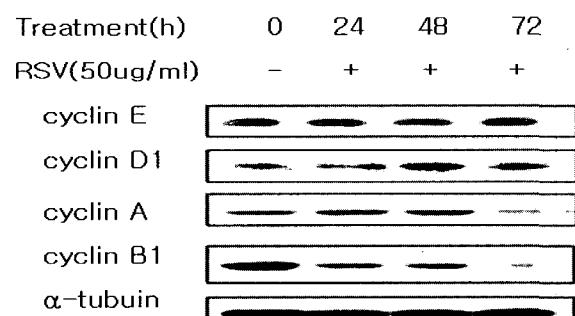


Fig. 6. Effect of G1 phase-associated regulatory proteins in gastric AGS cells treated with *Rhus verniciflua Stokes (RVS)* extract. Effects of cell cycle regulatory proteins in gastric cancer AGS cells treated with *Rhus verniciflua Stokes* extract. Treatment of RVS extract changes cell cycle related proteins expression. AGS cells were treated with 50 µg/ml RVS extract for indicated periods and the resulting cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with anti- cyclin D1, -cyclin E, cyclin A, cyclin B1, -α-tubulin

#### 6. p53과 p21 및 p27 Kip1과 p16ink4a에 미치는 영향.

G1 cell cycle arrest 현상을 확인하기 위해서 CDK1 (CDK inhibitors) 단백질의 발현 양상을 확인한 결과, p53 단백질은 발현 변화가 적지만 감소하고 그 기질인 p21Cip/WAF 단백질은 乾漆 추출물을 처리한 후 48시간부터 발현이 급격하게 감소되었으며 72시간에서는 거의 발현되지 않았다. p27Kip1 단백질은

p21 단백질 발현과 반대로 48시간부터 증가하여 72시간에는 약 4배 정도 발현이 증가하였으며 p16INK4a 단백질 발현도 증가하였다(Fig. 7).

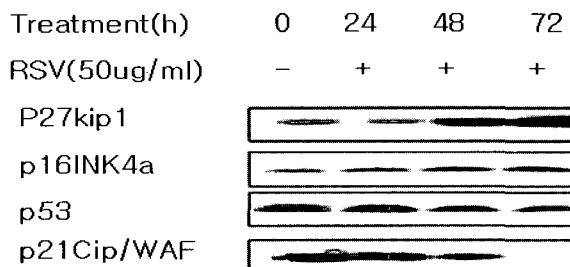


Fig. 7. Treatment of *Rhus verniciflua Stokes (RVS)* extract changes G1 cell cycle related proteins expression. AGS cells were treated with 50 µg/ml RVS extract for indicated periods and the resulting cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with anti- p27Kip1, -p16INK4a, -p53, -p21Cip/WAF

#### 7. p27Kip1 protein 발현에 미치는 영향.

乾漆 추출물은 시간 의존적으로 Histone H1에 association되는 CDK2 kinase activity를 감소시켰다. CDK2 항체와 immuno- precipitated된 complexes와 결합하는 p27Kip1 단백질의 양도 72시간에서 증가하였다 (Fig. 8).

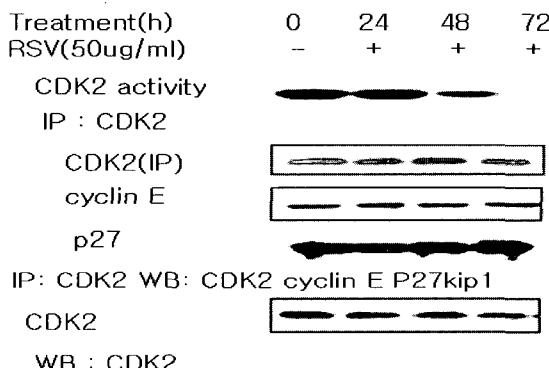


Fig. 8. Effect of p27Kip1 induction by *Rhus verniciflua Stokes (RVS)* extract on kinase activity of CDK2 associated with cyclin E in gastric AGS cells. Treatment of RVS extract significantly decreased the histone H1-associated kinase activity of CDK2 in a time-dependent manner. The complexes immunoprecipitated with anti-CDK2 antibody and then CDK2 kinase assay on histone H1 was done by incubating the immune complex beads with kinase reaction buffer. Samples were analyzed by SDS-PAGE, and the gels were dried and then subjected to autoradiography. The complexes immunoprecipitated with anti-CDK2 antibody exhibited higher amounts of immunodetectable p27Kip1 protein from RVS extract-treated cells in a time dependent manner (WB : CDK2-cyclin E).

#### 8. pRb와 p107 단백질의 인산화에 미치는 영향.

Rb family 단백질의 phosphorylation 여부를 확인한 결과 CDK2 kinase의 활성이 억제되는 것과 일치하게 pRb와 p107 단백질의 hyperphosphorylated form이 감소하였다(Fig. 9).

#### 9. Skp2 단백질 발현에 미치는 영향.

乾漆 추출물은 p27Kip1 단백질을 분해시키는 Skp2 단백질의 발현을 현저하게 감소시켰다(Fig. 10).

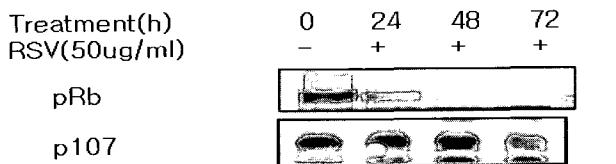


Fig. 9. *Rhus verniciflua Stokes* (RVS) extract decreased hyperphosphorylated levels of pRb. AGS cells were treated 50  $\mu$ g/ml RVS extract. The cellular proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with anti-pRb, -p107.

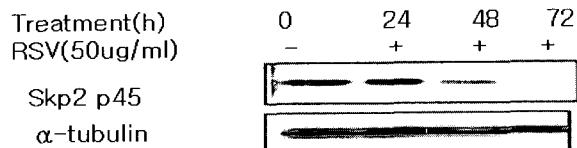


Fig. 10. Treatment of *Rhus verniciflua Stokes* (RVS) extract reduced Skp2 protein. AGS cells were treated with 50  $\mu$ g/ml RVS extract for indicated periods and the resulting cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with anti-Skp2, - $\alpha$ -tubulin.

10. Cycloheximide 전 처리 후 p27Kip1 단백질 발현에 미치는 영향.

p27Kip1 단백질 발현에 영향을 미치는 요인을 찾기 위하여, 단백질 합성 억제제인 cycloheximide(CHX)을 전 처리한 경우와 乾漆 추출물만을 투여한 경우에서 CHX를 전 처리한 세포에서 p27Kip1 단백질 발현이 억제되었다(Fig. 11).

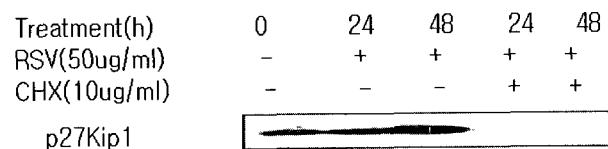


Fig. 11. p27Kip1protein induction by *Rhus verniciflua Stokes* (RVS) extract is also regulated at protein synthesis process. AGS cells were pretreated with 10  $\mu$ g/ml cycloheximide (CHX) for 1hour and then exposed to 50  $\mu$ g/ml RVS extract for 48 hours.

11. p27Kip1의 mRNA 발현에 미치는 영향.

p27Kip1 단백질의 발현 양이 전사 수준에서 조절되는 것인지를 확인하기 위하여 northern blotting 실험을 수행하여 mRNA 양을 측정하였다. 추출물을 처리하였을 때 p27Kip1 단백질의 mRNA 양이 변함이 없었다(Fig. 12).

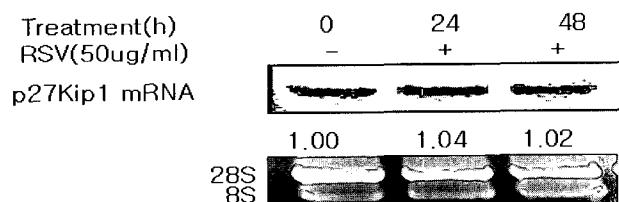


Fig. 12. *Rhus verniciflua Stokes* (RVS) extract maintains constantly p27Kip1 mRNA expression. AGS cells were treated with 50  $\mu$ g/ml RVS extract for indicated periods and the total mRNA were analyzed by Electrophoresis and Northern blotting with radiolabeled probes for p27Kip1 cDNA fragment for RNA expression. The relative band intensities of p27Kip1 mRNA were quantified by determining radioactivity using Fuji FLA2000 and image analysis software (image Gauge, Version 2.12 & TINA, Version 2.0)

## 고찰

乾漆(*Rhus verniciflua Stokes*- RVS)은 위장장애, 난소 혹은 자궁에 종양이 생겼을 때, 또는 痛經, 瘀血과 經脈不通 등에 효과가 큰 것으로 알려져 있다<sup>6,7)</sup>. 최근 乾漆의 다양한 생물학적 활성이 밝혀져 hydroxyl radical에 대해 항산화 효과를 가지며<sup>8,9)</sup>, human cancer cell lines에서 anti-proliferative activity<sup>10)</sup>, human lymphoma cell line에서는 apoptosis를 유발하는 것으로<sup>11,12)</sup> 보고 되었다. 그러나 乾漆이 사람세포에서 cell growth와 세포사멸을 유도하였다는 보고는 있지만, 구체적으로 어떠한 메커니즘을 통하여 일어나는지에 대해서는 아직까지 밝혀진 바가 없다.

AGS 위암 세포주에 대하여 乾漆이 항암 활성을 가지는지에 초점을 맞추는 실험으로 MTS assay를 농도별로 72시간 동안 AGS 세포주에 처리하였을 때, 농도 의존적으로 cell proliferation이 감소하였다 (Fig. 1). IC 50 농도는 약 50  $\mu$ g/ml로 나타났다. 이러한 결과는 human T cell과 B lymphoma cell에서도 이와 유사한 결과가 보고<sup>11,12)</sup>되었지만, 본 실험에서 정상 세포주인 RIE1에서는 100  $\mu$ g/ml을 처리하였을 때도 92 % 정도의 viability를 나타내며 cell growth inhibition이 거의 일어나지 않았다.

乾漆 추출물에 의한 위암 세포주 AGS의 세포 성장 억제가 세포독성 때문인지를 확인하기 위하여 Flow cytometric cell sorter로 DNA contents를 분석하였다. 乾漆 추출물을 50 $\mu$ g/ml 농도로 0, 48시간 동안 처리한 후 DNA contents를 분석한 결과, 0 시간(1.19 %)에 비하여 24.12 %의 apoptotic sub-G1 fraction이 나타나 약 20배 이상으로 DNA에 damage를 입은 것을 확인하였다 (Fig. 2). RIE1에서는 3.2 % 정도의 apoptotic sub-G1 fraction이 나타났다. 이러한 결과는 乾漆 추출물은 AGS 위암 세포주에만 세포독성을 유발한다는 것을 암시한다.

Programmed cell death (apoptosis)는 조직의 항상성이나 발생 과정에서 세포에 원치 않는 자극이나 위협이 가해질 때 개체를 보호하기 위해 진화적으로 생겨난 과정이라고 알려져 왔다<sup>13-15)</sup>. 세포사멸 메커니즘의 핵심 요소는 caspases라는 proteolytic system이며, caspase-8 와 caspase-9와 같은 upstream initiator caspases는 다른 downstream effector caspases: caspase-3, -6 와 -7들을 활성화시킨다. 그 중 caspase-3의 활성은 세포사멸 과정에서 핵심적인 역할을 하며 세포 내 많은 단백질-poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), gelsolin, Rb 와 (-catenin 16,17) 등을 분해시킨다. Caspase와 더불어 세포사멸 과정에서 Bcl-2 family protein 역시 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Bcl-2 family protein은 Bcl-2 와 Bcl-XL 같은 anti-apoptotic members와 Bax 와 Bak 같은 pro-apoptotic members가 있다. 이 단백질들은 생사의 세포운명을 결정하는데 checkpoints와 같은 역할을 한다<sup>18,19)</sup>.

乾漆 추출물에 의한 cell proliferation 감소와 sub-G1 fraction 증가가 apoptotic cell death를 유발하는지 확인하기 위한 실험을 진행하였다. Caspase-3와 같은 caspases는 세포사멸 신호를 받았을 때, 세포 내에서 세포 사멸을 진행하는 가장 주요한 역할을 한다<sup>16,17)</sup>. 따라서 procaspase와 proteolytic processing 과정을 거친 cleaved caspase가 활성화되었는지 western blotting

실험을 통하여 확인하였다. 乾漆 추출물을 50ug/ml로 처리하고 시간대별로 (24, 48, 72 시간)로 sample을 획득하여 SDS-PAGE 후 Western blotting을 수행한 결과, procaspase-3의 cleavage와 caspase-3 activation이 일어나며 caspase-3의 기질인 poly ( ADP - ribose ) polymerase (PARP)가 degradation되었다. PARP cleavage는 24시간째부터 일어나지만 72시간 째 가장 두드러지게 나타났다(Fig. 3). 또한 세포 사멸 과정에서 두드러진 변화를 보이는 Bcl-2 family protein의 level 변화를 확인하였다. Bcl-2 와 Bcl-XI와 같은 anti-apoptotic members<sup>16)</sup>는 시간 의존적으로 서서히 감소하였고 pro-apoptotic members인 Bax 발현은 시간 의존적으로 두드러지게 증가하였고 72시간에 최고를 나타내었다. 이러한 결과는 乾漆 추출물은 위암세포주 AGS에서 세포독성을 나타내며 이러한 세포독성은 세포사멸에서 유발된다고 볼 수 있다.

또한 AGS cells에 caspase inhibitor인 z-VAD-fmk 를 1시간 전 처리한 후 乾漆 추출물을 처리하였을 때 PARP degradation, caspase-3 activation이 현저히 억제되었다(Fig. 4), 이러한 결과는 乾漆 추출물에 의해 유도되는 세포사멸은 caspase activation이 결정적으로 필요하다는 것을 알 수 있다. 따라서 乾漆 추출물은 AGS 위암 세포주에서 Bax, Bcl-2 와 Bcl-XI 발현 변화와 미토콘드리아를 매개로 하는 caspase-9, -3 cascade activation을 통하여 세포사멸을 유도하는 것으로 생각된다.

세포 성장 억제는 주로 세포사멸 유도와 세포 증식억제를 통하여 일어난다. Cell cycle progression은 cyclins이 cyclin dependent kinases (CDKs)에 결합하여 cell cycle이 G1 phase에서 S phase로 다시 G2를 거쳐 mitosis가 일어나는 것으로 정의한다<sup>20)</sup>. 부적절하게 조절된 cyclin-dependent kinases (CDKs) 활성은 종종 cancer의 원인이 되기도 한다. 이러한 것을 막기 위해서 세포 내에서는 cell cyclin dependent inhibitor(CDKIs)-p21CIP/WAF과 p27Kip1 과 같은 Cip/Kip 단백질이 존재하여 세포 주기를 조절한다<sup>21,22)</sup>. 단백질은 anti-mitotic signal이나 DNA damage 등이 세포에 전달되었을 때 cyclin-CDK complexes에 결합하여 catalytic activity를 억제하고 cell cycle arrest를 일으킨다<sup>23,24)</sup>. 특히 p27Kip1 단백질은 cyclin E-CDK 2 complexes에 결합하여 G1 cell cycle arrest를 유도한다<sup>25)</sup>. P27Kip1 단백질 발현에 관한 연구는 많이 진행되어 왔는데, 그 중 posttranslational ubiquitin-mediated proteolysis system은 p27Kip1 단백질의 발현 및 분해에 관한 주요한 조절 기작으로 알려져 있다<sup>26,27)</sup>. 최근에는 SCF3-type ubiquitin ligase complex의 한 구성요소이자 p27Kip1 단백질에 targeting하는 단백질로 알려진 Skp2 와 p27Kip1 단백질에 관한 연구가 많이 진행되고 있다<sup>28,29)</sup>. Skp2 단백질의 발현은 p27Kip1 단백질의 ubiquitination과 결과적으로 분해에 필수적이라는 것이 in vitro<sup>30-36)</sup>와 Skp2 knock-out cells 실험을 통하여 증명되었다<sup>33)</sup>.

Flow cytometric cell sorter로 DNA contents를 확인하여 세포 주기를 분석하였다. 그 결과 乾漆 추출물을 처리한 세포에서는 처리하지 않은 세포에 비해서 G1 시기에서 세포주기가 정지되어 있었다. 이는 세포사멸이 일어나는 시간과 거의 동시에 일어나는 것으로 보여진다. 따라서 乾漆 추출물을 다양한 시간대별

로 처리하여 AGS 세포의 세포 주기가 어떻게 변화하는지 관찰하였다. 그 결과 乾漆 추출물을 처리하지 않은 세포에 비하여 점진적으로 G1 phase가 증가하였고, 반면에 S 과 G2/M phase는 급격하게 감소하였다(Fig. 5). 이러한 G1 cell cycle arrest 현상은 농도 의존적으로 더욱 잘 일어남을 확인하였다. 세포주기 억제현상의 기전을 살펴보자 세포 주기와 관련된 cyclins 단백질들의 발현을 비교하였다. 乾漆 추출물을 처리 하였을 때 S phase와 G2/M phase에 관련된 cyclin A, B1 단백질 발현은 시간 의존적으로 모두 점진적으로 감소하였으며 G1 phase와 관련있는 cyclin D1 과 cyclin E 발현은 지속되었다(Fig. 6). Cyclin D1 과 cyclin E의 지속적인 발현은 CIP/KIP 와 INK4 family와 같은 cyclin dependent kinase inhibitors (CDKI)가 세포 증식 억제에 관여하고 있다는 것을 암시한다. 특히, 이러한 cyclin D1와 E는 CDK2와 CDK4/6 활성에 영향을 준다. 따라서 G1 cell cycle arrest 현상을 확인하기 위해서 CDKI 단백질들의 발현 양상을 확인하였다. 주로 DNA damage에 의해 활성화되는 p53/p21 단백질과 anti-mitotic signal에 의해 활성화되는 p27Kip1, p16INK4a 단백질의 발현을 확인하였다. p53 단백질은 발현 변화가 적지만 감소하고 그 기질인 p21 단백질은 乾漆 추출물을 처리한 후 48시간부터 발현이 급격하게 감소되며 72시간째는 거의 발현되지 않았다. 반면 p27 Kip1 단백질은 p21 단백질 발현과 반대로 48시간 째부터 증가하여 72시간째는 乾漆 추출물을 처리하지 않은 세포에 비해 약 4배 정도 발현이 증가하였다(Fig. 7). 또한 p16INK4a 단백질 발현도 유도되었다. 즉 G1-cell cycle arrest에 관계하는 CDKI인 p53/p21Cip/WAF 발현은 시간 의존적으로 감소하였다. 이는 乾漆 추출물에 의한 세포주기 억제현상에는 p21Cip/WAF와 p53보다 p27Kip1단백질과 관련성이 높다고 할 수 있다.

증식이 잘 일어나는 세포에서 p27Kip1은 cyclin D-CDK4/6 복합체와 결합하게 되면, 이 복합체는 catalytically active하고 free CDK2 역시 활성화를 가져 cell cycle이 원만하게 G1에서 S phase로 잘 돌아가도록 해준다<sup>23)</sup>. 반면 세포 성장억제 신호가 오면, p27Kip1 단백질은 cyclin E-CDK2 복합체와 결합하여 그 활성을 막아 cell cycle arrest를 일으키는 것을 알려져 있는데 CDK2 kinase의 Histone H1과의 association이 감소하게 되어 cell cycle 이 G1 phase에 정체하게 된다<sup>24)</sup>.

乾漆 추출물을 처리한 AGS 세포에서 p27Kip1 단백질을 증가가 CDK2 kinase activity를 감소시키는지 알아보기 위한 실험에서, 乾漆 추출물은 시간 의존적으로 Histone H1에 association 되는 CDK2 kinase activity가 현저하게 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 8). 특히 72시간째는 Histone H1과 CDK2 kinase 사이에 association이 거의 일어나지 않았다. CDK 2 kinase 단백질에서는 변화가 거의 없었지만, kinase 활성을 乾漆 추출물 처리 후 현저하게 감소하였음을 알 수 있었다. 또한 CDK2 항체와 immunoprecipitated된 complexes와 결합하는 p27Kip1 단백질의 양도 72시간 째 현저하게 증가하였다 (Fig. 8). 즉 乾漆 추출물은 p27Kip1 단백질의 유도를 일으키고 CDK2 kinase 활성을 억제하여 G1-cell cycle arrest를 일으키는 경로를 가진다고 볼 수 있다. 다음으로 Rb family 단백질의 phosphorylation 여부를 확인하였

다. pRb, p105, p107과 같은 Rb family 단백질은 인산화를 통하여 G1에서 S phase로 cell cycle이 이동하도록 해주는 역할을 한다<sup>34-36)</sup>. CDK2 kinase의 활성이 억제되는 것과 일치하게 pRb와 p107 단백질의 hypophosphorylated form이 증가하였다(Fig. 9). Hypophosphorylated된 pRb, p107 단백질은 E2F transcription factor의 활성부위에 결합하여 세포 성장을 억제시킨다고 알려져 있다<sup>34-36)</sup>. 따라서 乾漆 추출물을 AGS세포에 G1 cell cycle arrest를 유도함을 확인하였다. 즉 pRb, o105, p107과 같은 Rb family 단백질의 hypophosphorylated level을 증가시키는 것은 E2F 전사인자의 활성을 억제하여 세포증식과 관련된 단백질로 cyclin A, cdc2, c-Myc, PCNA의 발현을 억제할 가능성이 있다<sup>37,38)</sup>.

乾漆 추출물을 AGS 세포에 처리하였을 때, p27Kip1 단백질은 현저하게 증가하는 양상을 보였다. 일반적으로 단백질의 발현은 다양한 수준 즉 전사, 번역, 번역 후 변형 과정, 인산화 등에서 조절된다. 사람의 암세포에서 p27 Kip1 단백질의 발현은 전사 후에 다양한 경로를 거쳐서 조절되는 것으로 알려져 있다<sup>37-39)</sup>.

SCF ubiquitin - proteasome proteolytic pathway는 p27 Kip1 단백질의 발현 및 분해에 관계하는 것으로 알려져 있다<sup>29)</sup>. Skp2 단백질은 이 SCF3-type ubiquitin ligase complex의 한 부분으로써, 최근에 *in vitro*에서 p27Kip1 단백질의 ubiquitination과 degradation에 아주 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고되고 있다<sup>29-31)</sup>.

p27 Kip1 단백질을 분해시키는 Skp2 단백질의 발현을 乾漆 추출물을 처리하였을 때 어떠한 변화를 보이는지 확인하였는데, p27Kip1 단백질 증가하는 때와 맞물려 현저하게 Skp2 단백질 발현 양이 감소함을 알 수 있었다(Fig. 10). 이러한 결과는 p27Kip1 단백질이 post - translational level에서 발현이 조절됨을 알 수 있다. 그리고 p27Kip1 단백질 발현에 영향을 미치는 요인을 찾기 위하여, 단백질 합성 억제제인 cycloheximide를 전 처리한 다음 乾漆 추출물을 처리하였을 때와 추출물만을 처리하였을 때의 결과 (Fig. 11)를 보면, 억제제를 전 처리한 세포에서 p27Kip1 단백질 발현이 억제되었다. 따라서 이러한 결과를 종합하여 보면 乾漆 추출물에 의한 p27Kip1 단백질의 축적은 Skp2와 같은 단백질의 발현억제로 나타나며, 이외에도 p27Kip1에 의한 CDK2-cyclin E complexes의 활성억제로, 이복합체에 의한 P27Kip1 단백질의 인산화 억제가 발생하지 않아 p27Kip1 단백질의 세포내 축적 현상이 더욱 잘 일어날 것으로 추정된다<sup>39,40)</sup>. 또한 乾漆 추출물에 의해서 새로운 단백질 발현도 일어난다(Fig. 9).

p27Kip1 단백질의 발현 양이 전사 수준에서 조절되는지 확인하기 위하여 northern blotting 실험을 수행하여 mRNA 양을 측정하였는데, p27Kip1 단백질의 mRNA 양은 변화가 없었다 (Fig.12). 이러한 결과를 볼 때, AGS세포에서 乾漆 추출물에 의한 p27Kip1 단백질의 발현 증가는 다양한 전사 후 과정에서 조절된다고 볼 수 있다.

결과적으로 upregulated p27Kip1 level은 p27Kip1 분해기작의 억제와 새로운 단백질합성으로 인한 단백질 안정화에 의한 것으로 할 수 있다. 최근에는 p27Kip1 단백질을 prognostic 과 diagnostic marker로 사용할 수 있는지에 대한 실험이 진행되고

있다. 이는 human cancers, breast, colon, gastric, lung non small cell, prostate carcinoma 등에서 p27Kip1 protein level의 감소현상이 관찰된다<sup>41)</sup>. p27Kip1 단백질을 prognostic and/or diagnostic marker로 사용할 만큼의 장점이 몇 가지 있다. 우선 p27Kip1protein은 유전자의 변이나 변형없이 단백질 발현이 유지가 되며, 세포 내에서 p27Kip1 단백질은 전사 후 다양한 조절 기작에 의해 발현이 조절된다<sup>42)</sup>. 최근에는 Skp2 단백질까지 p27Kip1 단백질의 조절 기작으로 이용할 수 있음을 볼 때<sup>43)</sup>, 乾漆 추출물을 새로운 gastric cancer drug candidate로 이용할 가치도 있다.

이번 실험에서 AGS 위암 세포주에 80% 에탄올로 추출한 乾漆 추출물은 p27Kip1 단백질의 유도에 의해 G1 cell cycle arrest 현상이 일어났다. 이러한 현상은 cyclin E-CDK2 복합체 형성 억제와 p27Kip1 단백질의 발현 및 활성을 억제하는 Skp2 단백질 발현 감소를 통하여 확인하였다. 또한 乾漆에 의한 세포사멸은 세포사멸 과정에서 핵심적인 역할을 하는 caspase cascade activation을 통하여 이루어지며 caspase inhibitor를 처리하였을 때 세포사멸이 억제되는 것을 통하여 확인하였다.

## 결 론

乾漆의 위암세포에 대한 활성작용(mechanism)에 관한 연구를 수행하였다. AGS 위암 세포주에 80% 에탄올로 추출한 乾漆을 처리하였을 때, 세포사멸과 세포주기억제 현상이 일어났다. 세포사멸 현상은 FACS study를 통한 sub-G1 population과 Western blotting을 통한 apoptotic marker-PARP, caspase cascade activation을 통하여 확인하였다. 세포주기 억제현상은 FACS study를 통하여 세포주기가 G1-cell cycle arrest를 확인하였고, p27Kip1 단백질이 세포주기조절 단계 중 G1에서 S phase로 넘어가는데 중요한 역할을 하는 cyclin E-CDK2 복합체 형성을 억제시켰다. 또한 p27Kip1 단백질의 발현 및 활성을 억제하는 Skp2 단백질 발현이 감소됨을 확인하여 乾漆에 의한 세포주기억제 현상에 p27Kip1 단백질이 핵심적인 역할을 한다는 것을 밝혔다. 따라서 향후 乾漆 추출물에서 새로운 위암치료제로 이용될 수 성분을 밝힐 수 있는 가능성을 제시하였다.

## 참 고 문 헌

1. 통계청. 2004년도 사망원인통계결과. 서울. 통계청, pp 13-15, 2005.
2. 김 병, 문 구. 위암의 동서의학적 진치개황. 대한한의학회지. 17(2):100-116, 1996.
3. 윤성우, 유봉하, 박동원, 유기원. 위암이 동의학 및 동서의 결합치료에 관한 문헌적 고찰. 대한종양학회지. 2(1):177-192, 1996.
4. 김성훈. 韓醫學界의 癌研究動向과 研究戰略에 대한 연구. 대한한의학회지. 19(1):470-499, 1998.
5. 김동희, 김성훈. 抗癌劑 및 放射線 副作用에 대한 韓方療法. 동의병리학회지. 9:239-264, 1994.
6. 안덕균. 한국본초도감. 서울. 교학사, p 729, 2003.

7. Jung, N.C. Biological activity of urushiol and flavonoids from Lac tree (*Rhus verniciflua* Stokes). Ph.D. Thesis, Chonnam National University, Kwang-ju, South Korea, 1998.
8. Lee, J.C., Kim, J., Lim, K.T., Yang, M.S. and Jang, Y.S. Ethanol eluted extract of *Rhus verniciflua* Stokes showed both antioxidant and cytotoxic effects on mouse thymocytes depending on the dose and time of the treatment. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* 34:250-258, 2001.
9. Lee, J.C., Lim, K.T. and Jang, Y.S. Identification of *Rhus verniciflua* Stokes compounds that exhibit free radical scavenging and anti-apoptotic properties. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1570:181-191, 2002.
10. Kitts, D.D., and Lim, K. TAntitumorigenic and cytotoxic properties of an ethanol extract derived from *Rhus verniciflua* Stokes (乾漆). *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A.* 64:357-371, 2001.
11. Lee, J.C., Kim, J. and Jang, Y.S. Ethanol-eluted extract of *Rhus verniciflua* stokes inhibits cell growth and induces apoptosis in human lymphoma cells. *J Biochem Mol Biol.* 4:337-343, 2003.
12. Lee, J.C., Lee, K.Y., Kim, J.N., et al. Extract from *Rhus verniciflua* Stokes is capable of inhibiting the growth of human lymphoma cells. *Food Chem Toxicol.* 9:1383-1388, 2004.
13. Meier, P., Finch, A. and Evan, G. Apoptosis in development. *Nature.* 407:796-801, 2000.
14. Jonstone, R.W. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell.* 108:153-164, 2002.
15. Green, D.R. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell.* 102:1-4, 2000.
16. Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C. et al. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: Effector of morphological change in apoptosis. *Science.* 278:294-298, 1997.
17. Nunez, G., Benedict, M.A., Hu, Y. and Inohara, N. Caspases: The proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene.* 17:3237-3245, 1998.
18. Adams, J.M. and Cory, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 281:1322-1326, 1998.
19. Atan, G., James, M.M. and Stanley, J.K. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes. Dev.* 13:1899-1911, 1999.
20. Nasmyth, K. Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science.* 274:1643-1645, 1996.
21. Sherr, C.J. and Roberts, J.M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 12:1501-1121, 1999.
22. Polyak, K., Kato, J.Y., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J.M., and Koff, A. P27 KIP1, a cyclin Cdk inhibitor, links transforming growth factor beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* 8:9-22, 1994.
23. Toyoshima, H. and Hunter, T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell.* 78:67-74, 1994.
24. Coats, S., Flanagan, M., Nourse, J., and Roberts, J.M. Requirement of p27kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science.* 272:877-880, 1996.
25. Coqueret, O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment. *Trends. Cell Biol.* 2:65-70, 2003.
26. Elledge, S.J. and Harper, J.W. The role of protein stability in the cell cycle and cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 1377:M61-M70, 1998.
27. Pagano, M., Tam, S.W., Theodoras, A.M. et al. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science (Wash. DC).* 269:682-685, 1995.
28. Schulman, B.A., Carrano, A.C., Jeffrey, P.D. et al. Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. *Nature (Lond.).* 408:381-386, 2000.
29. Carrano, A.C., Eytan, E., Hershko, A. and Pagano, M. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat. Cell Biol.* 1:193-199, 1999.
30. Sutterluty, H., Chatelain, E., Marti, A., Wirbelauer, C., Senften, M., Muller, U. and Krek, W. p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nat. Cell Biol.* 1:207-214, 1999.
31. Tsvetkov, L.M., Yeh, K.H., Lee, S.J., Sun, H. and Zhang, H. p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr. Biol.* 9:661-664, 1999.
32. Nakayama, K.I., Hatakeyama, S. and Nakayama, K. Regulation of the cell cycle at the G1-S transition by proteolysis of cyclin E and p27Kip1. *Biochem Biophys Res Commun.* 4:853-860, 2001.
33. Masuda, T.A., Inoue, H., Sonoda, H. et al. Clinical and biological significance of S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) gene expression in gastric carcinoma: modulation of malignant phenotype by Skp2 overexpression, possibly via p27 proteolysis. *Cancer Res.* 13:3819-3825, 2002.
34. Nevins, J.R. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science.* 258:424-429, 1992.
35. Flemington, E.K., Speck, S.H., and Kaelin, Jr. W.G. E2F-1-mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 90:6914-6918, 1993.
36. Helin, K., Harlow, E. and Fattaey, A.R. Inhibition of E2F-1

- transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol. Cell. Biol.* 13:6501-6508, 1993.
37. Humbert, P.O., Verona, R., Trimarchi, J.M., Rogers, C., Dandapani, S. and Lees, J.A. E2F3 is critical for normal cellular proliferation. *Genes Dev.* 14:690-703, 2000.
38. Dalton, S. Cell cycle regulation of the human cdc2 gene. *EMBO J.* 11:1797-1804, 1992.
39. Sheaff, R.J., Groudine, M., Gordon, M., Roberts, J.M. and Clurman, B.E. Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev.* 11:1464-1478, 1997.
40. Vlach, J., Hennecke, S., and Amati, B. Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *EMBO J.*, 16:5334-5344, 1997.
41. Lloyd, R.V., Erickson, L.A., Jin, L. et al. p27kip1: a multifunctional cyclin dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol.*, 2:313-323, 1999.
42. Stacy, W.B. p27 as a target for cancer therapeutics. *Cancer cell.* 3:111-115, 2003.
43. Masuda, T.A., Inoue, H., Sonoda, H. et al. Clinical and biological significance of S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) gene expression in gastric carcinoma: modulation of malignant phenotype by Skp2 overexpression, possibly via p27 proteolysis. *Cancer Res.* 13:3819-3825, 2002.