

Hep3B 간암세포에서 개똥쑥 추출물에 의한 Cell Cycle Arrest 효과

김은지¹, 김근태¹, 김보민¹, 임은경¹, 김상용², 하성호³, 김영민¹, 유제근^{1*}

Cell Cycle Arrest Effects by *Artemisia annua* Linné in Hep3B Liver Cancer Cell

Eun Ji Kim¹, Guen Tae Kim¹, Bo Min Kim¹, Eun Gyeong Lim¹, Sang Yong Kim², Sung Ho Ha³, Young Min Kim¹, and Je-Geun Yoo^{1*}

Received: 22 June 2015 / Revised: 6 August 2015 / Accepted: 17 August 2015
© 2015 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Cells proliferate via repeating process that growth and division. This process is G1, S, G2 and M four phases consists. Monitoring the progression of the cell cycle is a specific step that to be a continuous process is repeated to adjust the start of the next step. At this time, this process is called a Checkpoint. Currently, there are three known checkpoints that G1-S phase, G2-M phase, and the M phase. In this study, we confirmed that cell cycle arrest effects by ethanol extracts of *Artemisia annua* Linne (AAE) in Hep3B liver cancer cells. AAE was regulated proteins which involved in cell cycle such as pAkt, pMDM2, p53, p21, pCDK2 (T14/Y15). AAE induced cell cycle arrest in G1 checkpoint through phosphorylation of CDK2. Akt and p53 upstream is inhibited by AAE and p53 activated by non-activated pMDM2, p53 inhibitor. Thereby, activated p53 is transcript to p21 and activated p21 protein is combined with Cyclin E-pCDK2 complex. Therefore, we confirmed that AAE-induced cell cycle arrest was occurred by

p21-Cyclin E-pCDK2 complex by inhibition of pAkt signal. Because of this cell cycle can't pass to S phase from G1 phase.

Keywords: Hep3B, Cell cycle arrest, Cyclin E-Cdk2, AAE, G1 arrest

1. INTRODUCTION

간암은 원발성 간암과 전이성 간암으로 나눌 수 있으며, 이와 같이 간에 발생하는 악성종양을 모두 간암이라 하지만, 일반적으로는 원발성 간암을 말한다. 간암은 전 세계적으로 자주 발병되는 암 중의 하나로 암 사망원인 3위를 차지하고 있으며, 우리나라도 인구 10만명 당 남녀 26.9명 정도로 간암이 흔히 발생하여 세계에서 가장 높은 발생률을 보이고 있다 [1]. 또한 간암은 다른 부위 암에 비해 진행되는 속도나 예후가 불안정한 형태의 질환으로 치료와 예방에 관심이 높아지고 있다 [2].

최근 연구에 따르면 개똥쑥 (*Artemisia annua* Linné)은 국화과에 속하는 일년생 초본으로 열대아시아에 분포되어 있으며, 우리나라에서는 길가나 들판에 무리지어 야생하고 있다. 한방에서는 주로 해열제, 지혈제, 피부병 치료제나 살충제로 사용되며, 그외 항균, 항바이러스 및 망산화 작용 등이 알려져 있다 [3,4]. 개똥쑥의 주요 성분으로는 arteannuin, arteannuin B, scopoletin, coumarin 및 eupatin 등이 있으며 이러한 성분들이 항암 및 항균 작용과 관계가 깊어 이들의 화학적 구조를 밝혀내는 연구가 수행되었다 [5,6].

최근 보고에 의하면 개똥쑥은 총 항산화력이 높은 약용식

¹한남대학교 생명나노과학대학 생명시스템과학과
¹Department of Biological Sciences and Biotechnology, College of Life Science and Nano Technology, Hannam University, Daejeon 305-811, Korea
Tel: +82-42-629-8934, Fax: +82-42-629-8873
e-mail: jgyoo@gmail.com

²주바이오엔진
²Department of BIONGENE, Seoul 110-521, Korea

³한남대학교 생명나노과학대학 화학공학과
³Department of Chemical Engineering, College of Life Science and Nano Technology, Hannam University, Daejeon 305-811, Korea

물 중의 하나로서 개똥썩의 높은 항산화 활성은 시료 중에 함유된 페놀 화합물에 의한 것으로 보고되어 있다. 선행 연구에서는 에탄올로 추출한 개똥썩 (Ethanol extracts of *Artemisia annua* Linné, AAE)를 인체자궁경부 상피암 세포 (HeLa)와 위암세포 (AGS)에 처리하였을 때 암세포 증식 억제효과가 있음이 보고되었다 [3,4].

인간의 암은 cell cycle 조절인자들의 돌연변이에 의해 유발된다. Cell cycle에 있어서 다음 단계로의 진행을 조절하는 Checkpoint가 존재하고, Checkpoint를 조절하는 protein인 Cyclin-CDK 복합체가 발현된다. 세포에 이상이 생기면 Cyclin-CDK을 조절하여 cell cycle arrest를 유도함으로써 세포증식이 중단되고, 이상이 없는 세포들은 Cyclin-CDK에 의해 cycle이 원활하게 진행된다. 따라서, Cyclin-CDK의 돌연변이나 이상이 종양형성에 관련됨이 보고되었다 [7]. Cyclin과 Cdk는 여러 암세포에서 과발현되며, 이러한 Cyclin-Cdks 복합체의 억제를 유도하는 protein은 CKI (Cdk kinase inhibitor) family라 불리는 p53, p21, p27이다. 이들은 Cyclin-Cdk 복합체에 붙어 Cdk의 탈 인산화를 억제시킴으로써 Cell cycle arrest를 유도한다 [8].

따라서 본 연구에서는 Hep3B 간암세포에 개똥썩 추출물 (AAE)을 처리하였을 때, 암세포 증식 억제가 cell cycle arrest에 의한 것인지를 알아보고자 하였다. 또한, AAE의 증가에 따른 Cell cycle 관련 protein의 발현 변화를 확인하였고, Checkpoint를 조절하는 상위조절인자인 p-Akt, p53신호분자 조절의 연관성을 알아보기 위하여 LY294002와 Pifithrin- α 를 각각 단독으로 처리하거나 AAE (개똥 썩 추출물)과 병행 처리하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 실험재료

실험에 사용된 개똥 썩은 대전한약재시장에서 구입하였고, 개똥 썩 100 g에 에탄올 800 mL을 가하여 72시간 동안 상온에서 환류 시키며 추출하였다. 이러한 방법으로 추출된 개똥 썩 추출물을 감압농축기를 이용하여 감압농축시킨 뒤, 농축된 추출물은 -86°C 에서 보관하였다. 각 농도별 개똥 썩 추출물은 상기 추출물을 동일 용량의 DMSO에 녹여 만들었으며, -20°C 에서 냉동 보관하여 사용하였다. LY294002와 Pifithrin- α 는 Calbiochem (Calbiochem, SD, CA, USA)에서 구입하여 20 mM으로 만들어 사용하였다.

2.2. 세포배양

Hep3B 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양 받았으며, 10% FBS (Hyclone, Laboratoris Inc., Logan, UT, USA)와 1% antibiotics가 포함된 DMEM media (Hyclone, Laboratris Inc., Logan, UT, USA)를 사용하여 5% CO₂, 37°C 조건 하에 배양하였다. 매 48시간마다 Trypsin-EDTA (Hyclone, Laboratories Inc., Logan, UT,

USA)를 이용하여 세포를 부유 상태로 만든 다음 세포를 1×10^6 cells/mL로 분주하고 계대 배양하였다.

2.3. MTT assay에 의한 암세포의 생존율 측정

12 well plate에 Hep3B cell 를 1×10^5 cells/mL로 분주하고 24 시간 동안 안정화시킨 후 AAE를 12시간과 24시간 동안 처리하여 CO₂ incubator에서 배양하였다. LY294002, Pifithrin- α 와 병행처리 시에는 inhibitor를 30분 전처리 한 뒤, AAE를 처리 한 후 12시간과 24시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 그런 다음 MTT solution 100 $\mu\text{g/mL}$ 를 첨가하여 1시간 동안 CO₂ incubator에서 반응시켰다. MTT solution을 처리한 media를 제거하고 PBS washing 후 PBS를 제거한 뒤 DMSO 150 μL 씩 넣어 각 well에 생성된 formazan을 모두 녹인 다음 96 well plate에 100 μL 씩 옮긴 후 ELISA microplate reader (Bio-Red model 680, Bio-Red Laboratories Inc. Tokyo, Japan)로 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 각 농도별로 세 번 시행하였으며, 이에 따른 평균값과 표준오차는 Microsoft Excel program을 사용하여 분석하였다.

2.4. 유세포분석기 (Fluorescence-activated Cell Sorting, FACS)를 통한 Cell cycle arrest 관찰

Cell cycle은 Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS)를 사용하여 측정하였다. Hep3B cell에 AAE를 24시간 동안 농도별 (40, 60, 80 $\mu\text{g/mL}$)로 처리한 후 PBS로 washing 하였다. LY294002, Pifithrin- α 와 병행처리 시에는 inhibitor를 30분 전처리 한 뒤, AAE를 처리하였다. Trypsin-EDTA로 세포를 떼어낸 뒤 원심분리 (3000 rpm, 10분)를 통해 세포를 모으고 95% 이상의 에탄올에 고정시킨 뒤, 40 $\mu\text{g/mL}$ 의 propidium iodide (PI)과 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 RNase A로 염색한 다음 Flow-FACS Canto (Becton-Dickinson Biosciences, Drive Franklin Lakes, NJ, USA)로 DNA content를 측정하였다.

2.5. Wound healing assay

Hep3B cell을 6 well plate에 각 well당 1×10^5 cells/mL로 분주하여 24시간 동안 배양한 다음 배양액을 제거한 뒤 10 μL pipet tip으로 scratch하였다. 현미경으로 관찰하고 배양액 교체 후 AAE를 40, 60, 80 $\mu\text{g/mL}$ 농도별로 처리하였다. LY294002, Pifithrin- α 와 병행처리 시에는 inhibitor를 30분 전처리 한 뒤, AAE를 처리하였다. 물질처리 후 12~24시간 동안 wound healing이 된 정도를 현미경으로 사진을 찍어 관찰하였다.

2.6. Western blotting

6-well plate에 Hep3B cell를 각 well당 1×10^5 cells/mL로 분주하여 24시간 동안 배양한 다음 AAE를 농도별로 처리하였다. LY294002, Pifithrin- α 와 병행처리 시에는 inhibitor를 각각 20 μM 을 처리 후 30분 뒤, 모든 물질을 최종 처리한 후 6시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양이 끝난 세포에 RIPA lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.4), 1% NP40, 0.5% sodium

deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF]를 각 well에 150 μ L씩 첨가하여 단백질을 분리한 뒤 14000 rpm, 4°C에서 20분 동안 원심분리하여 상등액을 취하였다. 추출한 단백질은 ELISA-reader를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 8%, 12% acrylamide gel를 이용하여 만들어 놓은 sample을 loading한 뒤 전기영동을 실시한 후 nitrocellulose membrane에 transfer하였고, 다음에 2% Bovine serum albumin (BSA)을 이용해 blocking한 후, 1차 항체를 4°C에서 밤새 반응시키고 TBST로 5분씩 4번 washing후 2차 항체를 결합시킨 다음 실험결과를 측정하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. AAE의 처리가 Hep3B 간암세포주의 증식에 미치는 영향

선행연구에서는 항산화 효과가 뛰어나다고 알려진 개뿔쑥을 에탄올로 추출하여 인체자궁경부상피암세포 (HeLa)와 위암세포 (AGS)에 처리하였을 때 암세포 증식 억제효과가 있음이 보고되었다 [3,4]. 본 연구에서는 Hep3B 간암세포에 AAE를 처리하였을 때 암세포의 증식억제효과를 알아보려고 하

였다. AAE가 Hep3B 세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 AAE를 농도별 (10, 20, 40, 60, 80, 100 μ g/mL)로 처리한 뒤 MTT assay를 통하여 암세포의 생존율을 측정하였다. 그 결과, Fig. 1(a)에 따르면 AAE의 농도가 높아질수록 Hep3B 간암세포의 증식이 억제되는 것을 확인하였으며, 12시간보다 24시간에서 증식이 더 많이 억제되고 있다는 것을 확인하였다. 따라서 Hep3B 간암세포의 증식억제가 AAE의 농도와 시간 의존적으로 일어남을 확인하였다. 또한 wound healing assay를 통하여 AAE이 세포 증식 억제에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. Hep3B cell을 배양한 6 well plate에 scratch를 낸 후 AAE를 12시간 동안 농도별 (40, 60, 80 μ g/mL)로 처리하여 wound healing area를 측정하였다. 그 결과 Fig. 1(b)에서와 같이 control 군보다 물질처리군에서 시간이 지날수록 wound healing area이 감소함을 확인하였다. 따라서 본 실험에서 수행한 연구 결과를 통하여 AAE가 Hep3B 간암세포의 세포증식을 억제하고 있음을 확인하였다.

3.2. AAE를 처리한 Hep3B 간암세포의 cell cycle arrest 유도 효과

CDK2는 Cyclin E와 결합하여 G1에서 S단계로의 전이와 DNA복제를 위한 가장 중요한 신호 단백질이다. Cyclin E-

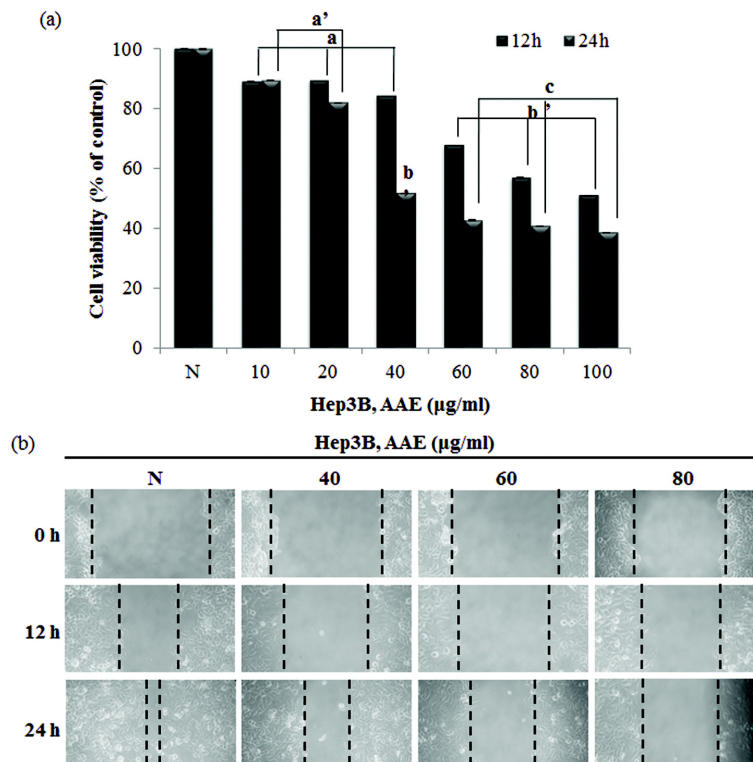


Fig. 1. Cell cycle arrest effect of AAE in Hep3B liver cancer cell. Cell viability was measured by MTT assay. Hep3B cells were treated with concentrations of AAE 10~100 μ g/mL. (A) cells were treated with 10~100 μ g/mL of AAE 12 h and 24 h. The statistical analysis of the data was carried out by use of an ANOVA-test. $a^*c < 0.05$ and $a^*c < 0.05$ (each experiment, n=3). (B) The wound healing assay was employed to determine the migration of Hep3B liver cancer cell line. Wound was performed after confluence, and cells were treated with concentration of AAE 40~80 μ g/mL. Cells were monitored every 12 hours for one day to evaluate the rate of migration into the scratched area.

CDK2 복합체는 CDK2에 붙어있던 인산기가 떨어져 나가면서 Rb-E2F 복합체의 Rb 단백질이 인산화시켜 E2F와 떨어지면서 G1에서 S 단계로 넘어갈 수 있게 된다. [3] 이러한 복합체를 억제시키는 인자로 CKI라고 불리는 CIP/KIP 그룹이 있으며, CKI 중 하나인 p21 단백질은 이 복합체와 결합하여 CDK2에 붙어있는 인산기가 떨어지지 못하게 하는 과정을 통해 S 기로의 진행을 방해하여 세포주기 억제를 일으키는 것으로 보고되었다 [9]. 선행 연구에서는 인체혈구암세포 U937 cell에 물질을 처리하였을 때 암세포의 증식이 억제되고 cell cycle arrest가 유도됨이 보고되었다 [10]. 따라서 본 실험에서는 AAE에 의한 세포증식억제효과가 cell cycle arrest에 의한 것인지 알아보기 위하여 Flow cytometric을 실시하였다. Hep 3B cell에 AAE를 농도별 (40, 60, 80 µg/mL)로 24시간 동안 처리하여 반응시킨 후 40 µg/mL의 propidium iodide (PI)과 200 µg/mL의 RNase A로 염색한 다음 DNA content를 측정하였다. 그 결과, Fig. 2에서 나타난 것과 같이 G1 값이 40 µg/mL에서 54.42%, 60 µg/mL에서 57.2%, 80 µg/mL에서 61.06%로 농도 의존적으로 증가하고 반면에, S 값이 40 µg/mL에서 22.72%, 60 µg/mL에서 21.04%, 80 µg/mL에서 16.67%와 G2 값이 40 µg/mL에서 23.96%, 60 µg/mL에서 21.83%, 80 µg/mL에서 13.45%로 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 실험 결과를 통하여 AAE가 Hep3B 세포의 G1 checkpoint arrest를 유도함을 확인하였다.

3.3. AAE처리에 따른 Cell cycle arrest 관련단백질의 조절
 정상세포에서 Akt는 Mdm2의 발현을 유도하여 p53을 저해시킨다고 보고되었다. 정상세포의 Akt가 인산화되어 활성상태가 되면 Mdm2를 인산화하여 p53 ubiquitination을 통해 일정 수준으로 존재하게 한다. 반면에, 손상된 세포가 계속해서 증식하여 생긴 암 세포에서는 Akt 활성이 억제됨으로써 p53 발현을 유도하여 세포증식억제에 영향을 준다는 것이 선행 연구를 통해 확인되었다 [11-14]. p53은 정상세포에서 p-Mdm2에 의해 일정 수준으로 존재하지만, 세포가 손상되거나 스트레스를 받게 되면 p-Mdm2의 활성이 억제되어 p53의 발현 정도가 일정 수준보다 상승하게 된다. 이렇게 상승된

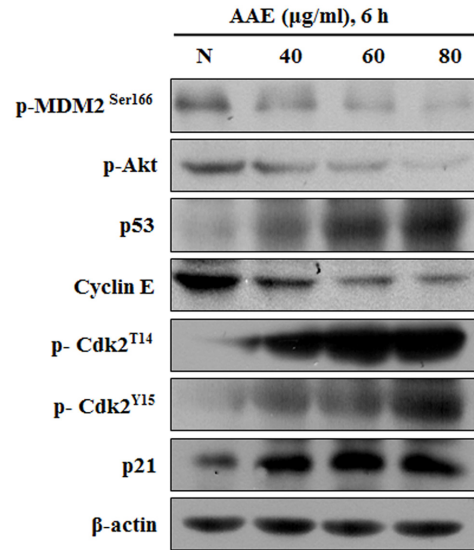


Fig. 3. AAE effects on p-MDM2^{Ser166}, p-Akt, p53, CyclinE, p-Cdk2^{T14}, p-Cdk2^{Y15} and p21 in Hep3B liver cancer cell. Cells were treated 40~80 µg/mL for 6 h. protein levels of p-MDM2^{Ser166}, p-Akt, p53, CyclinE, p-Cdk2^{T14}, p-Cdk2^{Y15} and p21 were determined by Western blotting. The β-actin probe served as protein-loading control.

p53은 손상된 세포를 복구 시키거나 복구가 불가능한 경우 세포주기 억제를 통한 성장 조절 및 apoptosis를 유도한다. 선행 연구에 의하면 Mdm2의 활성이 저해 될 수록 p53과 p21의 발현이 증가하는 것을 확인하였고, 그로 인해 cell cycle arrest가 일어난다는 것을 확인하였다 [12]. 본 실험에서는 Hep3B 세포에 AAE를 농도별로 처리하여 cell cycle 신호 단백질들의 양상을 알아보기 위하여 Western blotting을 실시하였다. 그 결과 Fig. 3에서 나타난 것과 같이 AAE를 농도별로 처리하였을 때 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비하여 AAE의 농도가 증가함에 따라 p-Akt의 활성은 감소하고, p53의 발현은 증가하는 것을 확인하였다. 인산화된 Akt는 Mdm2를 인산화하여 p53을 낮은 수준으로 발현되게 함으로써 Cell cycle을 진행하는 것으로 보고되었다 [15]. 또한 Akt pathway

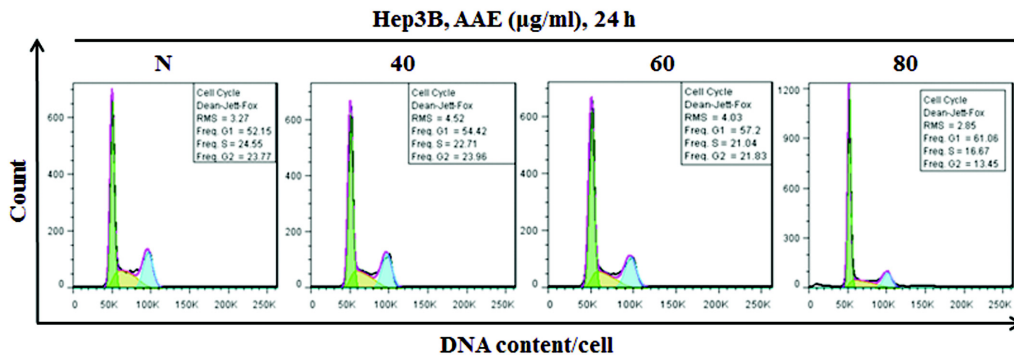


Fig. 2. AAE caused cell cycle arrest at G1 phase. Cells were treated with AAE (40~80 µg/mL) for 24h. Cell cycle arrest effect were measured by flow cytometric.

는 cell cycle protein의 활성을 조절함으로써 G1에서 S기로의 cycle을 진행시킨다 [16,17]. 선행연구에서 cell cycle에 관여하는 Akt와 Mdm2의 활성이 p53과 Cdk2, Cyclin E 그리고 p21의 활성을 감소하는 것을 확인하였고 [18,19], 본 실험에서 수행한 연구결과를 통하여 AAE가 Hep3B 간암세포에서 cell cycle에 관여하는 p-Akt와 p-Mdm2 신호분자의 활성을 감소시키고 p53과 CDK2, Cyclin E 억제제인 p21의 발현양이 증가하면서 Cyclin E의 발현양은 감소하는 것을 확인하였다.

또한 Cyclin E의 subunit인 phosphoform CDK2는 증가함을 확인하였다. CDK2는 Threonine14과 Tyrosine15에 인산기가 붙게 되는데 인산기가 떨어져 나가면서 cell cycle 진행이 이루어지기 때문에 Phosphoform CDK2는 Inactive한 형태임을 확인하였다.

3.4. Akt와 p53의 저해에 따른 신호단백질의 조절과 세포 증식에 미치는 영향

Hep3B 간암세포에서 Akt와 p53을 저해하였을 때 Hep3B 간암세포의 증식과 사멸에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Akt 저해제인 LY294002와 p53 저해제인 Pifithrin- α 를 AAE와 병행 또는 각각 단독으로 처리하였을 때 MTT assay와 Wound healing 및 cell cycle FACS와 Western blotting을 하였다. 그 결과 Fig. 4(a)에 나타난 바와 같이 LY294002 단독처리군에서는 세포 증식이 억제되었고, AAE 병행처리군은 LY294002 단독처리군보다 더욱 억제되는 것을 확인하였다. 반면에 Pifithrin- α 단독처리군은 control군에 비해 증가하였고, AAE 병행처리군은 Pifithrin- α 단독처리군보다 증식이 억제됨을 확인하였다. 또한 Fig. 4(b)에 나타난 바와 같이 wound healing assay의 결과 LY294002 단독처리군에서는 wound healing area이 control군에 비해 억제되었고, AAE 병행처리군은 LY294002 단독처리군보다 더욱 억제되는 것을 확인하였다. 반면에 Pifithrin- α 처리군은 control군과 wound healing area이 비슷하게 증가하였으며 AAE 병행처리군은 Pifithrin- α 단독처리군보다 wound healing area이 억제되었음을 확인하였다. 이러한 결과를 토대로 Akt가 암세포의 증식에 있어서 중요한 역할을 하며, Akt의 작용이 억제되었을 시 세포증식과 관련된 인자들이 억제됨을 알 수 있었다. 또한, Pifithrin- α 는 p53의 발현을 억제하는 것이 아니기 때문에 Pifithrin- α 단독처리시 세포증식억제에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

이와 같은 조건으로 FACS와 Western blotting을 실시한 결과 Fig. 4(c) FACS에서는 LY294002 단독처리군에서는 G1 값이 55.25% AAE 병행처리군은 58.83%로 AAE에 의해 더욱 증가하였고, S값은 LY294002 단독처리군에서는 22.87% AAE 병행처리군은 15.03%, G2값은 LY294002 단독처리군에서는 22.58% AAE 병행처리군은 21.33%로 감소하였다. 반면에 Pifithrin- α 단독처리군의 G1 값이 51.6% AAE 병행처리군은 52.16%로 AAE에 의해 더욱 증가하였고, G2값은 Pifithrin- α 단독처리군에서는 24.52% AAE 병행처리군은 16.43%로 감소하였다. 이와 같이 Akt를 저해했을 때 AAE에 의한 G1 cell cycle arrest효과가 더욱 강하게 나타나며 Akt가 세포증

식에 중요한 역할을 나타낸다. 이러한 결과를 토대로 AAE에 의한 cell cycle arrest가 Akt의존적으로 진행됨을 알 수 있었다. 동일한 조건에서 AAE가 p-Cdk2(T14,Y15), Cyclin E, p21 신호분자 조절에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 Western blotting을 실시하였다. 그 결과, Fig. 4(d)에서 보이는 바와 같이 LY294002와 AAE를 병행처리시 Cyclin E의 발현은 LY294002 단독처리군보다 현저히 감소하였고, Pifithrin- α 와 AAE 병행처리했을 때 AAE에 의해 감소하였지만 Pifithrin- α 의 영향으로 AAE 단독처리군과 비교하여 발현양이 증가한 것으로 보인다. p-Cdk2(T14,Y15), p21은 LY294002와 AAE를 병행처리했을 때 LY294002 단독처리군과 비교하여 발현양이 증가하였고 Pifithrin- α 와 AAE 병행처리했을 때 AAE에 의해 증가하였지만 Pifithrin- α 의 영향으로 AAE 단독처리군과 비교하여 발현양이 감소한 것으로 보인다. 이러한 결과로 보아 AAE에 의한 p-Cdk2(T14,Y15), Cyclin E, p21 신호분자의 조절은 Akt의존적인 경로를 통해 일어남을 확인하였다. 한편 Pifithrin- α 를 단독으로 처리했을 때 p-Cdk2(T14,Y15), p21의 발현이 감소하였으며, Cyclin E는 증가하였다. 이는 AAE가 p53에 비의존적으로 일어나며 Akt의존적인 경로로 일어남을 확인했다.

결론적으로, 본 연구를 통하여 AAE가 Hep3B 간암세포의 cell cycle arrest에 의한 증식억제하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 G1 cell cycle arrest는 AAE가 Akt 신호분자를 경유하여 일어나는 것으로 보인다.

4. CONCLUSION

개똥썩은 여러 신호경로를 통하여 암세포의 증식억제와 항암효과가 있다고 보고되었다 [3,4]. 따라서 본 연구에서는 Hep3B 간암세포에 AAE (개똥썩추출물)를 처리했을 때 cell cycle arrest에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. MTT assay를 통한 세포생존율 측정에서 AAE를 농도별과 시간별로 처리했을 때 Hep3B 간암세포의 증식이 억제되었다. Wound healing assay를 통한 이동성 실험에서 AAE가 농도와 시간에 의존적으로 세포 이동성이 감소됨을 확인하였다. 이러한 세포증식억제와 이동성억제가 cell cycle에 의한 것인지를 알아보기 위해 Flow cytometric를 실시한 결과 AAE 농도에 의존적으로 G1 cell cycle arrest가 일어남을 확인하였다. 또한, cell cycle 신호 단백질들의 양상을 알아보기 위하여 Western blotting을 실시한 결과 cell cycle을 진행하는 단백질인 p-Akt와 p-Mdm2, cyclin E의 발현은 감소하였고, cell cycle arrest를 유도하는 단백질인 p53, p-Cdk2(T14,Y15), p21의 발현은 증가함을 확인하였다. 한편 LY294002를 단독으로 처리했을 때와 AAE 병행처리했을 때 p-Cdk2(T14,Y15), p21의 발현이 증가하였으며 Pifithrin- α 를 단독으로 처리했을 때와 AAE 병행처리했을 때 p-Cdk2(T14,Y15), p21의 발현이 감소함을 확인하였다. 따라서 본 연구를 통하여 AAE가 Hep3B 간암세포의 cell cycle arrest효과가 Akt의존적으로 일어나는 것임을 확인

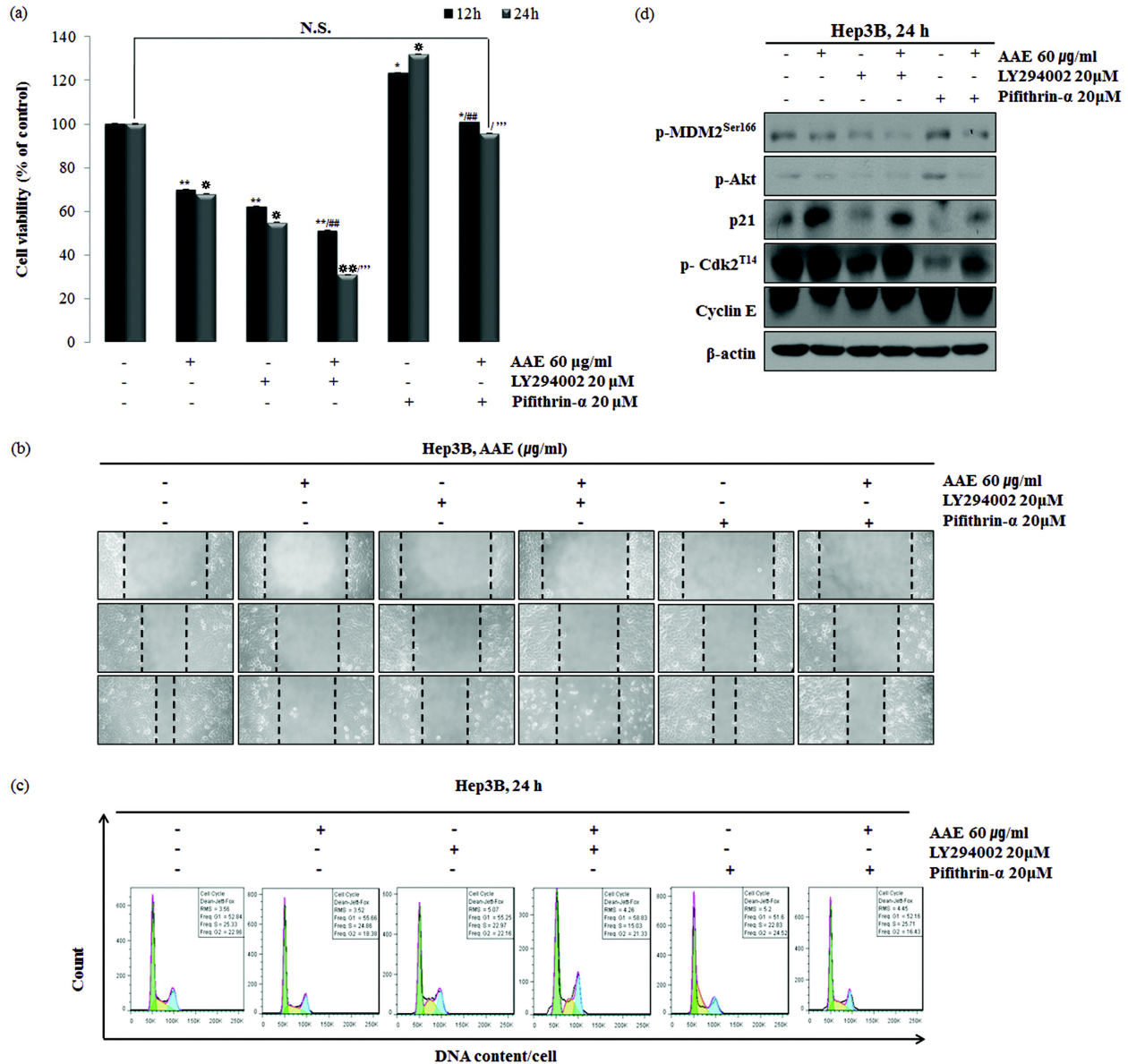


Fig. 4. AAE induces cell cycle arrest via Akt-dependent, p53-independent pathway. Cells co-treated LY294002 or Pifithrin-α with AAE in Hep3B liver cancer cells. (A) Cells were pre-treated with 20 µM LY294002 or 20 µM Pifithrin-α for 30 min and then co-treated with 60 µg/mL AAE for 12 h and 24 h. Cells viability was measured by MTT assay. The statistical analysis of the data was carried out by use of an ANOVA-test. *, □ $p < 0.05$, **, ###, □□ $p < 0.01$ and **** $p < 0.001$ (each experiment, n=3). (B) Wound was performed after confluence, and cells were pre-treated with 20 µM LY294002 or 20 µM Pifithrin-α for 30 min and then co-treated with 60 µg/mL AAE. Cells were monitored every 12 hours for one day to evaluate the rate of migration into the scratched area. (C) Cells were pre-treated with 20 µM LY294002 or 20 µM Pifithrin-α for 30 min and then co-treated with 60 µg/mL AAE for 24 h. Cell cycle arrest effect were measured by flow cytometric. (D) Cells were pre-treated with 20 µM LY294002 or 20 µM Pifithrin-α for 30 min and then co-treated with 60 µg/mL AAE for 6 h. Protein levels were determined by Western blot analysis.

하였다.

의하여 연구되었음.

Acknowledgements

이 논문은 2014학년도 한남대학교 학술연구조성비 지원에

REFERENCE

1. Montalto, G, M. Cervello, L. Giannitrapani, F. Dantona, A. Terra-

- nova, and L. A. M. Castagnetta (2002) Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma. *Ann. NY Acad. Sci.* 963: 13-20.
2. Yun, H. J., S. G. Hwang, H. J. Yun, C. H. Kim, G. S. Seo, W. H. Park, and S. D. Park (2006) Anticancer effect of Rheum Rhizoma on human liver cancer HepG2 cells. *Korea J. Herbol.* 4: 27-36.
 3. Ryu, J. H., S. J. Lee, M. J. Kim, J. H. Shin, S. K. Kang, K. M. Cho, and A. J. Sung (2011) Antioxidant and anticancer activities of *Artemisia annua* L. and determination of functional compounds. *J. Korea Soc. Food Sci. Nutr.* 40: 509-516.
 4. Romero, M. R., M. A. Serrano, M. Vallejo, T. Efferth, M. Alvarez, and J. J. Marin (2006) Antiviral effect of artemisinin from *Artemisia annua* against a model member of the Flaviviridae family, the bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *Planta Med.* 72: 1169-1174.
 5. Schmid, G., and W. Hofheinz (1983) Total synthesis of qinghaosu. *J. Am. Chem. Soc.* 105: 624-625.
 6. Avery, M. A., W. K. M. Chong, and White C. Jennings (1992) Stereoselective total synthesis of (dextro)-artemisinin, the antimalarial constituent of *Artemisia annua* L. *J. Am. Chem. Soc.* 114: 974-979.
 7. Park, M. T. and S. J. Lee (2003) Cell cycle and cancer. *J. Biochem. Mol. Biol.* 36: 60-65.
 8. Novák, B., J. C. Sible, and J. J. Tyson (2003) Checkpoints in the Cell Cycle, Encyclopedia of Life Sciences. DOI:10.1038/npg.els.0001355
 9. Lee, M. H. and H. Y. Yang (2003) Regulators of G1 cyclin-dependent kinases and cancers. *Cancer Metastasis Rev.* 22: 435-449.
 10. Kang, M. S., S. M. Ju, B. J. Jeon, H. M. Yang, W. S. Kim, and B. H. Jeon (2011) *Nardostachys chinensis* induces G0/G1 phase cell cycle arrest in U937 cells. *Korean J. Oriental Physiol. Pathol.* 25: 189-194.
 11. Giono, L. E. and J. J. Manfredi (2007) Mdm2 is required for inhibition of Cdk2 activity by p21, thereby contributing to p53-dependent cell cycle arrest. *Mol. Cellular Biol.* 11: 4166-4178.
 12. Yoko, O., K. Shohei, O. Toshiyuki, I. Yuko, S. Toshiaki, T. Keiji, M. Norihisa, and G. Yukiko (2002) Akt enhances Mdm2-mediated Ubiquitination and Degradation of p53. *J. Biol. Chem.* 24: 21843-21850.
 13. Arnold, J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331.
 14. Moll, U. M. and O. Petrenko (2003) The MDM2-p53 Interaction. *Mol. Cancer Res.* 1: 1001-1008.
 15. Lee, J. H., W. Y. Choi 1, Y. H. Choi 2 and B. T. Choi (2009) Cell cycle arrest by treatment of D-Ala2-Leu5-enkephalin in human Leukemia cancer U937 cell. *J. Life Sci.* 5: 620-624.
 16. Arnold, J., F. Zhaohui, W. M. Tak (2014) Coordination and communication between the p53 IGF-1-Akt-TOR signal transduction pathways. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 9.
 17. Mirela, F., S. Chintda, E. Carol, and D. Oliver (2012) Effect of OI 3K/Akt pathway inhibition-mediated G1 arrest on chemosensitization in ovarian cancer cells. *Anticancer Res.* 32: 445-452.
 18. Donnellan, R. and R. Chetty (1999) Cyclin E in human cancers. *FASEB J.* 13: 773-780.
 19. Pan, M. H., W. H. Chen, S. Y. Shiau, C. T. Ho, and J. K. Lin (2002) Tangeretin induces cell-cycle G1 arrest through inhibiting cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as elevating Cdk inhibitors p21 and p27 in human colorectal carcinoma cells. *Carcinogenesis* 10: 1677-1684.