

# 潤肺散에 의한 폐암세포 증식억제기전에 관한 연구

강윤경 · 박동일 · 이준혁<sup>1</sup> · 최영현<sup>2\*</sup>

동의대학교 한의과대학 폐계내과학교실, 1: 해부학교실, 2: 생화학교실

## The Effects of Yunpyesan on Cell Proliferation, Apoptosis and Cell Cycle Progression of Human Lung Cancer A549 Cells

Yun-Keong Kang, Dong Il Park, Jun Hyuk Lee<sup>1</sup>, Yung Hyun Choi<sup>2\*</sup>

*Internal Medicine of Respiratory System, 1: Department of Anatomy, 2: Department of Biochemistry, College of Oriental Medicine, Dongguk University*

To examine the effects of Yunpyesan on the cell proliferation of A549 human lung carcinoma cell line, we performed various experiments such as dose-dependent effect of Yunpyesan on cell proliferation and viability, morphological changes, quantification of apoptotic cell death and alterations of apoptosis/cell cycle-regulatory gene products. Yunpyesan declined cell viability and proliferation in both a dose- and a time-dependent manner. The anti-proliferative effect by Yunpyesan treatment in A549 cells was associated with morphological changes such as membrane shrinking and cell rounding up. Yunpyesan induced apoptotic cell death in a time-dependent manner, which was associated with degradation of poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP), an apoptotic target protein, without alterations of the balance between Bcl-2 and Bax expressions. DNA flow cytometric histograms showed that population of G1 phase of the cell cycle was increased by Yunpyesan treatment in a dose-dependent manner. Western blot analysis revealed that cyclin D1 and A were reduced by Yunpyesan treatment, whereas cyclin dependent kinase (Cdk) inhibitor p27 was markedly increased in a time-dependent fashion. The level of tumor suppressor p53 proteins was also increased by Yunpyesan treatment and its increase might be linked to increase of Cdk inhibitor p27. In addition, Mdm2, negative regulator of p53, was down-regulated by Yunpyesan treatment. Since the expression of retinoblastoma protein (pRB), a key regulator of G1/S progression, was reduced by Yunpyesan treatment, we supposed that phosphorylation of pRB might be also blocked. The present results indicated that Yunpyesan-induced inhibition of lung cancer cell proliferation is associated with the induction of apoptosis and the blockage of G1/S progression.

**Key words :** Yunpyesan(潤肺散), apoptosis, cell cycle, PARP, p53, p27, human lung cancer

### 서 론

세포주기 조절에 대한 기전 연구는 최근 아주 활발하게 이루어지고 있으며, 각 주기별 관여하는 다양한 유전자들에 의해 조절된다. 기본적으로 세포주기 checkpoint 각 시기에 요구되어지는 cyclins에 의하여 cyclin-dependent kinases (Cdk)의 연속적인 활성화와 불활성이 결정되어진다<sup>1,2)</sup>. 먼저 Cdk4 및 Cdk6와 complex를 이루는 D-type cyclin은 G1기의 조절에 중요하며<sup>3,4)</sup>, cyclin E는 Cdk2와 복합체를 이루면서 S기로의 전이에 중요한

역할을 담당하고 있다<sup>5,6)</sup>. 특히 D-type cyclins는 retinoblastoma protein (pRb)의 인산화 조절과 이로 인한 G1/S 전이 및 DNA 합성 조절에 중요한 전사인자 E2Fs의 활성을 조절한다<sup>7)</sup>. Cyclin A는 G1 후기에 발현을 시작하여 S기와 G2기 동안 발현이 증가되며 cyclin B1은 G2기에서 M기로의 전이를 조절하며, 각각은 Cdk2 및 Cdc2의 kinase 활성을 위한 양성 조절자로서 중요한 역할을 한다<sup>8-11)</sup>. 한편 Cdk는 다양한 세포증식 억제 신호에 의해 유도되는 Cdk inhibitor에 의하여 그 활성이 억제되어지는데, 크게 두 가지의 family로 분류 (INK4 및 CIP/KIP family)되어지고 있다<sup>12,13)</sup>. 이들 중 Cdk2와 결합하면서 그들의 활성을 저해하는 것으로 알려진 CIP/KIP family에 속하는 p21 및 p27은 DNA 손상에 의한 종양 억제인자 p53에 의해 조절을 받으며<sup>14,15)</sup>, 이는 세

\* 교신저자 : 최영현, 부산광역시 진구 양정동 산45-1, 동의대학교 한의과대학  
E-mail : choiyh@hyomin.dongguk.ac.kr Tel : 051-850-7413  
· 접수: 2002/06/08 · 수정: 2002/07/16 · 채택 : 2002/08/05

포주기 상 G1기에서 세포증식을 억제하는 세포주기와 연관된 가장 중요한 조절인자로 알려져 왔다<sup>16,17</sup>. 한편 apoptosis (programmed cell death)는 특이 발생단계나 DNA 손상, 바이러스 감염 등에 의한 유전적 조절 하에서 일어나는 정교한 인체방어기전이란 점에서 necrosis와 구별된다<sup>18,19</sup>, 또한 apoptosis는 개체보존수준에서 손상된 세포들의 제거를 위한 중요한 수단이며, 정상적인 세포주기의 이탈이나 Cdks 활성의 변화가 apoptotic cell death의 주원인이 될 수 있다<sup>20</sup>. Apoptosis의 유발에 p53이나, Bcl-2 및 Bax와 같은 유전자가 관여한다는 사실이 알려지면서 apoptosis와 연관된 분자적 기전이 최근 많이 밝혀지고 있는데, Bcl-2는 apoptosis를 억제하는 반면, Bax는 과발현되었을 때 apoptosis를 유도한다<sup>21</sup>. 두 단백질은 서로 dimer를 형성하면서 cytochrome c와 같은 apoptosis 유발에 관여하는 인자들의 조절에 관여한다. 특히 DNA 손상에 의한 p53의 유도는 p21과 연관되어 세포주기 상 G1기에서의 세포증식 억제뿐만 아니라 Bax 유전자를 활성화시키고 Bcl-2의 발현을 억제하면서 apoptosis에도 관여하는 것으로 알려지고 있다<sup>22,23</sup>. 또한 caspases라고 이름 붙여진 ICE/CED-like protease family 역시 apoptosis 유발에 중요한 역할을 하는데<sup>18,24</sup>, 이들은 proenzyme 형태로 존재하다가 apoptosis 유도를 활성화시키는 신호에 의해 활성화된 cysteine-related proteases로 되어 직접 또는 간접으로 세포 내 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다. 그러나 많은 경우에 apoptosis는 이러한 유전자들의 발현이나 세포주기 비의존적으로도 일어날 수 있다<sup>25,26</sup>. 윤페산(潤肺散)은 東醫寶鑑·咳嗽門에 潤肺丸으로 수록되어 있으며<sup>27</sup> 패모(貝母), 과루인(瓜蒌仁), 청대(靑黛)로 구성되어 조담(燥痰)과 건해(乾咳)와 노수(勞嗽)를 치료하는 처방으로, 개별 약물 각각은 유방암, 간암, 폐암, 위암, 췌장암 등에 항암작용이 있는 것으로 알려져 있다<sup>28</sup>. 최근 폐암의 발병기전에 대한 분자생물학적 연구가 활발히 진척되고 있는데 특히 암을 일으키는 원인으로 알려진 수십 가지의 종양유전자에 이어 최근에는 암의 발생을 억제하는 것으로 생각되는 여러 종류의 암억제 유전자가 밝혀지면서 폐암의 발병기전에 대한 이해가 넓어졌으며, 이를 이용한 폐암의 유전자 치료가 시도되고 있어 폐암 치료의 새로운 장이 열리고 있다. 이에 본 연구에서는 윤페산의 인체 폐암세포의 증식에 미치는 분자생물학적 영향을 알아보기 위하여 윤페산의 처리농도와 처리시간에 따른 폐암세포 성장률 및 생존율 억제, 이로 인한 형태적 변화 및 단백질 발현을 관찰하고 apoptosis 및 세포주기 조절과의 연관성을 가지는 유전자 산물의 발현 및 변화를 조사하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료준비

약재는 동의대학교 부속 한방병원에서 구입(주, 광명제약)하여 정선한 후 사용하였으며, 처방의 내용은 東醫寶鑑에 준하였고<sup>27</sup> 그 조성은 Table 1에 나타낸 바와 같다. 윤페산 (YPS, aqueous extract of Yun-pye san) 및 윤페산의 구성 한약제인 패모

[AEFU, aqueous extract of Bulbus fritillariae (Fritillaria ussuriensis Maxim.)], 과루인 [AETK, aqueous extract of Semen trichosanthis (Trichosanthes kirilowii Max.)] 및 청대 [AEPT, aqueous extract of Indigo naturalis (Persicaria tinctoria Gross.)]의 추출물을 얻기 위하여 약재 1 g당 증류수 1 ml을 가하여 환류 냉각장치가 장착된 가열기에서 180~200℃의 온도로 2 시간 동안 끓이고, 이를 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 시킨 후, 그 상층액을 Whatman 필터 (No. 2)로 걸러내고 감압 농축과 가열을 통해 고형성분을 얻어내어 막자사발로 잘게 마쇄하고 밀봉시켜 초저온 냉동고에 보관하였다.

Table 1. Composition of Yunpyesan

Oriental crude drug	Crude drug (Scientific name)	Ratio of weight
貝母	Bulbus fritillariae (Fritillaria ussuriensis Maxim.)	2
瓜蒌仁	Semen trichosanthis (Trichosanthes kirilowii Max.)	1
靑黛	Indigo naturalis (Persicaria tinctoria Gross.)	1

### 2. 암세포주 및 배양조건

실험에 사용한 A549 폐암세포는 생명공학연구소(KRIBB, Taejeon, Korea)에서 분주 받았으며, 세포의 배양을 위하여 90%의 RPMI-1640 배지 (Gibco BRL, Gaithersberg, MA, USA)에 10%의 fetal bovine serum (Gibco BRL, USA)과 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA) 등이 포함된 성장배지를 사용하여 배양하였다. 세포는 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였다.

### 3. 약재의 처리

약재의 처리를 위해 세포를 0.05% trypsin-EDTA를 이용하여 부유시킨 다음 1×10<sup>5</sup>개/ml 정도로 세포배양용 페트리 접시에 분주하여 24시간 동안 안정화 시켰다. 약재처리는 세포에 처리하기 직전 약재를 적정 농도로 성장배지에 첨가하여 녹인 다음, 0.22 μm의 pore size를 가진 주사기용 필터유닛을 사용하거나 1회용 펌프 필터 유닛을 사용하여 미생물 및 불순물을 걸러낸 다음, 세포의 성장배지를 갈아주면서 직접 처리하였다.

### 4. 세포 성장의 측정

세포배양용 페트리 접시에 세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 약재를 처리하고 24~72시간까지 배양하였다. 매 24시간 간격으로 배지를 제거한 후 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 부유시킨 후 PBS (phosphate-buffered saline)를 가하여 2 ml로 총량을 맞추고 Pasteur pipette의 모세관 현상을 이용하여 세포를 hemocytometer에 옮긴 후 현미경으로 그 수를 측정하였다. 측정은 모두 세 번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 구하였다<sup>29</sup>.

### 5. 세포 생존률의 측정

세포성장의 측정과 동일한 방법으로 약재를 48시간동안 처리 후 세포를 부유시킨 다음 0.05%의 trypan blue를 동량으로 2 분 동안 처리하여 Pasteur pipette의 모세관 현상을 이용하여

세포를 hemocytometer에 옮긴 후 현미경으로 검경하여 푸른색으로 염색된 세포를 죽은 세포로 추정하여 살아있는 세포의 수와 비교하였다. 대조군의 생존 세포수를 100%로 놓고 실험군의 생존률을 상대적으로 구하였고, 측정은 모두 세 번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 Sigma Plot 4.0 프로그램 (SPSS Inc.)으로 구하였다.

#### 6. Wright 염색 및 위상차 현미경을 이용한 세포형태의 관찰

세포배양용 페트리 접시에 세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 약재를 처리한 후, 24~72시간까지 배양하고, 배양액과 동량의 7.4% formaldehyde (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 가하여 세포를 고정시켰다. 3분 동안 고정 후, PBS로 두 번 씻어 내고 Wright 염색액 (Fisher Scientifics, Pittsburgh, PA, USA)을 차례로 처리하여 염색한 다음, 공기 중에서 말려 200배의 배율의 독일 Carl Zeiss 위상차 현미경으로 검경하였다<sup>30)</sup>.

#### 7. SDS-polyacrylamide gel 전기영동

Choi et al.<sup>31)</sup>의 방법에 따라 준비된 세포를 PBS로 세 번 씻어 내고, 적당량의 lysis buffer (40mM Tris-Cl pH8.0, 120mM NaCl, 0.1% NP-40, 0.1mM sodium orthovanadate, 2 $\mu$ g/ml aprotinin, 2 $\mu$ g/ml leupeptin and 100 $\mu$ g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride)를 첨가하여 4°C에서 20분간 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약과 그 사용방법에 따랐다 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). 동량의 단백질을 8~15%의 SDS (sodium dodesyl sulfate) polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하여 Coomassie blue 염색 용액 (Sigma)으로 염색하여 단백질 양상을 비교하였다.

#### 8. DNA flow cytometry 분석

정상 및 윤폐산이 함유된 배지에서 자란  $1 \times 10^5$ 개의 세포를 PBS로 세 번 씻어 내고, 고정액 (70% ethyl alcohol, 0.5% Tween 20)을 첨가하여 4°C에서 고정시킨 후, 핵산에 특이적으로 결합하는 DNA intercalating dye인 propidium iodide(PI, concentration, 50 $\mu$ g/ml; Sigma)와 10 kunit의 RNase (Sigma)를 처리하고 4°C에서 1시간동안 염색하였다. PBS로 세포를 두 번 씻어낸 후, nylon mesh로 세포덩어리를 하나씩으로 떼어내고 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 histogram을 Modifit LT(Becton Dickinson) 프로그램을 사용하여 분석하였다<sup>29,30)</sup>.

#### 9. Western blot analysis

정상 및 윤폐산이 처리된 배지에서 자란 세포들을 lysis buffer로 용해한 후, 고속원심분리로 세포 내 잔사물을 분리시킨 후 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBST (0.1% Tween 20 in PBS)를 이용하여 4°C에서 1시간 이상

incubation하면서 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고, 특정 단백질에 대한 항체를 membrane에 적용시켜 항원 항체 반응을 일으킨 후, PBST로 씻어내고 특정 항체에 대한 이차 항체를 적용시킨 다음 Enhanced ChemiLuminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다<sup>29-31)</sup>.

#### 10. 항체

Western blot analysis를 위해 사용된 항체들 중, mouse monoclonal antibody인 caspase-3, cyclin A, B1, D1, E, p21, p27, p53 및 pRB는 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하다. 그리고 rabbit polyclonal antibody인 PARP,  $\beta$ -catenin, Bcl-2, Bax, actin, Cdc2, Cdk2, Cdk4, Cdk6, p16, Mdm2, 및 c-Jun과 Cd25c, BRCA1 (breast cancer susceptibility gene product) 및 Sp-1에 대한 mouse monoclonal antibody는 Santa Cruz Biotechnology Int. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 암세포의 증식에 미치는 윤폐산의 영향

준비된 윤폐산 시료 (YPS)를 실험재료 및 방법에서 서술한 것처럼 48시간 동안 처리한 후, 살아있는 세포의 수를 계수하여 윤폐산이 처리되지 않은 대조군의 세포 수를 100%로 두고 실험군의 생존률을 상대적으로 구하였다. Fig. 1A에 나타난 바와 같이 윤폐산 처리농도의 증가에 따라 폐암세포의 생존율은 처리된 윤폐산의 농도 의존적으로 감소하는 것을 알 수 있었다. 즉 1.0 mg/ml 농도의 윤폐산 처리 48시간 후 생존율은 약 69.6%였으며, 2.0 mg/ml 처리군의 경우는 53.8%의 생존율을 보였다. 한편 3.0 mg/ml 및 5.0 mg/ml 처리군 (37.7% 및 34.9%)에서는 대조군에 비하여 생존율이 각각 60% 이상 감소하였다. 따라서 윤폐산의 처리농도 의존적으로 폐암세포의 성장이 강하게 억제되었음을 알 수 있었다. 다음은 이상의 결과에 준하여 윤폐산의 처리 시간에 따른 암세포의 세포 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 동일한 조건에서 준비된 윤폐산 추출물이 처리된 배지에서 암세포를 배양하여 매 24시간 경과에 따른 암세포의 성장률을 조사하였다. Fig. 1B에 나타난 결과에서처럼 정상배지에서 배양된 살아있는 세포의 수는 24시간 후 초기 ( $12 \times 10^4$ /ml)에 비하여 약 1.7배 ( $20 \times 10^4$ /ml) 증가되었으며, 48시간 및 72시간 경과에는 각각 3.4배 및 6.3배 ( $41 \times 10^4$ /ml 및  $75 \times 10^4$ /ml)로 증가되었다. 그러나 윤폐산이 처리된 배지에서 배양된 살아있는 세포는 24시간 후 1.4배 증가 ( $17.5 \times 10^4$ /ml)하였으며, 48시간 및 72시간 경과 후 각각 1.5배 ( $18.5 \times 10^4$ /ml) 및 1.4배 ( $17.5 \times 10^4$ /ml)로서 윤폐산이 처리된 배지에서 배양된 암세포의 생존율은 거의 증가되지 않았음을 알 수 있었다. 이상의 결과들에서 윤폐산이 처리된 배지에서 자란 암세포는 윤폐산의 처리농도 및 처리 시간 의존적으로 모두 정상적인 세포증식이 강하게 억제되었음을 알 수 있었다.

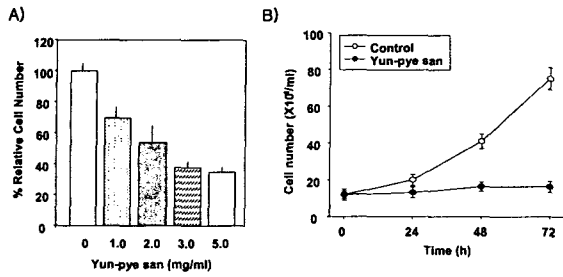


Fig. 1. A) Cell viability of A549 human lung carcinoma cells treated with various concentrations of Yunpyesane for 48 h as determined by cell count. Cells were seeded as described in Materials and Methods, and the viable cells were counted after 48 h Yunpyesane treatment. Results are expressed as percentage of the untreated control +/- SD obtained from three separate experiments. B) Effect of Yunpyesane on the cell growth of A549 human lung carcinoma cells. Cells were treated with 3.0 mg/ml Yunpyesane and the growth rate was determined by cell count. Cells were seeded as described in Materials and Methods, and counted after times indicated.

2. 암세포의 증식에 미치는 윤패산 구성 약재의 영향

다음은 윤패산의 구성 한약재인 과루인(AETK), 청대(AEPT) 및 패모(AEFU) 등 각각의 단미제 중 폐암세포의 성장 억제 효과가 가장 큰 단미제가 어떤 것인지를 조사하기 위하여 각각의 단미제 추출물에 대한 세포증식에 미치는 영향을 비교 조사하였다. 먼저 각각의 단미제를 3.0 mg/ml의 농도로 세포 배양배지에 희석하여 48시간 동안 암세포를 배양시켰다. Fig. 2A에서 알 수 있듯이 패모가 처리된 배지에서 자란 세포들의 생존율은 약 97.2%로서 정상배지에서 자란 세포와 거의 유사하였다. 그러나 과루인과 청대가 처리된 배지에서 자란 폐암세포의 생존율은 정상배지에서 자란 세포군에 비하여 각각 40.6% 및 33.0%로 나타나 두 단미제가 첨가된 배지에서 정상적인 증식을 하지 못하고 죽었음을 알 수 있었다. 다음은 각각의 단미제 추출물을 준비하여 3.0 mg/ml의 농도로 배지에 첨가한 후 매 24시간마다 세포를 모아 살아있는 세포의 수를 계수하여 살아있는 세포를 단미제가 첨가되지 않은 정상 배지에서 자란 세포의 수와 비교하여 Fig. 2B에 나타내었다. 결과에서 알 수 있듯이 패모가 처리된 배지에서 배양된 세포들의 증가는 정상 배지에서 자란 세포와 거의 유사한 경향성을 보여주어 패모 처리 전과 처리 48시간 후를 비교해 보면, 패모 처리 전 세포 수 ( $32 \times 10^4$ /ml)의 약 3.2배의 증가 ( $103 \times 10^4$ /ml)를 보여 정상 배지에서 자란 세포의 수 ( $106 \times 10^4$ /ml)와 거의 유사하였다. 패모 처리 72시간 경과 후에도 초기에 비하여 세포의 수가 약 5.5배 ( $178 \times 10^4$ /ml) 이상 증가되어 정상 배지에서 자란 세포의 성장 ( $183 \times 10^4$ /ml)과 유사하여 암세포의 성장에 본 실험 조건에서 사용된 농도의 범위 내에서는 거의 영향을 미치지 않았음을 알 수 있었다. 그러나 과루인 및 청대의 처리는 세포의 성장에 큰 영향을 주었다. 즉 48시간 경과 후 각각 단미제 처리군에서 세포의 성장은 1.3배 ( $43 \times 10^4$ /ml) 및 1.1배 ( $35 \times 10^4$ /ml)에 지나지 않았으며 72시간 후에도 세포의 성장은 거의 이루어지지 않아 (과루인,  $47 \times 10^4$ /ml; 청대,  $33.5 \times 10^4$ /ml) 정상 배지에서 자란 세포에 비하여 성장이 각각 74.3%

및 81.7% 정도 줄어들었음을 알 수 있었다. 따라서 윤패산을 구성하는 단미제 중 패모 추출물은 암세포의 성장에 거의 영향을 미치지 않았으나, 과루인과 청대 각각의 단미제가 처리된 배지에서 암세포의 성장이 거의 이루어지지 않아 두 단미제가 암세포의 성장 억제에 주된 역할을 하는 것으로 사료되며 그 영향은 거의 유사하였다. 이러한 결과는 암세포의 성장을 결과를 잘 뒷받침하는 주는 것으로서 과루인과 청대 처리군에서 보여준 낮은 세포 성장률은 이들 단미제의 처리에 의한 세포의 낮은 생존율에 기인함을 알 수 있었고, 세포 성장률의 경향성과 유사한 결과를 보여 주었음을 알 수 있었다.

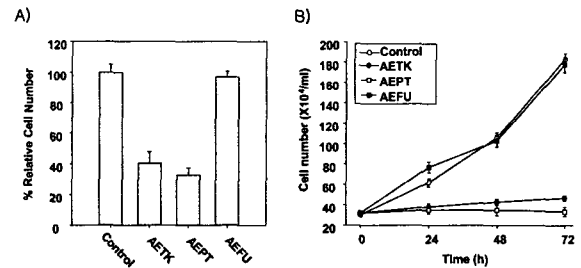


Fig. 2. A) Cell viability of A549 human lung carcinoma cells treated with aqueous extract of Bulbus fritillariae (Fritillaria ussuriensis Maxim., AEFU), aqueous extract of Semen trichosanthis (Trichosanthes kirilowii Max., AETK) and aqueous extract of Indigo naturalis (Persicaria tinctoria Gross., AEPT) for 48 h as determined by cell count. Cells were seeded as described in Materials and Methods, and the viable cells were counted after 48 h treatment. Results are expressed as percentage of the untreated control +/- SD obtained from three separate experiments. B) Effect of AEFU, AETK and AEPT on the cell growth of A549 cells. Cells were treated with 3.0 mg/ml AEFU, AETK and AEPT and the growth rate was determined by cell count. Cells were seeded as described in Materials and Methods, and counted after times indicated.

3. 윤패산 처리에 따른 암세포 형태 변화

윤패산 처리에 따른 암세포의 형태 변화 관찰을 위하여 다양한 농도 범위로 윤패산 추출물을 48시간 동안 처리한 후 Wright 염색을 실시하였다. Fig. 3에서 볼 수 있듯이 윤패산의 농도 증가에 따른 세포의 심한 형태적 변형이 관찰되었는데, 1.0 mg/ml 이상의 농도에서 이미 많은 암세포들이 부착 능력이 상실되어 배지위로 부유하기 시작하였으며 배양 접시에 부착된 세포들도 심한 형태적 변이를 수반하였다. 저농도 처리군 (0.5 mg/ml 및 1.0 mg/ml)에서의 경우는 전체적으로 세포질이 응축되면서 짧고 많은 가지를 친 듯한 모양으로 바뀌었으며, 3.0 mg/ml 및 5.0 mg/ml의 고농도 처리군에서 배양된 세포들은 신경세포에서 볼 수 있는 dendrite-like한 (화살표 표시) 형태적 변화가 특이적으로 관찰되었다. 이러한 결과는 윤패산 처리에 의한 암세포의 부착 능력 상실 및 암세포의 분화(differentiation)가 수반되었을 가능성을 의미하는 것으로 사료된다. 아울러 암세포의 형태적 변형 및 부착 능력 상실 등의 정도는 윤패산 처리에 따른 생존율 감소와 잘 일치되는 결과였다. 한편 각각의 단미제에 의한 형태변화 관찰에서의 경우, 과루인이 처리된 암세포의 경우

처리 24시간 후부터 세포의 형태적 변형이 관찰되었으며 시간이 경과할수록 다수의 세포들이 둥글게 변하면서 배지위로 떠올랐고, 바닥에 부착되어 살아있는 세포들도 정상세포에 비하여 부분적으로 세포질 부위가 응축되거나 크기가 비대해지는 경향성을 보여 주었다 (Fig. 4). 첨대 처리군의 경우는 처리 후 수 시간이 내부에서 세포의 모양에 큰 변화가 유도되었으며 시간이 경과할수록 더욱 더 현저하였다. 그러나 과루인의 처리에서 볼 수 있는 세포의 형태변화와는 완전히 다른 변형을 초래하였다. Fig. 4에서 볼 수 있듯이 첨대가 처리된 배지에서 배양된 세포는 24시간 경과 후부터 정상 세포에 비하여 가늘고 긴 분지를 형성하기 시작하였으며 상대적으로 세포질은 응축되었다. 첨대가 처리된 배지에서 배양시간이 경과할수록 이러한 분지상의 형태 변형은 더욱 심해졌으며, 72시간 경과 후 신경세포에서 볼 수 있는 dendrite-like한 분지가 세포들 사이를 연결하여 주는 듯한 특이한 형태를 관찰할 수 있었다. 그러나 패모 처리군의 경우는 정상 배지에서 자란 세포들과 동일한 형태를 여전히 유지하고 있었으며 시간의 경과에 따른 큰 변화도 관찰할 수 없었다.

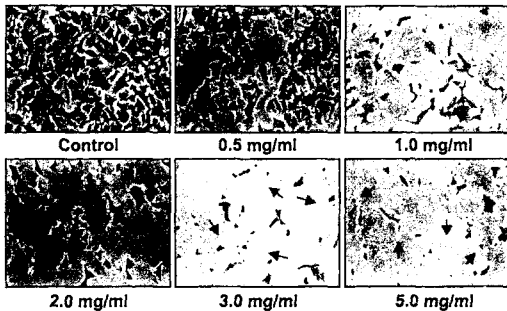


Fig. 3. Morphological changes in A549 human lung carcinoma cells following incubation with Yunpyesan. Exponentially growing cells were incubated with either vehicle alone (control) or Yunpyesane for 48 h, and Wright-stained. Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, X200.

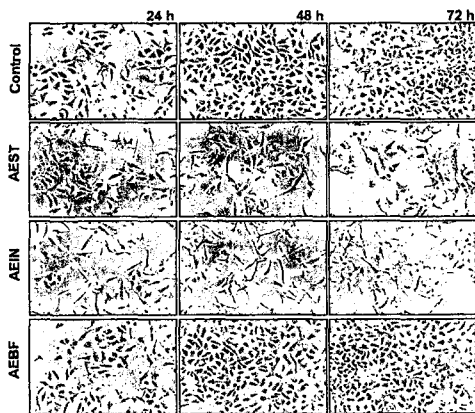


Fig. 4. Morphological changes in A549 human lung carcinoma cells following incubation with AEFU, AETK and AEPT. Exponentially growing cells were incubated with either vehicle alone (control) or AEFU, AETK and AEPT for indicated times. Cell morphology was visualized by inverted microscopy. Magnification, X200.

이상의 암세포 형태 관찰의 결과는 암세포 성장 및 생존에 미치는 윤폐산 및 각각 단미제의 결과와 매우 연관성이 있었으며 윤폐산의 처리에 의한 암세포의 심한 형태적 변형은 주로 과루인 보다 첨대에 의한 영향이 더 큰 것으로 사료되며, 패모에 의해서 거의 영향을 받지 않았다는 것은 매우 흥미로운 결과이다.

#### 4. 윤폐산 처리에 의한 apoptosis 유발

이상의 형태학적 관찰에서 윤폐산의 처리에 의한 암세포 증식의 억제는 암세포의 apoptosis 유발과 연관성이 있을 것으로 기대되어 DNA flow cytometry를 이용하여 apoptosis 유발의 정도를 분석하였다. 이를 위해 정상 및 윤폐산이 함유된 배지에서 자란 세포들을 고정한 후, 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 PI로 염색하였다. Fig. 5A는 이상의 방법에 의해 윤폐산 처리 후 매 24 마다 세포를 모아 정량적으로 분석하여 나타낸 것이다. 결과에서 알 수 있듯이 정상 배지에서 자란 암세포에서는 apoptosis 현상을 3% 미만이었으나, 윤폐산의 처리 24시간 및 48시간 후에 각각 약 27.5% 및 48.0%의 세포가 apoptosis의 과정을 통하여 사멸되었음을 알 수 있었다. 또한 윤폐산이 함유된 배지에서 72시간 배양된 암세포의 경우 57.2% 이상의 세포가 apoptosis를 일으켰음을 알 수 있었다. 다음은 윤폐산에 의한 apoptosis의 유발을 생화학적으로 증명하기 위하여 apoptosis 유발시 특이하게 분해가 일어나는 표적 단백질인 PARP<sup>32,33</sup>의 발현에 미치는 윤폐산의 영향을 Western blot 분석으로 조사하였다. 특정 내, 외부 자극에 의하여 세포 내에서 apoptosis가 일어나면 PARP 단백질의 분해가 수반되며, 그 결과 정상적인 세포의 경우 PARP 단백질은 116 kDa의 분자량을 가지지만 apoptosis가 일어난 경우 85 kDa 크기의 단편을 관찰할 수 있다<sup>32,33</sup>. 특히 PARP는 DNA repair나 genomic stability의 유지에 매우 중요한 역할을 하며<sup>34</sup>, apoptosis의 과정 중 caspase의 활성화에 의해 단백질의 분해가 일어나면 PARP의 효소적 기능의 상실로 인하여 정상적인 DNA repair 과정이 억제되어진다<sup>24,34</sup>. 이를 확인하기 위하여 윤폐산이 함유된 배지에서 자란 세포들을 24시간 간격으로 모아 동량의 단백질을 8% SDS-polyacrylamide gel로 전기영동한 후 nitrocellulose membrane으로 전이 시켜 PARP 항체를 이용하여 Western blotting을 실시하였다. Fig. 5B에서 볼 수 있는 바와 같이 정상 배지에서 배양된 세포들의 경우 116 kDa 위치에 강한 주 band를 볼 수 있으나 윤폐산이 처리된 세포의 경우 PARP 단백질은 116 kDa 및 85 kDa 위치에서 발현되는 2개의 band를 관찰할 수 있어 윤폐산 처리에 의한 apoptosis 과정에 PARP 단백질의 분해가 유발되었음을 알 수 있었다. 한편 catenin family 단백질( $\alpha$ ,  $\beta$  및  $\gamma$ )은 모든 세포에서 발현되는 세포질 단백질로서 E-cadherin과 결합하여 세포 연결기능에 중요한 역할을 한다<sup>35,36</sup>. 특히  $\beta$ -catenin은 세포내 골격의 유지와 다양한 부착성 세포의 전사 조절에 중요하며 세포 유착과 관계된 apoptosis 조절과 연관성을 가지고 있다<sup>36-38</sup>. 정상 세포의 경우  $\beta$ -catenin은 92 kDa의 분자량을 가지나 세포 유착성 apoptosis (adherent cell apoptosis)가 일어나면 62-72 kDa로 단편화가 일어난다<sup>38-40</sup>. 윤폐산에 의한 apoptosis가 이러한 세포 유착과 밀접한 관계를 지

니는지의 여부를 조사하기 위해서 Yunpyesan이 함유된 배지에서 자란 세포들의  $\beta$ -catenin 발현을 조사하였으나 Fig. 5B에서 보는 바와 같이 시간 경과에 따른  $\beta$ -catenin의 발현에 Yunpyesan은 아무런 영향을 미치지 못하였다. Yunpyesan이 처리된 세포들의 형태 관찰에서 Yunpyesan이 함유된 배지에서 자란 세포들의 부착 능력 상 실에도 불구하고  $\beta$ -catenin의 변화가 없는 것은 흥미로운 결과이나 cadherin 단백질들과의 결합력은 떨어질 것으로 예상되므로 세포 부착과 연관된 단백질들의 kinase 활성도 및 상호 결합과 관계된 연구가 요구되어진다. 또한 Yunpyesan이 처리된 배지에서 자란 암세포의 전체 단백질의 발현 변화를 조사하기 위하여 10% SDS-polyacrylamide gel로 전체 단백질을 전기영동으로 분리하였다. 분리가 끝난 gel을 Coomassie blue 염색액으로 염색하여 단백질의 발현 양상을 비교하였다. Fig. 5C는 이러한 방법에 의하여 얻은 결과로서, 처리시간의 경과에 따라 전체적인 총 단백질의 발현 양상은 크게 변화가 없었다. 이는 Yunpyesan 처리 후 단순히 단백질들의 분자량 차이에 기초를 둔 결과이므로 특정 단백질의 발현 변화를 조사하기 위해서는 2차원 전기영동을 통한 proteomics 연구를 통한 보다 정확한 단백질의 발현 양상을 파악해야 할 필요가 있을 것으로 사료된다.

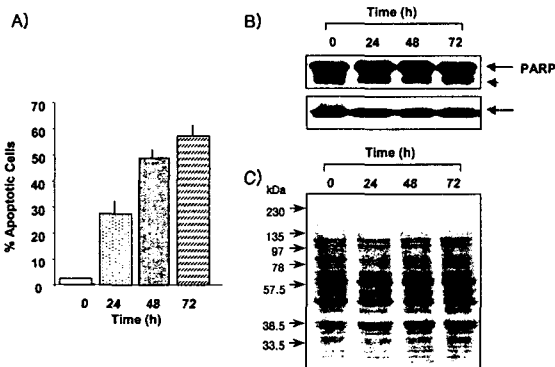


Fig. 5. A) Induction of apoptotic cell death by Yunpyesan treatment in A549 human lung carcinoma cells. Cells were treated with Yunpyesan for indicated times. Cells were then fixed and stained with PI. Apoptotic sub-G1 cells were determined by a DNA flow cytometry. Data are means  $\pm$  SEM of two separate experiments. B) Effect Yunpyesan on the levels of PARP and  $\beta$ -catenin in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with Yunpyesan for indicated times, lysed and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-PARP and anti- $\beta$ -catenin antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. C) Total protein patterns of A549 cells after Yunpyesan treatment. Cells were treated with 3.0 mg/ml Yunpyesan and the cell lysats were prepared after times indicated. Proteins were separated on 10% SDS-polyacrylamide gel and visualized by coomassie blue staining.

5. Apoptosis 관련 유전자의 발현에 미치는 Yunpyesan의 영향

상기의 결과들에서 알 수 있듯이 Yunpyesan이 함유된 배지에서 자란 폐암세포의 성장 억제제는 PARP 분해와 연관된 apoptosis와 밀접한 연관성이 있음을 알 수 있었다. 따라서 Yunpyesan에 의한

apoptosis에 관여하는 유전자의 탐색을 위하여 apoptosis와 연관성을 가지는 몇 가지 유전자 산물들의 발현을 조사하였다. 그중 Bcl-2/Bax family의 대표적 유전자인 Bcl-2는 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax는 pro-apoptotic 분자로 apoptosis의 유발과 관계가 있다<sup>21)</sup>. 이들 두 유전자는 세포 내 소기관 중 mitochondria로부터의 cytochrome c를 유리시켜 종양억제 유전자인 p53, cysteine-related protease인 caspase, DNA의 단편화와 연된 endonuclease 등의 활성을 조절한다<sup>21,26,41)</sup>. 이들은 서로 dimer의 형태로 존재하며 그들의 발현 수준에 변화가 초래되면 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다<sup>41,42)</sup>. 그러나 Yunpyesan의 처리에 의한 Bax 유전자 산물의 발현은 Fig. 6의 결과에서 알 수 있듯이 정상배지에서 증식된 세포나 Yunpyesan이 처리된 세포에서 그 발현의 차이는 거의 없었으며, Bcl-2 발현의 경우 본 실험의 조건에서는 거의 검출되지 않을 정도의 낮은 수준으로 존재하는 것으로 보아, Yunpyesan에 의한 apoptosis에는 최근에 발표된 다른 실험들의 결과<sup>38,43,44)</sup>에서와 같이 Bcl-2/Bax family와는 연관성이 없는 것으로 생각된다.

최근 caspase라 이름 붙여진 ICE/CED-like protease family는 어떤 조건하에서의 apoptosis 유발 경로에 중요한 조절인자 작용할 수 있는 것으로 보고되어져 오고 있다<sup>18,24)</sup>. 이들 family에 속하는 많은 단백질들은 세포에서 핵과 mitochondria의 외막에 존재하며<sup>45,46)</sup>, 이들의 활성화는 Bcl-2/Bax family 발현의 정도에 의존적인 경우도 있다<sup>47)</sup>. 따라서 지금까지 알려진 caspase 중 대부분의 apoptosis가 유발된 세포에서 높은 활성도를 보여주는 caspase-3 (CPP32)의 발현 정도를 조사하였다. Caspase-3가 활성화된 형태로 관찰된다면 불활성 형태인 32 kDa의 상대적 발현이 줄어들거나 그들의 활성형인 17 및 19 kDa 분자량을 가지는 단백질이 검출되어야한다. 그러나 Fig. 6에 나타낸 결과에서처럼 Yunpyesan의 처리는 caspase-3의 불활성형의 발현에 아무런 영향을 미치지 못하였고 그들의 활성형도 관찰할 수 없었다. 따라서 Yunpyesan의 처리에 의한 폐암세포의 apoptosis 유발은 Bcl-2/Bax family 뿐만 아니라 그와 연관된 caspase-3의 활성화와는 무관한 경로를 통한 것으로 생각된다.

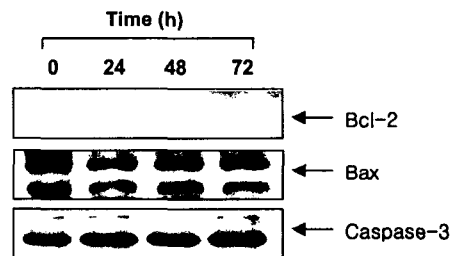


Fig. 6. Effect of Yunpyesan on the levels of Bcl-2, Bax and caspase-3 protein in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with Yunpyesan for indicated times, lysed and cellular proteins were separated by 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-Bcl-2, anti-Bax and anti-caspase-3 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system.

6. 윤폐산이 암세포의 세포주기 분포에 미치는 영향

다음은 윤폐산의 처리에 의한 폐암세포의 증식 억제 및 apoptosis와 연관된 세포주기 조절인자의 발현 변화를 조사하여 윤폐산에 의한 암세포 증식 억제기전을 검토하기 위하여 윤폐산에 의한 암세포의 증식억제가 세포주기의 특정시기와 연관성을 가지는지를 조사하였다. 이를 위하여 윤폐산이 함유된 배지에서 48시간 동안 배양된 세포를 대상으로 핵 내 DNA의 양을 상대적으로 비교하여 세포주기 각각에 분포된 세포의 수를 DNA flow cytometry를 이용하여 분석하였다. Table 2에 나타낸 바와 같이 윤폐산이 함유되지 않은 정상 배지에서 자란 폐암세포의 경우 G1기가 약 61.7%를 차지하고 있었으며, S기와 G2/M기에 속하는 세포가 각각 21.1% 및 17.2% 정도였다. 그러나 1 mg/ml의 윤폐산 농도에서 48시간 배양된 세포의 경우 G1기가 72.7%로 증가되었으며, S기와 G2/M기가 약 19.2% 및 10.1%로 나타났다. 또한 3 mg/ml 농도에서 자란 암세포의 경우는 G1기에 해당하는 세포의 분포가 75.1%로 증가되었으며 상대적으로 S기 및 G2/M기에 해당하는 세포의 빈도는 대조군에 비하여 86% 및 38% 정도 감소하였다. 즉 윤폐산의 처리 농도가 증가될수록 G1기에서의 세포성장억제가 억제되는 결과를 보여 주었다. 이상의 결과를 종합하여 보면 윤폐산의 처리에 의한 암세포의 성장억제와 apoptosis의 유발은 세포주기상 G1기에서 S기로 전이가 억제되는 G1 arrest 현상과 연관성이 있는 것으로 사료된다.

Table 2. Fractions of each cell cycle phase of A549 lung carcinoma cells cultured in the presence or absence of various concentration of aqueous extract of Yunpyesana (YPS)

YPS (mg/ml)	% of cells		
	G1	S	G2/M
0	61.7	21.1	17.2
1	72.7	19.2	10.1
2	74.4	18.5	7.1
3	75.1	18.3	6.6

7. Cyclins의 발현에 미치는 윤폐산의 영향

현재까지 약 10종 이상의 cyclins가 동정되었으며, 세포주기의 변화에 따른 그들의 역할이 점점 밝혀지고 있다<sup>12,7</sup>. 본 연구에서는 윤폐산이 포함된 배지에서 서로 다른 기간 동안 배양한 세포들을 대상으로 현재까지 밝혀진 cyclins 중에서 특히 세포주기 checkpoint 관점에서 중요한 cyclin들의 단백질 발현 정도를 조사하였다 (Fig. 7A). 먼저 D-type cyclin은 세포가 G1기로 접어들면서 발현이 증가되어지기 시작하여 Cdk4 및 Cdk6와 복합체를 형성하면서 G1기 조절을 담당하고 있다<sup>3,4</sup>. Fig. 7A에 나타낸 바와 같이 cyclin D1의 발현은 윤폐산이 처리된 시간이 경과될수록 단백질의 발현 정도가 점점 감소되는 경향성이 있는 것으로 나타났다. 이는 윤폐산 처리에 의한 cyclin D1의 전사 억제 또는 proteolysis에 의한 분해 중의 한 요인에 의한 것이라 생각되어지며, 정상 세포에 비해 발현의 정도가 감소하였으므로 상대적으로 cyclin D1에 의해 kinase 활성이 조절되는 Cdk4나 Cdk6의 활성이 감소될 것으로 생각된다. 한편 cyclin E는 Cdk2와 복합체를

형성하면서 세포주기상 G1기에서 S기로의 전이에 중요한 역할을 담당하고 있다<sup>5,6</sup>. Fig. 7A의 결과에서 알 수 있듯이 윤폐산에 의하여 세포의 성장이 억제되고 apoptosis가 유발되어도 cyclin E의 단백질 발현에는 큰 변화를 주지 않았다. 그러나 최근 발표된 연구 결과들에도 나타났듯이<sup>30,38,48-50</sup> 비록 cyclin E의 단백질 발현에는 변화가 없었으나 이와 연관된 kinase 활성은 크게 감소했을 것으로 생각된다. Cyclin A는 세포주기의 G1 후기에 발현을 시작하여 S기와 G2기를 거치는 발현이 증가되며 cyclin B1은 G2기에서 M기로의 전이를 Cdk2 및 Cdc2의 kinase 활성 변화를 통하여 조절한다<sup>8-11</sup>. 윤폐산이 처리된 세포들의 경우 Fig. 7A의 결과에서처럼 cyclin A의 발현은 윤폐산 처리 초기부터 그 발현의 정도가 급속하게 억제되었으나, 비교적 불완전하고 많은 경우 apoptosis가 일어난 세포에서 빠른 시간 내에 단백질 분해가 일어나는 cyclin B1 단백질의 경우<sup>11,12,51</sup>는 상대적으로 안정된 발현의 범위를 유지하고 있었다. 따라서 윤폐산에 의한 cyclin A 발현의 급속한 감소는 세포주기 상 가장 중요한 G1기에서 S기로의 전이 및 G2기로의 전이를 억제시켜주는 효과를 나타내었을 것으로 생각된다.

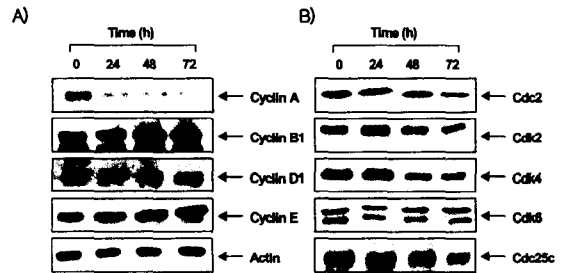


Fig. 7. Effect of Yunpyesana on the levels of cyclins (A) and Cdk (B) in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with Yunpyesana for indicated times, lysed and cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection. Actin was used as an internal control.

8. Cdk의 발현에 미치는 윤폐산의 영향

다양한 cyclins와의 결합을 통해 세포의 증식을 활성화할 수 있으면서 그의 inhibitor에 의해 활성화가 억제되는 세포주기 순환에서 중요한 역할을 수행하는 Cdk의 발현에 미치는 윤폐산의 영향을 조사한 결과는 Fig. 7B와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 윤폐산 처리에 의하여 Cdc2 및 Cdk2의 발현이 다소 감소되었음을 알 수 있었고, D-type cyclin과 결합하여 G1기에서 S기로의 전이에 중요한 역할을 하는 Cdk4의 발현 또한 윤폐산 처리 시간에 의존적으로 감소되었다(Fig. 7B). 세포분열 개시에 중요한 작용을 하며 protein phosphatase I 및 II에 의해 불활성화되는 Cdc25c<sup>52</sup> 역시 72시간 경과 후 대조군에 비하여 발현의 정도가 급속히 낮아졌다. 본 결과에서 특히 G1기에서 S기로의 전이에 중요한 Cdk4와 S기의 개시에 유지에 필수적인 Cdk2의 발현 감소는, cyclin A 발현의 감소와 더불어 윤폐산이 세포주기 중 G1

기에서 S기로의 전이를 억제할 수 있는 가능성이 있음을 시사하여 주는 결과로 생각된다.

9. Cdk inhibitors의 발현에 미치는 윤페산의 영향

다음은 윤페산의 처리에 의한 암세포의 증식억제가 Cdk inhibitor의 발현과 상관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 현재까지 알려진 Cdk inhibitor 중 가장 많은 연구가 이루어졌으며, G1기에서 S기로 전이에 중요한 역할을 하는<sup>8-11)</sup> p21, p27 및 p16의 발현을 Western blotting으로 조사하였다. Fig. 8A의 결과에서 알 수 있듯이 조사된 3가지의 Cdk inhibitor 중에서 p27의 발현만이 특이적으로 윤페산 처리 시간 의존적으로 발현이 급격히 증가되었다. 따라서 윤페산 처리에 의한 세포 증식의 억제에는 G1기에서 S기로의 전이에 중요한 역할을 하는 p27의 특이적인 발현증가와 연관성이 있으며, p27의 증가는 Cdk의 활성을 더욱 감소시켰을 것으로 생각되어진다.

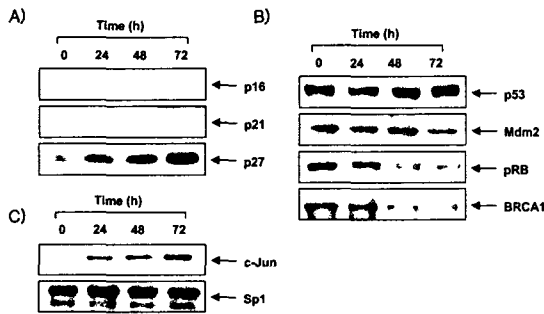


Fig. 8. Effect of Yunpyesan on the levels of Cdk inhibitors (A), tumor suppressor gene products (B) and transcription regulatory factors (C) in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with Yunpyesan for indicated times, lysed and cellular proteins were separated by 6-12% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with indicated antibodies, respectively. Proteins were visualized using ECL detection. Actin was used as an internal control.

10. 몇 가지 종양억제 유전자 및 전사조절인자의 발현에 미치는 윤페산의 영향

이상의 결과에서 알 수 있듯이 윤페산에 의한 암세포의 성장 억제 및 apoptosis의 유발은 몇 가지 세포주기조절 인자의 특이적인 발현 변화와 깊은 관계가 있음을 알 수 있었다. 본 연구에서 조사된 세포주기를 조절하는 인자들은 결국 종양억제 및 전사조절인자들의 발현에 따른 조절과 직접적인 연관성이 있기 때문에 윤페산이 함유된 배지에서 자란 암세포들의 증식 억제와 연관된 몇 가지 이들 유전자들의 발현의 변화를 조사하였다. 조사된 종양억제 유전자들 중 p53은 Fig. 8B에서 보는 바와 같이 윤페산 처리시간의 경과에 따라 발현이 증가되어 p27의 발현증가와 연관성이 있는 것으로 생각되어 지며, 특히 p53 및 p27은 세포주기의 조절뿐만 아니라 암세포의 apoptosis 및 분화 유발과도 밀접한 관계가 있으므로<sup>2,14,15,53)</sup>, 윤페산에 의한 암세포의 증식 억제 및 apoptosis에 이 두 유전자의 발현이 중요한 역할을 한 것으로 생각되어진다. 그리고 pRB는 D-type cyclins에 의하여 인

산화가 조절되며 이로 인한 G1/S 전이 및 DNA 합성 기전을 조절하는 유전자의 중요한 조절인자인 E2Fs의 활성을 조절한다<sup>3,4)</sup>. Fig. 8B에서 볼 수 있는 바와 같이 윤페산의 처리에 의하여 pRB의 전체적인 발현은 감소되었으나, 윤페산 처리 시간의 경과에 따라 윤페산이 처리되지 않은 정상배지에서 배양된 세포군에 비하여 인산화가 되지 않은 아래쪽의 band 발현이 상대적으로 점차 많아짐을 알 수 있다. 즉 윤페산 처리에 의한 pRB의 인산화가 억제되었음을 의미하고 이는 결국 전사조절인자의 작용을 억제하였을 것으로 생각된다. Mdm2는 일종의 oncogene으로 많은 종류의 종양에서 증폭되어 있고 높은 발현을 보여주고 있으므로, Mdm2의 발현 정도가 조직의 암화 및 전이와 연관된 지표로서 사용되어지고 있다<sup>54,55)</sup>. 본 실험의 결과에서는 윤페산이 처리됨에 따라 폐암세포에서의 Mdm2의 발현은 다소 감소되는 경향성을 보여 주었다 (Fig. 8B). Mdm2 유전자는 종양억제 유전자 p53에 의한 전사조절 활성의 표적 유전자이며 Mdm2 단백질은 p53의 음성 조절인자로서 작용함이 최근 밝혀져 있다<sup>54-57)</sup>. 따라서 윤페산의 처리에 의한 Mdm2 단백질 발현의 감소는 p53 단백질의 발현 증가와 상관관계가 있을 것으로 생각되어진다. 한편 BRCA1은 사람의 제 17번 염색체 상에 있는 유전자로서 가족성 유방암 환자 (familial breast cancer)에서 BRCA1 유전자의 돌연변이가 빈도가 높다고 보고된 바 있다<sup>58)</sup>. BRCA1 유전자 산물은 핵 내 존재하는 phosphoprotein으로 세포주기에 따라 혹은 DNA 손상에 연관된 외부 신호에 따라 다양한 phosphorylation 양상의 변화 및 발현의 변화를 보여주며<sup>59,60)</sup>, 세포주기 조절인자들과 연관된 다양한 기능들<sup>61-63)</sup>뿐만 아니라 DNA 수선 및 genome stability, apoptosis의 조절 등에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어져 오고 있다<sup>64,65)</sup>. 본 연구의 결과 (Fig. 8B)에서 볼 수 있는 바와 같이 BRCA1 단백질은 윤페산의 처리에 따라 발현의 정도가 매우 낮아져 세포주기의 조절 또는 DNA 수선의 정상적인 기능의 상실을 유도하였을 것으로 생각되어진다. 다음은 윤페산에 의한 암세포 증식의 억제 및 apoptosis의 유발과 연관된 전사조절인자의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Sp-1 및 c-Jun의 단백질 발현 정도를 윤페산이 함유된 배지에서 자란 암세포와 정상배지에서 자란 암세포를 대상으로 비교하였다 (Fig. 8C). Sp family에 속하는 전사조절인자는 현재 4가지가 밝혀져 있으며, 그중 가장 많은 연구가 이루어진 Sp-1은 RNA polymerase II의 활성에 관여할 것으로 생각되어지며<sup>66)</sup> 여러 유전자의 promoter 부분에서 가장 많이 발견되어지는 promoter-특이적 전사조절인자 중의 하나로서 다양한 유전자의 promoter 활성에 관여하고 있다. Sp-1은 종양 괴사인자 (tumor necrosis factor)에 의한 low density lipoprotein receptor의 활성을 조절하며<sup>67,68)</sup>, 많은 유전자들의 전사와 효소들의 활성 조절에 직접적으로 관여하는 것으로 보고되어져 오고 있다<sup>69,72)</sup>. 본 실험 결과의 경우 Fig. 8C에 나타내었듯이 윤페산의 처리에 따른 Sp-1의 단백질 수준에서의 변화는 관찰되지 않았다. 그러나 Sp-1이 윤페산 처리에 의해 나타난 몇 가지 특이적인 유전자 발현의 변화에 직, 간접적으로 관여했을 것으로 추정되므로 이에 관한 지속적인 연구가 요구되어져야 할 것으로 생각된다. 한편 c-Jun은 동형 혹은



Fos와 이형복합체로서 전사조절인자인 activator protein-1 (AP-1)을 구성하고 있으며, Jun family에는 c-Jun, Jun B 및 Jun D 등이 동정되어있다<sup>73,74)</sup>. 이는 세포주기조절이외에 정상세포 및 암세포에서의 apoptosis 유발뿐만 아니라 신경세포에서의 apoptosis, neuroprotection과 regeneration에서도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>73,75)</sup>. Fig. 8C에 나타난 결과에서처럼 정상 배지에서 배양된 암세포의 c-Jun 단백질의 발현은 극히 미비하여 immunoblotting에 의하여 검출하기 어려운 정도였으나, 윤페산이 함유된 배지에서 자란 암세포는 시간이 경과할수록 c-Jun의 발현이 매우 증가되었다.

## 결 론

인체 폐암 세포주인 A549 세포의 성장에 미치는 윤페산의 영향을 분석하기 위하여 윤페산 추출물 처리에 의한 암세포 생존율 및 성장률을 조사하고, apoptosis 유발 및 세포주기 조절과 관련된 인자들의 발현을 조사하였다. 윤페산 처리농도에 따른 암세포의 생존율 및 성장율은 농도 및 시간 의존적으로 대조군에 비하여 감소되었고, 각각의 단미제에 의한 생존율과 성장률을 비교한 결과 폐모 추출물은 암세포 성장에 큰 영향을 미치지 않았으나 과루인과 청대가 처리된 배지에서는 암세포의 성장이 거의 이루어지지 않았다. 윤페산 처리에 의한 암세포의 성장억제는 세포의 심한 형태적 변이와 연관이 있었고, 단미제의 경우 과루인, 청대에 의한 암세포변형은 현저했으나 폐모에 의한 영향은 발견되지 않았다. 이러한 결과들은 윤페산 처리에 의한 sub G1기의 증가 및 PARP 단백질의 분해와 연관된 apoptosis 유발과 상관성이 있었으나 Bcl-2/Bax family 및 caspase-3의 발현과는 상관성이 없었다. 또한 윤페산의 처리에 의하여 세포주기 분석에서 G1기 세포에 속하는 세포 수가 증가되었으며, 윤페산 처리에 의한 세포주기 조절인자의 발현을 조사한 결과 G1기에서 S기 및 G2기로의 전이에 중요한 양성조절인자인 cyclin D1 및 A 단백질의 발현은 감소되었으나 cyclin E 및 B1의 발현에는 큰 영향을 주지 않았다. 또한 종양억제유전자 p53 발현의 증가와 함께 Cdk inhibitor들의 활성에 있어서는 p27의 발현만이 특이적으로 증가되어, cyclin D1 및 A의 발현감소와 함께 G1 arrest를 유발한 주요 요인으로 사료된다. 이러한 특징은 pRB의 인산화 억제 및 Mdm2 발현의 감소와 상관성을 지니는 것으로 추정되어지며, c-Jun의 발현 증가도 윤페산에 의한 성장억제 및 apoptosis 유발에 중요한 조절인자로 작용할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Sherr, C.J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* 60, 3689-3695, 2000.
2. Weinberg, R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330, 1995.
3. Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C.J., Kato, J.Y. D-type cyclin-dependent kinase

- activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2066-2076, 1994.
4. Meyerson, M., Harlow, E. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2077-2086, 1994.
5. Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J.W., Elledge, S., Nishimoto, T., Morgan, D.O., Franza, B.R., Roberts, J.M. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 257, 1689-1694, 1992.
6. Ohtsubo, M., Roberts, J.M. Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science* 259, 1908-1912, 1993.
7. Sherr, C.J. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73, 1059-1065, 1993.
8. Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A., Lamb, N.J. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 67, 1169-1179, 1991.
9. Guadagno, T.M., Ohtsubo, M., Roberts, J.M., Assoian, R.K. A link between cyclin A expression and adhesion-dependent cell cycle progression. *Science* 262, 1572-1575, 1993.
10. Walker, D.H., Maller, J.L. Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication. *Nature* 354, 314-317, 1991.
11. Brandeis, M., Hunt, T. The proteolysis of mitotic cyclins in mammalian cells persists from the end of mitosis until the onset of S phase. *EMBO J.* 15, 5280-5289, 1996.
12. Elledge, S.J., Harper, J.W. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 847-852, 1994.
13. Morgan, D.O. Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131-134, 1995.
14. Gu, Y., Turck, C.W., Morgan, D.O. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* 366, 707-710, 1993.
15. Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., Elledge, S.J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816, 1993.
16. El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculesco, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, E.W., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825, 1993.
17. Xiong, Y., Hannon, G., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701-704, 1993.
18. Evans, V.G. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol. Int.* 17, 461-476, 1993.
19. Arends, M.J., Morris, R.G., Wyllie, A.H. Apoptosis. The role

- of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 136, 593-608, 1990.
20. Shi, L., Nishioka, W.K., Th'ng, J., Bradbury, E.M., Litchfield, D.W., Greenberg, A.H. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science* 263, 1143-1145, 1994.
  21. Chiarugi, V., Magnelli, L., Cinelli, G., Basi, G. Apoptosis and the cell cycle. *Cell. Mol. Biol. Res.* 40, 603-612, 1994.
  22. El-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietsenpol, J.A., Burrell, M., Hill, D.E., Wang, Y., Wiman, K.G., Mercer, W.E., Kastan, M.B., Kohn, K.W., Elledge, S.J., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 54, 1169-1174, 1994.
  23. Miyashita, T., Reed, J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299, 1995.
  24. Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell*, 88, 355-365, 1997.
  25. Zhan, Q., Fan, S., Bae, I., Guillouf, C., Liebermann, D.A., O'Connor, P.M., Fornace, A.J., Jr. Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene* 9, 3743-3751, 1994.
  26. Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T., Housman, D.E. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74, 957-967, 1993.
  27. 許浚, 東醫寶鑑 p 470, 南山堂, 서울, 1994.
  28. 劉春安, 彭明, 抗癌中草藥大辭典, p 107-115, 149-152. 374-377, 599-602, 849-852, 湖北科學技術出版社, 湖北, 中國, 1994.
  29. Choi, Y.H. Research technics for the cell cycle study, *Exp. Mol. Med.* 33, S15-36, 2001.
  30. Choi, Y.H., Lee, W.H., Park, K.Y., Zhang, L. p53-independent induction of p21 (WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 91, 164-173, 2000.
  31. Choi, Y.H., Lee, S.J., Nguyen, P., Jang, J.S., Lee, J., Wu, M.L., Takano, E., Maki, M., Henkart, P.A., Trepel, J.B. Regulation of cyclin D1 by calpain protease. *J. Biol. Chem.* 272, 28479-28484, 1997.
  32. Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E., Poirier, G.G. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 53, 3976-3985, 1993.
  33. Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., Earnshaw, W.C. Cleavage of poly ADP-ribose polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371, 346-347, 1994.
  34. Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S., Dixit, V.M. Yama/CPP32, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81, 801-809, 1995.
  35. Johnson, J.P. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis. Rev.* 18, 345-357, 1999.
  36. Wijnhoven, B.P., Dinjens, W.N., Pignatelli, M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br. J. Surg.* 87, 992-1005, 2000.
  37. Debruyne, P., Vermeulen, S., Mareel, M. The role of the E-cadherin/catenin complex in gastrointestinal cancer. *Acta. Gastroenterol. Belg.* 62, 393-402, 1999.
  38. Choi, Y.H., Baek, J.H., Yoo, M.A., Chung, H.Y., Kim, N.D., Kim, K.W. Induction of apoptosis by ursolic acid through activation of caspases and down-regulation of c-IAPs in human prostate epithelial cells. *Int. J. Oncol.* 17, 565-571, 2000.
  39. Fukuda, K. Apoptosis-associated cleavage of  $\beta$ -catenin in human colon cancer and rat hepatoma cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 31, 519-529, 1999.
  40. Steinhilber, U., Badock, V., Bauer, A., Behrens, J., Wittman-Liebold, B., Dorken, B., Bommert, K. Apoptosis-induced cleavage of  $\beta$ -catenin by caspase-3 results in proteolytic fragments with reduced transactivation potential. *J. Biol. Chem.* 275, 16345-16353, 2000.
  41. Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., Borner, C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 391, 496-499, 1998.
  42. Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75, 241-251, 1993.
  43. Spets, H., Georgii-Hemming, P., Siljason, J., Nilsson, K., Jernberg-Wiklund, H. Fas/APO-1 (CD95)-mediated apoptosis is activated by interferon-gamma and interferon-in interleukin-6 (IL-6)-dependent and IL-6-independent multiple myeloma cell lines. *Blood* 92, 2914-2923, 1998.
  44. Hieronymus, T., Blank, N., Gruenke, M., Winkler, S., Haas, J.P., Kalden, J.R., Lorenz, H.M. CD 95-independent mechanisms of IL-2 deprivation-induced apoptosis in activated human lymphocytes. *Cell Death. Differ.* 7, 538-547, 2000.
  45. Tsujimoto, Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells* 3, 697-707, 1998.
  46. Reed, J.C. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17, 3225-3236, 1998.
  47. Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., Newmeyer, D.D. The release of cytochrome c from mitochondria: a

- primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-1136, 1997.
48. Lee, J., Choi, Y.H., Nguyen, P., Kim, J.S., Lee, S.J., Trepel, J.B. Cyclic AMP induces inhibition of cyclin A expression and growth arrest in human hepatoma cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1449, 261-268, 1999.
  49. Choi, Y.H., Zhang, L., Lee, W.H., Park, K.Y. Genistein-induced G2/M arrest is associated with the inhibition of cyclin B1 and the induction of p21 in human breast carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 13, 391-396, 1998.
  50. Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A., Lamb, N.J.C. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 67, 1169-1179, 1991.
  51. Clute, P., Pines, J. Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nat. Cell Biol.* 1, 82-87, 1999.
  52. Lundberg, A.S., Weinberg, R.A. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur. J. Cancer* 35, 1886-1894, 1999.
  53. Bringold, F., Serrano, M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp. Gerontol.* 35, 317-329, 2000.
  54. Freedman, D.A., Wu, L., Levine, A.J. Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 96-107, 1999.
  55. Yap, D.B., Hsieh, J.K., Chan, F.S., Lu, X. mdm2: a bridge over the two tumour suppressors, p53 and Rb. *Oncogene* 18, 7681-7689, 1999.
  56. Zhang-Wang, H. MDM2 oncogene as a novel target for human cancer therapy. *Curr. Pharm. Des.* 6, 393-416, 2000.
  57. Lohrum, M.A., Vousden, K.H. Regulation and function of the p53-related proteins: same family, different rules. *Trends Cell Biol.* 10, 197-202, 2000.
  58. Kelsell, D.P., Black, D.M., Bishop, D.T., Spurr, N.K. Genetic analysis of the BRCA1 region in a large breast/ovarian family: refinement of the minimal region containing BRCA1. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1823-1828, 1993.
  59. Ruffner, H., Verma, I.M. BRCA1 is a cell cycle-regulated nuclear phosphoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7138-7143, 1997.
  60. Fan, S., Twu, N.F., Wang, J.A., Yuan, R.Q., Andres, J., Goldberg, I.D., Rosen, E.M. Down-regulation of BRCA1 and BRCA2 in human ovarian cancer cells exposed to adriamycin and ultraviolet radiation. *Int. J. Cancer* 77, 600-609, 1998.
  61. Chai, Y.L., Cui, J., Shao, N., Shyam, E., Reddy, P., Rao, V.N. The second BRCT domain of BRCA1 proteins interacts with p53 and stimulates transcription from the p21WAF1/CIP1 promoter. *Oncogene* 18, 263-268, 1999.
  62. Zheng, L., Lee, W.H. The retinoblastoma gene: a prototypic and multifunctional tumor suppressor. *Exp. Cell. Res.* 264, 2-18, 2001.
  63. Ruffner, H., Jiang, W., Craig, A.G., Hunter, T., Verma, I.M. BRCA1 is phosphorylated at serine 1497 in vivo at a cyclin-dependent kinase 2 phosphorylation site. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4843-4854, 1999.
  64. Andres, J.L., Fan, S., Turkel, G.J., Wang, J.A., Twu, N.F., Yuan, R.Q., Lamszus, K., Goldberg, I.D., Rosen, E.M. Regulation of BRCA1 and BRCA2 expression in human breast cancer cells by DNA-damaging agents. *Oncogene* 2229-2241, 1998.
  65. Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T., Livingston, D. Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell* 88, 265-275, 1997.
  66. Dynan, W.S., Tjian, R. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35, 79-87, 1983.
  67. Chopra, A., Ferreira-Alves, D.L., Sirois, P., Thirion, J.P. Cloning of the guinea pig 5-lipoxygenase gene and nucleotide sequence of its promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185, 489-495, 1992.
  68. Hamanaka, R., Kohno, K., Seguchi, T., Okamura, K., Morimoto, A., Ono, M., Ogata, J., Kuwano, M. Induction of low density lipoprotein receptor and a transcription factor SP-1 by tumor necrosis factor in human microvascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 267, 13160-13165, 1992.
  69. Wu, R.L., Chen, T.T., Sun, T.T. Functional importance of an Sp1- and an NF- $\kappa$ B-related nuclear protein in a keratinocyte-specific promoter of rabbit K3 keratin gene. *J. Biol. Chem.* 269, 28450-28459, 1994.
  70. Liden, M., Wilen, B., Ljunghall, S., Melhus, H. Polymorphism at the Sp 1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene does not predict bone mineral density in postmenopausal women in sweden. *Calcif. Tissue Int.* 63, 293-295, 1998.
  71. Zhu, Q.S., Chen, K., Shih, J.C. Bidirectional promoter of human monoamine oxidase A (MAO A) controlled by transcription factor Sp1. *J. Neurosci.* 14, 7393-7403, 1994.
  72. Hu, P.P., Shen, X., Huang, D., Liu, Y., Counter, C., Wang, X.F. The MEK pathway is required for stimulation of p21(WAF1/CIP1) by transforming growth factor- $\beta$ . *J Biol Chem.* 274, 35381-35387, 1999.
  73. Herdegen, T., Skene, P., Bahr, M. The c-Jun transcription factor-bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration. *Trends Neurosci.* 20, 227-231, 1997.
  74. McGill, G., Fisher, D.E. DNA bending and the curious case of Fos/Jun. *Chem. Biol.* 5, 29-38, 1998.
  75. Chen, Y.R., Tan, T.H. The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling. *Int. J. Oncol.* 16, 651-662, 2000.