

桑寄生이 HepG2 cell의 세포분열 및 관련유전자 발현에 미치는 영향

류광렬, 김영철, 이장훈, 우홍정
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

The Effects of *Loranthus parasiticus* Merr. on Cell Cycle and Expression of Related Genes in HepG2 Cell

Kwang-Yul Rhew, Young-Chul Kim, Jang-Hoon Lee, Hong-Jung Woo

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

Objectives : The aim of this study was to evaluate the effects of *Loranthus parasiticus* Merr. on cell cycle and expression of related genes in HepG2 cells.

Methods : The MTT assay, cell counting assay, [³H]-Thymidine incorporation assay, flow cytometric analysis, quantitative RT-PCR and western blot assay were studied.

Results : In the water extract of *Loranthus parasiticus* Merr., inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in HepG2 cells was seen. These inhibitory effects were due to inhibition of G1-S transition in cell cycle. After treatment with the extract, expression of cyclin D1(G1 check point related gene) was inhibited particularly in dose-dependent and time-dependent manners.

Conclusion : These results suggest that the inhibition of cell cycle progression by *Loranthus parasiticus* Merr. in HepG2 cell is due to suppression of cyclin D1(G1 check point related gene) mRNA expression and protein synthesis.

Key Words: *Loranthus parasiticus* Merr. HepG2 cell, Cell cycle, Cyclin D1

1. 緒 論

우리나라에서 간암은 남자에서 위암, 폐암에 이어 세 번째로 호발하고 여자에서는 일곱 번째로 호발하며¹, 사망원인 역시 인구 10만명당 22.8명으로 신생물에 의한 사망 중 폐암, 위암에 이어 세 번째로 높은 실정이다².

간암의 발생기전 및 치료와 관련하여 최근에는 분자생물학적 연구가 많이 보고되고 있다. 간세포암

형성에는 p53 등의 tumor suppressor gene과 cyclin D1 등의 oncogene³ 및 p15 등의 cell cycle regulation에 관련된 gene⁴ 등이 알려져 있다. 특히 B형 간염과 관련해서는 B형 간염 바이러스에 의해 생성되는 X단백질(HBx)이 간세포내 신호전달을 활성화시켜 간암의 발생과 전이에 관여하는 금속단백 분해효소(MMP-9)를 활성화시킨다는 보고⁵가 있다.

桑寄生은 겨우살이과(Loranthaceae)에 속한 뽕나무 겨우살이(*Loranthus parasiticus* Merr.)의 잎, 줄기, 가지이다⁶. 桑寄生은 補肝腎, 祛風濕, 強筋骨, 安胎의 효능을 갖고 있으며⁷, 항암⁸⁻¹¹, 항고혈압, 항균, 항바이러스 등의 약리효능이 보고되고 있다^{12,13}.

桑寄生에 대한 실험적 연구로 황¹⁴은 桑寄生 및

· 접수 : 2005. 1. 20 · 채택 : 2005. 2. 22
· 교신저자 : 이장훈, 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 한방병원 간계내과학교실
(Tel. 02-958-9118 Fax. 02-958-9120
E-mail: komclive@khu.ac.kr)

槲寄生 전탕액의 항종양 면역효과를, 차¹⁵ 등은 항산화작용을, 박¹⁶ 등은 면역조절작용이 있음을 보고하였으며, 최근 독일 등 유럽에서는 각종 악성종양의 치료 및 치료보조제로 광범위하게 사용되고 있다.

이에 저자는 槲寄生이 HepG2 cell에서 세포분열 및 관련유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 HepG2 cell의 증식과 DNA 합성에 미치는 영향을 바탕으로 세포분열주기에 대한 분석과 세포분열주기 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 약제

본 실험에 사용한 槲寄生(Visci Herba Et Loranthis Ramulus; SGS)은 대한약전의한약(생약)규격집⁶에 근거하여 경희의료원 한방병원 약제과에서 엄선한 것을 구입하여 사용하였다.

Herb	Pharmacognosy Name	Scientific Name
槲寄生	Visci Herba Et Loranthis Ramulus	<i>Loranthus parasiticus Merr.</i>

2) 검액의 조제

실험에 사용한 검액의 조제는 槲寄生(100g)을 3차 증류수 500ml에 혼합하여 90ml가 될 때까지 가열, 농축시키고 환류추출한 후 면으로 여과하여 그 남은 액을 80℃ 물 중탕 위에서 감압 농축하고, 동결건조기(Christ LDC-1 and Alpha/4, Osterode, Germany)를 이용하여 건조추출물 20.8g(수율; 20.8%)을 얻었다. 얻어진 추출물을 DMEM 배지 110 ml에 더하여 37℃에서 3시간 동안 녹였다. 원심분리하여 남아있는 시료를 제거한 상층액을 0.45 μm 필터(Millipore, USA)로 여과하여 멸균하고 4℃에 저장하였다.

2. 방법

1) 세포배양

인체 간암세포주 HepG2 cell은 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD)에서 구입하여 DMEM 90%와 fetal bovine serum 10% 혼합배지를 이용하여 5%의 CO₂ 상태가 유지되는 37℃ incubator에서 배양하였다.

2) 간암세포에 대한 검액의 처리

槲寄生의 HepG2 cell 증식에 미치는 영향을 분석하기 위하여 HepG2 cell을 1 x 10⁵ cells/well의 밀도로 배양한 후 槲寄生을 1, 10, 25, 50, 100 μg/ml의 농도로 12, 24, 48 시간 동안 처리하였다.

3) MTT 반응실험

(1) MTT 용액제작 및 처리

MTT 5mg/ml을 PBS에 녹여 pH 7.5로 맞춘 후 0.22μm의 filter로 여과하여 stock solution을 만들었다. 그 후 1 x 10⁵개의 세포를 포함하고 있는 100μl의 cell suspension에 10μl의 MTT stock solution을 첨가하였다.

(2) 효소반응과 면역형광측정

MTT stock solution에 cell suspension을 첨가한 상태로 37℃에서 3시간 보존한 후 100μl의 0.04M HCl in absolute isopropanol을 각각의 well에 잘 혼합하여 blue formazan crystals을 완전히 용해시켰다. 효소의 용해가 끝난 뒤 570nm에서 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) reader로 optical density(OD)를 측정하였다.

4) Cell counting analysis

槲寄生의 HepG2 cell 증식에 미치는 영향을 분석하기 위하여 HepG2 cell을 1 x 10⁵ cells/well의 밀도로 배양한 후 槲寄生을 1, 10, 25 μg/ml의 농도로 24, 48, 72 시간동안 처리하였다. 槲寄生을 처리한 세포와 처리하지 않은 대조군 세포는 trypsinization을 통해 회수하였으며 cell counter(Coulter Corp., USA)를 이용하여 세포수를 측정하였다.

5) [³H]-Thymidine incorporation assay를 이용한 세포증식분석

세포의 DNA 합성에 미치는 槲寄生의 영향을 조

사하기 위하여 [³H]-Thymidine incorporation assay를 시행하였다. HepG2 cell을 1×10^5 cells/well로 seeding한 후 10% serum이 첨가된 배지로 24시간 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후 새로운 배지로 교환함과 동시에 桑寄生 1, 5, 10, 25 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하였다. 桑寄生 처리 20시간 후에 1.0 $\mu\text{Ci/ml}$ 의 [³H]-Thymidine (Amersham, Arlington Heights, IL)을 4시간 동안 pulse-labeling 하였고 DNA내로 incorporation된 trichloroacetic acid-precipitable radioactivity의 양(count per minute: CPM)은 liquid scintillation counter를 이용하여 측정하였다.

6) Flow cytometric analysis

5×10^5 개의 cell을 0.2 ml PBS에 현탁시킨 후 2ml의 ice-cold 75% ethanol/25% PBS를 첨가하여 고정시켰다. PBS에 강력하게 재현탁시킨 후 100 $\mu\text{g/ml}$ RNase와 40 $\mu\text{g/ml}$ propidium iodide (PI)가 포함된 PBS에서 37 $^{\circ}\text{C}$ 로 30분간 배양한 후 세포를 회수하여 FACSscan (FACS Caliber cellquest program [Becton Dickinson])을 이용하여 cell cycle을 측정하였다.

7) 정량적 RT-PCR 분석

(1) Total RNA의 추출

Total RNA는 배양된 세포로부터 single-step method에 의해 추출하였다. RNA 추출을 위한 solution D는 GSS solution(250g의 guanidine isothiocyanate, 17.6ml의 0.75M sodium citrate, 26.4 ml의 10% sarkosyl과 293ml의 3차 증류수)에 0.1M 농도의 2-mercaptoethanol을 첨가하여 만들었다. 배양 후 회수된 세포들에 500 μl solution D와 2M의 50 μl sodium acetate(pH 4.0)를 첨가한 후 vortexing 하였다. 500 μl water-saturated phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)을 혼합하여 20초간 vortexing한 후 15분간 얼음에서 방치 하였고 20분간 15000g로 원심분리한 후 상층액에 1000 μl cold isopropanol을 혼합하여 -70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간동안 저장한 후 침전시켰다. RNA를 20분간 15000g으로 원심분리한 후 RNA pellets를 100% ethanol과 70% ethanol로 세척하였다. RNA는 30 μl 의 RNase-free

water에 용해시켰다. 추출된 RNA의 농도는 흡광도 260nm과 280nm에서 spectrophotometric measurement(Schimadzu Scientific Instruments, Inc., Concord, CA, USA)로 측정하였다.

(2) cDNA의 합성

추출된 1 μg 의 RNA는 M-MLV RT(Gibco)과 random hexamer를 사용하여 cDNA로 역전사시켰다. 1 μg 의 추출된 RNA를 2 μl 의 reverse transcriptase buffer, 1 μl 의 random hexamer(10 pM), 1 μl 의 M-MLV RT(10 U/ μl), 1 μl 의 dNTP(10 pM), 그리고 0.5 μl 의 RNase inhibitor와 혼합하였다. 이 혼합물은 23 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간, 42 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 그리고 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 반응시켰다. 각각의 RNA로부터 얻어진 2개의 분리된 cDNA는 1:4 또는 1:8로 sterile H₂O로 희석하여 PCR 반응에 이용하였다.

(3) PCR 시행

유전자 발현에 대한 정량적 분석을 위하여 cycle numbers(21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, and 42 cycles)를 증가시키면서 연속적으로 희석된 cDNAs (1:0, 1:2, 1:4, and 1:8)에 대한 PCR을 시행하였다. 각각의 cycle은 95 $^{\circ}\text{C}$ 로 1분간의 denaturation, 58-62 $^{\circ}\text{C}$ 로 45초간 annealing, 그리고 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간의 polymerization으로 구성하였다. 50 μl 의 PCR 반응에서 12.5-25ng의 cDNA는 26-34 cycle을 시행하는 동안 housekeeping gene인 GAPDH를 포함한 모든 유전자들의 증폭이 대수적으로 증가함이 확인되었다. RT-PCR 산생물은 1시간동안 110 Volt로 2% agarose gel (FMC, Rockland, ME)을 이용하여 전기영동하였다. Agarose gel은 30분간 ethidium bromide (0.5 $\mu\text{g/ml}$ of 1 X TBE)로 염색한 후 15분간 1 X TBE로 탈색하였다. PCR 산생물은 자외선을 이용하여 가시화한 후 사진촬영하였다. 사진영상의 음영이 깨끗해지도록 증류수에 적시고 나서 건조시켰다. Unspliced RNA 또는 genomic DNA의 PCR 산생물과 spliced mRNA의 PCR 산생물의 감별을 위하여 3'과 5' primer는 적어도 하나의 intron에 의해 분리되어 각각 다른 exons에 놓여지도록 제작하였다.

(4) RT-PCR 산생물의 densitometric analysis 유전자 발현에 대한 정량화는 ethidium bromide-stained gel을 laser densitometry로 scanning하여 얻었다. Signal intensity의 측정은 Molecular Analyst Program (version 2.0)을 이용하여 laser densitometer (Bio-Rad)로 실행하였다. RT-PCR 산생물 사진영상의 음영조절부는 지속적으로 scanning하고, 배경의 intensity를 감산한 후 housekeeping gene인 GAPDH의 intensity에 대한 각각의 유전자 발현 intensity의 비율을 계산함으로써 유전자의 발현을 정량화하였다. 각각의 준비된

cDNA는 최소 2회의 정량적 RT-PCR을 반복 시행하였다.

8) Western blot analysis

(1) 세포에서 단백질 추출

PBS로 세포를 두 번 씻어내고 RIPA buffer (50mM Tris-HCL pH8.0, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 1% deoxycholate, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1% Protease inhibitor cocktail(sigma))를 가하여 세포를 녹였다. 녹인 세포를 12000g로 15분 동안 원심분리하여 상

Oligonucleotide Primers Used for Quantitative RT-PCR Analysis
(All sequences are listed 5' to 3')

Gene	Sequences	Orientation
GAPDH	TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT	sense
	GACCATGAGAAGTATGACAACAGC	antisense
p53	TCTGTCCCTCCCAGAAAACC	sense
	TTGGGCAGTGCTCGCTTAGTGCTCC	antisense
p21/Waf1	AGCTGGGCGCGGATTCGCCGAG	sense
	AGGCTTCCTGTGAGCGGGCCTTG	antisense
p27/Kip1	CCATAGCCTAGTCAACAGATCAC	sense
	AGGCATAGGCGCTTTAACGAGAGT	antisense
Cyclin D1	TCTAAGATGAAGGAGACCATC	sense
	GCGGTAGTAGGACAGGAAGTTGTTG	antisense
Cdc2	CTAACTATGGAAGATTATAC	sense
	GAGATATAACCTGGAATCCT	antisense
c-Myc	GATTCTCTGCTCTCCTCGACGGAG	sense
	GCGCTGCGTAGTTGTGCTGATGTG	antisense
c-Fos	TTACTACCACTCACCCGCAGACTC	sense
	TGGAGTGTATCAGTCAGCTCCCTC	antisense
c-Jun	GGTACCATGGAACATAAGGATCAAT	sense
	CTTAGATCTGGATAAACTGATCGG	antisense
CDK4	GGTAAGCTGCATCGATCGGCTAC	sense
	AAATCCAGTCACCTAGGTAGCTC	antisense
RB1	AATCCCGTAGATCGAGAGTCCGG	sense
	CCTAACAGTTGATCGAGGTCCCTA	antisense
PTEN	ACATCTCTACTATAACATCTTGAT	sense
	ACATCTCTCCTATTTATAGTCGTT	antisense
p16/INK4A	AACATACCATTGGGACATGAGTC	sense
	GACTTGACCGTGCGGTAGTAGTT	antisense

등액을 취해 spectrophotometer로 정량하였다.

(2) SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis

(가) 1.9ml 증류수, 1.7ml 30% Acrylamide solution, 1.3ml 1.5M Tris-HCl(pH8.8), 50 μ l 10% SDS, 50 μ l 10% Ammonium persulfate, 2 μ l TEMED를 섞어 10% separating gel을 만들었다.

(나) 1.4ml 증류수, 0.33ml 30% Acrylamide solution, 0.25ml 1M Tris-HCl(pH6.8), 20 μ l 10% SDS, 50 μ l 10% Ammonium persulfate, 2 μ l TEMED를 섞어 5% stacking gel을 만들었다.

(다) Protein sample loading buffer(0.6ml 1M Tris-HCl(pH6.8), 5ml 50% glycerol, 2ml 10% SDS, 0.5ml β -mercaptoethanol, 1ml 1% bromophenolblue, 0.9ml D.W)와 protein sample을 섞어 gel에 단백질 20 μ g을 loading하였다.

(라) 60V로 30분간 running한 후, 100V로 45분간 running하였다.

(3) Nitrocellulose membrane으로 이동

전기영동이 끝난 후 젤 상의 단백질을 transfer buffer (20mM Tris-HCl pH8.3, 150mM glycine, 20% methanol)에서 170mA, 1시간 동안 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다.

(4) Immunoblotting

(가) Nitrocellulose membrane을 blocking solution (10mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 1% BSA, 0.05% Tween-20)하에서 1시간 동안 흔들면서 block하였다.

(나) Membrane에 anti-cyclin D1 monoclonal

antibody를 포함한 TBST(10mM Tris-HCl pH7.5, 0.9% NaCl, 0.05% Tween-20)를 상온에서 1시간 동안 반응시켰다.

(다) TBST로 5분씩 3회 세척하고 Horseradish peroxidase-conjugate secondary antibody(Amersham)를 포함한 TBST에 1시간 동안 담가두었다.

(라) TBST로 5분씩 3회 세척한 후 detection solution을 가하고 사진촬영하였다.

III. 結果

1. MTT assay를 이용한 cell viability 분석

桑寄生의 항암효과에 대한 분석에 앞서 약물의 과잉투여에 의하여 유발될 수 있는 세포독성과 실험을 위한 적정 투여농도범위의 결정을 위하여 MTT assay를 시행하였다. 3차 증류수를 이용하여 桑寄生을 1, 10, 25, 50 100 μ g/ml의 농도로 희석한 후 1×10^5 개의 배양 HepG2 cell에 12시간, 24시간, 48시간 처리하였고 ELISA를 이용하여 MTT assay를 시행하여 세포활성의 변화를 분석하였다. 桑寄生은 1 - 25 μ g/ml 농도로 처리한 경우 뚜렷한 세포활성의 감소가 관찰되지 않은 반면, 50 μ g/ml 이상의 농도로 처리할 경우 세포활성의 감소가 관찰되기 시작하였다. 본 실험결과를 토대로 이후 약물의 세포증식에 미치는 영향에 대한 실험에 적용될 약물의 투여농도는 약물의 독성효과를 배제할 수 있는 1-25 μ g/ml의 범위로 결정하였다(Table 1, Fig. 1).

Table 1. Effects of SGS on HepG2 Cell Viability

Concentration (μ g/ml)	12h	24h	48h
0	0.543 ^{a)}	0.562	0.539
1	0.555	0.560	0.549
10	0.547	0.570	0.559
25	0.530	0.540	0.532
50	0.470	0.444	0.421
100	0.402	0.364	0.282

a) Values represent the exponent obtained from optic density and cell concentration

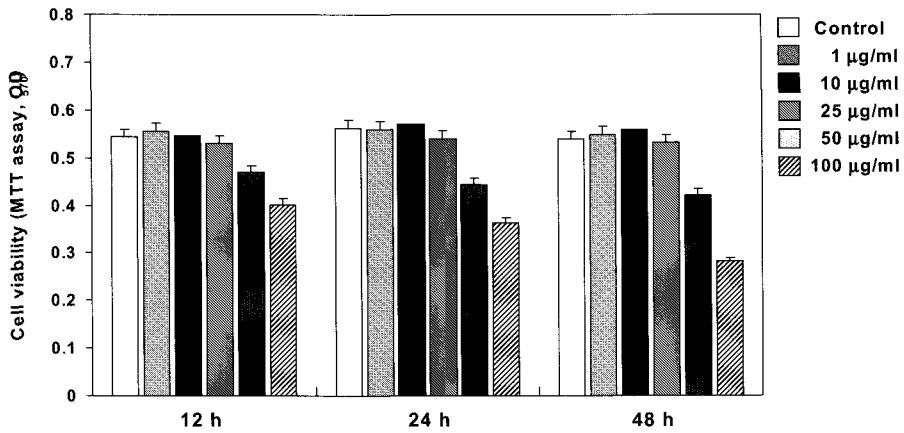


Fig. 1. Effects of SGS on HepG2 cell viability (MTT Assay)

2. HepG2 cell의 증식에 미치는 영향

桑寄生이 HepG2 cell의 증식에 미치는 영향을 분석하기 위하여 桑寄生의 처리 시간과 HepG2 cell의

증식과의 관련성 유무를 분석하기 위하여 cell counting을 시행하였다. 桑寄生 처리후 24, 48, 72 시간후에 세포를 회수하여 세포의 수를 대조군과

Table 2. Effects of SGS on HepG2 Cell Proliferation

Concentration (µg/ml)	0h	24h	48h	72h
0	1.00 ^{a)}	1.48	3.32	6.04
1	1.00	1.38	3.19	5.77
10	1.00	1.42	2.88	5.02
25	1.00	1.36	2.41	4.28

a) Values represent cell number(x 10⁵ cells)

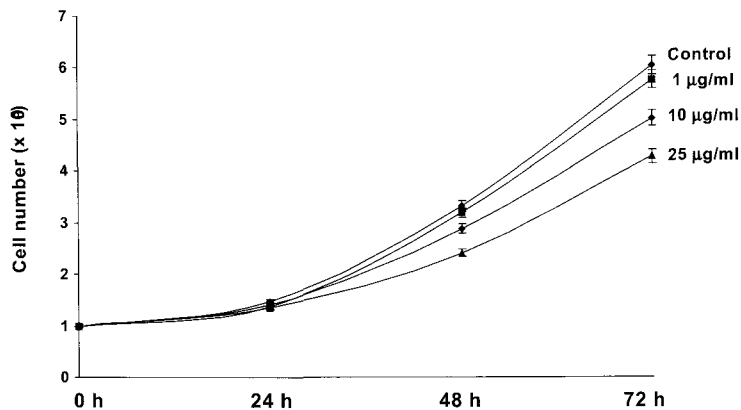


Fig. 2. Dose-dependent effects of SGS on inhibition of HepG2 cell proliferation(Cell Counting Assay)

비교하였다. HepG2 cell의 증식은 10 및 25 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 처리 48시간 후부터 대조군에 비하여 저하되었다(Table 2, Fig. 2).

3. HepG2 cell의 DNA 합성에 미치는 영향

桑寄生의 항암효과에 대한 분석을 위하여 HepG2 cell의 증식에 미치는 영향을 조사하였다. HepG2 cell의 분열능력에 대한 영향을 분석하기 위해 桑寄生이 DNA 합성을 억제하는 작용이 있는지의 여부를 $[^3\text{H}]$ -Thymidine incorporation assay를 시행하였다. 약제는 24시간 동안 처리하였으며 세포회수 4 시간 전에 $[^3\text{H}]$ -Thymidine을 투여하였고 DNA내에 incorporation된 $[^3\text{H}]$ -Thymidine의 양을 약제를 처리하지 않은 대조군과 비교하였다. HepG2 cell의 DNA 합성능은 桑寄生의 투여농도에 비례하여 감소하였다(Table 3, Fig. 3).

4. Flow cytometric analysis를 이용한 세포분열주기에 대한 분석

桑寄生의 DNA 합성억제효과가 세포분열주기의 특정 단계를 조절함으로써 유도되는가를 확인하기 위하여 flow cytometry를 이용하여 세포분열주기에 대한 분석을 수행하였다. DNA 합성억제가 뚜렷하게 나타난 10 및 25 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 HepG2 cell에 48시간 처리한 후에 10,000개의 세포에 대한 DNA content를 분석하였고 이를 약물로 처리하지 않은 대조군과 비교하였다. 桑寄生이 처리된 세포의 경우 뚜렷한 세포증식억제가 관찰되었으며 대조군에 비하여 G1기의 세포수는 증가하고 S기의 세포수는 감소하였다. 이상에서 桑寄生은 HepG2 cell의 DNA 합성을 억제하여 세포분열주기의 진행을 억제하는 효과가 있음이 관찰되었으며, 세포분열주기중 G1기에서 S기로의 세포분열 진행을 억제하는 효과가 있었다(Table 4, Fig. 4).

Table 3. Effects of SGS on DNA Synthesis of HepG2 Cell ($[^3\text{H}]$ -Thymidine Incorporation Assay)

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	0.0	1.0	5.0	10.0	25.0
$[^3\text{H}]$ -Thymidine uptake(CPM)	4850	4800	4550	4200	3850

CPM: count per minute

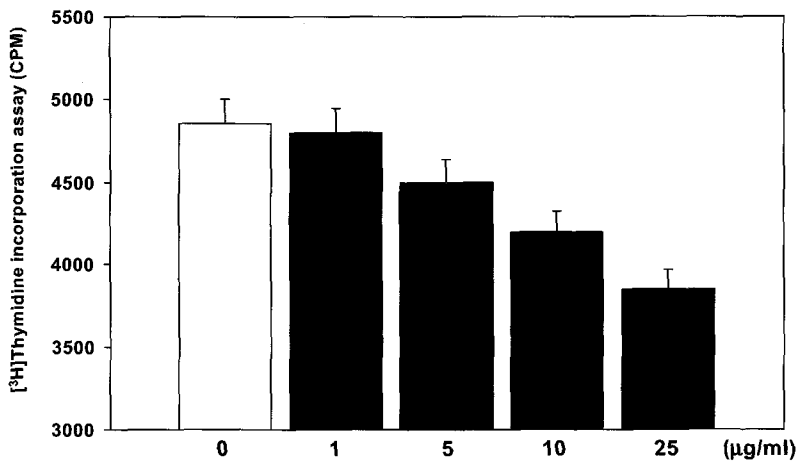
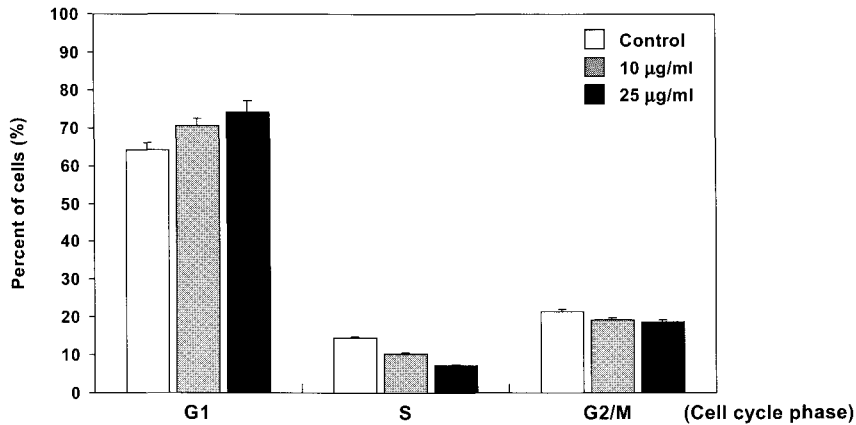


Fig. 3. Suppression of HepG2 cell DNA synthesis by SGS ($[^3\text{H}]$ -Thymidine Incorporation Assay)

Table 4. Effects of SGS on Cell Cycle Phase of HepG2 Cell (Flow Cytometric Analysis)

Cell cycle phase	G1	S	G2/M
0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	64.2%	14.4%	21.4%
10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	70.4%	10.3%	19.3%
25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	74.2%	7.2%	18.6%

**Fig. 4.** Induction of G1 cell cycle arrest by SGS (Flow Cytometric Analysis)

5. 세포분열주기 관련 유전자 발현에 미치는 영향

종양세포의 세포분열 억제효과와 유전자 발현과의 상관성을 파악하기 위하여 세포분열주기의 촉진을 유도함으로써 종양세포의 증식을 촉진하는 c-Jun, c-Fos, c-Myc, cyclin D1, CDK4, CDC2 유전자와 세포분열을 억제함으로써 종양세포의 성장을 억제하는 p53, p21/Waf1, p27/Kip1, RB1, p16/INK4a, PTEN 유전자의 발현이 세포분열을 억제하는 것으로

확인된 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 종양세포 투여에 의하여 변화하는 양상을 분석하기 위하여 quantitative RT-PCR을 시행하였다. 종양세포는 세포분열을 촉진하는 유전자 중 cyclin D1 유전자의 발현을 처리시간에 의존적으로 감소시켰다(Table 5, Fig. 5).

그러나, 종양억제유전자의 발현에는 영향을 미치지 않았다(Table 6, Fig. 6).

Table 5. Effects of SGS on Gene Expression Associated with Cell Cycle Promotion in HepG2 Cell (Quantitative RT-PCR Analysis)

Genes	0h	12h	24h	48h
c-Jun	1.00 ^{a)}	1.04	0.98	1.04
c-Fos	1.00	0.95	0.96	0.96
c-Myc	1.00	0.98	1.04	1.01
Cyclin D1	1.00	0.62	0.30	0.16
CDK4	1.00	1.04	1.02	1.04
CDC2	1.00	0.92	0.99	0.95

a) Values represent relative ratio of each gene to GAPDH after treatment with 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SGS

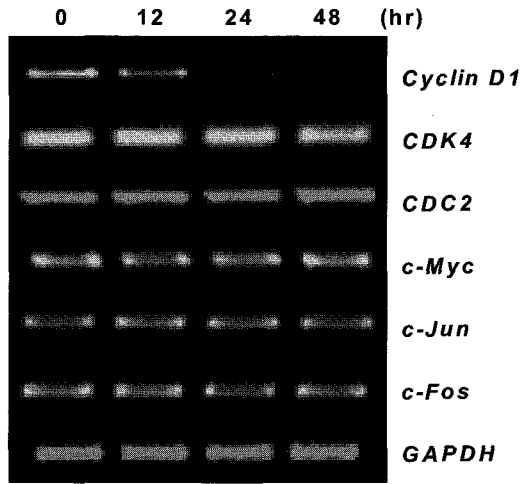


Fig. 5. Suppression of cyclin D1 mRNA expression by 25 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ SGS (Quantitative RT-PCR Analysis)

Table 6. Effects of SGS on Gene Expression Associated with Cell Cycle Suppression in HepG2 Cell (Quantitative RT-PCR Analysis)

Genes	0h	12h	24h	48h
p53	1.00 ^{a)}	1.04	1.02	1.01
p21/Waf1	1.00	0.94	0.98	0.94
p27/Kip1	1.00	1.04	1.04	0.95
RB1	1.00	1.00	1.02	1.07
p16/INK4a	1.00	0.96	1.04	1.04
PTEN	1.00	0.98	0.98	1.05

a) Values represent relative ratio of each gene to GAPDH after treatment with 25 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ SGS

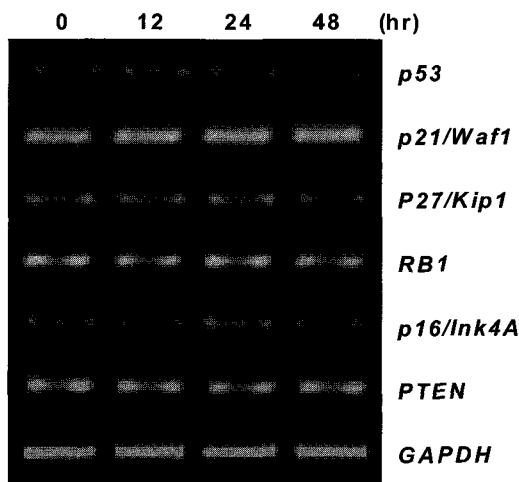


Fig. 6. Inhibitory effect of 25 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ SGS on mRNA expression of tumor suppressor genes (Quantitative RT-PCR Analysis)

6. Cyclin D1 단백질 합성에 미치는 영향

Quantitative RT-PCR 분석결과 桑寄生에 의한 cyclin D1 mRNA 발현억제가 관찰됨에 따라 桑寄生 투여 농도에 따른 cyclin D1 단백질 합성의 변화를 분석하였다. 대조군 및 桑寄生 투여군으로부터 protein을 추출하여 각각 20 µg의 protein을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 이용하여 분리하였으며 anti-cyclin D1 monoclonal antibody를 이용하여 western blot analysis를 시행하였다. Cyclin D1 단백질의 합성량은 桑寄生의 처리시간 및 처리농도에 비례하여 감소하였다(Table 7, Fig. 7).

IV. 考 察

우리나라에서 간암은 2003년 한국중앙암등록사업 연례보고서¹에 의하면 남자에서 위암, 폐암에 이어 세 번째로 호발하고 여자에서는 일곱 번째로 호발하며, 사망원인 역시 2003년 우리나라 인구 10만 명당 22.8명으로 신생물에 의한 사망 중 폐암, 위암에 이어 세 번째로 발생하고 있어² 간암에 대한 효과적인 치료가 요구되고 있다.

간암의 치료에는 수술적 치료법인 간 절제술과 간이식, 비수술적 치료법인 경도자 동맥 화학색전술(transcather arterial chemoembolization, TACE), 알코올 주입술(percutaneous ethanol injection therapy, PEIT)과 고주파 열치료(radiofrequency ablation, RFA)와 방사선 치료 등이 있다^{17,18}. 간세포암 환자의 대부분은 만성 간질환이나 간경변증을 동반하고 있으므로 충분한 용량의 항암제를 투여하는 것이 불가능하고, 항암제에 의한 독성이 발생할 가능성이 높으므로 간세포암종에서 전신 항암요법은 전신상태와 간기능이 양호한 환자들에게 제한적으로 사용되고 있다¹⁹.

최근 간암의 발생기전 및 치료와 관련하여 분자생물학적인 연구가 활발히 진행되고 있다. 현재까지 보고되어 있는 간세포암 형성에 관련된 유전자를 살펴보면, 다른 장기의 암형성에도 관련되어 있다고 알려진 p53, Rb, DLC-1 같은 tumor suppressor gene을 비롯하여 N-ras, H-ras, K-ras, c-erbA, c-met, c-myc, cyclin-D1 같은 oncogene³과 p15, p16, p21, p27 등의 cell cycle regulation에 관련된 gene⁴ 등이 알려져 있다. 특히 B형 간염과 관련해서는 B형 간

Table 7. Effects on Cyclin D1 Protein Synthesis of HepG2 Cell by SGS (Western Blot Analysis)

25 µg/ml treated	0h	12h	24h	48h
	1.00 ^{a)}	0.88	0.41	0.22
24h treated	0µg/ml	5µg/ml	10µg/ml	25µg/ml
	1.00 ^{a)}	0.72	0.61	0.34

a) Values represent ratio of produced protein with / without SGS treatment

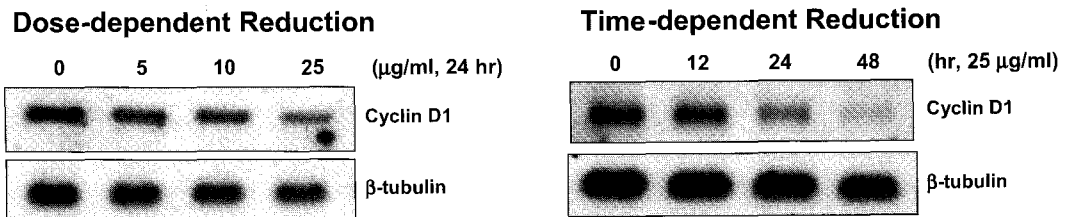


Fig. 7. Dose-dependent and time-dependent reduction of cyclin D1 protein synthesis in HepG2 cell were observed after SGS treatment (Western Blot Analysis)

염 바이러스에 의해 생성되는 X단백질(HBx)이 간 세포내 신호전달을 활성화시켜 간암의 발생과 전이에 관여하는 금속단백분해효소(MMP-9)를 활성화시킨다는 보고⁵가 있다.

桑寄生은 겨우살이科(Loranthaceae)에 속한 뽕나무 겨우살이 (*Loranthus parasiticus* Merr.)의 잎, 줄기, 가지이며⁶ 桑寄生에 대한 실험적 연구로 황¹⁴은 桑寄生 및 槲寄生 전탕액이 항종양 면역효과를, 차¹⁵ 등은 항산화작용을, 박¹⁶ 등은 면역조절작용이 있음을 보고하였다.

최근까지 대한약전의한약(생약)규격집에는 桑寄生(*Loranthus parasiticus* Merr.; 뽕나무 겨우살이) 및 槲寄生(*Viscum album* L. var. *coloratum* Ohwi; 겨우살이)이 각각 별개의 생약재로 수록되어 왔으나 2002년에 발간된 수정판⁶에는 뽕나무겨우살이 및 겨우살이 모두 桑寄生으로 통합정리 수록되어 있다.

한국산 겨우살이(*Viscum album* L. var. *coloratum* Ohwi)는 항암⁸⁻¹¹, 항고혈압, 항균, 항바이러스, 강심 효과 등의 약리효능이 보고되고 있다^{12,13}. 특히 유럽산 겨우살이(*Viscum album* L.)는 독일 등 유럽에서 오래전부터 항암 활성을 널리 인정받아 각종 악성 종양의 치료 및 치료보조제로 광범위하게 사용되고 있으며 항암활성의 유효성분으로는 당단백질(glycoprotein)계열에 속하는 lectin류와 단백질계열에 속하는 viscotoxin류가 잘 알려져 있다²⁰⁻².

인간의 암은 조직의 자율적인 과잉적 성장 즉, 세포의 증식 및 성장 조절의 이상으로 인한 세포의 과잉증식에 의해 발생하며²³, 세포생장의 조절에 있어 중요한 역할을 하는 유전자 변이와 관련된 다단계 과정에 의해 일어난다. 세포의 증식 및 분화는 세포와 세포의 기질과의 작용에 영향을 주는 여러 성장 인자와 호르몬 등의 상호 작용에 의해 조절되며^{24,25}, 이렇게 조화롭게 구성된 조절기전에 이상이 생기면 세포증식 및 분화 기전의 불균형이 나타나 암이 발생하게 된다²⁶. 분자생물학적 발암요인으로는 암발생을 억제시키는 암억제 유전자의 억압, 암유전자의 증폭, 세포주기 단백질의 조절이상, apoptosis 기전의 장애, 세포 성장인자 등이 관여하는 것으로 알려

져 있다²⁷.

본 실험에서 桑寄生은 cell counting을 이용한 분석에서 HepG2 cell의 증식을 세포독성이 야기되지 않는 10 및 25 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 처리 48시간 후부터 대조군에 비하여 세포증식을 저하시켰으며, 桑寄生의 HepG2 cell 분열능력에 대한 영향을 분석하기 위해 [³H]-Thymidine incorporation assay를 시행하여 HepG2 cell의 DNA 합성능이 桑寄生의 투여농도에 비례하여 감소됨이 관찰되었다.

DNA 합성억제효과가 세포분열주기의 특정 단계를 조절함으로써 유도되는가를 확인하기 위하여 flow cytometry를 이용한 세포분열주기에 대한 분석을 하였다. 실험결과 桑寄生은 세포분열주기중 주로 G1기에서 S기로의 세포분열 진행을 억제하는 효과가 있음이 확인되었다.

桑寄生에 의한 이러한 세포학적 현상이 유전자의 발현의 변화에 의하여 야기될 가능성을 파악하기 위해 quantitative RT-PCR을 이용하여 세포분열주기의 축진을 유도함으로써 종양세포의 증식을 촉진하는 것으로 알려진 c-Jun, c-Fos, c-Myc, cyclin D1, CDK4, CDC2 유전자와 세포분열을 억제함으로써 종양세포의 성장을 억제하는 p53, p21/Waf1, p27/Kip1, RB1, p16/INK4a, PTEN 유전자 발현분석을 수행하였다. 실험결과 桑寄生은 여러 유전자중 cyclin D1의 유전자의 발현을 감소시키는 것으로 나타났으며, western blot assay를 통한 분석에서도 cyclin D1의 단백질 합성량은 桑寄生의 처리시간 및 처리농도에 비례하여 감소하였다.

세포 주기와 발암 과정은 매우 밀접한 관계가 있으며 cyclin은 세포 주기를 조절하는 주 단백질로, 이는 cyclin-dependent kinase에 결합하여 이 효소의 활성도를 조절함으로써 세포주기를 조절하게 된다. Cyclin은 크게 G1-S와 G2-M의 이동과정에서 세포 주기의 조절인자로 작용하는데 작용부위에 따라 전자에 관여하는 cyclin을 G cyclin, 그리고 후자에 관여하는 cyclin을 M cyclin이라 하며, G cyclin에는 D와 E, M cyclin에는 A와 B 등이 있다. 이 중 D cyclin은 가장 중요한 조절인자로서 R point cyclin

이라 부르며 지금까지 D1, D2, D3 cyclin이 알려져 있다^{28,29}. 그 중 cyclin D1의 과발현은 발암 과정에 관여하는 유전자로 인정되고 있으며, 인체의 간암, 유방암, 두경부암 및 방광암 등에서 과발현과 증폭이 관찰되었다³⁰⁻². Cyclin D1 단백질은 G1 late phase에서 G1/S로 이행하는 과정에서 주 효소인 cyclin D1-dependent kinase4(CDK4)와 결합하여 CDK4의 활성화에 관여한다. 이 CDK4는 그 기질이 매우 제한되어 있어, 지금까지 알려진 기질로는 retinoblastoma(Rb) 단백질이 있는바, 암조직에서는 인산화 Rb 단백질이 결합된 E2F(transcription activation factor 총칭)가 방출하게 된다. 방출된 E2F는 DNA 합성에 필요한 단백질 유전자들의 전사를 촉진하여 DNA 합성을 증진시킨다²⁸.

인체 암종의 다단계적 발암 과정 중 cyclin D1의 역할에 대해서는 인체의 간암, 유방암, 두경부암에서 cyclin D1의 과발현이 악성도 및 재발과 밀접한 관계가 있어 아마도 발암 과정의 말기에 작용할 것으로 추정되고 있다³³⁻⁵.

이상에서 桑寄生이 HepG2 cell의 증식을 억제하는 것은 cyclin D1 유전자의 mRNA 발현 및 protein 합성을 억제하여 G1기에서 S기로의 세포분열 진행을 억제하는 기전에 의하는 것으로 볼 수 있다. 향후 한국산 겨우살이(*Viscum album* L. var. *coloratum* Ohwi)와 유럽산 겨우살이(*Viscum album* L.)의 cyclin D1 유전자의 mRNA 발현 및 protein 합성에 대한 비교관찰 연구와 桑寄生의 cyclin D1 발현억제와 관련된 기전에 대한 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

V. 結 論

桑寄生이 HepG2 cell의 세포분열 및 관련유전자 발현에 미치는 영향을 규명하기 위하여 MTT assay, cell counting assay, [³H]-Thymidine incorporation assay, Flow cytometric analysis, quantitative RT-PCR, western blot assay를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 桑寄生은 세포독성을 야기하지 않는 저농도(10 및 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서 HepG2 cell의 세포증식을 처리 농도에 비례하여 억제하였다.
2. 桑寄生은 HepG2 cell의 DNA 합성을 농도 의존적으로 억제하였다.
3. 桑寄生에 의한 HepG2 cell의 증식억제는 세포분열주기의 G1-S transition을 억제하는 작용에 기인하였다.
4. 桑寄生은 세포분열을 촉진하는 유전자인 cyclin D1의 mRNA 발현 및 protein 합성을 처리시간 및 농도 의존적으로 억제하였다.
5. 桑寄生은 세포분열을 억제하는 유전자인 p53, p21/Waf1, p27/Kip1, RB1, p16/Ink4A, PTEN의 발현에는 영향을 미치지 않았다.

이상에서 桑寄生이 HepG2 cell의 증식을 억제하는 것은 G1기에서 S기로의 세포분열 진행을 억제하고 cyclin D1 유전자의 mRNA 발현 및 protein 합성을 억제하는 기전에 의하는 것으로 나타났다.

參考文獻

1. 보건복지부 한국중앙암등록본부. 한국중앙암등록 사업 연례보고(2002.1-2002.12). 서울: 한국중앙암등록본부; 2003.
2. 통계청. 2004년 사망원인통계연보. 서울: 통계청; 2004.
3. Nobuo K, Toru W, Akingide R. Identification and Characterization of Genes Associated with Human Hepatocellular Carcinogenesis. *Hepato-Gastroenterology* 1998;45:1635-42.
4. Ai-Min H, Masatoshi M, Xin L. Cell Cycle Regulators and Human Hepatocarcinogenesis. *Hepato-Gastroenterology* 1998;45:1635-42.
5. Chung TW, Lee YC, Kim CH. Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathways: Involvement of invasive potential. *FASEB J*. 2004;18(10):1123-5.

6. 식품의약품안전청. 대한약전의한약(생약)규격집. 서울: 동원문화사; 2002, p.203.
7. 강소신의학원편. 중약대사전(하편). 상해: 상해 과학기술출판사; 1997, p.1970-3.
8. 김미정, 이미숙, 김정희. 실험적 간암모델에서 한국산 겨우살이 추출물 및 렉틴 투여가 전암성 병변의 생성 및 Apoptosis에 미치는 영향. 한국 식품영양과학회 2002;31(5):782-7.
9. Siegle I, Fritz P, McClellan M, Gutzeit S, Murder T.E. Combined cytotoxic action of *Viscum album* agglutinin-1 and anticancer agents against human A549 lung cancer cells. *Anticancer Res.* 2001;21(4A):2687-91.
10. 서지희, 최연희, 김정숙, 김성기, 최상운, 김영섭, 김영균, 김성훈, 유시용. 한국산 겨우살이 전초의 Methanol 추출물로부터 암세포증식 저해 성분의 분리. *생약학회지* 2004;35(2):134-8.
11. 전국 간계내과학 교수 공저. *간계내과학*. 서울: 동양의학연구원; 2001, p.367.
12. Karagoz A, Onay E, Arda N, Kuru A. Antiviral potency of mistletoe (*Viscum album* ssp. *album*) extracts against human parainfluenza virus type 2 in Vero cells. *Phytother. Res.* 2003;17(5):560-562
13. Fernandez T, Cerda Z. P, Aulicino P, Caldas L. E, Wagner M, Ricco R, Hajos S, Gurni A, Alvarez E. Immunobiological features of the galatinside lectin L-Lc isolated from the Argentine mistletoe *Ligaria cuneifolia*. *J. Ethnopharmacol.* 2003;85(1):81-92.
14. 황금택. 桑寄生 및 槲寄生 전탕액이 마우스 항종양 면역반응에 미치는 영향. 원광대학교대학원, 1993.
15. 차은이, 김병수, 김동희, 이용구, 김연진, 강정수. 桑寄生의 항산화작용에 관한 연구. *동의병리학회지* 2003;17(4):939-45.
16. 박진호, 서영배. 桑寄生의 면역조절작용에 대한 실험적 연구. *대한본초학회지* 2001;16(1):55-71.
17. 백승운. 간암치료법의 선택. *대한간학회지* 2002; 8(supp1):57-65.
18. Nagasue N, Uchida M, Makino Y, Takemoto Y, Yamanoi A. Incidence and factors associated with intrahepatic recurrent following resection of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1993;105(2):488-94.
19. 우광훈, 윤정환, 한철주, 이효석, 이진욱, 김정룡. 소간세포암에 대한 근치적 절제 후의 생존율 및 예후 결정 인자. *대한내과학회지* 1997;53: 686-93.
20. Boneberg E. M, Hartung T. Mistletoe lectin-1 increases tumor necrosis factor-alpha release in lipopoly saccharide-stimulated whole blood via inhibition of interleukin-10 production. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;298(3):996-1000.
21. Tabiasco J. Pont F. Fournie J. J. Vercellone A. Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 2002;269(10):2591-600.
22. Mengs U, Gotherl D, Leng-Peschlow E. Mistletoe extracts standardized to mistletoe lectins in oncology: review on current status of preclinical research. *Anticancer Res.* 2002; 22(3):1399-407.
23. 대한병리학회. *병리학*. 서울: 고문사; 1990, p.225-71.
24. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194:23-8.
25. Vogelstein B. Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 1993;9:138-41.
26. Quantanilla M. Brown K. Ramsden M. Carcinogen specific mutation and amplication of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature* 1986;322:77-80.
27. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the tumor suppressor gene clue to cancer etiology and molecular

- pathogenesis. *Cancer Res.* 1994;53:4855-78.
28. Bates S, Peters G. Cyclin D1 as a cellular proto-oncogene. *Seminars in Cancer Biology* 1995;6:73-82.
 29. Pines J. Cyclins, CDKs and cancer. *Seminars in Cancer. Biology* 1995;6:63-72.
 30. Protor AJ, Coombs LM, Cairns JP, Knowles MA. Amplification at chromosome 11q13 in transitional cell tumors of the bladder. *Oncogene* 1991;6:789-95.
 31. Michalides R, van Veelen N, Hart H, Loftus B, Wientjens E, Balm A. Overexpression of cyclin D1 correlates with recurrence in a group of forty-seven operable squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res.* 1995;55:975-8.
 32. Bringuier PP, Tamimi E, Schuurin E, Schalken J. Expression of cyclin D1 and EMS1 in bladder tumors : relationship with chromosome 11q13 amplification. *Oncogene* 1996;12(8):1747-53.
 33. Schuurin E, Verhoeven E, Van Tinteren H, Pererse JL, Nunnink B, Thunnissen FB et al. Amplication of genes within the chromosome 11q13 region is indicative of poor prognosis in patients with operable breast cancer. *Cancer Res.* 1992;52(19):5229-34.
 34. Muller D, Millon R, Velten M, Bronner G, Jung G . Amplication of 11q13 DNA markers in head and neck squamous cell carcinomas: correlation with clinical outcome. *Eur J Cancer B Onco1.* 1997;33(13):2203-10.
 35. Ito Y, Matsuura N, Sakon M, Miyoshi E, Noda M, Takeda T et al. Expression and prognostic roles of the G1-S modulators in hepatocellular carcinoma: P27 independently predicts the recurrence. *Hepatology* 1999;30(1):90-9.