



Original Article / 원저

황금 에탄올 추출물에 의한 인간 신장암 세포주 Caki-1의 G2/M arrest 유발

박동일^{1,*} · 정진우² · 박철³ · 홍수현⁴ · 신순식⁵ · 최성현⁶ · 최영현^{2,4,**}

¹동의대학교 한의과대학 내과학교실, ²동의대학교 항노화연구소

³동의대학교 자연과학대학 분자생물학과, ⁴동의대학교 한의과대학 생화학교실

⁵동의대학교 한의과대학 방제학교실, ⁶한국승강기대학교 승강기시스템관리과

Induction of Cell Cycle Arrest at G2/M phase by Ethanol Extract of *Scutellaria baicalensis* in Human Renal Cell Carcinoma Caki-1 Cells

Dong-Il Park^{1,*} · Jin-Woo Jeong² · Cheol Park³ · Su-Hyun Hong⁴ · Soon-Shik Shin⁵
Sung-Hyun Choi⁶ · Yung-Hyun Choi^{2,4,**}

¹Department of Internal Medicine, Dongeui University College of Korean Medicine

²Anti-Aging Research Center, Dongeui University

³Department of Molecular Biology, College of Natural sciences & Human Ecology,
Dongeui University

⁴Department of Biochemistry, Dongeui University College of Korean Medicine

⁵Department of Formula Sciences, Dongeui University College of Korean Medicine

⁶Department of Safety & System Management, Korea Lift College

ABSTRACT

Objectives : In the present study, we investigated the effects of ethanol extract of *Scutellaria baicalensis* (EESB) on the progression of cell cycle in human renal cell carcinoma Caki-1 cells.

Methods : The effects of EESB on cell growth and apoptosis induction were evaluated by trypan blue dye exclusion assay and flow cytometry, respectively. The mRNA and protein levels were determined by Western blot analysis and reverse transcription-polymerase chain reaction, respectively.

Results : It was found that EESB treatment on Caki-1 cells resulted in a dose-dependent inhibition of cell growth and induced apoptotic cell death as detected by Annexin V-FITC staining. The flow cytometric analysis indicated that

EESB resulted in G2/M arrest in cell cycle progression which was associated with the down-regulation of cyclin A expression. Our results also revealed that treatment with EESB increased the mRNA and proteins expression of tumor suppressor p53 and cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p21(WAF1/CIP1), without any noticeable changes in cyclin B1, Cdk2 and Cdc2. In addition, the incubation of cells with EESB resulted in a significant increase in the binding of p21 and Cdk2 and Cdc2. These findings suggest that EESB-induced G2/M arrest and apoptosis in Caki-1 cells is mediated through the p53-mediated upregulation of Cdk inhibitor p21.

Conclusions : Taken together, these findings suggest that EESB may be a potential chemotherapeutic agent and further studies will be needed to identify the biological active compounds that confer the anti-cancer activity of *S. baicalensis*.

Keywords : *Scutellaria baicalensis* L., renal cell carcinoma Caki-1 cells, G2/M arrest, apoptosis, p21

I. 서 론

신장세포암(renal cell carcinoma)은 원발성 신종양의 약 85%를 차지하는 악성종양으로 신장실질(renal parenchyma)에서 주로 발생하며, 최초 진단 시 약 25~30%에서 이미 전이가 진행되어 있는 것으로 알려져 있다^{1,2)}. 주로 60~70대의 노년층에서 발생하는 신장세포암은 우리나라의 경우에 비교적 10위권 이내의 발생율을 보이지만, 최근 지속적인 증가 추세를 보이고 있다. 신장세포암이 다른 기관으로 전이되지 않은 경우에는 신장과 그 주위 정상 조직을 광범위하게 절제하는 근치적 신적출술(radical nephrectomy)로 약 60~70%의 환자에서 5년 생존율을 기대할 수 있으나 전이가 진행된 경우에는 현재까지 뚜렷한 치료법이 없으며, 신적출술 외에도 면역요법, 호르몬요법, 항암 화학요법, 방사선요법 등이 시행되고 있지만 치료 효과는 크지 않은 것으로 알려져 있다^{3,4)}. 따라서 보다 효과적인 신장세포암 치료를 위하여 생리활성을 지닌 후보물질을 발굴하고 분자 및 세포 수준에서의 기전을 밝히는 것이 중요할 것이다.

꿀풀과(Labiatae)에 속하는 초본식물인 황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi, 黄芩)은 해열, 이뇨, 지사, 이담 및 소염제로서의 효능을 가지고 있으므로 예로부터 민간처방 약재로 사용되었을 뿐만 아니라 한방에서는 뿌리를 말린 것을 이질, 발열, 황달 및 음의 치료제로 사용되어 왔다^{5,6)}. 최근 연구에 따르면

황금에는 30여종 이상의 다양한 flavonoid가 함유되어 있어 항염증, 항당뇨, 항균, 항알레르기, 항바이러스, 항고혈압 및 항산화 효능 등을 가지는 것으로 알려져 오고 있다^{5,7-19)}. 또한 황금은 다양한 암세포에 있어서 apoptosis 유발을 통한 항암활성을 가지는 것으로 보고되어지고 있으나¹⁹⁻²²⁾, 세포주기 진행의 억제 측면에 관한 분자생물학적 기전에 대해서는 명확히 밝혀져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 황금의 에탄올 추출물(ethanol extract of *S. baicalensis*, EESB)이 인체 Caki-1 신장암세포에 미치는 항암 효과의 생화학적 기전의 해석을 위하여 암세포의 증식에 미치는 영향을 조사하였고, 세포주기 진행 차단 측면에서 어떠한 영향을 미치는 지를 조사한 결과 유의적인 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 준비

본 실험에 사용된 황금은 동의대학교 부속 한방병원에서 제공 받았으며, 에탄올 추출물(EESB)과 메탄올(MESB)을 얻기 위하여 건조시킨 후 잘게 분쇄하였다. 건조된 황금 100g 당 ethanol 및 methanol을 1 L 씩 첨가하여 60°C, 150 rpm으로 3일간 교반시킨 후 상층액만 분리하여 3,000 rpm에서 20분간 원심분리시켰

* Corresponding author : Dong-Il Park, Professor, Department of Internal Medicine, Dong-Eui University College of Korean Medicine, 52-57, Yangjeong-ro, Busanjin-gu Busan 47227, Republic of Korea.

· Tel : +82-51-850-8650 Fax : +82-51-853-4036 E-mail : dipark@deu.ac.kr

** Corresponding author : Yung-Hyun Choi, Professor, Department of Biochemistry, Dong-Eui University College of Korean Medicine, 52-57, Yangjeong-ro, Busanjin-gu Busan 47227, Republic of Korea.

· Tel : +82-51-850-7413 Fax : +82-51-853-4036 E-mail : choiyh@deu.ac.kr

• Received : October 19, 2015 / Revised : December 15, 2015 / Accepted : December 18, 2015



다. 모아진 상층액을 Whatman 필터(No. 2)를 이용하여 걸러내고 감압 농축과정을 통하여 고형성분을 얻은 다음 막자사발로 잘게 마쇄하고 밀봉시켜 -70°C 에 보관하였다(Ethanol 추출물의 수율은 약 23.6%였으며, methanol 추출물은 약 24.7% 정도였다). 실험 시에는 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 100 mg/ml의 stock solution을 만든 다음 이를 적정 농도로 배지에 희석하여 처리하였다.

2. 세포 배양, 세포 생존율의 측정 및 세포 형태의 관찰

본 연구에 사용된 Caki-1 세포는 생명공학연구소(KRIBB, Taejeon, Korea)에서 분양 받았으며 90%의 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10%의 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS, Gibco BRL) 및 1%의 penicillin 및 streptomycin (Gibco BRL)이 포함된 배지를 사용하여 5% CO_2 , 37°C 의 조건하에서 배양하였다. EESB 및 MESB 처리에 의한 세포의 생존율을 측정하기 위하여 세포 배양용 6 well plate에 Caki-1 세포를 1×10^5 개/ml의 개수로 well 당 2 ml씩 분주한 다음 EESB와 MESB를 적정농도로 처리하여 배양하였다. 48시간 경과 후 상층액을 제거하고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 phosphate-buffered saline (PBS)와 0.5% trypan blue solution (Gibco BRL)을 각 well 당 1 ml 씩을 동량으로 첨가하여 2분 간 처리하였다. 처리된 sample을 hemocytometer에 적용한 후 도립 현미경을 이용하여 살아있는 세포를 계수하였으며, EESB 처리에 따른 세포 형태의 변화를 도립 현미경 (inverted microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 200배의 배율로 관찰하였다.

3. Flow cytometry를 이용한 세포주기 변화 분석

EESB 처리에 따른 Caki-1 세포의 세포주기 분포도 변화의 정량적 분석을 위하여 정상 및 EESB가 48시간 동안 처리된 Caki-1 세포를 모은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 PBS를 이용하

여 2~3회 정도 세척하였다. 준비된 세포는 CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 고정 및 염색을 하여 4°C , 암실에서 30분 동안 반응을 시켰다. 반응시킨 세포를 35-mm mesh를 이용하여 단일세포로 분리한 후 FACSCalibur (Becton Dickinson)를 적용시켜 형광반응에 따른 Cellular DNA content 및 histogram을 CellQuest software 및 Modifit LT (Becton Dickinson) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

4. Flow cytometry를 이용한 apoptosis 정량화

EESB 처리에 의해 유발된 apoptosis의 정도를 정량적으로 분석하기 위하여 정상 및 EESB가 48시간 동안 처리된 Caki-1 세포를 annexin V binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl and 2.5 mM CaCl_2)에 부유시킨 후 annexin V fluorescein isothiocyanate (FITC, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 및 propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 첨가하여 암실에서 15분 동안 반응을 시켰다. 반응시킨 세포를 35-mm mesh를 이용하여 단일세포로 분리한 후 FACSCalibur를 적용시켜 apoptosis가 유발된 세포(V^+/PI^-)의 빈도를 측정하였다.

5. RNA의 분리 및 reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR)

전사 수준에서 특정 유전자들의 발현 변화를 조사하기 위하여 RNeasy kit (Qiagen, La Jolla, CA, USA)를 이용하여 RNA를 분리한 후, AMV reverse transcriptase (Amersham Corp., Arlington Heights, IL, USA)를 이용하여 complementary DNA를 합성하였다. 각각의 해당 유전자에 적절한 primer (Table 1)를 이용한 PCR은 Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 사용하여 수행하였다. PCR 반응 산물을 1% agarose을 이용하여 분리한 후, ethidium bromide (EtBr, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 염색을 통하여 발현의 정도를 비교하였다.

Table 1. Oligonucleotides used in RT-PCR

Gene name		Sequence
cyclin A	Sense	5'-TCC AAG AGG ACC AGG AGA ATA TCA-3'
	Antisense	5'-TCC TCA TGG TAG TCT GGT ACT TCA-3'
cyclin B1	Sense	5'-AAG AGC TTT AAA CTT TGG TCT GGG-3'
	Antisense	5'-CTT TGT AAG TCC TTG ATT TAC CAT G-3'
Cdk2	Sense	5'-GCT TTC TGC CAT TCT CAT CG-3'
	Antisense	5'-GTC CCC AGA GTC CGA AAG AT-3'
Cdc2	Sense	5'-GGG GAT TCA GAA ATT GAT CA-3'
	Antisense	5'-TGT CAG AAA GCT ACA TCT TC-3'
p53	Sense	5'-GCT CTG ACT GTA CCA CCA TCC-3'
	Antisense	5'-CTC TCG GAA CAT CTC GAA GCG-3'
p21	Sense	5'-CTC AGA GGA GGC GCC ATG-3'
	Antisense	5'-GGG CGG ATT AGG GCT TCC-3'
p27	Sense	5'-AAG CAC TGC CGG GAT ATG GA-3'
	Antisense	5'-AAC CCA GCC TGA TTG TCT GAC-3'
GAPDH	Sense	5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'
	Antisense	5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'

6. 단백질의 분리, immunoprecipitation 및 Western blot analysis

단백질 발현 변화 분석을 위한 총 단백질은 25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM ethylenediaminetetra acetic acid, 1% nonidet P-40, 0.1 mM sodium orthovanadate, 2 μ g/ml leupeptin 및 100 μ g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride가 함유된 lysis buffer를 이용하여 분리하였다. 분리된 단백질들의 농도를 측정 후, Western blot analysis를 위해 동량의 단백질들을 sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 분리하고 nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA)으로 전이시켰다. 각각의 membrane을 적정 항체 및 enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Corp.) 용액을 이용하여 단백질들의 발현 변화를 조사하였다. 아울러 p21과 cyclin-dependent kinases (Cdks) 단백질들과의 결합 여부 확인을 위한 immunoprecipitation을 위해서, 500 μ g의 단백질을 4°C에서 Cdc2 및 Cdk2 항체와 면역 반응을 1시간 동안 시킨 다음, immunocomplex를 protein G/A-Sepharose beads (Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 이용하여 준비한 후, 이를 Western blot analysis에 사용하였다. 본 실험에 사용된 1차 항체들

은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며, 2차 항체들은 Amersham Corp.에서 구입하였다.

7. 통계 분석

모든 실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하였고 SigmaPlot (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA)을 이용하여 Student *t*-test를 이용하여 통계적 유의성을 얻었다.

III. 결 과

1. Caki-1 세포의 생존율에 미치는 EESB 및 MESB의 영향

Caki-1 세포에서 EESB 및 MESB가 유발하는 생존율 감소 현상을 알아 보기 위하여 EESB와 MESB를 적정농도로 48시간 동안 처리한 후, hemocytometer counting을 이용하여 조사하였다. Fig. 1A에 나타난 바와 같이 EESB 처리군의 경우에는 0.1 mg/ml 농도까지는 큰 변화가 나타나지 않았지만 0.2 mg/ml 처리군에서부터 생존율감소 및 증식억제 현상이 나타나기 시작하였다. 그러나 상대적으로 MESB에 의한 생존율의

저하는 낮게 나타나, 생존을 감소를 더 많이 유발하였던 EESB 처리군을 대상으로 다음 실험을 진행하였다.

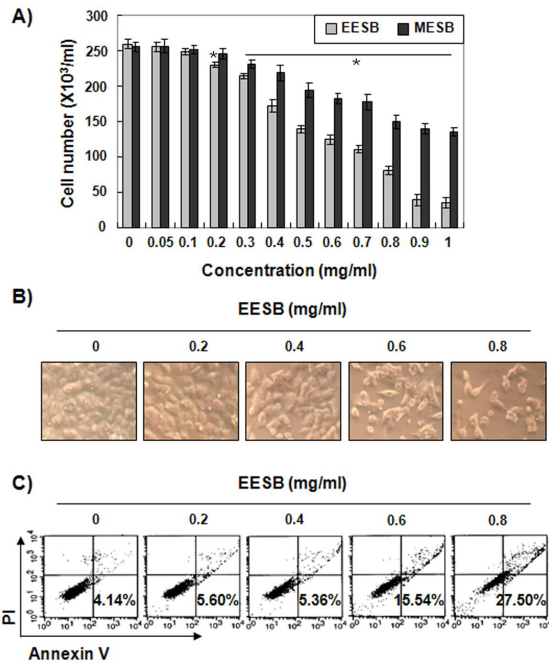


Figure 1. Inhibition of cell viability and induction of apoptosis by EESB in human renal cell carcinoma Caki-1 cells. (A) Cells were seeded at 1×10^5 /ml in a 6-well plate and treated with variable concentrations of EESB and MESB for 48 h. The cells were trypsinized and the viable cells were scored by hemocytometer counts of trypan blue-excluding cells. Each point represents the mean \pm SD of three independent experiments. Significance was determined using Student's t-test (*, $p < 0.05$ vs. untreated control). (B) After treatment with various concentrations of EESB for 48 h, the morphological changes of cells were imaged using an inverted microscope (original magnification, $\times 200$). (C) To quantify the degree of apoptosis induced by EESB, the cells were stained with annexin-V/PI and the percentages of apoptotic cells were then analyzed using flow cytometric analysis. The data shown are means of two independent experiments.

2. Caki-1 세포의 형태에 미치는 EESB의 영향

EESB 처리에 의한 Caki-1 세포의 생존율 감소 현상이 암세포의 형태에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 다양한 농도 범위로 EESB를 48시간 동안 처리한 후 형태 변화를 관찰하였다. Fig. 1B에서 볼 수 있듯이 EESB 0.2 mg/ml 농도까지는 큰 형태적인 변화가 관찰되지 않았지만 0.4 mg/ml 농도에서부터 전체적인 세포의 밀도가 감소하였고 apoptosis 유발 시 특이하게 관찰되는 membrane blebbing 현상이 나타나기 시작하였다. 또한 세포질 응축 현상과 함께 세포의 모양이 길어지면서 돌기와 같은 형태가 분

지를 이루기 시작하였고 부착 능력 상실에 따른 부유 세포의 증가와 함께 배양 접시에 부착된 세포들도 심한 형태적 변이가 나타났다.

3. EESB 처리에 의한 Caki-1 세포의 G2/M arrest 유발

이상에서 관찰된 EESB에 의한 Caki-1 세포의 생존율 억제효과가 세포주기 진행에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기 위해 flow cytometer를 이용한 세포주기 분포도의 변화를 조사하였다. Table 2에 나타난 것처럼, EESB의 처리 농도가 증가 할수록 G2/M기에 해당되는 세포의 빈도가 꾸준히 증가하였으며, 상대적으로 G1기에 해당되는 세포의 빈도는 점차 감소되었다. 이는 EESB에 의한 Caki-1 세포의 생존율 감소가 G2/M 세포주기 억제를 통해 이루어짐을 의미하는 결과이다.

Table 2. Induction of G2/M arrest by EESB in Caki-1 cells. Cells were treated with different concentrations of EESB for 48 h. The cells were stained with PI and analyzed by flow cytometry. The results are expressed as the percentage of cell distribution at each phase

EESB (mg/ml)	% of cells (%)		
	G1	S	G2/M
0	77.08	9.44	13.48
0.2	76.30	7.72	15.98
0.4	68.12	6.54	25.34
0.6	58.04	7.66	34.30
0.8	40.64	8.16	51.20

4. EESB 처리에 의한 Caki-1 세포의 apoptosis 유발

EESB에 의한 Caki-1 세포의 G2/M arrest를 통한 생존율 감소가 apoptosis 유발과 연관성이 있는지를 조사하기 위하여, Annexin V 염색을 통한 apoptosis가 일어난 세포의 빈도를 정량화하였다. Fig. 1C의 결과에서 알 수 있듯이 EESB 처리 농도의 증가에 따라 apoptosis 유발 빈도의 유의적인 증가를 확인할 수 있었다. 이상의 결과는 EESB에 의한 Caki-1 세포의 G2/M arrest를 동반한 생존율 감소는 apoptosis 유발과 연관되었음을 의미하는 것이다.

5. Caki-1 세포의 G2/M기 조절 단백질의 발현에 미치는 EESB의 영향

이상에서 관찰된 EESB 처리에 의한 G2/M arrest 유발에 관련된 기전을 해석하기 위하여 G2/M기를 중

심으로 한 주요 세포주기 조절인자들의 mRNA 및 단백질 발현 변화를 조사하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 EESB이 처리된 배지에서 배양된 Caki-1 세포에서 세포주기 양성조절 인자인 cyclin A의 mRNA 및 단백질의 발현이 현저하게 감소되었지만, cyclin B1 또는 cyclin 단백질들과 결합하여 세포주기에 조절에 중요한 역할을 하는 Cdk2인 Cdc2 및 Cdk2의 발현에는 전사 및 번역 수준에서 큰 차이가 관찰되지 않았다.

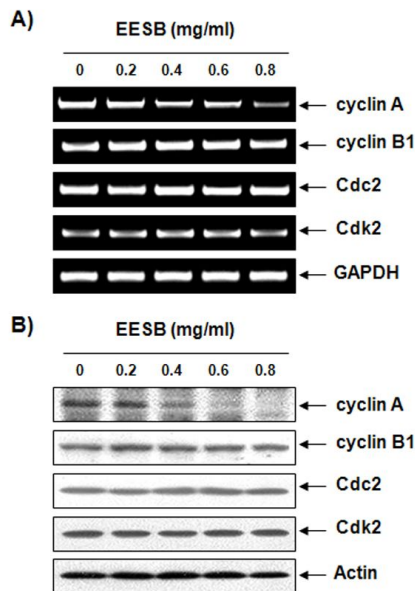


Figure 2. Effects of EESB on the levels of G2/M-associated cyclins and Cdk2 in Caki-1 cells. (A) After treatment with various concentrations of EESB for 48 h, total RNA was isolated, and RT-PCR was performed using the indicated primers, respectively. (B) The total cell lysates were prepared and separated by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels. Western blotting was then performed using the indicated antibodies and ECL solution. GAPDH and actin were used as the internal controls for the RT-PCR and Western blot assay.

6. Caki-1 세포에서 EESB 처리에 의한 p53 및 p21의 발현 증가

다음은 cyclin/Cdk2 복합체와의 결합을 통한 cyclin/Cdk2 활성 억제인자이면서 광범위한 세포주기 진행의 음성조절인자에 해당되는 p21(WAF1/CIP1) 및 p27(Kip1)의 발현과 p21의 조절인자로 알려진 종양억제 유전자 p53의 발현에 미치는 EESB의 영향을 조사하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이, EESB 처리에 따라 p27의 발현은 큰 변화가 없었으나 p53 및 p21의 발현이 EESB 처리 농도 의존적으로 증가되었다.

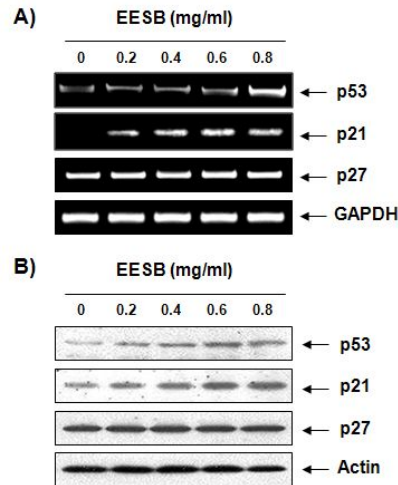


Figure 3. Induction of p53 and p21 by EESB in Caki-1 cells. (A) After treatment with various concentrations of EESB for 48 h, total RNA was isolated, and RT-PCR was performed using the indicated primers, respectively. (B) The total cell lysates were prepared and separated by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels. Western blotting was then performed using the indicated antibodies and ECL solution. GAPDH and actin were used as the internal controls for the RT-PCR and Western blot assay.

7. Caki-1 세포에서 EESB에 의한 p21과 Cdk2와의 결합력 증가

이상에서 관찰된 EESB 처리에 의하여 증가된 p21의 역할을 조사하기 위하여 co-immunoprecipitation 반응을 수행하였다. 이를 위하여 500 μ g/ml의 EESB이 처리된 세포에서 분리된 단백질을 이용하여 p21과 Cdc2 및 Cdk2 단백질과의 결합 여부를 조사하였다. Fig. 4에 나타난 바와 같이, EESB의 처리에 의하여 증가된 p21 단백질과 Cdc2 및 Cdk2과의 결합이 매우 증가되었음을 확인하였다.

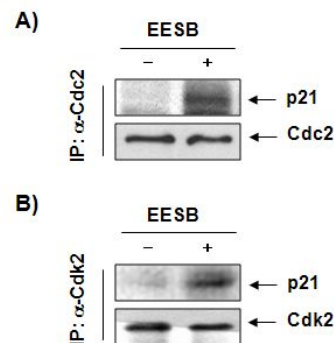


Figure 4. Increased association of p21 with Cdk2 by EESB in Caki-1 cells. After treatment with the indicated concentrations of EESB for 48 h, total cell lysates (500 μ g) were prepared and immunoprecipitated with anti-Cdc2 (A) or anti-Cdk2 (B) antibody, separated on 12% SDS-polyacrylamide gels, and transferred onto nitrocellulose membranes. Western blots were probed with anti-p21, anti-Cdc2 and anti-Cdk2 antibodies and an ECL detection system. IP, immunoprecipitation.

IV. 고찰

비록 황금 추출물 또는 구성 성분들이 다양한 *in vitro* 및 *in vivo* 실험계에서 항산화 작용, 염증 반응의 억제, 암세포에서의 apoptosis 유발, 암세포 전이 억제 등을 통하여 항암활성을 가진다고 보고된 바 있으나, 세포주기 조절 측면에서의 연구는 상대적으로 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 Caki-1 세포 모델에서 EESB에 의한 Caki-1 세포의 생존율 저하와 세포주기 진행 차단과의 연계성을 위주로 조사하였다.

G1, S, G2 및 M기로 나누어지는 진핵세포에서의 세포주기 진행은 다양한 Cdks의 활성화와 비활성의 연속적 조절에 의하여 이루어진다. 양성조절인자인 Cdks의 활성화는 세포주기 진행 동안 세포주기 특이적 cyclin 및 음성조절자로 알려진 Cdk inhibitor 들과의 복합체 형성을 통하여 조절되며, 이 과정에는 다양한 종양유전자 및 종양억제유전자 들의 활성화가 관여한다^{22,24}. 예를 들면, 세포가 G1기로 접어들면 D-type cyclin의 발현이 증가되어 Cdk4 및 Cdk6와 복합체를 형성하면서 G1기의 개시 및 진행을 담당하며, G1기 후반에는 cyclin E와 Cdk2가 복합체를 형성하여 S기로의 진입에 관여한다^{25,26}. Cyclin A는 G1기 후반에 발현이 증가하여 Cdk2와 결합함으로써 S기와 G2기의 조절에 관여하며, B-type cyclin의 경우에는 Cdc2와 결합하여 G2기와 M기의 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다^{24,27}. 또한 Cdk inhibitor는 p21, p27 및 p57과 같은 CIP/KIP family와 p15, p16 및 p18과 같은 INK4 family로 나누어지며, 이러한 Cdk inhibitors는 Cdks와 결합하여 cyclins와 Cdks의 복합체 형성을 억제함으로써 세포주기 진행을 억제하는 것으로 알려져 있다^{28,29}. 특히 DNA 손상에 의한 종양 억제유전자 p53에 의하여 조절 받는 p21의 경우에는 세포주기 전체에 걸쳐서 작용하는 것으로 알려져 왔으나 최근 연구에 의하면 p53 비의존적인 p21의 조절에 의하여 암세포의 성장 억제나 분화 유도에 관여하기도 한다^{1,30}.

본 연구를 통하여 얻어진 결과에 의하면, EESB은 Caki-1 세포에서 G2/M arrest를 유발하였으며, 이는 apoptosis 유발과 연관성이 있었음을 알 수 있었다. EESB 처리에 의한 apoptosis의 유발은 annexin V의 염색을 통한 정량화 등을 통하여 확인하였다. 특히 세포주기의 G2/M기는 G1기와 함께 세포주기 진행에 중

요한 check point로서 세포분열이 시작되기 전 DNA 손상에 대한 복구를 시행하여 세포증식과 분열에 대한 문제를 해결하는 시기이다^{27,31,32}. 또한 G2기에서 M기로의 전이에는 cyclin A 및 cyclin B의 발현 증가와 연관된 Cdk2 및 Cdc2의 인산화/탈인산화가 요구되는데, Cdc2의 인산화는 Cdc25C의 탈인산화 과정과 Wee1의 인산화를 통하여 조절된다^{27,33}. 본 연구의 결과에 의하면 EESB은 Caki-1 세포에서 cyclin A의 발현을 처리 농도 의존적으로 억제하였지만, cyclin B1 또는 Cdk2와 Cdc2의 발현에는 큰 변화가 관찰되지 않았다.

따라서 EESB에 의한 Caki-1 세포의 G2/M arrest에는 cyclin B1과 Cdks의 발현 억제보다 Cdk inhibitor에 의한 조절 가능성이 높을 것으로 기대되어, 대표적인 세포주기 진행 억제자에 해당되는 p21 및 p27의 발현을 조사한 결과, EESB 처리에 따른 두 유전자의 발현이 mRNA 및 단백질 수준에서 현저히 증가하였음을 관찰하였다. 또한 EESB에 의하여 발현이 증가된 p21 단백질은 Cdc2 및 Cdk2와 복합체를 형성하고 있음을 확인하였으며, 이는 p21의 발현 증가에 따른 Cdc2 및 Cdk2의 kinase 활성이 억제되었음을 보여주는 결과이다. 그리고 EESB가 처리된 배지에서 배양된 Caki-1 세포에서 p21의 전사활성 증가가 p53 의존적인지의 여부에 대한 추가적인 연구가 필요하지만, EESB 처리에 따른 p53의 발현 증가는 아마도 p21의 전사 활성 촉진에 관여하였을 것으로 기대된다.

V. 결론

Caki-1 인체 신장암 세포의 증식에 미치는 EESB의 영향을 조사한 결과, EESB의 처리 농도 증가에 따라 EESB에 의한 Caki-1 세포의 생존율이 유의적으로 억제되었으며, 이는 apoptosis의 유도과 세포주기 G2/M기 arrest 현상과 연관성이 있었다. EESB에 의한 G2/M기 arrest는 cyclin A의 전사 및 번역 수준에서의 발현 억제를 동반하였으나 cyclin B1과 Cdc2 및 Cdk2의 변화는 관찰되지 않았다. 또한 EESB는 종양억제 유전자인 p53과 Cdk inhibitor인 p21의 mRNA와 단백질의 발현을 증가시켰으며, EESB에 의하여 증가된 p21 단백질은 Cdc2 및 Cdk2와의 결합력을 증가시켰다. 이상의 결과에서 EESB 처리에 의한 Caki-1 세포의 증식 억제는 세포주기 교란과 관련이 있음을 확인할

수 있었으나 관련 유전자들의 kinase 활성도 검사 등을 통한 후속적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

감사의 글

이 논문은 2014학년도 동의대학교 연구년 지원에 의하여 연구되었음.

References

1. Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? Trends Cell Biol 2003; 13: 65-70.
2. Bohn OL, De las Casas LE, Leon ME. Tumor-to-tumor metastasis: Renal cell carcinoma metastatic to papillary carcinoma of thyroid-report of a case and review of the literature. Head Neck Pathol 2009; 3, 327-330.
3. Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. Renal-cell carcinoma. N Engl J Med. 1996; 335: 865-875.
4. Joniau S, Vander Eeckt K, Van Poppel H. The indications for partial nephrectomy in the treatment of renal cell carcinoma. Nat Clin Pract Urol 2006; 3: 198-205.
5. Huang Y, Tsang SY, Yao X, Chen ZY. Biological properties of baicalein in cardiovascular system. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord 2005; 5: 177-184.
6. Lam TL, Lam ML, Au TK, Ip DT, Ng TB, Fong WP, Wan DC. A comparison of human immunodeficiency virus type-1 protease inhibition activities by the aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs. Life Sci 2000; 67: 2889-2896.
7. Jung HS, Kim MH, Gwak NG, Im YS, Lee KY, Sohn Y, Choi H, Yang WM. Antiallergic effects of *Scutellaria baicalensis* on inflammation *in vivo* and *in vitro*. J Ethnopharmacol 2012; 141: 345-349.
8. Lu Y, Joerger R, Wu C. Study of the chemical composition and antimicrobial activities of ethanolic extracts from roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi. J Agric Food Chem 2011; 59: 10934-10942.
9. Waisundara VY, Hsu A, Huang D, Tan BK. *Scutellaria baicalensis* enhances the anti-diabetic activity of metformin in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. Am J Chin Med 2008; 36: 517-540.
10. Burnett BP, Jia Q, Zhao Y, Levy RM. A medicinal extract of *Scutellaria baicalensis* and *Acacia catechu* acts as a dual inhibitor of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase to reduce inflammation. J Med Food 2007; 10: 442-451.
11. Gao Z, Huang K, Yang X, Xu H. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. Biochim Biophys Acta 1999; 1472: 643-650.
12. Nagai T, Suzuki Y, Tomimori T, Yamada H. Antiviral activity of plant flavonoid, 5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavone, from the roots of *Scutellaria baicalensis* against influenza A (H3N2) and B viruses. Biol Pharm Bull 1995; 18: 295-299.
13. Woźniak D, Dryś A, Matkowski A. Antiradical and antioxidant activity of flavones from *Scutellariae baicalensis* radix. Nat Prod Res 2015; 29: 1567-1570.
14. Shin JW, Kang HC, Shim J, Sohn NW. *Scutellaria baicalensis* attenuates blood-brain barrier disruption after intracerebral hemorrhage in rats. Am J Chin Med 2012; 40: 85-96.
15. Hong GE, Kim JA, Nagappan A, Yumnam S, Lee HJ, Kim EH, Lee WS, Shin SC, Park HS, Kim GS. Flavonoids identified from Korean *Scutellaria baicalensis* Georgi inhibit



- inflammatory Signaling by Suppressing Activation of NF- κ B and MAPK in RAW 264.7 Cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013: 912031.
16. Li C, Fong SY, Mei Q, Lin G, Zuo Z. Influence of mefenamic acid on the intestinal absorption and metabolism of three bioactive flavones in *Radix Scutellariae* and potential pharmacological impact. *Pharm Biol* 2014; 52: 291-297.
 17. He X, Wei Z, Zhou E, Chen L, Kou J, Wang J, Yang Z. Baicalein attenuates inflammatory responses by suppressing TLR4 mediated NF- κ B and MAPK signaling pathways in LPS-induced mastitis in mice. *Int Immunopharmacol* 2015; 28: 470-476.
 18. Wang CZ, Li XL, Wang QF, Mehendale SR, Yuan CS. Selective fraction of *Scutellaria baicalensis* and its chemopreventive effects on MCF-7 human breast cancer cells. *Phytomedicine* 2010; 17: 63-68.
 19. Gao J, Morgan WA, Sanchez-Medina A, Corcoran O. The ethanol extract of *Scutellaria baicalensis* and the active compounds induce cell cycle arrest and apoptosis including upregulation of p53 and Bax in human lung cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 254: 221-228.
 20. Park KI, Park HS, Kang SR, Nagappan A, Lee DH, Kim JA, Han DY, Kim GS. Korean *Scutellaria baicalensis* water extract inhibits cell cycle G1/S transition by suppressing cyclin D1 expression and matrix-metalloproteinase-2 activity in human lung cancer cells. *J Ethnopharmacol* 2011; 133: 634-641.
 21. Zhang J, Park HS, Kim JA, Hong GE, Nagappan A, Park KI, Kim GS. Flavonoids identified from Korean *Scutellaria baicalensis* induce apoptosis by ROS generation and caspase activation on human fibrosarcoma cells. *Am J Chin Med* 2014; 42: 465-483.
 22. Choi BB, Choi JH, Park SR, Kim JY, Hong JW, Kim GC. *Scutellariae radix* induces apoptosis in chemoresistant SCC-25 human tongue squamous carcinoma cells. *Am J Chin Med* 2015; 43: 167-181.
 23. Errico A, Deshmukh K, Tanaka Y, Pozniakovskiy A, Hunt T. Identification of substrates for cyclin dependent kinases. *Adv Enzyme Regul* 2010; 50: 375-399.
 24. Lim S, Kaldis P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* 2013; 140: 3079-3093.
 25. Erlanson M, Landberg G. Prognostic implications of p27 and cyclin E protein contents in malignant lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2001; 40: 461-470.
 26. Sarita Rajender P, Ramasree D, Bhargavi K, Vasavi M, Uma V. Selective inhibition of proteins regulating CDK/cyclin complexes: strategy against cancer—a review. *J Recept Signal Transduct Res* 2010; 30: 206-213.
 27. Raleigh JM, O'Connell MJ. The G(2) DNA damage checkpoint targets both Wee1 and Cdc25. *J Cell Sci* 2000; 113: 1727-1736.
 28. Sgambato A, Cittadini A, Faraglia B, Weinstein IB. Multiple functions of p27(Kip1) and its alterations in tumor cells: a review. *J Cell Physiol* 2000; 183: 18-27.
 29. Shapiro GI, Edwards CD, Rollins BJ. The physiology of p16(INK4A)-mediated G1 proliferative arrest. *Cell Biochem Biophys* 2000; 33: 189-197.
 30. Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 400-414.
 31. Cuddihy A, O'Connell M. Cell-cycle responses to DNA damage in G2. *Int Rev Cytol* 2003; 222: 99-140.
 32. Niida H, Nakanishi M. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* 2006; 21: 3-9.

33. Boutros R, Dozier C, Ducommun B. The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18: 185-191.