

MCF-7 인체 유방암 세포에서 옷나무 추출물이 p53-Dependent G1 Cell Cycle에 미치는 영향

홍상훈¹, 한민호², 최영현², 박상은¹

¹동의대학교 한의과대학 한방내과, ²동의대학교 한의과대학 생화학교실

Induction of p53-Dependent G1 Cell Cycle Arrest by *Rhus verniciflua* Stokes Extract in Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells

Sang-hoon Hong¹, Min-ho Han², Yung-hyun Choi², Sang-eun Park¹

¹Dept. of Korean Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dong-Eui University,

²Dept. of Biochemistry, College of Korean Medicine, Dong-Eui University

ABSTRACT

Objectives: In Korea, *Rhus verniciflua* Stokes (RVS) has been used in traditional medicine for various diseases such as back pain, syndromes of the blood system in women, gastrointestinal disease, and cancer. However, the molecular mechanisms of its anti-cancer activity have not been clearly elucidated yet.

Methods: This study investigated the possible mechanisms by which RVS extract (RVE) exerts its anti-proliferative action in cultured human breast carcinoma MCF-7 cells.

Results: Treatment with RVE in MCF-7 cells resulted in inhibition of cell viability through G1 arrest of the cell cycle and induction of apoptosis in a time- and concentration-dependent manner, as determined by MTT assay and flow cytometry analysis. The induction of G1 arrest by RVE treatment was associated with the inhibition of cyclin D1, cyclin-dependent kinase (Cdk) 2, retinoblastoma protein (pRB), and mouse double minute 2 (MDM2) expression. Moreover, RVE treatment concentration dependently increased the levels of tumor suppressor p53, which was associated with the marked induction of Cdk inhibitors such as p21 (Waf1/Cip1) and p27 (Kip1). However, the inhibition of p53 function by the wild-type p53-specific inhibitor, pifithrin- α , abolished the above-mentioned effects of RVE, showing that p53 was responsible for the cytotoxicity of RVE.

Conclusions: These data indicate that a molecular pathway involving p53-dependent G1 cell cycle arrest plays a pivotal role in the cellular response to RVE, and demonstrate the potential applications of RVE as an anti-cancer drug for breast cancer treatment.

Key words: *Rhus verniciflua*, breast cancer, G1 arrest, p53

1. 서 론

2014년에 발표된 중앙암등록본부의 자료에 의하

· 투고일: 2015.02.23, 심사일: 2015.03.20, 게재확정일: 2015.03.23

· 교신저자: 박상은 울산 남구 중앙로 282

동의대학교 울산한방병원

TEL: 052-226-8105

E-mail: pse@deu.ac.kr

면, 2012년 우리나라에서 유방암의 조발생률이 인구 10만 명당 33명으로 갑상선암, 위암, 대장암, 폐암 다음으로 높았다. 이는 1999년에 비해 2배 이상 높은 수치로 유방암의 효과적인 선별검사에 의한 진단율의 증가가 일정부분 작용한 것을 감안하더라도 갑상선암과 더불어 높은 증가율을 나타내고 있다¹. 최근에는 Mammography를 활용한 정기적인

선별검사에 따라 초기에 발견되는 경우가 많아지고 그에 따른 치료법의 발달로 5년 생존율이 89-91.3%에 이르고 있다¹⁻³. 전이가 동반되지 않은 초기 유방암은 5년 생존율이 98%로 높으나 전이가 동반된 유방암의 5년 생존율은 27%로 매우 낮다⁴. 치료법 중 수술, 방사선, 항암화학요법, 내분비치료 등은 여러 가지 부작용을 동반한다. 수술의 경우 어깨관절의 활동 범위의 축소, 근력 약화, 림프부종 등이 자주 발생한다. 항암화학요법, 방사선요법은 피로감, 설사, 근육통, 구토 등의 가벼운 증상부터 심하면 심폐독성, 폐경, 림프부종, 조기 폐경 등이 나타나 삶의 질을 악화 시킨다^{5,6}.

한의학 임상에서는 윗나무과(Anacardiaceae)에 속한 낙엽교목인 윗나무(*Rhus verniciflua stokes*)의 樹脂를 여름에 채취하여 건조한 것을 활용한다. 性味가 辛溫鹹, 有毒하고, 간, 비, 위, 대소장경으로 귀경하므로 血分에 작용하여 破血하고, 위장의 積滯를 消散시킨다. 윗나무 수지의 行血, 止血, 殺蟲, 消散積滯시키는 작용은 어혈요통, 風寒濕痺, 冷心痛, 위장질환, 부인의 어혈성질환, 암 등에도 효과가 있으며, urushiol을 제거한 추출물에서도 항암, 항산화 효과가 있다⁷.

본 연구에서는 윗나무 추출물(RE)의 항암효과에 관한 생화학적인 기전을 밝히기 위하여 MCF-7 인체 유방암 세포에서의 성장억제 정도와 세포주기 조절과 관련된 주요 인자들의 발현 변화를 조사한 결과 몇 가지 중요한 유전자들의 발현 변화에 대한 유의적인 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 시료준비

본 실험에 사용된 RE는 충북 옥천군 소재 (주) 참웃들에서 생산된 참웃 분말을 구입하여 사용하였다. 참웃 분말의 생산은 충북 옥천군 소재의 20년 이상 된 참웃나무를 특허 제 10-1228119호, 특허 제 10-0763320호의 의거하여 제조(수율 7.5%)되었다.

준비된 RE는 3차 증류수에 녹여 100 mg/ml의 stock solution으로 만든 다음 이를 적정 농도로 배지에 희석하여 처리하였다.

2. 세포 배양 방법

본 실험에 사용한 인체 유방암 MCF-7 세포는 American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)에서 분주 받아 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS: Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 및 1%의 penicillin 및 streptomycin이 포함된 RPMI-1640 배지(Gibco BRL)를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

3. MTT assay에 의한 세포 증식억제 조사

RE 처리에 의한 MCF-7 세포의 증식 억제 정도를 확인하기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium(MTT) assay를 이용하였다. 이를 위하여 MCF-7 세포에 적정 농도의 RE를 처리하고 24 시간 또는 48시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 MTT(Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Paul, MN, USA)를 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 200 µl씩 분주하고 37 °C에서 3시간 동안 다시 배양하였다. 배양이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Chemical Co. USA)를 1 ml씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 96 well plate에 200 µl씩 옮겨서 ELISA reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 3회에 걸친 실험을 통하여 얻어진 결과를 통계 처리하였다.

4. DNA Flow cytometry를 이용한 세포주기 분석

MCF-7 세포에서 RE의 처리에 따른 증식 억제가 세포주기 교란과 연관이 있는지를 조사하기 위하여 정상 및 RE가 함유된 배지에서 자란 MCF-7 세포들을 모은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 phosphate buffered saline (PBS)를 이용하여 2~3회 정도 세척하였다. 이들

세포를 CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 고정 및 염색을 하여 4 °C, 암실에서 30분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 다음 35-mm mesh를 이용하여 단일세포로 분리한 후 flow cytometer(Becton Dickinson)를 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 Modifit LT(Becton Dickinson) 프로그램으로 분석하였다.

5. Flow cytometry를 이용한 apoptosis의 정량적 분석

MCF-7 세포에서 RE의 처리에 따른 증식 억제에 apoptosis 유발과 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 준비된 세포를 PBS로 2번 씻고 1x binding buffer를 넣어준 후 annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC, Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 처리하여 암상태의 실온에서 20분간 염색하였다. 그 후 flow cytometer를 이용하여 형광 반응에 따른 apoptosis 유발 세포의 빈도를 분석하였다.

6. 단백질 분리, 전기영동 및 Western blot analysis

준비된 세포들을 모아 PBS로 씻어내고 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 5 mM dithiothreitol(DTT)]를 첨가하여 4 °C에서 1시간 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 모았다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 정량한 다음 동량의 Laemmli sample buffer(Bio-Rad)를 섞어서 sample을 만들었다. 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate(SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후, nitrocellulose membrane(Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시켰다. 분리된 단백질이 전이된 membrane에 5% skim milk를 함유한 PBS-T(0.1% Tween 20 in PBS)를 처리하여 비

특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 1차 항체를 처리하여 상온에서 2시간 이상 또는 4 °C에서 over night 시킨 다음 PBS-T로 세척하고 처리된 1차 항체에 맞는 2차 항체를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 반응이 끝난 후 암실에서 enhanced chemiluminescence(ECL) solution(Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 발현량을 분석하였다. 단백질 발현 분석을 위하여 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc.(Santa Cruz, CA, USA) 및 CalBiochem(San Diego, CA, USA)에서 구입하였으며, immunoblotting을 위해 2차 항체로 사용된 horseradish peroxidase(HRP)-conjugated anti-mouse 및 anti-rabbit 항체는 Amersham Life Science Corp.에서 구입하였다.

7. 통계 처리

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

III. 결 과

1. MCF-7 세포의 증식에 미치는 RE의 영향

인체 유방암 MCF-7 세포에서 RE 처리에 의한 증식 억제 현상을 조사하기 위하여 RE를 적정 농도로 24시간 및 48시간 동안 처리한 후 MTT assay를 실시하였다. Fig. 1A에 나타난 바와 같이 100 µg/ml RE 처리군의 경우에는 증식 억제 현상은 관찰되지 않았지만 200 µg/ml 처리군에서부터 증식 억제 현상이 나타나기 RE 처리 농도 및 시간 의존적으로 강력한 증식억제 효과가 있는 것으로 나타났다. 특히 48시간 동안의 400 µg/ml 및 500 µg/ml 처리군에서 각각 35% 및 47% 정도의 현저한 증식 억제 효과를 보였다.

2. Apoptosis 유발에 미치는 RE의 영향

RE 처리에 의한 MCF-7 세포의 증식 억제에 apoptosis 유발과 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 annexin V 염색을 이용하여 flow cytometry 분석을 실시한 결과, 현저한 apoptosis 유발 효과는 없었지만, RE의 처리 농도 및 시간이 증가할수록 유의적인 apoptosis 유발 증가를 확인할 수 있었다 (Fig. 1B). 즉 RE 처리에 의한 MCF-7 세포의 증식 억제는 apoptosis 유발과 어느 정도 연관성이 있음을 의미하였다(Fig. 1).

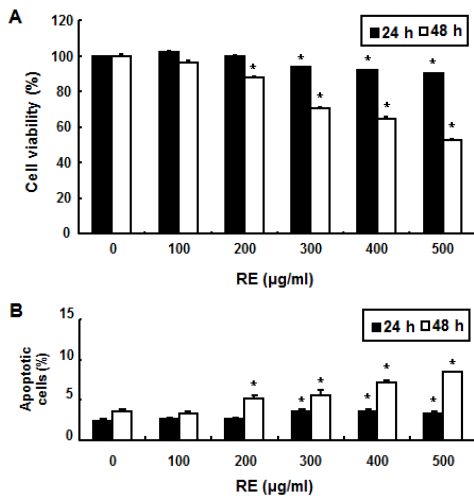


Fig. 1. Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by RE treatment in MCF-7 cells.

Cells were seeded in 6-well plates at an initial density of 1×10^5 cells per well and treated with the indicated concentrations of RE for 24h and 48h. (A) The growth inhibition was measured by the metabolic-byte-based MTT assay. (B) For the quantification of apoptosis level, cells were collected, stained with annexin V-FITC and analyzed by flow cytometry. The data shown are means \pm SD of three independent experiments. The statistical significance of the results was analyzed by Student's t-test (*, $p < 0.05$ vs. untreated control).

3. RE에 의한 세포주기 G1 arrest 유도

다음은 RE의 처리에 의한 MCF-7 세포의 증식

억제가 세포주기 특정 시기의 진행억제와 연관성을 지니는지의 여부를 조사하기 위하여 MCF-7 세포의 세포주기 분포에 미치는 RE의 영향을 조사하였다. 이를 위하여 정상 및 다양한 농도의 RE가 처리된 배지에서 24시간 및 48시간 배양한 후 flow cytometry를 이용하여 분석하였다. Table 1에 나타난 바와 같이, RE가 처리된 MCF-7 세포의 경우 특히 G1기에 속하는 세포의 빈도가 RE 처리 농도 및 시간이 증가할수록 상승되었으며, 상대적으로 S기 및 G2/M기에 해당되는 세포의 빈도는 감소되었다. 이러한 결과는 RE 처리에 의한 MCF-7 세포의 증식억제가 세포주기 G1 arrest와 연관이 있음을 의미하는 것이다(Table 1).

Table 1. Induction of G1 Arrest of MCF-7 Cells by RE Treatment

RE (µg/ml)	Time (h)	G1	S	G2/M
0		58.35%	20.37%	21.27%
100		57.41%	19.42%	23.16%
200	24	59.79%	21.72%	18.48%
300		61.24%	22.04%	16.72%
400		66.57%	20.34%	13.10%
500		70.22%	15.32%	14.46%
0		60.02%	18.54%	21.44%
100		60.56%	22.03%	17.40%
200	48	68.46%	17.32%	14.22%
300		70.07%	14.94%	14.99%
400		74.06%	12.74%	13.20%
500		82.30%	7.42%	10.27%

3. 세포주기 주요 조절인자들의 발현에 미치는 RE의 영향

상기 결과에 의하면 RE 처리에 의한 MCF-7 세포의 증식억제가 G1 arrest와 연관이 있었기에, 이와 연관된 기전 해석을 위하여 세포주기 G1 조절과 연관된 주요 유전자들의 발현에 미치는 RE의 영향을 조사하였다. Fig. 2에 나타난 것처럼, 조사된 cyclins, cyclin-dependent kinases(Cdks) 및 retinoblastoma

protein(pRB) family 연관 단백질들 중에서, cyclin D1과 Cdk2 및 pRB의 단백질 발현이 RE 처리 농도가 증가할수록 점차 감소되었으나 pRB family의 다른 인자인 p130을 포함한 나머지 유전자들의 발현에서는 큰 변화를 관찰할 수 없었다. 다음은 세포주기 조절 상위 핵심인자인 종양억제 유전자 p53 및 Cdk 저해인자들의 발현에 미치는 RE의 영향을 조사하였다. Fig. 3에 나타낸 바와 같이 p53의 활성을 제어하는 것으로 알려진 mouse double minute 2 (MDM2)^{8,9}의 발현은 RE 처리 농도의 증가에 따라 점차 감소함에 비하여 p53의 발현은 매우 증가되었다. 아울러 Cdk 저해인자인 p21(Waf1/Cip1) 및 p27(Kip1)의 발현도 p53 발현 증가와 동반된 상승효과가 관찰되었다(Fig. 2, 3).

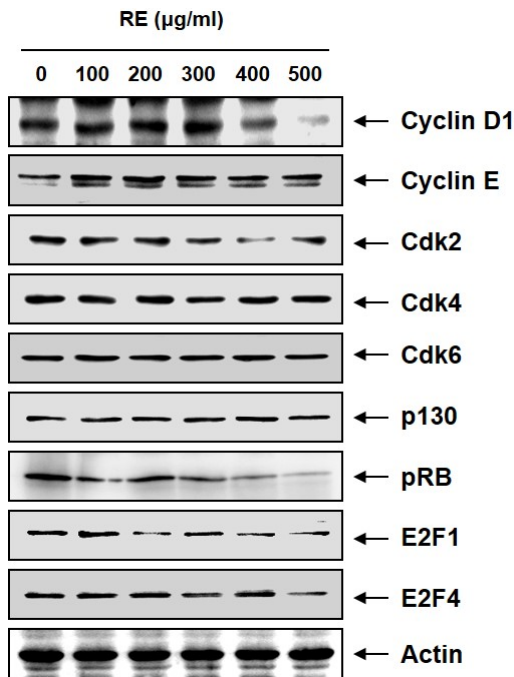


Fig. 2. Modulation of G1 phase-related proteins by RE treatment in MCF-7 cells.

Cells were treated with the indicated concentrations of RE for 48h. The cells were lysed and then equal amounts of cell lysates were separated on SDS-polyacrylamide gels and transferred to membranes.

The membranes were probed with the indicated antibodies and the proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

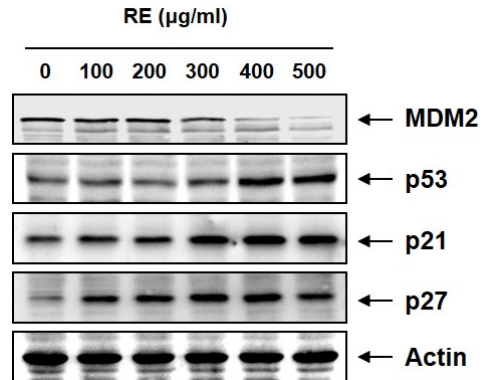


Fig. 3. Induction of tumor suppressor p53 and Cdk inhibitors by RE treatment in MCF-7 cells.

The cells grown under the same condition as Fig. 2 were lysed and then equal amounts of cell lysates were separated on SDS-polyacrylamide gels and transferred to membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies and the proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

4. p53 활성 억제가 RE에 의한 G1 arrest 유발에 미치는 영향

이상에서 관찰된 RE 처리에 의한 p53의 발현 증가가 RE의 MCF-7 세포 증식 억제에 어떤 의미를 가지는지를 조사하기 위하여 정상 p53 유전자의 활성을 선택적으로 차단하는 pifithrin- α ¹⁰를 적용하였다. Fig. 4에 나타낸 바와 같이 pifithrin- α 의 전처리는 RE에 의한 p53의 발현을 완벽하게 차단하였을 뿐만 아니라 p21(Waf1/Cip1)의 발현도 대조군 수준처럼 전혀 유도되지 않았다. 이러한 p53 발현 억제가 RE에 의한 G1 arrest 유발에 어떠한 영향을 주는지를 조사한 결과 RE에 의한 G1 arrest도 pifithrin- α 전처리에 의하여 현저히 억제되었다(Table 2). 이는 RE에 의한 MCF-7 세포의 증식 억제에 따른 G1 arrest 유발이 p53 의존적으로 이루어

지고 있음을 보여주는 결과이다(Fig. 4, Table 2).

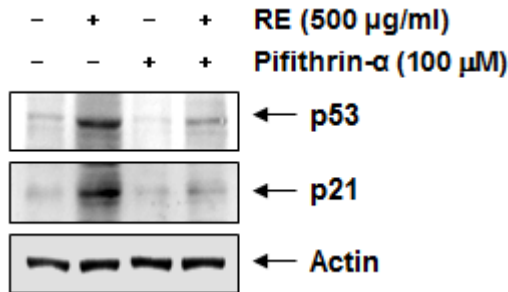


Fig. 4. Inhibition of RE-induced p53 and p21 proteins by pretreatment with pifithrin- α in MCF-7 cells.

MCF-7 cells were pretreated with 100 μ M pifithrin- α for 1h prior to 500 μ g/ml RE treatment. The cells were lysed and then equal amounts of cell lysates were separated on SDS-polyacrylamide gels and transferred to PVDF membranes. The membranes were probed with the anti-p53 and anti-p21 antibodies, and the proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

Table 2. Inhibition of RE-induced G1 Arrest by Pifithrin- α in MCF-7 Cells

RE (μ g/ml)	Pifithrin- α (μ M)	G1	S	G2/M
0	0	59.55%	18.40%	22.04%
500	0	82.15%	6.73%	11.11%
0	100	55.46%	21.74%	22.79%
500	100	63.20%	17.15%	19.65%

IV. 고 찰

옷나무추출물에 대한 최근 국내 연구 경향을 보면, 암에 대한 연구가 주로 시행되고 있다. 이 등¹¹은 건칠산(대황, 건칠, 목향, 원화, 적작약, 계심, 당귀, 천궁, 호박, 우슬, 도인, 사향) 전탕액으로 여성암 세포주에 미치는 영향을 살펴보았는데 MCF-7, HeLa, SK-OV3 세포주의 증식을 억제할 확인하였다. 안 등¹²은 건칠이 위암세포의 활성화, 세포사멸에

미치는 영향을 살펴보았는데, 건칠이 AGS 위암세포주의 apoptosis를 유도하고 p27Kip1 단백질이 Cyclin E-CDK2 복합체의 형성을 억제시켜 G1 cell cycle arrest를 확인하였다. 옷나무 추출물의 임상연구는 알러젠(urushiol)을 제거한 옷나무추출물을 활용하는 연구가 대부분이나, 증례 보고 중심인 점은 아쉽다. 박 등¹³은 옷나무추출물(Nexia-한국특허 0506160)을 13주 동안 투여한 급성림프구성 백혈병환자 4인에 대한 치료과정을 보고하였는데, 86개월-110개월의 생존을 보고하였다. 최 등¹⁴은 편평세포암종(T4N3M0)인 편도암을 보인 47세 남성에게 8개월간의 알러젠 제거 옷나무추출물 투여로 암의 크기 감소 및 목통증 개선효과를 보고하였다. 김 등¹⁵은 변형 근치적 유방절제술 후 4년 만에 폐로 전이 되어 재발한 환자에게 알러젠 제거 옷나무추출물을 24개월간 복용하여 암의 크기 감소 및 환자의 상태 개선을 보고하였다. Lee 등¹⁶은 유방암 세포주 MCF-7에 옷나무 추출물을 처리하여 AMPK pathway에 미치는 영향을 관찰하는 등 국내 연구진에 의한 보고가 주류를 이루고 있다.

이에 저자는 이미 진행된 실험 결과 및 비록 증례 보고이지만 임상적 효능이 추론되는 유방암 세포주를 대상으로 옷나무추출물의 작용기전을 검증하고자 하였다. 본 연구에서는 RE의 항암활성 기전을 연구하기 위하여 인체 유방암 MCF-7 세포를 이용하였으며, MCF-7 세포의 증식에 미치는 RE의 영향을 조사하기 위하여 MTT assay를 실시한 결과, RE의 처리 농도 및 시간이 증가될수록 MCF-7 유방암세포의 증식이 현저히 감소하였고 이는 세포주기 G1 arrest 및 apoptosis 유발과 연관성이 있었다. 또한 RE에 의한 G1 arrest는 종양 억제 유전자 p53 의존적 p21(Waf1/Cip1)의 발현 증가와도 연관성이 있었다.

세포주기 조절의 관점에서 암세포는 세포주기의 비정상화에 기인된 질병으로 정의 될 수 있으며, 특정 시기의 세포주기 억제는 세포주기 조절 양성인자의 발현 저하 또는 음성 조절 인자의 과발현에

의한 것으로 요약될 수 있다. 진핵세포의 세포주기 조절은 각 주기별 관여하는 다양한 유전자들에 의해 조절되는데, 기본적으로 세포주기 checkpoint 각 시기에 요구되어지는 양성 조절인자인 cyclins에 의하여 Cdk의 연속적인 활성화와 불활성 및 Cdk 저해인자의 발현 정도에 따라 결정되어 진다^{17,19}. 따라서 RE의 처리에 의한 MCF-7 세포의 증식억제가 세포주기 특정 시기의 진행 억제와 연관성을 지니는지의 여부를 조사하기 위하여 MCF-7 세포의 세포주기 분포에 미치는 RE의 영향을 조사한 결과, G1기에 해당되는 세포의 빈도 증가에 따라 S 및 G2/M기에 속하는 세포의 빈도가 상대적으로 감소되어 RE 처리에 MCF-7 세포의 증식억제는 세포주기 G1 arrest와 연관이 있었다(Table 1).

세포주기 진행 조절에 관여하는 인자 중, D-type cyclin은 G1기로 접어들면서 발현이 증가되어 Cdk4 및 Cdk6과 복합체를 형성하면서 활성화되어 종양 억제인자인 pRB를 인산화시킨다^{18,20,21}. pRB는 인산화 정도에 따라 전사조절인자 E2F family에 속하는 단백질들과의 결합을 통해 E2F 인자들의 활성을 조절하는데, pRB가 인산화되면 E2F가 유리되어 S기 특이적 유전자를 포함한 DNA 합성과 연관된 많은 유전자들의 발현을 촉진시킨다. 비록 pRB에 대한 인산화 장소는 다르지만 cyclin E/Cdk2/4 복합체에 의한 pRB의 인산화도 이와 유사한 결과를 낳는데, DNA 손상이나 분화와 같은 증식 억제 신호는 Cdk inhibitor의 발현을 증가시켜 cyclins/Cdks의 활성을 억제하여 S기로의 진입이 되지 못하게 된다^{17,22}. 부가적으로 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^{23,24}. Cdk는 다양한 세포증식 억제 신호들에 의해 유도되는 Cdk 억제자에 의하여 그 활성이 조절되는데 크게 두 가지의 family로 분류 (INK4 및 CIP/KIP family)되고 있다. 그 중 CIP/KIP family에 속하는 p21(Waf1/Cip1) 및 p27(Kip1)은

DNA 손상에 의한 종양 억제인자인 p53에 의해 조절을 받는다고 알려져 있다^{19,25,26}. 본 연구에서 RE에 의한 MCF-7 세포의 증식억제가 G1 arrest와 연관이 있었기에, 이와 연관된 기전 해석을 위하여 몇 가지 유전자들의 발현에 미치는 RE의 영향을 조사한 결과 다양한 인자들 중에서 cyclin D1 및 Cdk2의 발현뿐만 아니라 pRB의 발현도 저해되었다(Fig. 2). 또한 p53 뿐만 아니라 p21(Waf1/Cip1) 및 p27(Kip1)의 발현도 RE가 처리된 세포에서 매우 높게 나타났다(Fig. 3). 특히 p53의 발현 증가에 동반한 p21(Waf1/Cip1) 및 p27(Kip1)의 발현 증가는 RE에 의해 증가된 p53과 연관이 있을 것으로 추정되어 p53의 선택적 저해제인 pifithrin- α 를 전처리한 결과 p53의 발현 억제뿐만 아니라 p21(Waf1/Cip1)의 발현도 완벽하게 차단되었다(Fig. 4). 이와 더불어 RE에 의한 G1 arrest 유도 현상 역시 pifithrin- α 의 전처리에 의하여 유의하게 억제되었다.

따라서 본 연구의 결과는 비록 RE가 cyclin E나 Cdk4 및 Cdk6 등의 발현에는 큰 변화를 주지 못하지만, p21(Waf1/Cip1) 및 p27(Kip1)의 발현 증가와 동반된 pRB의 발현을 억제하여 cyclins/Cdks complex의 활성을 저해하며, 그로 인하여 S기 진입에 요구되는 인자들의 발현을 억제하는 것으로 추정된다. 또한 이러한 모든 RE의 항암활성이 p53 의존적으로 이루어지며, p53이 정상인 암세포의 증식 제어를 위한 RE의 활용 가능성이 높을 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구에서 RE는 MCF-7 세포의 증식을 처리 농도 및 시간 의존적으로 억제시켰으며, 이는 세포주기 G1 arrest 및 apoptosis 유발과 연관성이 있음을 MTT assay 및 flow cytometry 분석으로 확인하였다. RE에 의한 MCF-7 세포의 G1 arrest는 cyclin D1, Cdk2, pRB 및 MDM2의 발현 저하와 연관성이 있었다. 또한 RE는 처리 농도 의존적으로 종양

억제 유전자 p53의 발현을 매우 증가시켰으며, Cdk 억제자인 p21(Waf1/Cip1) 및 p27(Kip1)의 발현 증가가 동반되었다. 그러나 p53 선택적 억제제인 pifithrin-α에 의한 p53의 발현 억제는 p21(Waf1/Cip1)의 발현 억제뿐 만 아니라 RE에 의한 G1 arrest를 해리시켰다. 따라서 본 연구의 결과는 RE가 p53 의존적인 G1 arrest를 통하여 MCF-7 세포의 증식을 억제시켰음을 의미하며, RE는 p53을 정상적으로 가지는 유방암 치료제 개발의 활용에 사용될 수 있음을 보여주는 것이다.

감사의 글

이 논문은 2013학년도 동의대학교 교내연구비에 의해 연구되었음(2013AA105)

참고문헌

1. 국가암정보센터: 암통계, 2014.
2. Kalles V, Zografos GC, Provatopoulou X, Koulocheri D, Gounaris A. The current status of position emission mammography in breast cancer diagnosis. *Breast Cancer* 2013;20(2):123-30.
3. Göttsche PC, Nielsen M. Screening for breast cancer with mammography. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;19(1):CD001877.
4. Lee KS, Shin JS, Nam KS. Cancer chemopreventive effects of starfish polysaccharide in human breast cancer cell. *Biotechnol Bioprocess eng* 2011;16(5):987-91.
5. Fairey AS, Courneya KS, Field CJ, Mackey JR. Physical exercise and immune system function in cancer survivors: a comprehensive review and future directions. *Cancer* 2002;94(2):539-51.
6. Markers M, Brockow T, Resch KL. Exercise for women receiving adjuvant therapy for breast

- cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;18(4):CD005001.
7. 송미선, 김윤상, 임은미. 건칠에 대한 문헌적 고찰. *대한한방부인과학회지* 2002;15(1):61-76.
8. Levine AJ, Hu W, Feng Z. P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ* 2006;13(6):1027-36.
9. Vargas DA, Takahashi S, Ronai Z. Mdm2: A regulator of cell growth and death. *Adv Cancer Res* 2003;89:1-34.
10. Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV, Gudkov AV. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* 1999;285(5434):1733-7.
11. 이준성, 유동열. 건칠산 전당액이 여성암 세포주에 미치는 영향. *대한한방부인과학회지* 1997;10(2):201-21.
12. 안진영, 고성규, 고흥. 건칠(乾漆)이 위암세포의 활성, 세포사멸 및 세포주기관련 유전자 발현에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 2006;20(3):701-9.
13. 윤성우, 박재우, 김경석, 정현식, 최원철. 건칠추출물(Nexia)의 독성 실험과 금성림프구성 백혈병환자의 임상증례군. *대한암한의학회지* 2007;11(1):1-21.
14. 최진영, 박재우, 김경석, 최원철, 윤성우. 알러젠 제거 옷나무추출물 투여로 호전된 편도선암 환자 1례. *대한암한의학회지* 2007;12(1):91-7.
15. 김초영, 박재우, 정현식, 최원철, 윤성우. 알러젠 제거 옷나무추출물 투여로 호전된 유방암 환자 1례. *대한암한의학회지* 2007;12(1):67-73.
16. Lee JO, Moo JW, Kim SM, Kim N, Ko SG, Kim HS, et al. Rhus verniciflua extract modulates survival of MCF-7 breast cancer cells through the modulation of AMPK-pathway. *Biol pharm Bull* 2014;37(5):794-801.

17. Wesierska-Gadek J, Krystof V. Selective cyclin-dependent kinase inhibitors discriminating between cell cycle and transcriptional kinases: future reality or utopia? *Ann N Y Acad Sci* 2009;1171:228-41.
18. Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 2000;60(14):3689-95.
19. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995;374(6518):131-4.
20. Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2002;1602(1):73-87.
21. Bartek J, Bartkova J, Lukas J. The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8(6):805-14.
22. Helmbold H, Galderisi U, Bohn W. The switch from pRb/p105 to Rb2/p130 in DNA damage and cellular senescence. *J Cell Physiol* 2012;227(2):508-13.
23. Girard F, Strausfeld U, Fernandez A, Lamb NJ. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 1991;67(6):1169-79.
24. 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* 1996;15(19):5280-9.
25. Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol* 2003;13(2):65-70.
26. Elledge SJ, Harper JW. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6(6):847-52.