

HCT116 대장암세포에서 Akt-mTOR 신호경로를 통한 개똥쑥 추출물 (AAE)의 세포주기 억제 효과

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

Cell Cycle Arrest of Extract from *Artemisia annua* Linné. Via Akt-mTOR Signaling Pathway in HCT116 Colon Cancer Cells

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

Received: 22 June 2015 / Revised: 24 August 2015 / Accepted: 27 August 2015

© 2015 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: In this study, extract from *Artemisia annua* in L. (AAE) is known as a medicinal herb that is effective against cancer. The cell cycle is regulated by the activation of cyclin-dependent kinase (CDK)/cyclin complex. We will focus on regulation of CDK2 by cyclin E. cyclin E is associated with CDK2 to regulate progression from G1 into S phase. Akt is known to play an important role in cell proliferation and cell survival. Activation of Akt increases mTOR activity that promotes cell proliferation and cancer growth. In this study, we investigated that AAE-induced cell cycle arrest at G1/S phase in HCT116 colon cancer. Treatment of AAE shows that reduced activation of Akt decreases mTOR/Mdm2 activity and then leads to increase the activation of p53. The active p53 promotes activation of p21. p21 induces inactivation of CDK2/cyclin E complex and occurs cell cycle arrest at G1/S phase. We treated LY294002 (Akt inhibitor) and Rapamycin (mTOR

inhibitor) to know the relationship between the signal transduction of proteins associated with cell cycle arrest. These results suggest that AAE induces cell cycle arrest at G1/S phase by Akt/mTOR pathway in HCT116 colon cancer cell.

Keywords: AAE, Cell cycle arrest, Akt/mTOR pathway, HCT116

1. INTRODUCTION

대장암은 매년 환자수가 증가하고 있는 암으로 대장암의 발생률은 서구화된 식습관으로 인해 더욱 높아지고 있으며 남녀 전체 암 발생의 3위를 차지하고 있다 [1]. 대장암 치료의 기본은 수술이며 수술로 완치가 불가능한 경우 항암 화학요법 등이 사용되고 있으나 부작용을 초래하는 문제점이 제시되고 있다 [2,3]. 이로 인해 여러 가지 천연 추출물들을 이용한 암 예방 및 치료에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 대장암을 포함한 여러 암에서 예방 및 치료효과를 나타내는 것으로 알려진 대표적인 것으로 개똥쑥이 있다. 개똥쑥 (*Artemisia annua* L.)은 국화과 (Compositae)에 속하는 일년생 초본으로 전국 각지의 길가나 들판뿐만 아니라 여러 나라에서도 볼 수 있고, 오래 전부터 말라리아 치료제로 이용되어 왔으며 항암 활성이 높다는 것이 알려짐으로써 세계적으로 주목 받고 있다 [4,5].

세포가 손상을 입게 되면 세포주기를 지연시켜 복구할 수 있는 시간을 갖는다. 그러나 암세포는 일반적인 세포주기 조

¹한남대학교 생명나노과학대학 생명시스템과학과

¹Department of Biological sciences and Biotechnology, College of Life Science and Nano Technology, Hannam University, Daejeon 305-811, Korea

Tel: +82-42-629-8753, Fax: +82-42-629-8873

e-mail: kym@hnu.kr

²(주)바이오엔진

²Department of BIONGENE, Seoul 000-000, Korea

³한남대학교 생명나노과학대학 화학공학과

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

절에서 벗어나 지속적인 세포분열을 통해 활발한 세포증식을 한다 [6,7]. 세포주기의 진행은 G1, S 및 G2기, M기로 나누어지는데 S기는 DNA합성, M기는 세포분열이 일어난다. G1기와 G2기는 S기와 M기 사이에 존재하는 것으로 다음 단계를 위한 준비가 이루어진다. 이러한 세포주기를 진행시키는데 있어서 핵심적으로 작용하는 것이 cyclin-dependent kinases (CDK)와 cyclin이다. CDK의 활성화는 세포주기가 진행되는 동안 일정한 상태를 유지하고 있지만 cyclin은 주기에 따라 변한다. 각 주기마다 다르게 활성을 갖는 cyclin은 해당 주기에서 활성을 가질 때 발현량이 증가하지만 세포주기가 정지되거나 다른 주기로 넘어가게 되면 분해된다. 이러한 cyclin의 활성에 따라 주기적으로 CDK를 활성화시킨다. 세포주기에서는 세 개의 checkpoint가 존재하는데 G1/S checkpoint를 조절하는 대표적인 단백질에는 CDK2와 cyclin E가 관여한다 [8].

Protein kinase B (PKB)라 불리는 Akt는 serin/threonine kinase로 Akt 활성은 다른 단백질을 인산화 시킴으로써 세포주기 조절, 세포의 생존, 대사를 촉진한다. 이러한 Akt 신호경로의 조절은 비정상적인 암세포의 증식을 억제하는데 큰 역할을 한다 [9]. Akt는 Tuberous Sclerosis Complex 2 (TSC2)를 인산화시켜 Mammalian target of rapamycin (mTOR)을 활성화시키는데 mTOR는 세포의 성장, 증식을 조절하는 중요 조절자로서 종양형성에 관여한다. Murine Double Minute 2 (MDM2)는 세포의 성장에 관여하는 것으로 Akt와 mTOR의 활성이 증감함에 따라 활성을 가지게 된다. Akt에 의해 ser166 위치에서 인산화된 Mdm2는 p53의 전사활성 (transactivation) 부위에 결합하여 p53의 ubiquitination한다. 그러므로 Akt/mTOR/Mdm2 신호조절이 대장암치료를 중요한 신호분자로 작용할 수 있음을 보여준다 [10-12]. 종양 억제유전자인 p53은 다양한 하위 유전자의 발현을 조절함으로써 세포주기를 조절하고 apoptosis를 유도하여 정상세포가 암화되는 과정을 억제한다. p21의 발현은 전사인자의 역할을 하는 p53에 의해 유도된다 [13]. CDK inhibitor (CKI)인 p21은 S기를 유도하는 CDK/cyclin 복합체에 결합하여 CDK의 활성을 저해함으로써 세포주기 G1기의 정지를 일으켜 일시적으로 세포의 증식을 억제시키는 것으로 알려져 있다 [14].

따라서 본 연구에서는 HCT116 대장암세포에 AAE를 처리했을 때, 세포주기 억제에 의한 HCT116 대장암세포의 증식이 억제되는지 확인하고자 하였다. 또한 이러한 효과에 있어서 AAE의 처리에 따른 Akt-mTOR 신호경로의 저해와 TSC2, Mdm2, p53, p21, CDK2/cyclin E 단백질간의 상관관계를 알아보고자 하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 실험재료

본 실험에서 사용된 개똥썩은 대전 한약재시장에서 구입하여 개똥썩 분쇄가루 250 g에 에탄올 200 mL을 가하여 72시간

동안 상온에서 환류 추출하였다. 이러한 방법으로 추출된 AAE를 감압농축기를 이용하여 감압 농축과정을 거친 뒤 100 mg/mL stock으로 만들어 -20°C에 보관하여 사용하였고, 이때 수득률은 0.64%이었다. 각 농도별 AAE는 DMSO에 녹여 만들었으며, -20°C에 보관하여 사용하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 5 mg/mL stock으로 만들어서 사용하였다. 또한 LY294002와 Rapamycin은 Calbiochem (San Diego, CA)에서 구입하여 DMSO에 녹인 뒤 각각 20 mM과 100 µg/mL stock으로 만들어 사용하였다.

2.2. 세포배양

본 실험에서 사용된 HCT116 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양 받았으며, 10% FBS (Hyclone, LaboratorisInc, Logan, UT, USA)와 1% antibiotics (Hyclone, LaboratorisInc, Logan, UT, USA)가 포함된 RPMI 1640 배지 (Hyclone, Laboratris Inc., Logan, UT, USA)를 사용하였고 Fibroblast 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양 받았으며 10% FBS와 1% antibiotics가 포함된 DMEM (Hyclone, Laboratris Inc., Logan, UT, USA) 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C 조건하에 배양하였다. 매 48시간 마다 Trypsin-EDTA (Hyclone, Laboratories Inc., Logan, UT, USA)를 이용하여 세포를 부유상태로 만든 다음 세포를 1×10⁶ cells/mL로 분주하고 계대 배양하였다.

2.3. MTT assay에 의한 세포생존율 측정

세포배양용 12 well plate에 HCT116와 Fibroblast 세포를 1×10⁴ cells/mL로 분주하고 12시간, 24시간 동안 배양시킨 후 AAE를 처리하였다. LY294002와 Rapamycin 처리시에는 LY294002, Rapamycin을 30분 먼저 처리한 후 AAE를 농도별로 처리하여 12시간, 24시간 동안 배양하였다. MTT용액 5 mg/mL을 30 µL씩 첨가하여 30분 동안 CO₂ incubator에서 배양한 후, MTT 시약이 들어있는 배지를 제거하고 DMSO를 150 µL넣어 well에 생성된 formazan을 모두 녹여 96 well plate에 100 µL씩 옮겨서 Microplate Reader (BIO-RAD Laboratories, Inc, USA)로 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)에 의한 세포주기 정지 관찰

AAE가 HCT116 세포의 세포주기에 미치는 영향을 조사하기 위하여 60 mm dish에 HCT116 세포를 1×10⁵ cells/ml 농도로 분주하여 24시간 배양 후, 시료를 농도별로 처리하였다. LY294002와 Rapamycin 처리시에는 LY294002, Rapamycin을 30분 먼저 처리한 후 시료를 처리하였다. 24시간 배양 후 배지를 제거하고 trypsin-EDTA를 처리하고 원심분리 (3000 rpm, 5 min)하여 세포들을 모아주었다. PBS 0.3 mL에 세포를 부유시키고 0.7 mL의 99% 에탄올, 4°C에서 고정시켰다. 세포

들을 다시 PBS로 세척하고 RNase (10 mg/mL) 2.5 μ L와 PI (25 mg/mL) 2.5 μ L를 첨가한 다음 Flow cytometry FACS Canto (Becton-Dickinson Biosciences, Drive FranklinLage, NJ, USA) 로 분석하여 결과를 측정하였다.

2.5. Western blotting

6 well plate에 HCT116 세포를 well 당 1×10^6 cells/mL로 분주하여 24시간 동안 배양한 후 AAE를 농도별로 처리하였다. LY294002, Rapamycin과 병행 처리시에는 inhibitor를 30분 먼저 처리하였으며, 모든 물질을 최종 처리한 후 6시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양이 끝난 세포에 RIPA lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.4), 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF]를 각 well에 150 μ L씩 첨가하여 단백질을 분리한 뒤 14000 rpm, 4°C에서 20분 동안 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 추출한 단백질은 ELISA-reader를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 그 다음에 8%, 12% acrylamide gel을 이용하여 전기영동을 실시한 후 nitrocellulose membrane에 transfer 하였다. 그런 다음 2% Bovine serum albumin (BSA)을 이용해 blocking하고, 1차 항체를 4°C에서 overnight 처리한 다음 2차 항체를 결합시켜 1시간 반 동안 반응시킨 후 Blue X-ray film에 감광하여 실험 결과를 측정하였다.

2.6. Wound healing

6 well plate에 HCT116 세포를 well 당 1×10^6 cells/mL로 분주하여 48시간 동안 배양한 후 200 μ L tip으로 긁어주고 0시간 사진을 찍은 후 AAE를 농도별로 처리하여 12시간, 24시간 동안 CO₂ incubator에서 배양 후 관찰하였다. LY294002, Rapamycin과 병행 처리시에는 inhibitor를 30분 먼저 처리하였으며, 모든 물질을 최종 처리한 후 12시간, 24시간 동안 CO₂ incubator에서 배양 후 관찰하였다.

2.7. 통계처리

통계 프로그램인 SPSS 22.0을 사용하였고 실험 설계에 대한 분산분석은 *t*-test를 실시하여 검정하였다. 각 자료는 3번 이상의 반복된 실험을 통하여 얻어진 결과로 검정하였고 $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. AAE가 HCT116 세포의 증식에 미치는 효과

암은 세포성장과 관련된 세포 내 신호경로의 과활성화에 따라 비정상적인 세포증식이 일어나는 것이다. 최근에는 여러 암 치료에 사용되는 항암제의 부작용을 최소화하고자 식품 또는 식물과 같은 천연물의 추출물을 사용한 암 예방 및 치료 연구가 이루어지고 있다. 선행연구에 따르면 천연추출물이 폐암, 유방암, 대장암을 포함한 여러 암세포의 성장이 세포주기 정지를 통해 억제된다고 보고되었다 [15].

본 연구에서는 AAE가 HCT116 대장암세포의 생존율과 증식을 감소를 관찰하기 위해 MTT assay와 Wound healing을 실시하였다. 정상세포인 Fibroblast 세포에 대한 AAE의 세포 독성을 측정한 결과는 Fig. 1(a)에 나타내었다. AAE를 농도별 (10, 20, 40, 60, 80, 100 μ g/mL)로 처리한 후 24시간 동안 반응시켰을 때 정상세포의 생존율이 90% 이상으로 유지되는 것으로 보아 추출물의 독성이 없음을 확인하였다. Fig. 1(b)에서는 AAE를 농도별 (10, 20, 40, 60, 80, 100 μ g/mL)로 처리한 후 12시간과 24시간 동안 반응시켰을 때 AAE의 농도와 시간에 의존적으로 HCT116 대장암세포의 생존율이 감소하는 것을 확인하였다. Fig. 1(c)와 Fig. 1(d)에서는 AAE를 농도별 (40, 60, 80 μ g/mL)로 처리한 후 12시간과 24시간 동안 반응시켰을 때 AAE의 농도에 의존적으로 HCT116 cell의 증식이 감소하는 것을 확인하였다. 이를 통하여 AAE를 농도별로 처리했을 때, HCT116 세포의 생존율과 증식이 뚜렷하게 감소되는 것으로 보아 AAE가 HCT116 대장암세포의 증식 억제에 효과적으로 작용한다는 것을 확인하였다.

3.2. AAE에 의한 HCT116 세포증식이 억제되는 세포주기 확인

이와 같은 HCT116 세포의 증식억제 효과가 세포주기의 어떤 단계에서 일어난 것인지 알아보기 위해 대장암세포 HCT116에 AAE를 농도별로 처리하고 24시간 후, FACS를 사용하여 세포주기를 측정하였다. Fig. 2(a)에서와 같이, AAE 40 μ g/mL, 60 μ g/mL, 80 μ g/mL로 24시간 동안 처리했을 때, 세포주기별 세포의 분포를 비교해보면 AAE 40 μ g/mL 처리시에 G1기 40.69%, S기 27.19%, G2기 29.12%, 60 μ g/mL 처리시에 G1기 43.2%, S기 27.68%, G2기 24.41%, 80 μ g/mL 처리시에 G1기 48.75%, S기 26.1%, G2기 14.97%로 나타난 것으로 보아 AAE의 농도가 증가함에 따라 G1기에 분포하고 있는 세포의 비율이 증가하고 S기와 G2기 세포의 비율은 감소하는 것으로 확인되었다. 이를 통해 HCT116 세포의 증식억제에 있어서 AAE가 효과적으로 작용하며 세포주기 G1기에서 정지되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 농도가 증가함에 따라 sub-G1기의 비율이 증가하는 것으로 보아 세포주기 정지를 통해 apoptosis가 일어날 수 있음을 알 수 있었다.

3.3. AAE가 세포주기 관련 신호단백질에 미치는 효과

세포주기는 세포분열을 통한 세포증식과 관련된 과정으로 인산화 효소인 CDK와 cyclin의 활성에 따라 조절된다. G1기에서는 cyclin E가 관여하며 활성화된 CDK2와 결합하여 복합체를 이루어 G1기에서 S기로의 진행을 조절한다 [8]. Akt-mTOR pathway는 단백질합성과 세포성장에 영향을 미치는 단백질로 알려져 있으며 이 단백질들을 저해하였을 때, 암세포의 성장이 저해되는 것으로 보고되었다 [16,17]. 암 억제인자인 p53에 활성화된 p21은 CDK/cyclin 복합체가 결합하는 것을 억제하며 이를 통해 세포주기 G1기를 멈추게 하여 세포주기 진행의 조절과 세포사멸 등에 관여하는 것으로 알려져 있다 [18].

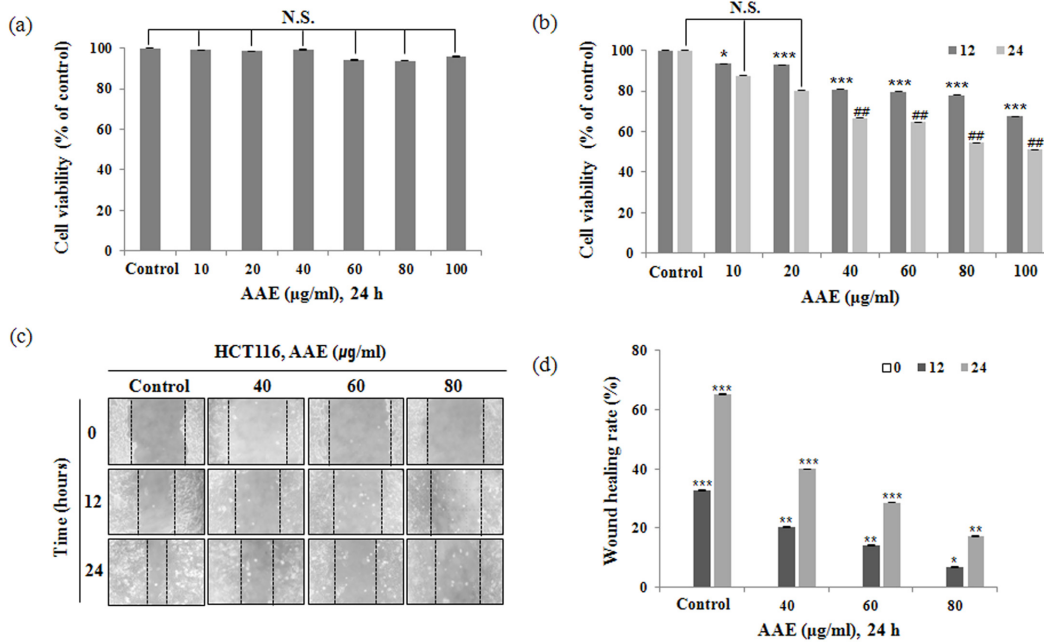


Fig. 1. Artemisia annua inhibits cell proliferation in HCT116 colon cancer cells. (a) Fibroblast cell was not effected by Artemisia annua 10~80 µg/mL for 24 hr. The statistical analysis of the data was carried out by use of a *t*-test. N.S.; not significant (each experiment's, n=3). (b) HCT116 cells were treated with Artemisia annua 10~80 µg/mL for 12-24 hr. The statistical analysis of the data was carried out by use of a *t*-test. **p*<0.05, ****p*<0.001 compared to control. N.S.; not significant (each experiment's, n=3). (c) Artemisia annua inhibits cell proliferation in HCT116 colon cancer cells. A line was scratched with a 200 µL plastic pipette tip. Cells were photographed at 0, 12, 24 hours after scratch. (d) Graph shows the results of wound healing rate at 0, 12, 24 hours after scratch. The statistical analysis of the data was carried out by use of a *t*-test. ***p*<0.01, ****p*<0.001 compared to control (each experiment's, n=3).

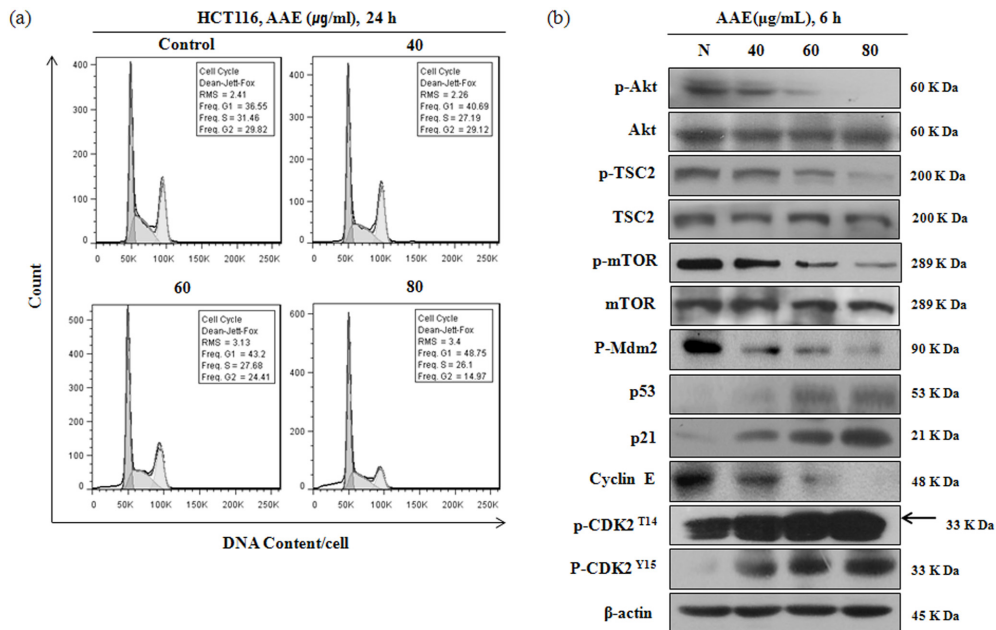


Fig. 2. (a) Cell cycle arrest effects of Artemisia annua were evaluated by fluorescence-activated cell-sorting analysis. Artemisia annua induces cell cycle arrest in G1 phase. Cells were treated with Artemisia annua (40~80 µg/mL) for 24 hr. (b) Artemisia annua effects on p-Akt, total-Akt, p-TSC2, total -TSC2, p-mTOR, total mTOR, p- Mdm2, p53, p21, p-CDK2^{T14}, p-CDK2^{Y15}, cyclin E in HCT116 colon cancer cells. Cells were treated with 40~80 µg/mL of Artemisia annua for 6 hr. Protein levels of them were determined by Western blotting. The β-actin probe served as protein-loading control.

본 연구에서는 HCT116 대장암 세포에 AAE를 농도별로 처리했을 때, 세포주기 G1기 정지와 관련된 신호 단백질들의 발현량을 알아보기 위해 Western blotting을 실시하였다. Fig. 2(b)에서와 같이 AAE를 농도별 (40, 60, 80 µg/mL)로 처리한 후 세포주기 관련신호단백질인 p-Akt, Akt, p-mTOR, mTOR, p-TSC2, TSC2, p-Mdm2, p53, p21, p-CDK2 (CDK2^{T14}, CDK2^{Y15}), cyclin E의 발현 정도를 확인하였다. 그 결과 세포 증식에 관여하는 p-Akt와 p-mTOR, p-Mdm2의 발현이 감소하는 것을 확인하였고 암 억제인자이지만 불활성화 상태인 p-TSC2의 감소, 그리고 또 다른 암 억제유전자인 p53이 p21의 활성을 증가시켜 CDK2/cyclin E 복합체의 활성을 저해함으로써 세포주기 G1기에서 정지됨을 확인하였다. 선행연구에 따르면 CDK 억제인자인 p21이 CDK에 결합함으로써 활성을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 세포주기의 조절에 의한 증식 억제뿐만 아니라 apoptosis도 유도할 수 있다고 보고되었다 [6]. 현재까지의 선행 연구에서는 활성화된 Akt가 Mdm2를 인산화시키고 인산화된 Mdm2가 세포질에서 핵 내로 이동하여 p53의 발현을 저해하는 것으로 보고되었다 [19]. 따라서 AAE를 처리함으로써 p-Akt의 활성을 저해하여 p53의 활성을 증가시키고 이로 인해 p21이 증가하여 세포주기 G1기와 관련된 p-CDK2, cyclin E가 감소한 것을 확인하였다. 또 다른 선행연구에 의하면 CDK2가 인산화되어 불활성화 상태가 되는데 G1기의 경우 T14와 Y15 위치에서 인산화되

는 것을 알게 되었다. 이에 따라 본 연구에서도 역시 AAE 처리에 따라 CDK2^{T14}, CDK2^{Y15}에서 인산화가 일어남으로써 세포주기 G1기에서 정지된 것을 확인하였다 [18]. 이러한 단백질들의 발현양상을 통하여 AAE의 농도가 높아질수록 HCT 116 대장암 세포에서 세포의 증식에 관여하는 단백질들의 활성을 억제하여 세포주기 정지를 유도하는 단백질들의 활성을 증가시키는 것을 확인하였다.

3.4. Akt 및 mTOR 저해제가 HCT116 세포의 증식에 미치는 영향

Akt와 mTOR가 HCT116 대장암세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해 Akt, mTOR의 저해제인 LY294002와 Rapamycin 그리고 AAE 단독 혹은 병행 처리한 후 MTT assay를 통한 세포의 생존율과 Wound healing을 통한 세포증식 억제를 확인하였다. Fig. 3(a)와 Fig. 3(b)에 나타난 바와 같이, LY 294002 20 mM와 Rapamycin 100 mg/mL, AAE 60 µg/mL을 12시간, 24시간 동안 각각 그리고 병행처리 했을 때 암세포 증식을 확인하였다. 즉 24시간 반응시킨 HCT116 대장암세포에 있어서 AAE 단독으로 처리했을 때에는 약 65%의 생존율을 보였고, LY294002를 단독처리 했을 때에는 약 60%의 생존율을 보였다. 또한 LY294002와 AAE를 병행처리 했을 때에는 약 46%의 생존율을 보였고 Rapamycin을 단독으로 처리했을 때에는 약 78%의 생존율을 보였고 AAE와 병행 처

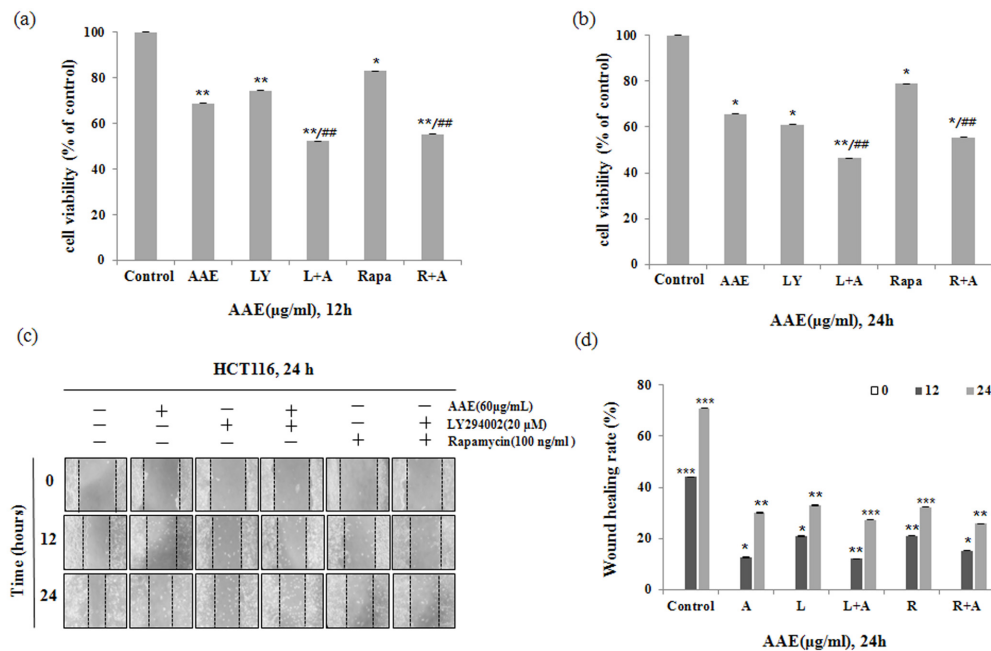


Fig. 3. (a),(b) Co-treatment of LY294002, Rapamycin and Artemisia annuain inhibits cell proliferation. Cells were pre-treated with 20 µM LY294002 or 100 ng/mL Rapamycin for 30 min and co-treated with 60 µg/mL Artemisia annuainfor 24 hr. The statistical analysis of the data was carried out by use of a t-test. **p*<0.05 compared to control. ***p*<0.01 compared to control. ##*p*<0.01 compared to 60 µg/mL AAE-treated group (each experiment, n=3). (c) Artemisia annuain inhibits cell proliferation in HCT116 colon cancer cells. A line was scratched with a 200 µL plastic pipette tip. Cells were pre-treated with 20 µM LY294002 or 100 ng/mL Rapamycin for 30 min and co-treated with 60 µg/mL AAE. Cells were photographed at 0, 12, 24 hours after scratch application. (d) Graph shows the results of wound healing rate at 0, 12, 24 hours after scratch. The statistical analysis of the data was carried out by use of a t-test. ***p*<0.01, ****p*<0.001 compared to control (each experiment's, n=3).

리했을 때에는 약 55%의 생존율을 보였다. 이를 통해 LY294002와 Rapamycin을 처리했을 때 AAE를 단독 처리했을 때와 비슷하게 세포의 생존율이 감소함을 확인하였고 AAE와 병행처리 했을 때에는 생존율의 감소효과가 더 크게 나타남을 확인하였다. 그리고 Fig. 3(c)와 Fig. 3(d)에서 억제제와 AAE를 병행 처리했을 때 세포증식 억제의 효과가 더 크게 나타남을 확인하였다. Fig. 4(a)에서는 Akt와 mTOR를 저해했을 때 AAE에 의한 G1기 증가와 비슷함을 보였고 저해제와 AAE 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 병행처리 했을 때 G1기의 증가와 S기, G2기의 감소가 뚜렷하게 나타나는 것을 확인하였다. 이를 통해 세포 성장에 관여하는 Akt/mTOR를 억제함으로써 세포주기 G1기의 정지효과가 더 크게 나타나는 것을 확인하였고 이러한 세포주기 G1기의 정지 효과가 클수록 sub-G1기의 비율이 증가하는 것으로 보아 apoptosis가 유도됨을 알 수 있었다.

3.5. Akt 및 mTOR 저해제에 의한 세포주기 관련 단백질의 신호경로 조절

Akt/mTOR 저해제와 AAE의 처리에 따른 세포주기 관련 신호 단백질들간의 관계를 알아보기 위해 Akt 저해제인 LY294002와 mTOR 저해제인 Rapamycin 그리고 AAE를 각각 혹은 병행 처리했을 때, Akt와 mTOR의 저해에 따른 세포주기 관련 단백질들의 발현 정도를 알아보기 위해 Western blotting을 실시하였다. Fig. 4(b)에서 보는 것과 같이 세포주기의 진행을 통해 세포성장을 증가시키는 p-Akt, p-TSC2, p-mTOR,

p-Mdm2, cyclin E는 감소하고 세포주기 G1기의 정지를 통해 세포성장을 억제하는 p53, p21, p-CDK2^{T14}, p-CDK2^{Y15}가 증가함을 확인하였다. 다수의 선행연구에 의하면 LY294002와 Rapamycin을 HCT116 대장암세포 혹은 다른 암세포에 처리했을 때 p53의 발현이 증가한다고 보고되어 있다 [17,20]. 이러한 선행연구와 비교해 보았을 때 AAE에 의한 Akt, mTOR의 저해는 p53의 발현을 촉진하여 세포주기 정지를 유도하는 신호전달 단백질들을 활성화시켜 세포주기의 G1기를 정지하는 것으로 보인다.

4. CONCLUSION

최근에는 천연추출물이 세포주기 정지를 통해 여러 암세포의 성장을 억제하여 암 예방 및 치료 연구에 사용되고 있다 [4,5]. 본 연구에서는 HCT116 대장암세포에 AAE를 처리했을 때 암세포의 성장과 관련된 단백질들의 발현 양상과 활성화, 그리고 단백질들간의 조절관계를 확인하여 암세포의 세포주기 억제효과를 확인하였다. MTT assay와 Wound healing assay를 통해 AAE 처리에 따른 세포 생존율과 증식률의 억제를 확인하였고 세포주기 G1기의 정지에 의한 것임을 FACS를 통해 확인하였다. Western blotting을 이용하여 AAE가 세포 내 신호경로 조절을 통해 세포주기를 촉진하는 단백질들의 활성을 감소시키고 세포주기 정지를 촉진하는 단백질들

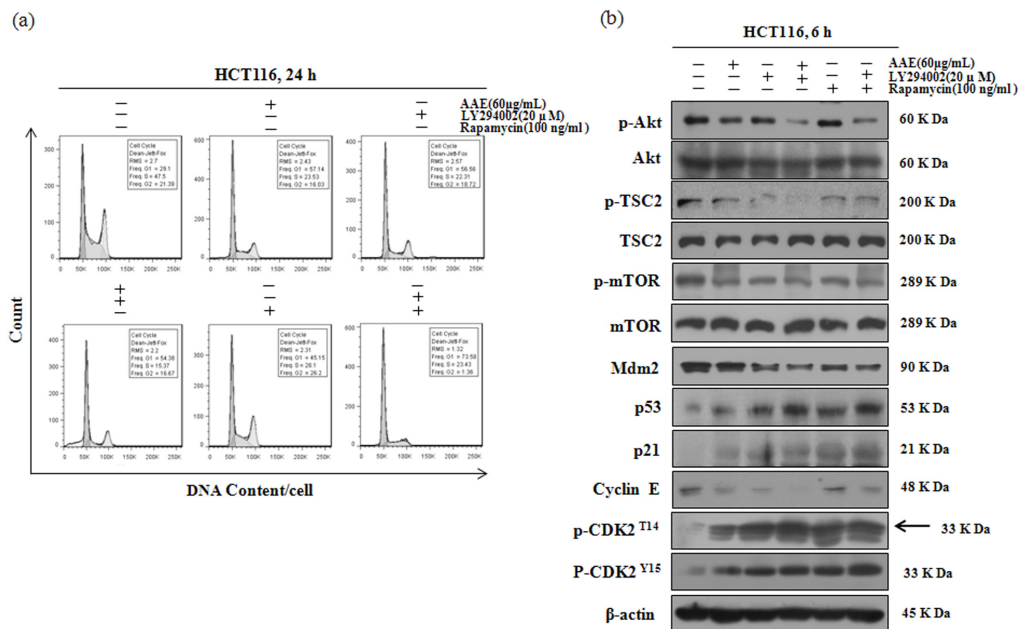


Fig. 4. (a) Cell cycle arrest effects of Artemisia annuain were evaluated by fluorescence-activated cell-sorting analysis. Artemisia annua induces cell cycle arrest in G1 phase. Cells were pre-treated with 20 μM LY294002 or 100 ng/mL Rapamycin for 30 min and co-treated with 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Artemisia annuain for 24 hr. Protein levels of them were determined by Western blotting. The β -actin probe served as protein-loading control. (b) Artemisia annuain effects on p-Akt, total-Akt, p-TSC2, total -TSC2, p-mTOR, total mTOR, p- Mdm2, cyclin E in HCT116 colon cancer cells. Cells were pre-treated with 20 μM LY294002 or 100 ng/mL Rapamycin for 30 min and co-treated with 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AAE. Protein levels of them were determined by Western blotting. The β -actin probe served as protein-loading control.

의 활성을 증가시켜 세포주기 정지가 일어남을 확인하였다. 그리고 세포증식과 관련된 단백질인 Akt/mTOR의 저해제인 LY294002 /Rapamycin과 AAE를 단독 혹은 병행 처리하여 MTT assay, Wound healing, FACS, Western blotting을 실시하였다. 단독으로 처리했을 때보다 병행처리했을 때 효과가 더 크게 나타난 것으로 보아 AAE가 세포성장에 관여하는 Akt/mTOR pathway를 억제함으로써 HCT116 대장암세포의 증식 억제에 효과가 있다는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구결과 AAE에 의한 Akt, mTOR 억제는 p53, p21 활성의 증가, CDK2/cyclin E 복합체의 활성이 감소함에 따라 세포주기 G1의 정지를 유도하는 것으로 확인되었고 sub-G1기에 존재하는 세포 비율의 증가로 보아 apoptosis가 유발됨을 확인하였다. 하지만 apoptosis의 유발이 세포주기 G1기의 정지에 의한 것이라는 것을 증명하기 위해서는 apoptosis에 대한 연구가 필요할 것이다. 그리고 Akt와 mTOR의 저해는 암 억제에 있어서 중요한 역할을 하기 때문에 암 예방과 치료연구에 있어서 향후 더 진행되어야 할 연구 과제로 여겨진다.

Acknowledgements

본 연구는 한국 연구재단의 지원 (KRF-2010-0021402) 및 2015학년도 한남대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

1. Rebecca, S., M. Jiemin, Z. Zhaohui, and J. Ahmedin (2014) Cancer Statistics. *Ca. Cancer J. Clin.* 64: 9-29.
2. Kim, W. S., R. A. Lee, D. Y. Hwang, Y. J. Hong, and S. I. Hong (2004) Histoculture drug response assay in colorectal cancer specimen. *J. Korean Surg. Soc.* 66: 109-115.
3. Andersen, C., L. Adamsen, T. Moellar, J. Midtaard, M. Quist, A. Tvet-erass, and M. Rorth (2006) The effect of a multidimensional exercise programme on symptoms and side-effects in cancer patients undergoing chemotherapy-The use of semi-structured diaries. *Eur. J. Oncol. Nurs.* 10: 247-262.
4. Ryu, J. H., S. J. Lee, M. J. Kim, J. H. Shin, S. K. Kang, K. M. Cho, and N. J. Sung (2011) Antioxidant and anticancer activities of *Artemisia annua* L. and determination of functional compounds. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 40: 509-516.
5. Kim, R. J., M. J. Kang, C. R. Hwang, W. J. Jung, and J. H. Shin (2012) Antioxidant and cancer cell growth inhibition activity of five different varieties of *Artemisia* Cultivars in Korea. *J. Life Sci.* 22: 844-851.
6. Jin, S., S. G. Yun, Y. N. Oh, J. Y. Lee, H. J. Park, K. S. Jin, H. J. Kwon, and B. W. Kim (2013) Induction of G2/M arrest and apoptosis by the methanol extract of typha orientalis in human colon Adenocarcinoma HT29 cells. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 29: 181-185.
7. Kim, D. W., K. S. Lee, M. K. Kim, Y. H. Cho, and C. H. Lee (2001) Inhibitory mechanisms of cell cycle regulation induced by indole-3-carbinol in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29: 181-185.
8. Katrien, V., D. R. Van Bockstaele, and Z. N. Berneman (2004) The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 36: 131-149.
9. Camero, A. (2010) The PKB/AKT pathway in cancer. *Curr. Pharm. Des.* 16: 34-44.
10. Lee, S. H., I. S. Kim, S. Y. Park, O. J. Park, and Y. M. Kim (2011) Quercetin induces apoptosis via regulation of mTOR-VASP signaling pathway in HT-29 colon cancer cells. *Cancer Prev. Res.* 16: 340-347.
11. Lee, Y. K., S. Y. Park, Y. M. Kim, D. C. Kim, W. S. Lee, Y. J. Surh, and O. J. Park (2010) Suppression of mTOR via Akt-dependent and -independent mechanisms in selenium-treated colon cancer cells: Involvement of AMPK α 1. *Carcinogenesis.* 31: 1092-1099.
12. Agarwal, M. L., A. Agarwal, W. R. Taylor, and G. R. Stark (1995) p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *PNAS* 92: 8493-8497.
13. Hongyan, Z., N. Linghu, and G. Carl (2005) Cdk2-dependent inhibition of p21 stability via a C-terminal cyclin-binding motif. *JBC* 280: 29282-29288.
14. Vidushi, S. N., B. Theeshan, W. T. Ethan, S. J. Ling, and A. Okezie (2010) Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. *Sci. Direct.* 278: 229-241.
15. Iwao, M., Z. Fang, H. Tomomi, O. Junichi, K. Kiyoshi, S. Kazuo, and J. David (2010) Inhibition of activated phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway in malignant pleural mesothelioma leads to G1 cell cycle arrest. *Oncol. Rep.* 24: 1677-1681.
16. Wei, D., Y. Yi, H. Zhang, J. Bergholz, J. Wu, H. Ying, Y. Zhang, and J. X. Zhi-Xiong (2013) Rapamycin inhibits IGF-1-mediated up-regulation of MDM2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy. *PLoS ONE* 8: e63179.
17. Andrei, L. G. and A. Tyner (2002) The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Molec. Cancer Therapeutics* 1: 639-649.
18. Donjerkovic, D. and D. W. Scott (2000) Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle. *Cell Res.* 10: 1-16.
19. Lindsay, D. M. and D. B. Donner (2002) The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. *Sci. Direct.* 27: 462-467.
20. Park, S. Y., S. H. Lee, O. J. Park, and Y. M. Kim (2011) Apoptotic effects of curcumin and EGCG via Akt-p53 signaling pathway in HCT116 colon cancer cells. *JLS* 21: 89-95.