

## Apoptotic Effect of Extract from *Artemisia annua* Linné by Akt/mTOR/GSK-3 $\beta$ Signal Pathway in Hep3B Human Hepatoma Cells

Eun Ji Kim<sup>1</sup>, Guen Tae Kim<sup>1</sup>, Bo Min Kim<sup>1</sup>, Eun Gyeong Lim<sup>1</sup>, Sung Ho Ha<sup>2</sup>, Sang-Yong Kim<sup>3</sup> and Young Min Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Science and Biotechnology, College of Life Science and Nano Technology, Hannam University, Yuseong-dero 1646, Yuseong-gu, Daejeon 305-811, Korea

<sup>2</sup>Department of Chemical Engineering, College of Life Science and Nano Technology, Hannam University, Daejeon 34054, Korea

<sup>3</sup>Department of Food Science & Bio Technology, Shinansan University, Daehakro Darwon-gu, Ansan-city, Gyeonggi-do 15435, Korea

Received April 15, 2016 / Revised May 26, 2016 / Accepted May 26, 2016

Extracts from *Artemisia annua* Linné (AAE) have been known to possess various functions, including anti-bacterial, anti-virus, and anti-oxidant effects. However, the mechanism of those effects of AAE is not well-known. The aim of this study was to analyze the inhibitory effects of AAE on cell proliferation of the human hepatoma cell line (Hep3B) and to examine its effects on apoptosis. Activation by phosphorylation of Akt is cell proliferation through the phosphorylation of TSC2, mTOR, and GSK-3 $\beta$ . We suggested that AAE may exert cancer cell apoptosis through Akt/mTOR/GSK-3 $\beta$  signal pathways and mitochondria-mediated apoptotic proteins. For this, we examined the effects of extracts of AAE on cell proliferation according to treatment concentration. Treatment with AAE not only reduced cell viability, but also resulted in the induced release of lactate dehydrogenase (LDH). These results were determined with a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and a lactate dehydrogenase (LDH) assay. Furthermore, we determined the effects of apoptosis through Hoechst 33342 staining, annexin V-propidium iodide (PI) staining, 5,5', 6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide (JC-1) staining, and Western blotting. Our study showed that the treatment of liver cancer cells with AAE resulted in the inhibition of Akt, TSC2, GSK-3 $\beta$ -phosphorylated, Bcl-2, and pro-caspase 3 and the activation of Bim, Bax, Bak, and cleaved PARP expressions. These results indicate that AAE induced apoptosis by means of a mitochondrial event through the regulate of Akt/mTOR/GSK-3 $\beta$  signaling pathways.

**Key words** : Akt/mTOR/GSK-3 $\beta$  pathway, Bax-Bak, bim, Hep3B, mitochondria potential

### 서 론

암은 우리나라에서 사망률 1위를 차지하는 심각한 질병이다. 이러한 암은 인체에서 비정상적으로 조절되며 침윤 및 전이를 유발하는 질병을 말한다[5]. 한국인의 3대 암종의 하나인 간암은 많은 치료법을 연구하고 개발하고 있으나 생존율의 큰 증가는 입증되지 않았다.

간암은 원발성 간암과 전이성 간암으로 나눌 수 있다. 원발성 간암은 간 조직에서 기원되는 간암이고, 전이성 간암은 다른 부위의 암에서 떨어져 나온 암세포가 혈관이나 림프관을 통해서 간에 도달하여 간 조직에 암 덩어리를 만들거나 직접

적으로 간에 도달하여 암 덩어리를 만드는 것을 말한다. 우리나라의 경우 10만 명 당 26.9명으로 세계에서 가장 높은 발생률을 보이고, 나이가 많을수록 발병이 증가하는 경향을 보이고 있다. 간암은 예로부터 타 부위 암에 비해 진행속도나 예후가 극히 불량한 형태의 질환으로 여겨지고 있다[18, 27].

항암치료는 다양한 기전을 통해 암세포의 분열과 증식을 억제하는 방법과 선택적으로 암세포를 제거하는 특수한 방법이 있다. 세포 자가 사멸로 알려진 apoptosis는 항암제 개발에 가장 중요한 영역으로 인식되고 있다. 세포 자가 사멸은 세포가 정상적인 상태 또는 병리학적인 요인에 노출된 후에 죽음을 이르게 되는 생리적인 과정으로 정상세포의 기능 유지에 필수적인 과정이다[13].

Apoptosis는 mitochondria를 매개하는 intrinsic apoptosis 및 death receptor (DR)를 매개하는 extrinsic apoptosis로 구분된다. Intrinsic pathway는 mitochondria의 기능과 연관이 있으며, 미토콘드리아의 다양한 유전자 산물들의 조절로 caspase (caspase-9)의 활성을 증가함으로써 유도된다. 반면에, Extrinsic pathway의 경우 세포막에 존재하는 death receptor에 특정 ligand가 결합하여 caspase (caspase-8)의 활성을 유도

#### \*Corresponding author

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

E-mail : kym@hnu.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

하여 이루어진다. 이러한 두 가지 경로는 미토콘드리아에서 세포질로 방출되는 cytochrome C와 연관되며 caspase cascade를 유발하여 최종 effector caspase (caspase-3/-7)의 활성을 통하여 apoptosis를 유도한다[10-12].

최근 천연물의 작용기전과 이들의 다양한 생리활성 대한 연구들이 진행되면서 천연물로부터 새로운 항암물질을 도출하려는 시도들이 이루어지고 있다[13]. 본 연구에 사용한 천연 식물인 개똥쑥(*Artemisia annua* Linné)은 쌍떡잎 식물로 국화과 쑥 속에 속하는 일년생 초본으로 열대아시아에 분포되어 있으며 한방에서는 경열과 부스럼을 치료하며 독충, 해열제, 지혈제, 피부병치료제나 살충제로 사용되고, 신경계질환에 효능이 있다고 알려져 있다. 개똥쑥의 성분 중 Artemisin 이라는 물질이 항암효능을 가지며 말라리아나 이질, 결핵 등을 치료하는데 효과가 있다고 알려져 있다. 또한 항균, 백혈병, 항염, 항바이러스 및 항산화에도 효과가 입증되어 국내뿐만 아니라 세계적으로 주목 받고 있다. 최근 보고에 의하면 개똥쑥의 높은 항산화 활성은 페놀화합물에 의한 것으로 보고되었다. 또한 개똥쑥 추출물은 유방암세포, 자궁경부상피암세포, 위암세포의 증식을 억제시켰으며[21, 23], 선행연구에서는 에탄올로 추출한 개똥쑥 추출물을 인체자궁경부상피암세포(Hela cell)와 AGS 인체 위암 세포에 처리하였을 때 암세포 증식억제효과가 있음이 보고되었다[2, 24].

따라서, 본 연구에서는 개똥쑥 추출물(AAE)의 항암 활성기전을 확인하기 위해 AAE처리를 통한 Hep3B 인체 간암세포의 증식 억제가 apoptosis유도에 의한 것인지 알아보려 하였다. 또한, AAE 농도 증가에 따른 apoptosis 관련 단백질의 발현 변화를 확인하였다. 이러한 apoptosis가 intrinsic pathway에 의한 것인지 알아보기 위해 mitochondria membrane potential변화를 확인하고, 이와 관련된 단백질의 발현 변화를 확인하였다. Mitochondria membrane potential을 조절하는 상위조절자인 p-Akt, p-mTOR, p-TSC2, p-GSK-3 $\beta$  신호분자 조절의 연관성을 알아보기 위하여 LY294002, Rapamycin, 6-Bromindirubin-3'-oxime (BIO)를 각각 단독으로 처리하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

실험에 사용된 개똥쑥은 대전 한약재시장에서 구입하였고, 개똥쑥 100 g에 95% 에탄올 800 ml를 가하여 48시간 동안 상온에서 환류 추출하였다. 이러한 방법으로 추출된 개똥쑥 추출물을 감압농축기를 이용하여 감압 농축시킨 뒤, 농축된 추출물은 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 각 농도별 개똥쑥 추출물은 상기 추출물을 동일 용량의 Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 만들었으며, -20 $^{\circ}$ C에서 냉동 보관하여 사용 하였다. LY 294002와 Rapamycin, BIO는 Calbiochem (Calbiochem, SD,

CA, USA)에서 구입하여 20 mM으로 만들어 사용하였다.

### 세포배양

Hep3B세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양 받았으며, 10% Fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, Laboratoris Inc., Logan, UT, USA)와 1% antibiotics가 포함된RPMI media (Hyclone, Laboratris Inc., Logan, UT, USA)를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37 $^{\circ}$ C 조건에서 배양하였다. 매 48시간마다 Trypsin-EDTA (Hyclone, Laboratories Inc., Logan, UT, USA)를 이용하여 세포를 부유상태로 만든 다음 세포를 1 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/ml로 분주하고 계대배양 하였다.

### 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) assay에 의한 암세포의 생존율 측정

12 well plate에 Hep3B cell을 1 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후 AAE와 LY294002, Rapamycin, BIO를 12시간, 24시간, 48시간 동안 처리하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 그런 다음 MTT solution 100  $\mu$ g/ml를 첨가하여 1시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 반응시켰다. MTT solution을 처리한 media를 제거하고PBS washing후 PBS를 제거한 뒤 DMSO 150  $\mu$ l씩 넣어 각 well에 생성된 formazan을 모두 녹인 다음 96 well plate에 100  $\mu$ l씩 옮긴 후 ELISA microplate reader (Bio-Red model 680, Bio-Red Laboratories Inc. Tokyo, Japan)로 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 각 농도 별로 세 번 시행하였으며, 이에 따른 평균값과 표준오차는 Microsoft Excel program을 사용하여 분석하였다.

### Lactate dehydrogenase (LDH) assay에 의한 세포독성 측정

apoptosis시 세포막의 손상으로 발생하는 LDH의 양을 측정하는 LDH cytotoxicity assay kit (Thermo Scientific, USA)를 사용하여 세포 독성을 확인하였다. 배양된 Hep3B cell을 12 well plate에 1 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후 AAE와 LY294002, Rapamycin, BIO를 24시간과 48시간 동안 처리하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 상등액 100  $\mu$ l와 LDH reagent 100  $\mu$ l를 혼합하여 30분간 암조건에서 반응 시킨 다음 stop solution으로 1N HCl 50  $\mu$ l를 가한 후 490 nm와 595 nm에서 흡광도를 측정하여 LDH방출량을 비교하였다.

### Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)에 의한 Apoptosis 관찰

Apoptosis는 FITC-Annexin V apoptosis detection kit (BD PharmingenTM, San Diego, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. Annexin V-PI staining을 위해, Hep3B cell에 AAE를 농도

별(30, 40, 60  $\mu\text{g/ml}$ )로 처리하였다. 24시간 배양한 세포를 PBS로 세척 후 trypsin-EDTA로 모은 다음,  $1 \times 10^6$  cells/ml의 농도에서 binding buffer로 suspension하였다. 그 후 Hep 3B cell을 Annexin V-FITC와 propidium iodide (PI)로 15분간 염색한 후, Flow cytometry - FACS Canto (Becton-Dickinson Biosciences, Drive Franklin Lakes, NJ, USA)로 분석하여 결과를 관찰하였다.

#### Hoechst 33342 staining

12 well plate에 Hep3B cell 를  $1 \times 10^5$  cells/ml로 분주하고  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 가 공급되는 조건에서 24시간 동안 안정화시킨 후 AAE를 농도별(30, 40, 60  $\mu\text{g/ml}$ )로 처리하였다. 그 후 24시간 배양한 세포를 Hoechst 33342를 0.7  $\mu\text{l}$ 씩 처리 한 후 3.5% formalin을 처리하여 20분간 고정 시켰다. 그 후, PBS로 세척하여 sample을 제작하여 형광 현미경(DAPI)에서 관찰하였다.

#### Mitochondrial membrane potential (MMP, $\Delta\psi\text{m}$ )의 분석

암세포의 MMP 변화 정도를 측정하기 위하여 Hep3B cell에 AAE를 농도별(30, 40, 60  $\mu\text{g/ml}$ )로 처리하였다. 24시간 배양한 세포를 PBS로 세척 후 trypsin-EDTA로 모은 다음 10  $\mu\text{M}$ 의 5,5', 6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide (JC-1, Sigma-Aldrich) 용액을 처리하여 20분 동안 상온에서 반응시켰다. 이렇게 준비된 세포를 Flow cytometry - FACS Canto (Becton-Dickinson Biosciences, Drive Franklin Lakes, NJ, USA)로 분석하여 결과를 관찰하였다.

#### Caspase-3/7 activity 분석

세포의 caspase activity 변화 정도를 측정하기 위하여 Hep3B cell에 AAE를 농도별(30, 40, 60  $\mu\text{g/ml}$ )로 처리하였다. 24시간 배양한 세포를 PBS로 세척 후 trypsin-EDTA로 모은 다음 50  $\mu\text{l}$ 의 1X assay buffer BA로 세포를 풀어준 뒤 caspase 3/7 Reagent wating solution을 5  $\mu\text{l}$  처리하여  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 에 30분 동안 반응 시켰다. 준비된 sample에 caspase 7-AAD wating solution을 150  $\mu\text{l}$  처리하여 5분 동안 상온에서 반응시킨 뒤 Muse automated cell analyzer (Merck Millipore)로 분석하여 결과를 관찰하였다.

#### Western blotting

6-well plate에 Hep3B cell을 각 well당  $1 \times 10^5$  cells/ml로 분주하여 24시간 동안 배양한 다음 AAE와 LY294002, Rapamycin, BIO를 처리하여 24시간 동안  $\text{CO}_2$  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  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 단백질을 분리 한 뒤 14,000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ 에서 20분 동안 원심 분리 하여

상등액을 취하였다. 추출한 단백질은 ELISA-reader를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 8%, 12% acrylamide gel을 이용하여 만들어놓은 sample을 loading한 뒤 전기영동을 실시한 후 nitrocellulose membrane에 transfer하였고, 다음에 2% Bovine serum albumin (BSA)을 이용해 blocking 한 후, 1차항체를  $4^\circ\text{C}$ 에서 밤새 반응시키고 TBST로 5분씩 4번 washing후 2차항체를 결합시킨 다음 실험결과를 측정하였다.

#### 통계처리

실험설계에 대한 분석은 통계 프로그램인 SPSS (SPSS, Chicago, IL, USA)의 Student's t-test로 검정하였다. 각 자료는 3번 이상의 반복된 실험을 통하여 얻어진 결과로 검정하였고  $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의 하다고 판정하였다.

## 결과 및 고찰

#### AAE가 Hep3B 간암 세포의 증식에 미치는 영향

암 세포 증식과 연관된 세포 신호경로의 변성에 따라 비정상적인 세포의 증식이 일어나는 과정과 세포 내 apoptosis가 원활히 이루어지지 않을 때 나타나는 질병으로 알려져 있다[17].

개똥썩추출물(AAE)이 Hep3B 간암 세포 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해 AAE를 농도별(10, 20, 30, 40, 60, 80  $\mu\text{g/ml}$ )로 처리한 뒤 MTT assay를 이용하여 세포 증식률을 조사하였다. 그 결과 AAE를 12시간, 24시간, 48시간 동안 처리하였을 때 농도 및 시간 의존적으로 세포 증식이 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 1A). 정상세포인 섬유아세포(Fibroblast cell)에 대한 AAE의 세포 독성을 측정된 결과 AAE를 위와 동일한 농도로 24시간 동안 처리하였을 때 섬유아세포의 증식률이 90% 이상으로 유지되는 것으로 보아 AAE의 독성이 없음을 확인하였다(Fig. 1B). 또한, 구체적인 독성 수준 파악을 위해 세포가 사멸할 때 미토콘드리아 세포막이 파괴되면서 방출되는 물질인 lactate dehydrogenase 방출량을 측정하는 LDH assay를 실시하였다. AAE를 Hep3B cell에 MTT assay와 같은 농도로 처리하여 24시간과 48시간에서 LDH 방출량을 측정한 결과, 농도 의존적으로 LDH 방출량이 증가함을 확인할 수 있으며(Fig. 1C). 이러한 결과로 AAE에 의한 세포 증식 억제가 세포 손상에 의한 것임을 알 수 있다.

#### AAE에 의한 Hep3B 세포의 세포 apoptosis 유도 효과

MTT assay와 LDH assay를 통해 Hep3B cell의 증식 억제에 있어서 AAE가 농도 및 시간 의존적으로 작용함을 관찰하였다. 이러한 세포 손상에 의한 세포증식 억제 효과가 apoptosis에 의한 것인지 알아보기 위해 Fig. 2에서 나타난 바와 같이 Hep3B cell에 AAE를 농도별(30, 40, 60  $\mu\text{g/ml}$ )로 24시간 동안

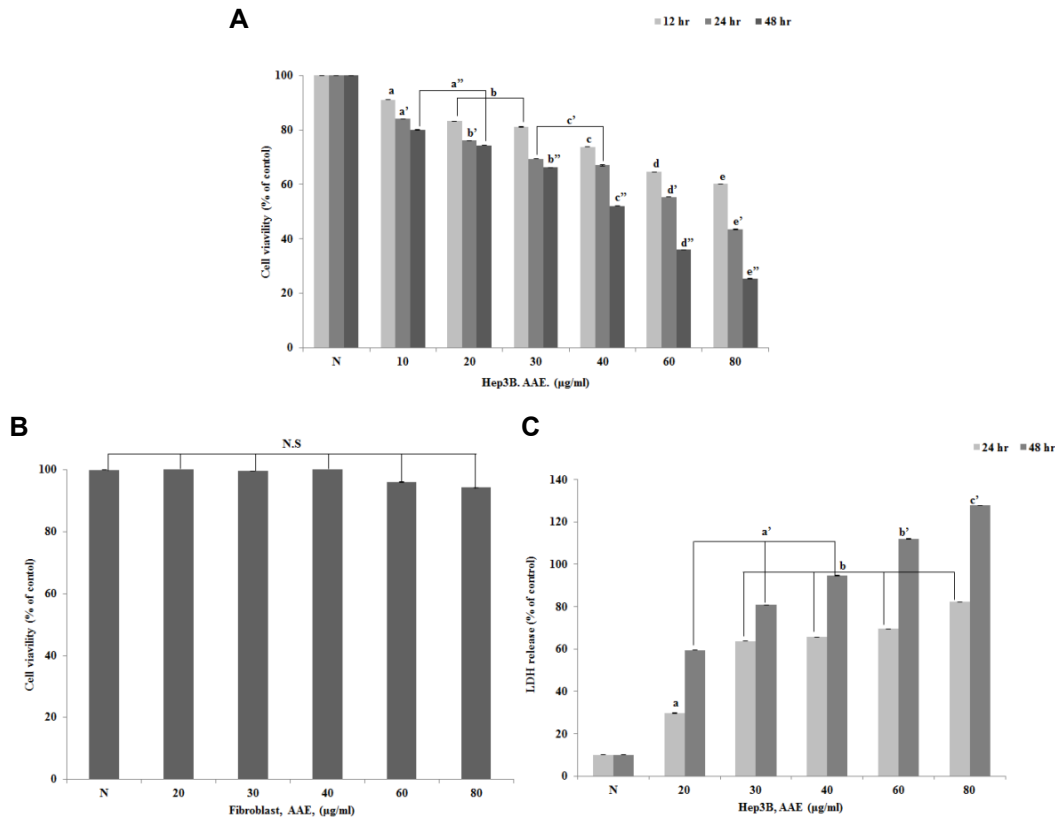


Fig. 1. (A, B) Cell viability was measured by MTT assay. (A) is Hep3B cell line. (B) is Fibroblast cell line. The statistical analysis of the data was carried out by use of an ANOVA-test. <sup>a-c</sup>  $p < 0.05$  and <sup>a-c</sup>  $p < 0.05$  (each experiment, n=3). (C) LDH assay was performed for assessing cell deaths. Cytotoxicity was induced by AAE. The statistical analysis of the data was carried out by use of an ANOVA-test. <sup>a-c</sup>  $p < 0.05$  and <sup>a-c</sup>  $p < 0.05$  (each experiment, n=3).

처리한 후 Annexin V-PI staining을 통한 FACS 분석과 Hoechst 3342 (10 mM) staining을 실행하였다. Annexin V-PI staining결과 AAE를 처리하였을 때 농도 의존적으로 apoptosis가 유도됨을 확인하였다. Hoechst 3342 (10 mM) staining에서는 아무것도 처리하지 않은 Hep3B cell의 핵이 타원형의 온전한 핵 모양을 나타냈지만, AAE를 농도별로 처리하였을 때 세포의 핵이 응축과 분절로 인한 세포 사멸체가 핵 주변에 나타나는 전형적인 apoptosis의 특징을 나타내었다(Fig. 2B). 이를 통해 AAE의 처리에 따른 Hep3B cell의 증식억제 효과는 apoptosis 유도에 의한 것임을 확인하였다.

**AAE가 Hep3B cell 내에서 apoptosis 조절 단백질의 발현에 미치는 영향과 MMP ( $\Delta\psi_m$ ) 및 Caspase activity 효과**  
 intrinsic pathway의 활성화를 통한 apoptosis유발에는 여러 종류의 단백질이 관여한다. 그 중 세포질에 존재하는 Bax는 상류에 위치한 BH3-only protein들이 직, 간접적으로 활성화시키는데 BH3-only protein중 Bim은 주로 Bax에 직접적으로 결합하여 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 반면 Bcl-2 protein은 Bax의 억제작용을 방해하여 간접적으로 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 또한, DNA 손상과 같은 스트레스가 전해

지면 미토콘드리아 외막에서 BAK과 oligomerization에 의해 미토콘드리아 막의 전위 조절 능력을 파괴 시킨다. 이러한 과정으로 세포질로의 cytochrome C 유리에 의해 caspase-9 및 -3의 활성화 되어 apoptosis를 유도한다[1, 8, 9, 15, 20, 28]. Caspase는 initiator caspase인 caspase-8 및 -9와 effector caspase인 caspase-3, -6 및 -7으로 나뉘는데, initiator caspase가 활성화 되면 하위 단계에 있는 effector caspase를 활성화 시킴으로써 세포의 apoptosis를 유발한다[7]. 본 실험에서는 Hep3B cell에 AAE를 농도별(30, 40, 60 µg/ml)로 처리하여 apoptosis 조절 단백질들의 양상을 알아보기 위해 Western blotting을 실시하였다. Fig. 3A에서 나타낸 바와 같이, 농도 의존적으로 세포 생장에 관여하는 신호 단백질인 p-mTOR, p-TSC2, p-Akt, p-GSK-3 $\beta$ 의 발현이 감소하는 것을 확인하였고, 이로 인해 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2의 활성이 억제됨으로써 pro-apoptotic 단백질인 Bim과 Bax, Bak의 발현이 증가하는 일련의 신호경로를 조절할 수 있다는 것을 확인하였다. 또한, caspase의 비활성화 상태인 procaspase-3의 발현양이 감소하는 것을 확인하였고, apoptosis시 활성화된 caspase에 의한 cleaved PARP의 발현양이 AAE 농도 의존적으로 증가함을 확인하였다.

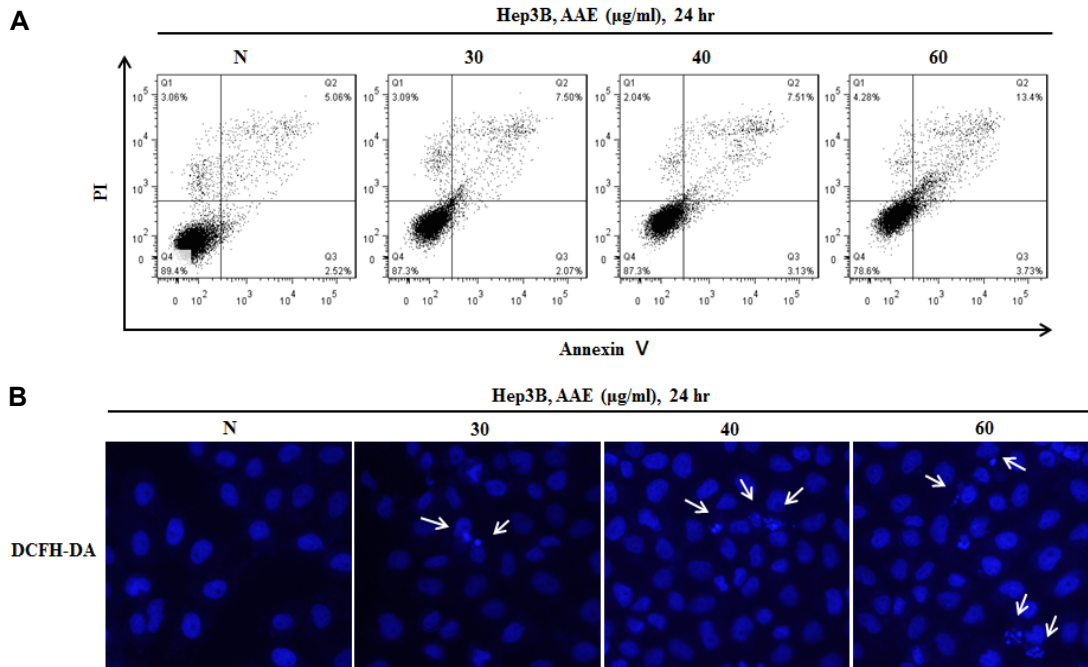


Fig. 2. (A) Apoptotic effects of different concentration AAE were evaluated by Annexin V-fluorescein and propidium iodide (PI). Hep3B were treated with AAE (0, 30, 40, and 60 µg/ml) for 24 hr. Data analyzed by flow cytometry. (B) Cell apoptosis observed using Hoechst 33342 staining. Hep3B were treated with AAE (0, 30, 40, and 60 µg/ml) for 24 hr. Fluorescence was detected using a fluorescence microscope. Arrows indicate apoptotic bodies, which were DNA fragments produced when apoptosis occurred.

Apoptosis를 유발하는 경로 중 intrinsic pathway는 DNA 손상, cytokine, 활성산소 종(ROS) 등의 자극에 의해 유발되며 이러한 자극으로 인해 미토콘드리아 투과도 전이 미세공 (mitochondrial permeability transition pore)이 열리게 됨으로써 미토콘드리아 막의 전위조절 능력을 파괴하게 되어 Cytochrome C, Smac/DIABLO같은 apoptosis 개시단백질들을 세포질로 유출시킨다[3, 25]. 이와 같이 AAE에 의한 apoptosis 기전을 확인하기 위해 mitochondrial membrane depolarization assay(JC-1)를 실시하였다. AAE를 농도별(30, 40, 60 µg/ml)로 24시간 동안 처리 결과, 30 µg/ml에서 10.3%, 40 µg/ml에서 26.7%, 60 µg/ml에서 84.7%의 결과를 보였다(Fig. 3B, D). JC-1 assay를 통해 AAE가 미토콘드리아 막 전위의 탈분극을 유도함 확인하였다. 미토콘드리아 막 전위가 탈분극화되면 Cytochrome C 유리에 의해 caspase가 활성화되어 apoptosis를 유도하게 되는데, 본 실험에서 AAE를 처리하였을 때 caspase 활성을 확인하기 위해 caspase -3/7 activity assay를 실시하였다. Fig. 3C, E에서 나타난 바와 같이 AAE를 농도별(30, 40, 60 µg/ml)로 24시간 동안 처리 결과, 30 µg/ml에서 36.60%, 40 µg/ml에서 45.15%, 60 µg/ml에서 69.65%의 결과를 보였다. 이러한 결과를 통하여 AAE가 Hep3B cell에서 intrinsic pathway를 통하여 apoptosis를 유도한다는 것을 확인하였다.

### Akt, mTOR, GSK-3β의 저해에 따른 신호단백질의 조절과 세포증식에 미치는 영향

mTOR는 Akt 신호경로의 하위 단백질로 세포의 성장과 분화, 생존을 촉진하며 apoptotic signal을 저해한다. 그러므로, 활성화된 Akt - mTOR 신호경로는 apoptosis를 억제하여 세포의 생존을 증가시키는 역할을 한다[19]. GSK-3는 Akt에 의해 조절되는 단백질로 anti-apoptosis 관련 단백질의 발현 촉진 및 apoptosis 촉진 단백질의 활성 억제를 통해 세포 생존을 증진시킨다고 알려져 있다[4, 14, 16, 22, 26].

GSK-3β는 세포 내 신호전달경로에서 다양한 작용을 보이는 serine, threonine kinase로, GSK-3β에 의해 인산화되는 대부분의 단백질이 불활성화되고 다른 kinase와 달리 GSK-3β는 기저상태에서 활성화된 상태로 존재하기 때문에 세포의 정상적인 성장 조건에서 GSK-3β는 세포 내 신호전달경로의 지나친 활성화를 억제하는 기능을 보인다. GSK-3β는 외부자극에 의한 억제로 조절되며 serine9에 인산화되어 불활성화된다고 알려져 있다[6]. 따라서, GSK-3β의 억제는 apoptosis를 억제시킨다.

본 실험에서는 LY294002와 Rapamycin, BIO를 Hep3B cell에 각각 처리하였을 때, 세포증식에 미치는 영향과 신호 단백질의 발현 양상을 알아보기 위해 MTT assay, LDH assay, Western blotting을 실시하였다. 그 결과, Fig. 4A에 나타난 바와 같이 MTT assay에서 AAE와 LY294002, Rapamycin에서

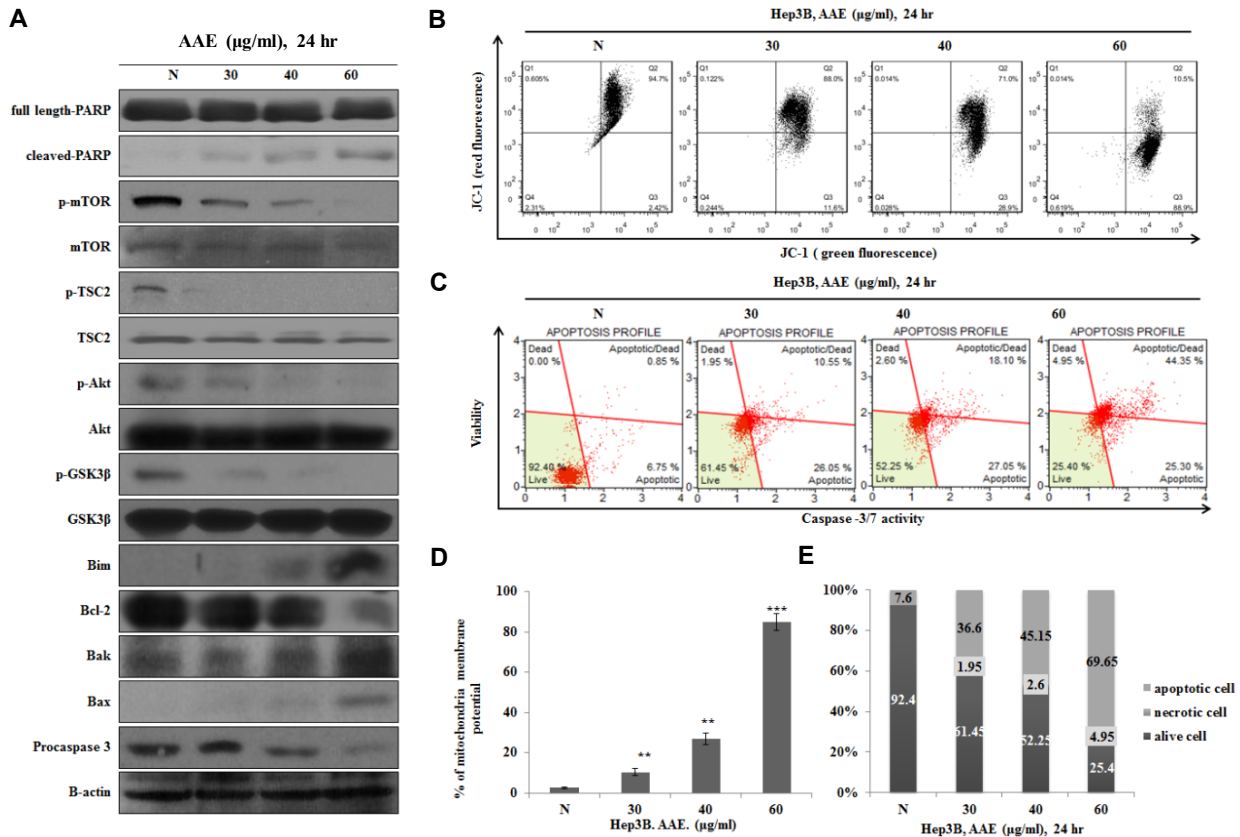


Fig. 3. (A) Cells were treated with the indicated concentrations of AAE for 24 hr. The expression of Akt, mTOR, TSC2, GSK-3β, Bcl-2, pro-caspase 3 and the activation of Bax, Bak, Bim and cleaved PARP were analyzed by Western blot analysis. (B) Mitochondria membrane potential were evaluated by JC-1. Cells were treated with different concentration of AAE (Hep3B were treated with 0, 30, 40, and 60 μg/ml of AAE) for 24 hr. (C) Hep3B were treated with 0, 30, 40, and 60 μg/ml of AAE 24 hr, caspase 3/7 activity was analyzed using a Muse™ Caspase-3/7 kit, as described in Materials and Methods. (D) Mitochondrial depolarization is indicated by an increase in green/red fluorescence ratio. (E) Caspase -3/7 activity was showed by live cell/dead cell/apoptotic cell fluorescence intensity ratio.

는 세포 증식이 억제됨을 확인한 반면 BIO를 처리한 군에서는 아무것도 처리 하지 않은 control군과 유사한 세포 성장률을 확인하였다. 또한, Fig. 4B에서는 LDH assay에서 AAE 처리 군에서는 33.4%, LY294002를 처리한 군에서는 15.4%, Rapamycin을 처리한 군에서는 14.5%로 LDH 방출량이 증가되는 것을 확인한 반면, BIO를 처리한 군에서는 10.4%로 아무것도 처리하지 않은 control군과 비슷한 정도의 양을 나타남을 확인하였다. 이러한 결과를 토대로 Akt와 mTOR를 저해했을 때 암세포 증식을 억제 시킨다는 것을 확인하였으며, 반면, BIO 처리로 인해 GSK-3β의 인산화가 이루어지지 않아 Gsk-3β는 억제되며, 억제된 Gsk-3β는 세포 자가 사멸에 영향을 주지 않고 세포 증식을 유도하는 것을 확인하였다. 이와 같은 조건으로 Western blotting을 실시한 결과, Fig. 4C에서 나타내는 것과 같이 AAE, LY294002, Rapamycin을 처리한 군에서 세포 성장에 관여하는 신호 단백질인 p-mTOR, p-TSC2, p-Akt, p-GSK3β의 발현이 감소 하는 것을 확인하였고, Fig. 3C와 같이 AAE, LY294002, Rapamycin을 처리한 군에서 Bcl-2의 발현

이 억제됨으로써 Bim과 Bax, Bak 그리고 cleaved PARP의 발현을 증가시키는 신호경로를 조절할 수 있다는 것을 확인하였다. 반면에 BIO를 처리한 군에서는 세포 성장에 관여하는 신호 단백질인 p-mTOR, p-TSC2, p-Akt, p-GSK-3β의 발현 양이 아무것도 처리하지 않은 군과 같았고, 이로 인해 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2가 발현됨으로써 pro-apoptotic 단백질인 Bim과 Bax, Bak 그리고 cleaved PARP의 발현을 감소시켜 세포 성장 신호경로를 조절한 다는 것을 확인하였다.

이상의 결과를 종합해보면, Hep3B cell에서 개똥썩 추출물인 AAE를 처리하였을 경우 유발되는 apoptosis는 Akt/mTOR/GSK-3β 경로 활성을 통한 Bcl-2의 발현 감소에 동반된 mitochondria의 기능 이상으로 Bim, Bax, Bak을 활성화시켜 세포질로의 cytochrome C의 유리에 따른 caspase의 활성으로 이루어진다는 것을 알 수 있었다. 즉, AAE 처리에 의해 유도되는 apoptosis는 Akt/mTOR/GSK-3β 경로를 통한 intrinsic pathway에 의하여 조절되는 것을 알 수 있다.

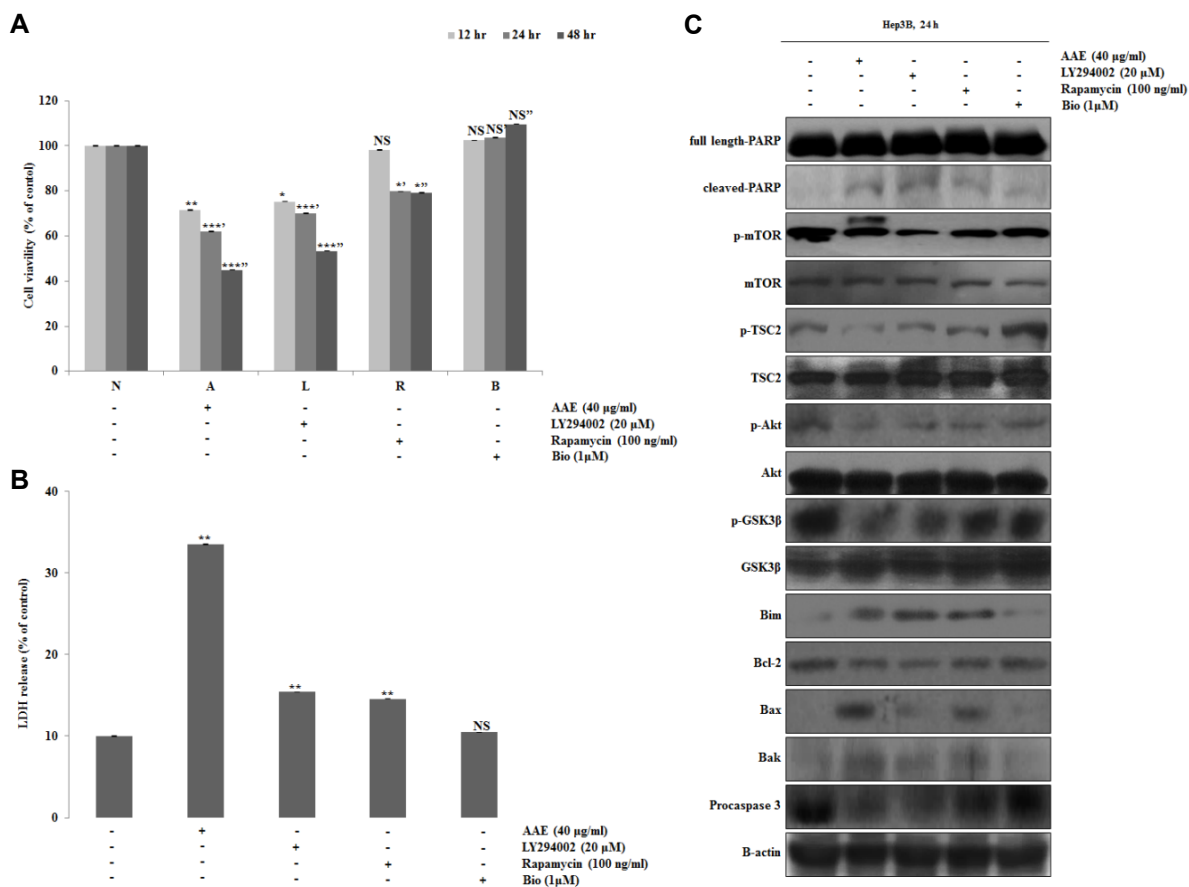


Fig. 4. Cells treated LY294002, Rapamycin, Bio and AAE in Hep3B cells. Cells were treated with 20 µM LY294002, 100 ng/ml Rapamycin, 1 µM Bio and 40 or 60 µg/ml AAE for 12 hr, 24 hr and 48 hr. (A) Cells viability was measured by MTT assay. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  (each experiment,  $n = 3$ ). (B) LDH assay was performed for assessing cell deaths. The statistical analysis of the data was carried out by use of a T-test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  (each experiment,  $n = 3$ ). (C) Cells were treated with 20 µM LY294002, 100 ng/ml Rapamycin, 1 µM Bio and 40 or 60 µg/ml AAE (40 µg/ml) for 24 hr. The expression of Akt, mTOR, TSC2, GSK-3β, Bcl-2, pro-caspase 3 and the activation of Bax, Bak, Bim and cleaved PARP were analyzed by Western blot analysis.

## References

- Adams, J. M. and Cory, S. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**, 1324-1337.
- Avery, M. A., Chong, W. K. M. and Jennings, W. C. 1992. Stereoselective total synthesis of (dextro)-artemisinin, the antimalarial constituent of *Artemisia annua* L. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 974-979.
- Baek, I. S., Im, L. H., Park, C. and Choi, Y. H. 2015. Anti-cancer Potentials of *Rhus verniciflua* Stokes, *Ulmus davidiana* var. *japonica* Nakai and *Arsenium sublimatum* in human gastric cancer AGS cells. *J. Life Sci.* **25**, 849-860.
- Cantrell, D. A. 2001. Phosphoinositide 3-kinase signaling pathways. *J. Cell Sci.* **114**, 1439-1445.
- Chung, U. J., Park, C., Jeong, Y. K. and Choi, Y. H. 2011. Apoptosis induction by methanol extract of *Prunus mume* fruits in human Leukemia U937 Cells. *J. Life Sci.* **21**, 1109-1119.
- Doble, B. W. and Woodgett, J. R. 2003. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell Sci.* **116**, 1175-86.
- Fiandalo, M.V. and Kyprianou, N. 2012. Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis. *Exp. Oncol.* **34**, 165-175.
- Fulda, S. and Debatin, K. M. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**, 4798-4811.
- Hacker, G. and Weber, A. 2007. BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how? *Arch. Biochem. Biophys.* **462**, 150-155.
- Holcik, M., Gibson, H. and Korneluk, R. G. 2001. IAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis* **6**, 253-261.
- Hyun, J. H., Kim, E., Kang, J. I., Kim, S. C., Yoo, E. S. and Kang, H. K., 2008. Apoptosis induction of HL-60 Leukemia cells by extract of *Crinum asiaticum*. *Yakhak Hoeji* **52**, 1-6.
- Jeong, J. W., Baek, J. Y., Kim, K. D., Choi, Y. H. and Lee, J. D., 2015. Induction of apoptosis by pachymic acid in T24 human bladder cancer cells. *J. Life Sci.* **25**, 93-100.
- Kim, E. J., Park, H., Lim, S. S., Kim, J. S., Shin, H. K. and

- Yoon, J. H. 2008. Effect of the hexane extract of *Saussurea lappa* on the growth of HT-29 human colon cancer cells. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **40**, 207-214.
14. Kirschenbaum, F., Hsu, S. C., Cordell, B. and McCarthy, J. V. 2001. Glycogen synthase kinase 3-beta regulates presenilin 1 terminal fragment levels. *J. Biol. Chem.* **276**, 30701-30707.
  15. Labi, V., Erlacher, M., Kiessling, S. and Villunger, A. 2006. BH3-only proteins in cell death initiation, malignant disease and anticancer therapy. *Cell Death Differ* **13**, 1325-1338.
  16. Leever, S. J., Vanhaesebroeck, B. and Waterfield, M. D. 1999. Signaling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take center stage. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 219-225
  17. Mikami, I., Zhang, F., Hirata, T., Okamoto, J., Koizumi, K., Shimizu, K., Jablons, D. and He, B. 2010. Inhibition of activated phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway in malignant pleural mesothelioma leads to G1 cell cycle arrest. *Oncol. Rep.* **24**, 1677-1681.
  18. Moon, J. Y., Nguyen, L. T. T., Hyun, H. B., Osman, A., Cho, M. H., Han, S., Lee, D. S. and Ahn, K. S. 2015. Anticancer activities of the methanolic extract from lemon leaves in human breast cancer stem cells. *J. Appl. Biol. Chem.* **58**, 219-226.
  19. Majchrzak, A., Witkowska, M. and Smolewski, P. 2014. Inhibition of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in diffuse Large B-cell lymphoma: current knowledge and clinical significance. *Molecules* **19**, 14304-14315.
  20. Reed, J. C. 2006. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death and Differentiation* **13**, 1378-1386.
  21. Romero, M. R., Serrano, M. A., Vallejo, M., Efferth, T., Alvarez, M. and Marin, J. J. 2006. Antiviral effect of artemisinin from *Artemisia annua* against a model member of the Flaviviridae family, the bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *Planta. Med.* **72**, 1169-1174.
  22. Roymans, D. and Slegers, H. 2001. Phosphatidylinositol 3-kinases in tumor progression. *Eur. J. Biochem.* **268**, 487-498
  23. Ryu, J. H., Lee, S. J., Kim, M. J., Shin, J. H., Kang, S. K., Cho, K. M. and Sung, A. J. 2011. Antioxidant and Anticancer Activities of *Artemisia annua* L. and Determination of Functional Compounds. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* **40**, 509-516.
  24. Schmid, G. and Hofheinz, W. 1983. Total synthesis of qinghaosu. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 624-625
  25. Susan, E. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495-516
  26. Vanhaesebroeck, B. and Waterfield, M. D. 1999. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp. Cell Res.* **253**, 239-254.
  27. Yun, H. J., Hwang, S. G., Yun, H. J., Kim, C. H., Seo, G. S., Park, W. H. and Park, S. D. 2006. Anticancer effect of *Rheum rhizoma* on human liver cancer HepG2 cells. *Kor. J. Herbology* **4**, 27-36.
  28. Zinkel, S., Gross, A. and Yang, E. 2006. Bcl-2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death. Differ.* **13**, 1351-1359.

## 초록 : Hep3B 간암세포에서 개똥쑥추출물로부터 Akt-mTOR-GSK3 $\beta$ 신호경로에 의한 apoptosis 효과

김은지<sup>1</sup> · 김근태<sup>1</sup> · 김보민<sup>1</sup> · 임은경<sup>1</sup> · 하성호<sup>2</sup> · 김상용<sup>3</sup> · 김영민<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>한남대학교 생명나노과학대학 생명시스템과학과, <sup>2</sup>한남대학교 생명나노과학대학 화학공학과, <sup>3</sup>신안산대학교 식품생명과학과)

개똥쑥 추출물은 항박테리아, 항바이러스 그리고 항산화효과를 포함한 다양한 기능을 가지고 있는 것으로 잘 알려져 있다. 그러나, 개똥쑥 항증식 작용기전은 알려지지 않았다. 따라서, 우리는 Hep3B 간암 세포에서 AAE추출물의 apoptotic 효과를 알아보고자 한다. 본 연구의 목적은 AAE가 인체 간암 세포주(Hep3B)의 증식에 미치는 효과를 분석하고 이에 대한 apoptosis의 효과를 조사하는데 있다. 인산화에 의해 활성화된 Akt는 TSC2, mTOR 그리고 GSK-3 $\beta$ 의 인산화를 유도하여 세포증식을 유도한다. 본 연구에서, 우리는 AAE가 Akt-mTOR-GSK3 $\beta$  신호 경로와 mitochondria를 매개하는 apoptotic 단백질을 통한 암세포의 apoptosis 유도할 것이라고 추측하였다. 이를 위해, 먼저 AAE가 처리농도에 따라 세포증식에 미치는 효과를 분석하였다. AAE처리는 세포증식을 억제시켰을 뿐만 아니라 젖산 탈수소 효소의 방출을 유도하였다. 이러한 결과는 MTT assay, LDH assay로 확인하였다. 또한 Hoechst 33342 staining, Annexin V - PI staining, JC-1 staining 그리고 Western blotting을 통해 apoptosis 효과를 확인하였다. 본 연구에서는 간암세포에 AAE의 처리가 Akt, TSC2, GSK-3 $\beta$ -phosphorylated, Bim, Bcl-2, pro-caspase 3의 억제와 Bak, Bax 활성을 유도한다는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 AAE가 Akt-mTOR-GSK-3 $\beta$  신호 경로를 통해 intrinsic apoptosis를 유도한다는 것을 나타낸다.