J Korean Soc Food Sci Nutr
45(9), 1257~1264(2016)

한국식품영양과학회지
http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2016.45.9.1257

AGS 인체 위암 세포에서 Akt/mTOR/GSK-3β 신호경로 조절을 통한 개똥쑥 추출물의 Apoptosis 유도 효과

김은지[1] · 김근태[1] · 김보민[1] · 임은경[1] · 김상용[2] · 김영민[1]

[1]한남대학교 생명나노대학 생명시스템과학과
[2]신안산대학교 식품생명과학과

Apoptosis-Induced Effects of Extract from *Artemisia annua* Linné by Modulating Akt/mTOR/GSK-3β Signal Pathway in AGS Human Gastric Carcinoma Cells

Eun Ji Kim[1], Guen Tae Kim[1], Bo Min Kim[1], Eun Gyeong Lim[1], Sang-Yong Kim[2], and Young Min Kim[1]

[1]*Department of Biological Science and Biotechnology, College of Life Science and Nano Technology, Hannam University*
[2]*Department of Food Science & Bio Technology, Shinansan University*

ABSTRACT Extracts from *Artemisia annua* Linné (AAE) have various functions (anti-malaria, anti-virus, and anti-oxidant). However, the mechanism of the effects of AAE is not well known. Thus, we determined the apoptotic effects of AAE in AGS human gastric carcinoma cells. In this study, we suggested that AAE may exert cancer cell apoptosis through the Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR)/glycogen synthase kinase (GSK)-3β signal pathway and mitochondria-mediated apoptotic proteins. Activation by Akt phosphorylation resulted in cell proliferation through phosphorylation of tuberous sclerosis complex 2 (TSC2), mTOR, and GSK-3β. Thus, de-phosphorylation of Akt inhibited cell proliferation and induced apoptosis through inhibition of Akt, mTOR, phosphorylation of GSK-3β at serine9, and control of Bcl-2 family members. Inhibition of GSK-3β attenuated loss of mitochondrial membrane potential and release of cytochrome C. Bax and pro-apoptotic proteins were activated by their translocation into mitochondria from the cytosol. Translocation of Bax induced outer membrane transmission and generated apoptosis through cytochrome C release and caspase activity. We also measured 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay, lactate dehydrogenase assay, Hoechst 33342 staining, Annexin Ⅴ-PI staining, 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylimidacarbocyanine iodide staining, and Western blotting. Accordingly, our study showed that AAE treatment to AGS cells resulted in inhibition of Akt, TSC2, GSK-3β-phosphorylated, Bim, Bcl-2, and pro-caspase 3 as well as activation of Bax and Bak expression. These results indicate that AAE induced apoptosis via a mitochondrial event through regulation of the Akt/mTOR/GSK-3β signaling pathways.

Key words: Akt/mTOR/GSK-3β pathway, Bax-Bak, AAE, mitochondria potential

서 론

잔잎쑥, 개땅쑥이라고도 불리는 개똥쑥(*Artemisia annua* L.)은 국화과 쑥속에 속하는 일년생 초본으로 열대 아시아를 원산지로 하여 우리나라에서는 길가나 들판에 분포한다. 예로부터 한방에서 개똥쑥을 해열제, 지혈제, 피부병 치료제 및 살충제 등으로 사용하고 있고, 그 외 항균, 항바이러스 및 항산화 작용 등이 알려져 있다(1). 개똥쑥의 항산화 활성은 성분 중 페놀 화합물에 기인한다고 보고되고 있으며, 개똥쑥의 주성분인 artemisinin에 대한 항말라리아 활성이 알려짐에 따라 의약용으로 이용되고 있다(2-4). 선행연구에서 개똥쑥 추출물을 유방암세포, 자궁경부 상피암세포, 위암세포에 처리하였을 때 암세포 증식 억제 효과가 있음이 보고되었으며(5,6), 최근에는 유방암세포 선택적 괴사 작용의 항암 활성이 입증됨으로써 세계적으로 주목받고 있는 생약제로 평가되고 있다(7). 최근 천연물의 다양한 생리활성 및 작용기전들에 대한 연구들이 진행되면서 천연물로부터 새로운 항암물질을 도출하려는 시도들이 이루어지고 있다(8).

항암 치료에 있어서 중요하게 생각하는 것 중 하나는 다양한 기전을 통하여 암세포의 분열과 증식을 억제하고 선택적으로 암세포를 제거하는 것이다. 이러한 특정 약물의 처리에 의한 apoptosis 유발은 항암제 개발에 가장 중요한 영역으로 인식되고 있다(9,10). 세포 자멸사라고도 불리는 apoptosis는 손상된 세포를 제거하기 위한 과정으로 apoptosis 과정에 이상이 생기면 손상된 세포가 비정상적으로 증식하

Received 16 May 2016; Accepted 1 July 2016
Corresponding author: Young Min Kim, Department of Biological Science and Biotechnology, College of Life Science and Nano Technology, Hannam University, Daejeon 34054, Korea
E-mail: saysay308@gmail.com, Phone: +82-42-629-8760

여 세포의 암화가 유도된다. 따라서 암세포를 제거하기 위한 전략으로 apoptosis 유도에 관한 연구가 진행되어 왔다(11-13). Apoptosis는 염색질의 응축, apoptotic body 형성 및 DNA 단편화 등의 특징을 보이며, 사멸 수용체를 통한 외인성 경로(extrinsic pathway)와 미토콘드리아를 통한 내인성 경로(intrinsic pathway)의 두 가지 경로를 통해 유도된다(14). 또한, apoptosis는 세포 내외적인 apoptosis 신호로 시작되어 apoptosis 조절 단백질인 Bcl-2 family, caspases, apoptosis 억제 단백질의 상호작용으로 조절된다. Bcl-2 family 중 apoptosis 억제 단백질인 Bcl-2와 이를 유도하는 Bax가 존재하여 길항적으로 조절된다. 한편 apoptosis의 외인성 경로와 내인성 경로는 미토콘드리아에서 세포질로의 cytochrome c 방출과 연계될 수 있으며, caspase cascade를 유발하여 최종 effector caspase(caspase-3/-7)의 활성을 통하여 apoptosis를 일으킨다(15).

따라서 본 연구에서는 개똥쑥 추출물(AAE)의 항암 활성 기전을 확인하기 위해 AAE 처리를 통한 AGS 인체 위암 세포의 증식 억제가 apoptosis 유도에 의한 것인지 알아보고자 하였다. AAE 농도 증가에 따른 mitochondria membrane potential 변화와 이와 관련된 단백질의 발현 변화를 확인하여 apoptosis가 intrinsic apoptosis pathway의 경로를 통해 이루어짐을 확인하고자 하였다. Mitochondria membrane potential을 조절하는 상위조절자인 p-Akt, p-mTOR, p-TSC2, p-GSK-3β 신호분자조절의 연관성을 알아보기 위하여 LY294002, Rapamycin, 6-bromoindirubin-3'-oxime(BIO)을 각각 단독으로 처리하여 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용된 개똥쑥(경북 청송, 2015년 10월 제조)은 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°C에서 보관하였다. 농도별 개똥쑥 추출물은 상기 추출물을 동일 용량의 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 만들었으며 -20 °C에서 냉동 보관하여 사용하였다. LY294002와 Rapamycin, BIO(Calbiochem, San Diego, CA, USA)는 20 mM로 만들어 사용하였다.

세포배양

AGS cell은 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양받았으며, 10% fetal bovine serum(HyClone Laboratories Inc., Logan, UT, USA)과 1% antibiotics가 포함된 RPMI media(HyClone Laboratris Inc.)를 사용하여 5% CO_2, 37°C 조건에서 배양하였다. 48시간마다 trypsin-EDTA(HyClone Laboratories Inc.)를 이용하여 세포를 부유 상태로 만든 다음 세포를 1×10^6 cells/mL로 분주하고 계대배양 하였다.

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay에 의한 암세포의 생존율 측정

Kim 등(8)의 시험법을 참고하여 12 well plate에 AGS cell을 1×10^5 cells/mL로 분주하고 24시간 동안 안정화한 후 AAE와 LY294002, Rapamycin, BIO를 12시간, 24시간, 48시간 동안 처리하여 CO_2 incubator에서 배양하였다. 그런 다음 MTT solution 100 μg/mL를 첨가하여 1시간 동안 CO_2 incubator에서 반응시켰다. MTT solution을 처리한 media를 제거하고 PBS washing 후 PBS를 제거한 뒤 DMSO 150 μL씩 넣어 각 well에 생성된 formazan을 모두 녹인 다음 96 well plate에 100 μL씩 옮긴 후 ELISA microplate reader(model 680, Bio-Rad Laboratories Inc., Tokyo, Japan)로 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 농도별로 세 번 시행하였으며, 이에 따른 평균값과 표준오차는 Microsoft Excel program을 사용하여 분석하였다.

Lactate dehydrogenase(LDH) assay에 의한 세포독성 측정

Apoptosis 시 세포막의 손상으로 발생하는 LDH 양을 측정하는 LDH cytotoxicity assay kit(Thermo Scientific, USA)을 사용하여 세포독성을 확인하였다. Jang(16)의 시험법을 참고하여 배양된 AGS cell을 12 well plate에 1×10^5 cells/mL로 분주하고 24시간 동안 안정화한 후 개똥쑥 추출물과 LY294002, Rapamycin, BIO를 24시간과 48시간 동안 처리하여 CO_2 incubator에서 배양하였다. 상등액 100 μL와 LDH reagent 100 μL를 혼합하여 30분간 암 조건에서 반응시킨 다음 stop solution으로 1 N HCl 50 μL를 가한 후 490 nm와 595 nm에서 흡광도를 측정하여 LDH 방출량을 비교하였다.

Fluorescence-activated cell sorting(FACS)에 의한 apoptosis 관찰

Apoptosis는 FITC-Annexin V apoptosis detection kit (BD Pharmingen™, San Diego, CA, USA)을 사용하여 측정하였다. Annexin V-PI staining을 위해 AGS cell에 AAE를 농도별(40, 60, 80 μg/mL)로 처리하였다. 24시간 배양한 세포를 PBS로 세척 후 trypsin-EDTA로 모은 다음 1×10^6 cells/mL의 농도에서 binding buffer로 suspension 하였다. 그 후 AGS cell을 Annexin V-FITC와 propidium iodide(PI)로 15분간 염색한 후 Flow Cytometry-FACSCanto (Becton-Dickinson Biosciences, Drive Frankline Lages, NJ, USA)로 분석하여 결과를 관찰하였다.

Hoechst 33342 staining

12 well plate에 AGS cell을 1×10^5 cells/mL로 분주하고 37°C, 5% CO_2가 공급되는 조건에서 24시간 동안 안정화한 후 AAE를 농도별(40, 60, 80 μg/mL)로 처리하였다. 그 후 24시간 배양한 세포를 Hoechst 33342를 0.7 μL씩 처리한 다음 3.5% formalin을 처리하여 20분간 고정했다. 그 후 PBS로 세척하여 sample을 제작하여 형광현미경(DAPI)에서 관찰하였다.

Mitochondrial membrane potential(MMP, $\Delta\psi m$)의 분석

암세포의 MMP 변화 정도를 측정하기 위하여 AGS cell에 AAE를 농도별(40, 60, 80 μg/mL)로 처리하였다. 24시간 배양한 세포를 PBS로 세척 후 trypsin-EDTA로 모은 다음 10 μM의 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide(JC-1, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 용액을 처리하여 20분 동안 상온에서 반응시켰다. 이렇게 준비된 세포를 Flow Cytometry-FACS Canto(Becton-Dickinson Biosciences)로 분석하여 결과를 관찰하였다.

Caspase-3/7 activity 분석

세포의 caspase activity 변화 정도를 측정하기 위하여 AGS cell에 AAE를 농도별(40, 60, 80 μg/mL)로 각각 처리하였다. 24시간 배양한 세포를 PBS로 세척 후 trypsin-EDTA로 모은 다음 50 μL의 1× assay buffer BA로 세포를 풀어준 뒤 caspase 3/7 reagent waking solution을 5 μL 처리하여 37°C, 5% CO_2에 30분 동안 반응시켰다. 준비된 sample에 caspase 7-AAD waking solution을 150 μL 처리하여 5분 동안 상온에서 반응시킨 뒤 Muse automated cell analyzer(Merck Millipore, Darmstadt, Germany)로 분석하여 결과를 관찰하였다.

Western blotting

6 well plate에 AGS cell을 각 well당 1×10^5 cells/mL로 분주하여 24시간 동안 배양한 다음 AAE와 LY294002, Rapamycin, BIO를 처리하여 24시간 동안 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 μL씩 첨가하여 단백질을 분리한 뒤 14,000 rpm, 4°C에서 20분 동안 원심분리 하여 상등액을 취하였다. 추출한 단백질은 ELISA-reader를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 8%, 12% acrylamide gel을 이용하여 만들어놓은 sample을 loading 한 뒤 전기영동을 실시한 다음 nitrocellulose membrane에 transfer 하였고, 다음에 2% bovine serum albumin(BSA)을 이용해 blocking 한 후, 1차 항체를 4°C에서 밤새 반응시키고 TBST로 5분씩 4번 washing 후 2차 항체를 결합한 다음 실험 결과를 측정하였다.

통계처리

실험설계에 대한 분석은 통계 프로그램인 SPSS(20.0, SPSS, Chicago, IL, USA)의 Student's t-test로 검정하였다. 각 자료는 3번 이상의 반복된 실험을 통하여 얻은 결과로 검정하였고 $P<0.05$인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

AAE가 AGS 위암 세포의 증식에 미치는 영향

개똥쑥 추출물이 AGS 위암 세포 증식률에 미치는 영향을 확인하기 위해 AGS 위암 세포에 AAE를 농도별(20, 30, 40, 60, 80, 100 μg/mL)로 처리 후 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). 정상 세포인 섬유아세포(fibroblast cell)에 대한 AAE의 세포독성을 측정한 결과 AAE를 위와 동일한 농도로 24시간 동안 처리하였을 때 섬유아세포의 증식률이 90% 이상으로 유지되는 것으로 보아 AAE의 독성이 없음을 확인하였다(Fig. 1B).

또한, 세포막의 손상으로 세포질에 있던 젖산 탈수소효소(lactose dehydrogenase: LDH)는 배지로 방출되어 젖산의 탈수소화를 촉매 작용함으로써 pyruvate와 NADPH를 생성한다. 이렇게 생성된 NADH는 diaphorase와 tetrazolium salt를 환원시켜 formazan을 형성한다. 이때 흡광도를 측정해 LDH의 방출량을 측정함으로써 세포 손상도를 파악할 수 있다(16). 본 실험에서는 AAE에 의한 세포 증식억제가 세포 손상에 의한 것인지 구체적인 독성 수준 파악을 위해 LDH assay를 실시하였다. AAE를 AGS 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 의해 나타난 세포 증식억제가 세포 손상에 의한 것임을 알 수 있었다.

AAE에 의한 AGS 위암 세포의 apoptosis 유도 효과

AAE에 의한 AGS cell의 증식억제를 MTT assay와 LDH assay를 통해 확인하였다. 이러한 세포 증식억제 효과가 apoptosis에 의한 것인지 알아보기 위해 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 AGS cell에 AAE를 농도별(40, 60, 80 μg/mL)로 24시간 동안 처리한 후, Hoechst 33342(10 mM) staining과 Annexin V-PI staining을 통한 FACS 분석을 시행하였다. 그 결과 아무것도 처리하지 않은 AGS cell의 핵이 온전한 핵 모양을 나타냈지만, AAE를 농도별로 처리하였을 때 세포의 핵이 응축과 분절로 인해 나타나는 전형적인 apoptotic body가 형성됨을 확인하였다(Fig. 2A). 또한, AAE를 처리하였을 때 농도 의존적으로 apoptosis가 유도됨을 FACS를 통하여 확인하였다(Fig. 2B, C). 이러한 결과로

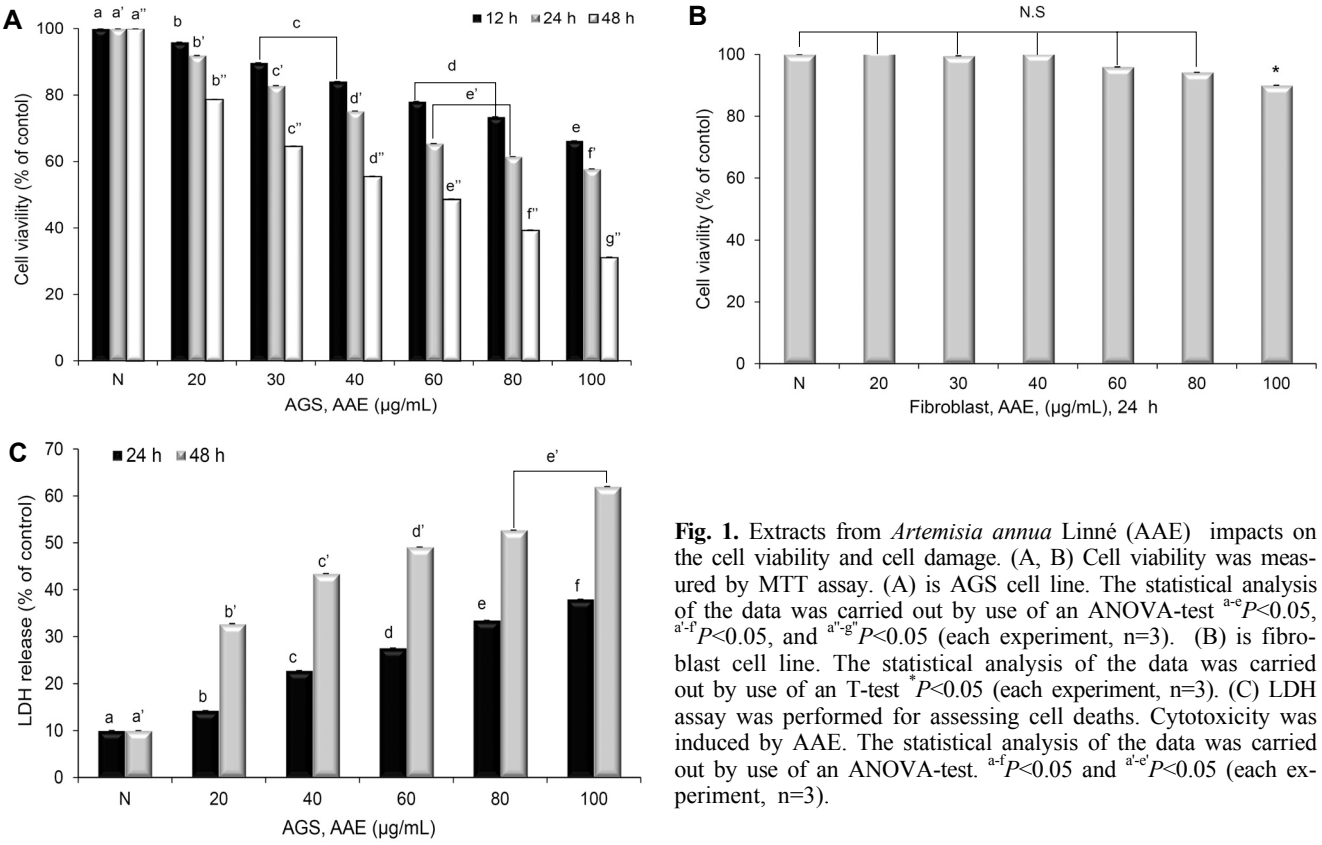

Fig. 1. Extracts from *Artemisia annua* Linné (AAE) impacts on the cell viability and cell damage. (A, B) Cell viability was measured by MTT assay. (A) is AGS cell line. The statistical analysis of the data was carried out by use of an ANOVA-test $^{a\text{-}e}P<0.05$, $^{a'\text{-}f'}P<0.05$, and $^{a''\text{-}g''}P<0.05$ (each experiment, n=3). (B) is fibroblast cell line. The statistical analysis of the data was carried out by use of an T-test $^{*}P<0.05$ (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. $^{a\text{-}f}P<0.05$ and $^{a'\text{-}e'}P<0.05$ (each experiment, n=3).

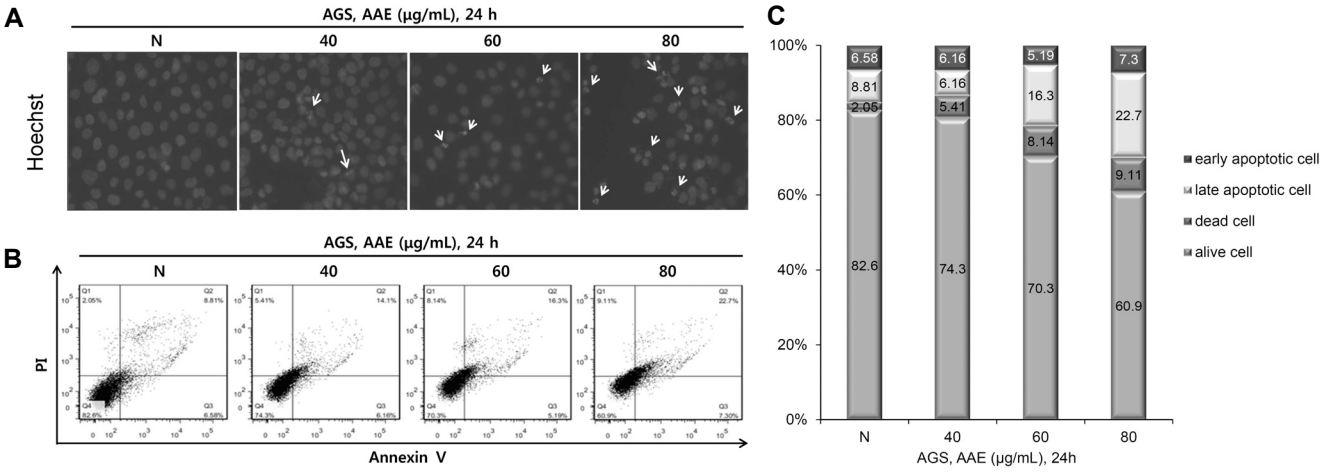

Fig. 2. Apoptosis inducing effects of AAE. (A) Cell apoptosis observed using Hoechst 33342 staining. AGS were treated with AAE (0, 40, 60, and 80 μg/mL) for 24 h. Fluorescence was detected using a fluorescence microscope. Arrows indicate apoptotic bodies, which were DNA fragments produced when apoptosis occurred. (B) Apoptotic effects of different concentration AAE were evaluated by Annexin V-fluorescein and propidium iodide (PI). AGS were treated with AAE (0, 40, 60, and 80 μg/mL) for 24 h. Data analyzed by flow cytometry. (C) Annexin V-PI staining was showed by alive cell/dead cell/early-late apoptotic cell fluorescence intensity ratio.

AAE의 처리에 따른 AGS cell의 증식억제 효과는 apoptosis 유도에 의한 것임을 알 수 있었다.

AAE가 AGS cell 내에서 apoptosis 조절 단백질의 발현에 미치는 영향과 MMP($\Delta\psi$m) 및 caspase activity 효과

Apoptosis intrinsic pathway에 관여하는 Bax 단백질은 주로 세포질에 존재하지만, DNA 손상이 일어나면 미토콘드리아 외막으로 이동하여 oligomerization에 의해 투과가 일어나 cytochrome C를 세포질로 유리시킴으로써 apoptosis를 유도한다. 이러한 pro-apoptotic 단백질인 Bax를 억제하는 단백질은 Bcl-2와 Bcl-xL로 미토콘드리아 막에서 Bax의 oligomerization을 저해하여 세포 생존을 촉진한다.

Cytochrome C 유리에 의한 caspase-9 및 -3의 활성화는 apoptosis를 유도한다. Caspase는 initiator caspase인 caspase-8 및 -9와 effector caspase인 caspase-3, -6 및 -7로 나뉘는데, initiator caspase가 활성화되면 하위 단계에 있는 effector caspase를 활성화함으로써 세포의 apoptosis를 유발한다(17,18). 본 실험에서는 AGS cell에 AAE를 농도별(40, 60, 80 μg/mL)로 처리하여 apoptosis 조절 단백질들의 양상을 알아보기 위해 western blotting을 실시하였다. Fig. 3A에서 AAE 농도 의존적으로 세포 생장에 관여하는 신호 단백질인 p-Akt, p-TSC2, p-mTOR, p-GSK-3β의 발현이 감소함을 확인하였다. 또한, anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2의 발현이 억제됨으로써 pro-apoptotic 단백질인 Bax, Bak의 발현이 증가하는 일련의 신호경로를 조절할 수 있다는 것을 확인하였다. 또한, caspase의 활성 전 상태인 pro-caspase-3의 발현량이 감소하는 것을 확인하였다.

AAE의 미토콘드리아 막 전위의 탈분극 유도를 확인하기 위해 mitochondrial membrane depolarization assay(JC-1)를 실시하였다. AAE를 농도별(40, 60, 80 μg/mL)로 24시간 동안 처리한 결과 40 μg/mL에서 71.8%, 60 μg/mL에서 96.6%, 80 μg/mL에서 98.4%의 결과를 보였다(Fig. 3B, D). 이를 통해 AAE가 농도 의존적으로 미토콘드리아 막 전위의 탈분극을 유도함을 확인하였다. 또한, AAE를 처리하였을 때 caspase 활성을 확인하기 위해 caspase-3/7 activity assay를 실시하였다. Fig. 3C, E에 나타낸 바와 같이 AAE를 농도별(40, 60, 80 μg/mL)로 24시간 동안 처리한 결과 40 μg/mL에서 32.8%, 60 μg/mL에서 46.6%, 80 μg/mL에서 52%의 결과를 보였다. 이러한 결과를 통하여 AAE가 AGS cell에서 intrinsic pathway를 통하여 apoptosis를 유도한다는 것을 확인하였다.

Akt, mTOR, GSK-3β 의 저해에 따른 신호 단백질의 조절과 세포증식에 미치는 영향

Akt 활성은 다른 단백질을 인산화시켜 세포 주기조절 및

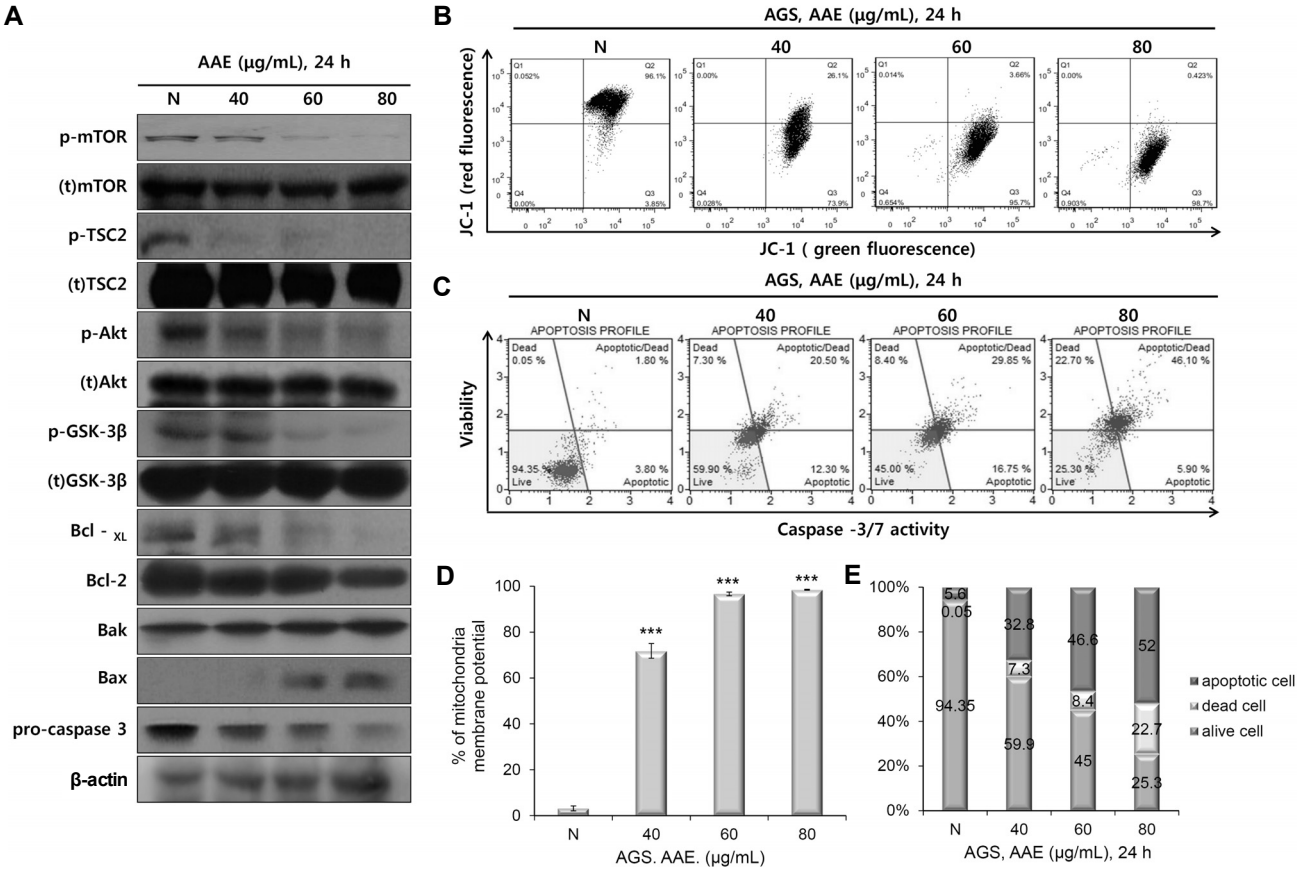

Fig. 3. AAE effects on the expression of apoptosis regulatory proteins and MMP (Δψm), caspase activity. (A) Cells were treated with the indicated concentrations of AAE for 24 h. The expression of Akt, mTOR, TSC2, GSK-3β, Bcl-2, pro-caspase 3, and the activation of Bax and Bak were analyzed by western blot analysis (each experiment, n=3). (B) Mitochondria membrane potential were evaluated by JC-1. Cells were treated with different concentration of AAE (AGS were treated with 0, 40, 60, and 80 μg/mL of AAE) for 24 h. (C) AGS were treated with 0, 40, 60, and 80 μg/mL of AAE 24 h, 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. The statistical analysis of the data was carried out by use of a T-test. $^{***}P<0.001$ (each experiment, n=3). (E) Caspse-3/7 activity was showed by alive cell/dead cell/apoptotic cell fluorescence intensity ratio.

세포의 생존과 대사를 촉진하며 이러한 Akt 신호경로는 비정상적인 암세포의 증식을 억제하는 데 중요한 역할을 한다. 또한, Akt는 Tuberous Sclerosis Complex 2(TSC2)를 인산화시킴으로써 Mammalian target of Rapamycin(mTOR)을 활성화한다. mTOR은 세포의 성장과 증식을 조절하는 중요한 조절인자로 종양 형성에 관여한다고 알려져 있다(19).

GSK-3β는 세포 내 신호전달경로에서 다양한 작용을 하는 serine/threonine kinase로, GSK-3β에 의해 인산화되는 대부분 단백질이 불활성화된다. 다른 kinase와 달리 GSK-3β는 탈인산화 상태에서 활성화된 상태로 존재하기 때문에 정상적인 세포 성장 조건에서 세포 내 신호전달경로의 과도한 활성화를 억제한다. 또한, GSK-3β는 외부자극에 의한 억제로 조절되며 serine9에 인산화되어 불활성화된다고 알려져 있다(20).

본 실험에서는 apoptosis가 일어나는 일련의 신호경로를 확인하기 위해 apoptosis 상위 단백질인 Akt, mTOR, GSK-3β의 활성을 억제하는 LY294002, Rapamycin, BIO를 각각 AGS cell에 처리하였다. LY294002는 PI3K를 억제하여 Akt 활성을 저해시키며, Rapamycin은 mTOR complex에 작용하여 mTOR 신호경로를 억제한다. 또한, BIO는 GSK-3β를 인산화시켜 비활성 상태를 유도한다.

세포증식에 미치는 영향과 신호 단백질의 발현 양상을 알아보기 위해 MTT assay, LDH assay, western blotting을 실시하였다. 그 결과 MTT assay에서 AAE와 LY294002, Rapamycin에서는 세포증식이 억제됨을 확인했지만, BIO를 처리한 군에서는 아무것도 처리하지 않은 control군과 유사한 세포 생장률을 확인하였다(Fig. 4A). Fig. 4B에서는 LDH assay에서 AAE 처리군과 LY294002를 처리한 군 그리고 Rapamycin을 처리한 군에서 LDH 방출량이 증가하는 것을 확인했지만, BIO를 처리한 군에서는 아무것도 처리하지 않은 군과 비슷한 정도의 양을 나타냄을 확인하였다. 이러한 결과는 Akt와 mTOR를 저해했을 때 암세포 증식을 억제한다는 것을 나타낸다. 반면 GSK-3β의 인산화를 억제하는 BIO 처리로 GSK-3β는 억제되며, 억제된 GSK-3β는

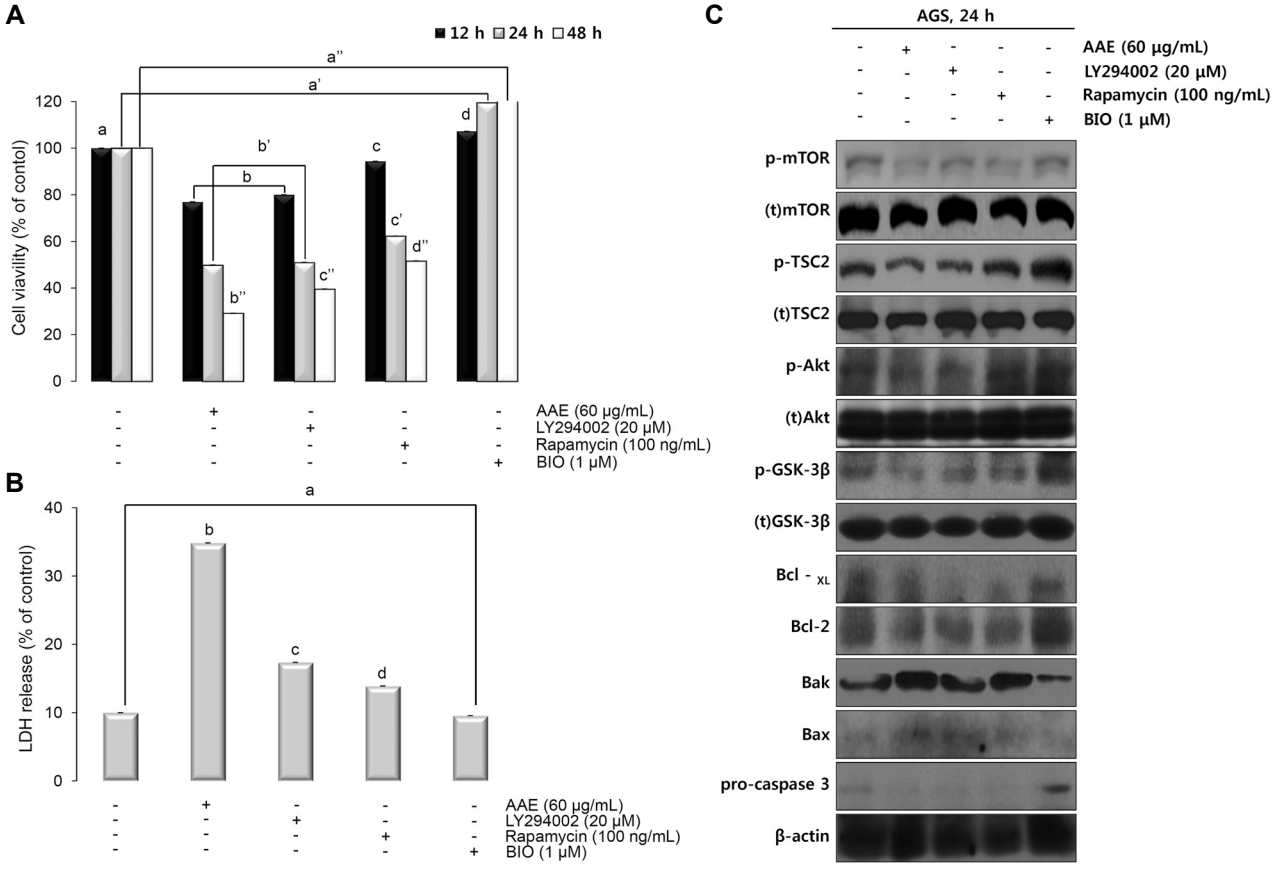

Fig. 4. Effects on cell proliferation and the control of the signal protein via inhibition of Akt/mTOR/GSK-3β. Cells treated LY294002, Rapamycin, BIO, and AAE in AGS cells. Cells were treated with 20 μM LY294002, 100 ng/mL Rapamycin, 1 μM BIO, and 60 μg/mL AAE for 12 h, 24 h and 48 h. (A) Cells viability was measured by MTT assay. The statistical analysis of the data was carried out by use of an ANOVA-test $^{a\text{-}d}P<0.05$, $^{a'\text{-}c'}P<0.05$, and $^{a''\text{-}d''}P<0.05$ (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 an ANOVA-test $^{a\text{-}d}P<0.05$ (each experiment, n=3). (C) Cells were treated with 20 μM LY294002, 100 ng/mL Rapamycin, 1 μM BIO, and 60 μg/mL AAE for 24 h. The expression of Akt, mTOR, TSC2, GSK-3β, Bcl-2, pro-caspase 3, and the activation of Bax and Bak were analyzed by western blot analysis (each experiment, n=3).

세포 자가 사멸에 영향을 주지 않고 세포증식을 유도하는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 조건으로 western blotting을 실시한 결과, Fig. 4C에서 나타내는 것과 같이 AAE, LY 294002, Rapamycin을 처리한 군에서 세포 생장 신호 단백질인 p-mTOR, p-TSC2, p-Akt, p-GSK-3β의 발현이 감소하는 것을 확인하였고, Bcl-2의 발현이 억제됨으로써 Bax와 Bak의 발현을 증가시키는 신호경로가 조절된다는 것을 확인하였다. 한편 BIO를 처리한 군에서는 세포 생장 신호 단백질인 p-mTOR, p-TSC2, p-Akt, p-GSK-3β의 발현량이 아무것도 처리하지 않은 군과 같았고, 세포 생장 신호 단백질의 발현 영향으로 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2가 발현됨으로써 pro-apoptotic 단백질인 Bax와 Bak의 발현을 감소시켜 세포 생장 신호경로를 조절한다는 것을 확인하였다.

이와 같은 결과를 종합해 보면, AGS cell에서 개똥쑥 추출물을 처리하였을 때 유도되는 apoptosis 효과는 Akt/mTOR/GSK-3β 경로 활성 억제를 통해 Bcl-2 발현이 감소함에 따라 미토콘드리아 기능에 이상이 나타나 Bax, Bak를 활성화해 세포질로의 cytochrome C 유리에 따른 caspase 활성으로 이루어진다는 것을 알 수 있었다. 즉 AAE 처리에 의한 apoptosis는 Akt/mTOR/GSK-3β 경로를 통한 intrinsic pathway에 의하여 유도됨을 알 수 있었다.

요 약

개똥쑥은 예로부터 항암, 항바이러스 및 항균의 효능을 지니는 것으로 알려져 왔지만 작용 기작에 대한 내용이 많이 알려지지 않았다. 본 연구에서는 AGS 인체 위암 세포를 대상으로 개똥쑥 추출물(AAE)에 의한 apoptosis 효과와 신호경로 연구를 시행하였다. AAE의 암세포 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 AGS cell에 AAE를 처리하고 MTT assay와 LDH assay를 수행한 결과 AAE 농도 의존적으로 나타난 세포 성장 억제가 세포 손상에 의한 것임을 확인하였다. 또한, AAE에 의한 암세포 증식 억제 효과가 apoptosis에 의한 것인지 확인하기 위하여 Hoechst 33342 staining과 Annexin V-PI staining을 수행한 결과, Hoechst 33342 staining에서 apoptotic body와 세포질 응축이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였고, Annexin V-PI staining에서 apoptotic cells의 변화가 농도 의존적으로 증가함을 확인하였다. Western blotting의 결과 AAE가 농도 의존적으로 세포 생장에 관여하는 신호 단백질인 p-Akt, p-TSC2, p-mTOR, p-GSK-3β의 발현이 감소함을 확인하였고, anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2의 발현이 억제됨으로써 pro-apoptotic 단백질인 Bax, Bak의 발현이 증가하는 일련의 신호경로를 조절할 수 있다는 것을 확인하였다. 미토콘드리아 막 전위의 탈분극 유도를 확인하기 위한 JC-1 assay 수행 결과, AAE 농도 의존적으로 미토콘드리아 막 전위의 탈분극이 유도됨을 확인하였다. 탈분극에 의한 caspase 활성을 확인하기 위해 caspase-3/7 activity assay를 수행한 결과, AAE 농도 의존적으로 caspase activity 증가를 확인하였다. 또한, apoptosis가 일어나는 일련의 신호경로를 확인하기 위해 apoptosis 상위 단백질인 Akt, mTOR, GSK-3β의 활성을 억제하는 LY294002, Rapamycin, BIO를 각각 AGS cell에 처리하고 세포증식에 미치는 영향과 신호 단백질의 발현 양상을 알아보기 위해 MTT assay, LDH assay, western blotting을 수행하였다. 그 결과 AAE와 LY294002, Rapamycin 처리군에서 세포증식 억제와 LDH 방출량 증가뿐만 아니라 세포 생장 신호 단백질인 p-mTOR, p-TSC2, p-Akt, p-GSK-3β의 발현이 감소하는 것을 확인하였고, Bcl-2의 발현이 억제됨으로써 Bax와 Bak의 발현을 증가시키는 신호경로를 조절할 수 있다는 것을 확인하였다. 따라서 AGS cell에 개똥쑥 추출물을 처리하였을 때 유도되는 apoptosis 효과는 Akt/mTOR/GSK-3β 경로 활성 억제를 통해 Bcl-2 발현이 감소함에 따라 Bax, Bak를 활성화해 세포질로의 cytochrome C 유리에 따른 caspase 활성으로 이루어진다는 것을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2016년도 (주)포바이오의 연구용역비에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Romero MR, Serrano MA, Vallejo M, Efferth T, Alvarez M, Marin JJ. 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.
2. Ryu JH, Lee SJ, Kim MJ, Shin JH, Kang SK, Cho KM, Sung NJ. 2011. Antioxidant and anticancer activities of *Artemisia annua* L. and determination of functional compounds. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 509-516.
3. Ryu JH, Kim RJ, Lee SJ, Kim IS, Lee HJ, Sung NJ. 2011. Nutritional properties and biological activities of *Artemisia annua* L.. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 163-170.
4. Klayman DL. 1985. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science* 228: 1049-1055.
5. Avery MA, Chong WKM, Jennings-White C. 1992. Stereoselective total synthesis of (+)-artemisinin, the antimalarial constituent of *Artemisia annua* L.. *J Am Chem Soc* 114: 974-979.
6. Schmid G, Hofheinz W. 1983. Total synthesis of qinghaosu. *J Am Chem Soc* 105: 624-625.
7. Singh NP, Lai H. 2001. Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells. *Life Sci* 70: 49-56.
8. Kim EJ, Park H, Lim SS, Kim JS, Shin HK, Park JHY. 2008. Effect of the hexane extract of *Saussurea lappa* on the growth of HT-29 human colon cancer cells. *Korea J Food Sci Technol* 40: 207-214.
9. Kasibhatla S, Tseng B. 2003. Why target apoptosis in cancer treatment. *Mol Cancer Ther* 2: 573-580.
10. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic

biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.
11. Han SI, Kim YS, Kim TH. 2008. Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. *BMB Rep* 41: 1-10.
12. Jin Z, El-Deiry WS. 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 4: 139-163.
13. Okada H, Mak TW. 2004. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 4: 592-603.
14. Oh YN, Jin S, Park HJ, Kim BW, Kwon HJ. 2015. Anti-oxidative and anti-cancer activities of *Treculia africana* extract in human colon adenocarcinoma HT29 cells. *J Life Sci* 25: 515-522.
15. Jeong YJ, Kang KJ. 2011. Effect of *Angelica keiskei* extract on apoptosis of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1654-1661.
16. Jang HH, Nam SY, Kim MJ, Kim JB, Kim HR, Lee YM. 2014. Antioxidant activity and protective effects of anthocyanins-rich fraction from Korean purple sweet potato variety, "Shinjami" against oxidative stress in HepG2 cell. *Korean J Food Nutr* 27: 1090-1095.
17. Choi JH. 2007. Bax protein in cancer treatment. *J Korean Med Assoc* 50: 1016-1022.
18. Fiandalo MV, Kyprianou N. 2012. Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis. *Exp Oncol* 34: 165-175.
19. Kim BM, Kim GT, Lim EG, Kim EJ, Kim SY, Ha SH, Kim YM. 2015. Cell cycle arrest of extract from *Artemisia annua Linné*. via Akt-mTOR signaling pathway in HCT116 colon cancer cells. *Korean Soc Biotechnol Bioeng J* 30: 223-229.
20. Doble BW, Woodgett JR. 2003. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* 116: 1175-1186.