

Anti-oxidative and Anti-cancer Activities of Ethanol Extract of *Litsea populifolia*

Soojung Jin¹, You Na Oh¹, Hyun Young Jeong¹, Hee Jung Yun², Jung-ha Park², Hyun Ju Kwon^{1,2} and Byung Woo Kim^{1,2*}

¹Blue-Bio Industry Regional Innovation Center, Dong-eui University, Busan 47340, Korea

²Division of Applied Bioengineering, College of Engineering, Dong-eui University, Busan 47340, Korea

Received April 3, 2019 / Revised May 31, 2019 / Accepted June 5, 2019

Litsea populifolia, a plant species of the Lauraceae family, is widely distributed in the tropical and subtropical areas of Asia. The phylogenetic relationships and botanical characteristics of *L. populifolia* have been reported; however, its anti-oxidative and anti-cancer activities remain unclear. In this study, we evaluated the anti-oxidative and anti-cancer effects of ethanol extracts of *L. populifolia* (EELP) together with the molecular mechanism of its anti-cancer activity in human lung adenocarcinoma A549 cells. EELP showed significant anti-oxidative effects with a 50% inhibitory concentration at 11.71 µg/ml, which was measured by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging assay. EELP exhibited cytotoxic activity and induced cell cycle arrest at the G1 phase in A549 cells in a dose-dependent manner, whereas EELP did not have the cytotoxic effect on the normal human lung cell line IMR90. Treatment with EELP also resulted in a decreased expression of G1/S transition-related molecules – including cyclin-dependent kinase (CDK) 2, CDK6, cyclin D1, and cyclin E – both for the transcription and translation levels. EELP-induced G1 arrest was associated with the phosphorylation of checkpoint kinase 2 (CHK2), p53, cell division cycle 25 homolog A (CDC25A), and the reduction of CDC25A expression in A549 cells. Collectively, these results suggest that EELP may exert an anti-cancer effect by cell cycle arrest at the G1 phase through both p53-dependent and p53-independent (ATM/CHK2/CDC25A/CDK2) pathways in A549 cells.

Key words : A549 cells, anti-cancer, anti-oxidative, G1 arrest, *Litsea populifolia*

서 론

암은 전세계적으로 주요한 사망 원인 중 하나이며, 2015년 한해 동안 전세계에서 8.8백만명이 암으로 사망하였으며, 우리나라에서는 2016년 한해 동안 7만 8천여명이 암으로 사망하였다[18]. 또한 통계청 자료에 따르면 암이 국내 사망원인 1위이며, 암종별 사망률은 폐암이 작년 대비 2.9% 증가한 35.1%로 가장 높았다. 이러한 암 발병률과 암으로 인한 사망률은 전세계적으로 지속적인 증가추세에 있으며, 국내에서도 식생활의 서구화, 급격한 노령화 등으로 인하여 꾸준히 증가하고 있다. 폐암은 주로 외과적인 수술 또는 방사선 요법과 화학요법으로 치료되나, 표준 화학요법의 경우 암 조직에 대한 낮은 선택성 때문에 정상조직에 여러 부작용을 유발하는 한계가 있다. 따라서 뛰어난 항암활성을 보유하고 부작용이 적은 천연물 유래 소재 개발의 중요성이 지속적으로 대두되고 있으며, 이에 관

한 연구가 활발히 이루어 지고 있다[12, 30].

세포 내외의 신호에 반응하여 세포 내 DNA를 완전히 복제하고, 복제된 DNA를 정확하게 나누어 두 개의 완전한 딸세포로 분리되는 일련의 과정을 세포주기라고 한다. 진핵세포의 세포주기는 S기를 준비하는 G1기, DNA를 합성하는 S기, 복제된 DNA의 확인 및 M기를 준비하는 G2기와 복제된 DNA의 분배 및 체세포 분열이 일어나는 M기로 나뉜다. G1, G2기는 각각 다음 단계인 S기와 M기로 진행하기 위해서 체크포인트(checkpoint)라는 세포주기 감시 시스템이 있어 체크포인트 관련인자들의 상호작용을 통하여 세포주기가 조절된다. 이때 각 체크포인트에서 적절하게 조절되지 않으면 세포주기가 제어되지 못하고 이상증식을 야기하여 암의 원인이 되기도 한다[28]. 정상세포는 여러 환경상황에 맞게 세포주기를 조절하여 항상 일정한 수의 세포를 유지하는데, 외부자극 등에 의해 DNA에 손상을 입게 되면 세포주기를 지연시켜 손상된 DNA의 회복 경로를 거쳐 항상성을 유지하게 된다[23, 33, 42]. 그러나 암세포에서는 정상세포와 달리 유전자 변이 등에 의해 세포주기 제어에서 벗어나 G1/S 또는 G2/M기의 비정상적인 진행이 일어나 지속적으로 분열하여 증식하게 된다[21, 22]. 따라서 암세포의 세포주기를 조절함으로써 강력한 항암효과를 가질 수 있고 이러한 세포주기 제어에 의한 항암활성에 관하여 활발히 연구되고 있다[37].

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-2900, Fax : +82-505-182-6951

E-mail : bwkim@deu.ac.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.

세포주기는 cyclin-dependent kinase (CDK)와 cyclin 복합체(CDK/cyclin complex)의 활성화에 의해 다음 단계로 진행되며, CDK/cyclin complex의 활성제어에 의해 세포주기가 조절된다. 현재까지 보고된 바로는 CDK 저해제로 알려진 p21, p27 등에 의해 CDK 활성이 저해되어 cell cycle arrest가 야기되며, 종양억제자인 p53에 의해 p21의 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다[2, 35, 38]. 반면, Cyclin과 결합한 CDK는 Tyr15 잔기가 인산화되어 있을 경우 비활성화 되고, 인산화된 Tyr15 잔기의 탈인산화에 의해 활성화된다[8, 16, 27]. 이렇게 활성화된 CDK/cyclin complex는 세포주기를 다음 단계로 진행시킨다. 이때 CDK에 작용하는 탈인산화효소가 cell division cycle 25 (CDC25) 단백질이며 CDC25A는 G1/S기에서 cyclinE/CDK2 complex에 작용하여 G1/S 전환을 야기하며, CDC25C는 G2/M기에서 cyclinB/CDK1 complex를 활성화시킨다[11, 25, 32]. 특히 비소세포성 폐암, 두경부암과 유방암 환자들에게서 이들 탈인산화효소인 CDC25A가 과발현되어 있으며, CDC25A의 발현을 저해시켰을 때 간암세포의 성장과 침투가 억제되었다는 보고가 있어, CDC25 단백질의 활성 억제제를 찾는 것이 새로운 기전의 항암치료제 개발의 중요한 분야로 대두되고 있다[17, 24, 39].

*Litsea populifolia*는 녹나무과(Laurel) 녹나무속(Lauraceae)에 속하는 관목으로 아시아의 열대 및 아열대 지역에 위치하고 있으며, 일부 종은 북한 또는 남아메리카에서도 발견된다. 현재까지 *L. populifolia*의 생육특성 및 계통학적 연구가 진행되어 왔으나, 생리활성에 관해서는 전혀 밝혀진 바 없다[34]. 따라서, 본 연구에서는 인간 폐암세포 A549를 사용하여 *L. populifolia* 에탄올 추출물(Ethanol extract of *L. populifolia* 이하 EELP)의 항산화 활성 및 A549 세포의 세포주기조절에 의한 항암활성과 그 분자적 기전에 관하여 연구하였다.

재료 및 방법

시료준비

본 실험에서 사용한 *L. populifolia* 에탄올 추출물은 해외생물소재허브센터(한국생명공학연구원; 분양번호 FBM123-011)에서 구입하였다. *L. populifolia*은 95% 에탄올 용매를 가하여 45°C에서 초음파로 분쇄하여 수득 후 여과, 농축, 건조과정을 거친 추출물로써 100 mg/ml의 농도로 디메틸설폭사이드(DMSO; Sigma, USA)에 용해시켜 4°C에 보관하고 세포에 처리하기 전 배지에 희석하여 사용하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법에 따라 분석하였다[36]. 에탄올 추출물을 1 mg/ml 농도로 조제한 후, 이 시료액 100 μ l에 10% Folin-Ciocalteu's phenol reagent 200 μ l를 첨가한 후 혼합하였다. 700 mM Na₂CO₃ 용액 700 μ l 넣어 혼합하여

실온에서 30분 방치한 후 640 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 표준물질 tannic acid를 이용하여 검량선을 작성한 후 정량하였다.

DPPH 라디칼 소거 활성 측정

EELP의 항산화능을 확인하기 위하여 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거 활성을 측정하였다[19, 26]. EELP를 농도별(2.56-320 μ g/ml)로 메탄올에 녹여 준비한 후, 96 웰 플레이트에 메탄올에 용해된 1.5 \times 10⁻⁴ M DPPH 40 μ l와 각 시료 160 μ l를 분주한 혼합액을 실온에서 30분간 반응시키고, microplate reader (Paradigm, Beckman, USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 비교하여 소거 정도를 백분율로 나타내고, 50% 저해 농도(Inhibitory Concentration, IC₅₀)를 계산하였다. 양성 대조군은 ascorbic acid를 사용하였으며, 측정값은 3회 반복 실험하여 평균값으로 나타내었다. 억제능의 백분율 공식은 다음과 같다.

DPPH radical scavenging activity (%)=[1-(A-B)/C]×100

A: sample absorbance 520 nm

B: color control absorbance 520 nm

C: control absorbance 520 nm

세포배양

본 연구에 사용한 정상세포주는 인체에서 유래한 폐섬유모세포인 IMR90 (CCL-186™)을 사용하였고, 암세포주는 인체 폐암세포주인 A549 (CCL-185™)를 사용하였다. 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC®, USA)으로부터 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS)와 penicillin/streptomycin을 첨가하여 37°C 배양기에서 5%의 CO₂를 유지하면서 배양하였다.

세포의 성장억제 조사

EELP가 정상세포와 암세포의 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 water soluble tetrazolium salt (WST) assay를 수행하였다. 정상세포 IMR90과 암세포 A549를 24-well plate에 1-3 \times 10⁴ cell로 분주한 후 24시간 뒤 EELP를 농도별(0-500 μ g/ml)로 처리하고 48시간 동안 배양하였다. 세포의 배지를 제거하고 WST 시약(Daeillab, Korea)이 포함된 배지를 분주 후 30분간 37°C 배양기에서 반응시키고 microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 3회 반복 실험을 하여 평균값으로 나타내었으며, 본 실험결과를 바탕으로 이후 적정 처리 농도를 결정하였다.

세포의 형태 변화 관찰

EELP 처리에 의한 A549와 IMR90의 형태학적 분석을 위하

여 6-well plate에 $1-2 \times 10^5$ cell로 분주하고 24시간 후 EELP를 적정 농도(0-400 $\mu\text{g/ml}$)로 처리하였다. 48시간 동안 배양 후 도립현미경(Axiovert 40C; Carl ZEISS, Germany)을 사용하여 100-200배의 배율로 관찰하였으며, Axio Vision program을 사용하여 촬영을 하였다.

세포주기 분석

EELP가 A549의 세포주기에 미치는 영향을 확인하기 위하여 EELP를 다양한 농도로 A549에 처리하여 CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit (Becton Dickinson, USA)로 분석하였다. 세포는 6-well plate에 $1-2 \times 10^5$ cell로 분주하고 EELP를 0-400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 48시간 처리 후 회수하였다. 1X PBS로 세척한 후 RNase A를 실온에서 10분간 처리하고, propidium iodide (PI) 용액을 첨가하여 4°C에서 10분간 염색하였다. 염색된 세포는 Flow cytometry (Cell Lab Quanta SC; Beckman Coulter, USA)로 측정하였으며 결과는 WinMDI software 2.9를 사용하여 분석하였다.

mRNA 발현 분석

EELP 처리에 의한 A549의 세포주기에 관련된 분자의 mRNA의 발현 양상을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. A549에 농도별(0-400 $\mu\text{g/ml}$)로 EELP를 처리하고 48시간 배양 후 TRIzol reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 1-2 μg 으로 정량한 후 oligo dT primer와 SuperScript First-Strand Synthesis System kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 이후 CDK2, CDK4, CDK6, Cyclin E, Cyclin D, CDC25A의 primer (Table 1)를 통하여 TaKaRa Taq kit (TaKaRa biotechnology, Japan)로 해당 유전자를 증폭시켰다. PCR 조건은 HID Veriti® 96-

Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하여 denaturation은 94°C, annealing은 55-63°C, extension은 72°C에서 각 30초간 28-35 주기를 수행하였다. 각 분자의 mRNA 발현되는 양을 분석하기 위하여 반 정량적인 방법을 사용하였다. 증폭된 유전자는 ethidium bromide (EtBr; Sigma, USA)로 염색한 1% agarose gel로 전기영동 후 UV 하에서 나타나는 band의 intensity를 image analyser (AlphaView® software, Band Analysis Tool, AlphaInnotech, USA)를 이용하여 측정하고, 같은 시료에서 얻어진 β -actin 산물의 intensity 측정값으로 나누어 비율을 구하였다. 또한 EELP 처리 농도별 시료에서 얻어진 상대값들을 용매처리 대조군의 상대값과 비교하여 발현량을 확인하였다.

단백질 발현 분석

EELP를 처리한 A549의 세포주기에 관련된 단백질의 발현 양상을 확인하기 위하여 Western blot을 수행하였다. A549에 농도별(0-400 $\mu\text{g/ml}$)로 EELP를 처리하고 48시간 배양하였으며 1X PBS로 세척 후 용해 버퍼 [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 1 mM PMSF]를 첨가하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포는 4°C에서 20분 동안 반응 후 14,000 \times g, 4°C에서 20분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. Bradford assay로 정량한 30-50 μg 의 단백질은 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동하고 Nitrocellulose Transfer Membrane (Protran®, Sigma-Aldrich, USA)에 transfer한 후 5% skim milk를 사용하여 상온에서 1시간 동안 blocking 하였다. 그 후 세포주기와 관련된 단백질을 인지하는 일차항체를 4°C에서 24시간 처리하였으며, 이차항체는 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL) Solution (Amersham Life Sci-

Table 1. Primer sets for RT-PCR analysis

Gene	Primer sequence (5'-3')	Tm (°C)	Product size (bp)
CDK2	F: GCTCACCTTTCTTCCAGGATG R: TGGTACGGCAAATCTAACGTAG	55	373
CDK4	F: ATGTTGTCGGGCTGATGGAC R: CTTTGACCTGATTGGGCTGC	59	208
CDK6	F: CCGAGTAGTGCATCGCGATCTAA R: CTTTGCCTAGTTCATCGATATC	55	407
Cyclin E	F: CGGAGCAGCCCCATCATGCC R: AGCGGGGAGCCTCTGGATGG	63	329
Cyclin D	F: CCCTCGGTGTCCTACTTCA R: GTTTGTCTCCTCCGCCTCT	57	409
CDC25A	F: AGCCCCAAAGAGTCAACTAATCCAGA R: CCGGTAGCTAGGGGGCTCACA	57	570
β -actin	F: TCATGTTTGAGACCTTCAA R: GTCTTTGCGGATGTCCACG	55	513

ence, USA)를 membrane에 도포하고 Chemiluminescence Detection System (FluoChem[®] FC2, AlphaInnotech, USA)을 사용하여 분석하였다. 일차항체인 p53, CDK2, CDK4, CDK6, Cyclin E, Cyclin D1, CDC25A, p-CDC25A (Ser79), Acitin과 이차항체 HRP-conjugated anti-rabbit, anti-goat, anti-mouse 는 Santa Cruz Biotechnology (USA)에서 구입하였으며, p-p53 (Ser20), p21, checkpoint kinase-2 (CHK2), p-CHK2 (Thr68)는 Cell Signaling Technology (USA)에서 구입하여 사용하였다.

통계 분석

실험의 측정결과는 평균(mean)±표준편차(SD)로 나타내었으며, 각 실험군 사이의 통계학적 유의성 검정은 student's t test를 통해 p값이 0.05 미만(p-value<0.05)인 경우 유의성이 있는 것으로 평가하였다.

결과 및 고찰

EELP의 총 폴리페놀 함량 및 항산화능 분석

폴리페놀 화합물은 분자 내에 phenolic hydroxyl기를 2개 이상 가지고 있는 방향족 화합물로 식물체에 널리 분포되어 항산화, 항암, 항염 등 다양한 생리활성을 보이는 것으로 보고되고 있다[1, 31]. 또한 생체 대사 과정 중 생성되는 활성산소종(Reactive oxygen species)은 높은 반응성 때문에 세포 신호와 항상성에 중요한 역할을 한다[9]. 대부분의 활성산소종은 생체 내 항산화 체계에 의해 분해되나, 방어시스템의 균형이 깨지는 경우 제거되지 못한 활성산소 축적에 의해 DNA, 단백질 등이 파괴되고 암, 관절염, 노화 등 각종 질병의 원인이 된다[10, 20]. 따라서 다양한 생리활성 특히 항암활성을 보유하는 소재의 개발을 위해서는 항산화능 보유 유무를 확인하는 것이 매우 중요하다[7]. 이에 본 연구에서는 EELP의 총 폴리페놀 함량을 측정하고, EELP의 항산화능 측정을 위하여 DPPH 라디칼 소거능을 확인하였다. 그 결과, Table 2에 제시된 바와 같이 EELP의 총 폴리페놀 함량은 78.59 mg/g으로 나타났으며, 항산화능을 측정된 결과, EELP의 농도가 2.56, 12.8, 64, 320 µg/ml로 증가할수록 25.76, 53.24, 94.91, 96.09%의 강한 DPPH radical 소거능을 보였다. 억제능 50%일 때의 EELP 농

도(IC₅₀) 값은 11.71 µg/ml로 양성 대조군인 ascorbic acid (1.53 µg/ml) 보다는 낮은 항산화능을 보였으나 EELP가 추출물인 점을 고려하면 뛰어난 항산화 활성을 지니는 것을 알 수 있었다.

EELP의 암세포 성장 억제 효과

암세포 성장에 미치는 EELP의 영향을 알아보기 위하여 적정농도의 EELP를 처리하고 48시간 배양 후 WST assay를 실시하였다. 그 결과, Fig. 1A에 나타난 바와 같이 정상세포인 폐섬유모세포(IMR90)의 경우 EELP에 의한 세포 독성 및 성장 억제 효과가 관찰되지 않았으나, 인체 폐암세포주인 A549의 경우 EELP 농도의존적으로 세포의 생존율이 감소하였으며, 200 µg/ml에서는 약 29.49%의 생존을 억제가 일어났고, 최고농도인 500 µg/ml에서는 71.34% 이상의 성장 억제 효과를 보였다. 또한, 도립현미경을 통하여 확인한 EELP 처리에 따른 A549 세포의 형태 변화는 EELP의 농도가 증가할수록 A549의 세포 형태가 변하고, 세포의 수 역시 감소하는 반면, IMR90의 세포 형태에는 영향을 끼치지 않는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1B). 이러한 결과로부터 EELP는 A549의 세포 성장을 억제시키는 것을 확인하였다.

EELP에 의한 G1 arrest 유도

EELP의 A549 세포주기에 미치는 영향을 알아보기 위하여 적정농도의 EELP를 세포에 처리하고 48시간 배양 후 Flow cytometry를 사용하여 세포주기 변화를 측정하였다. Fig. 2의 histogram 결과에서 보여지듯이 EELP 처리 농도가 높아질수록 G1기(region M2)의 세포 분포가 점차 증가하는 것을 알 수 있었다. 반면, S기(region M3) 및 G2/M기(region M4)의 세포는 EELP 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다. 또한 Table 3에서 나타난 바와 같이 각 주기별 실제 세포 분포수를 확인한 결과, DMSO 대조군에서는 64.55%였던 G1기 세포 분포는 EELP의 농도의존적으로 증가하여 최고 농도인 400 µg/ml에서는 82.15%의 A549 세포가 G1기에 정체되어 있음을 알 수 있었다. 상대적으로 G1기 이후 단계인 S기 및 G2/M기의 세포는 각각 21.49%에서 5.77%로, 8.95%에서 6.03%로 감소하였다. 따라서 본 결과는 EELP의 처리에 의해 A549 세포의 강력한 G1 arrest가 유도됨을 시사한다.

Table 2. Total phenolic contents (TPC) and DPPH activity of ethanol extract of *Litsea populifolia*

TPC (mg/g)		EELP		
		78.59±2.06		
DPPH	EELP	Concentration (µg/ml)	Inhibition rate (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
		2.56	25.76±0.61	
12.8	53.24±3.97			
64	94.91±0.59			
320	96.09±0.28			
Ascorbic acid		0.512	19.79±0.68	1.53
		2.56	80.38±0.62	
		12.8	97.59±0.48	

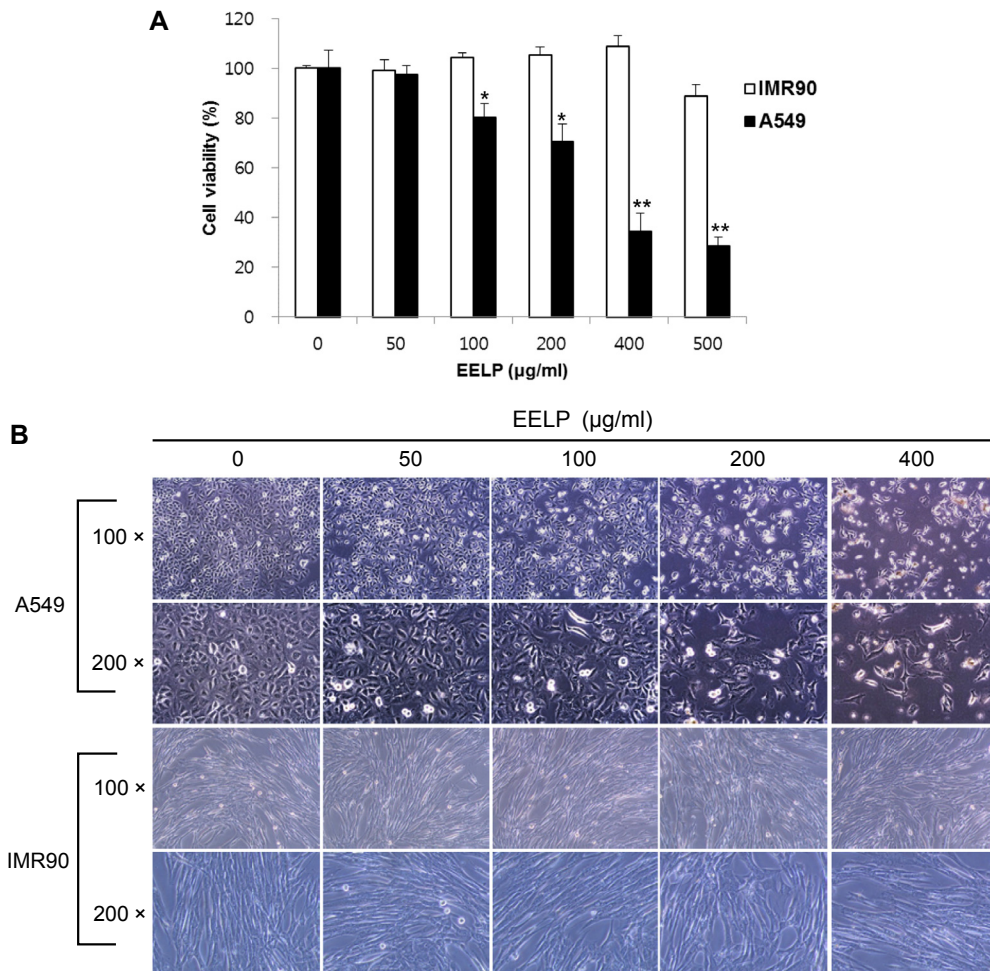


Fig. 1. Effects of EELP on cell growth and morphology in human lung carcinoma A549 cells. (A) Human fetal lung IMR90 cell line as a normal cell control and human lung adenocarcinoma A549 cells were treated with various concentration of EELP for 48 hr. Cytotoxic effect of EELP was determined by WST assay. Results are expressed as percentage of the vehicle treated control \pm SD of three independent experiments. * p <0.05 and ** p <0.01 compared with dissolved in dimethyl sulfoxide treated cells. (B) Morphological changes by EELP in A549 and IMR90 cells. The cells were treated with indicated concentration of EELP for 48 hr, and then visualized by light microscopy. Magnification, $\times 100$ and $\times 200$.

Table 3. Cell cycle distribution of ethanol extract of *Litsea populifolia*

EELP (µg/ml)	% of cell			
	SubG1 (M1)	G1 (M2)	S (M3)	G2/M (M4)
0	4.49	64.55	21.49	8.95
50	3.21	65.61	21.01	9.38
100	4.00	72.00	16.90	7.20
200	6.27	72.69	12.94	5.77
400	5.62	82.15	5.77	6.03

EELP에 의한 세포주기 관련 인자들의 mRNA 발현 변화 분석

앞서 EELP에 의한 A549 세포의 G1 arrest 유도를 확인하였으므로, 다음으로 A549 세포에 EELP를 48시간 동안 처리한

후 G1/S 체크포인트 분자들의 mRNA 발현 변화를 분석하였다. 그 결과, Fig. 3에서와 같이 최고농도인 400 µg/ml의 EELP 처리시 CDK2, CDK6의 mRNA 발현이 감소하였으며, 파트너 cyclin인 cyclin E, cyclin D의 발현이 감소하였다. 또한 CDC25A의 mRNA 발현도 감소하였음을 확인하였다. CDC25A는 탈인산화효소로 G1/S기 진행에 관여하는 CDK2를 탈인산화시켜 활성화시키는 분자로 알려져 있다. 따라서 이러한 결과는 EELP가 G1기에서 S기로의 진행을 유발하는 CDK, cyclin의 발현을 저해하고, CDK를 활성화시키는 CDC25A의 발현을 저해하여 A549세포의 세포주기가 G1에서 S기로 진행되는 것을 억제함을 시사한다.

EELP에 의한 세포주기 조절 기전 분석

다음으로 EELP의 세포주기 조절의 분자생물학적 기전을

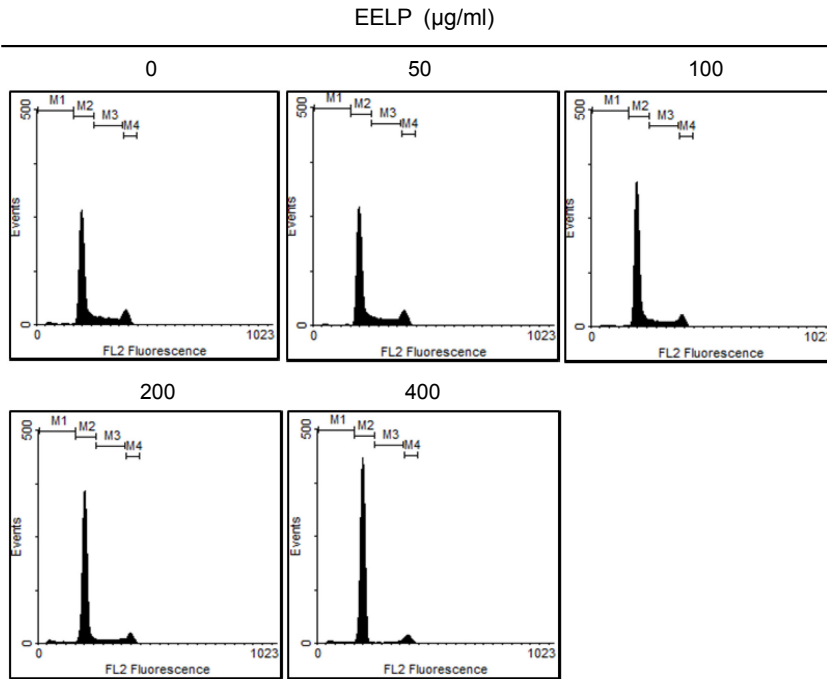


Fig. 2. G1 arrest of cell cycle in EELP-treated A549 cells. Cells were cultured and treated with EELP for 48 hr. Cells were harvested, and then stained with propidium iodide for 30 min and analyzed by flow cytometry. DNA-fluorescence histogram is shown.

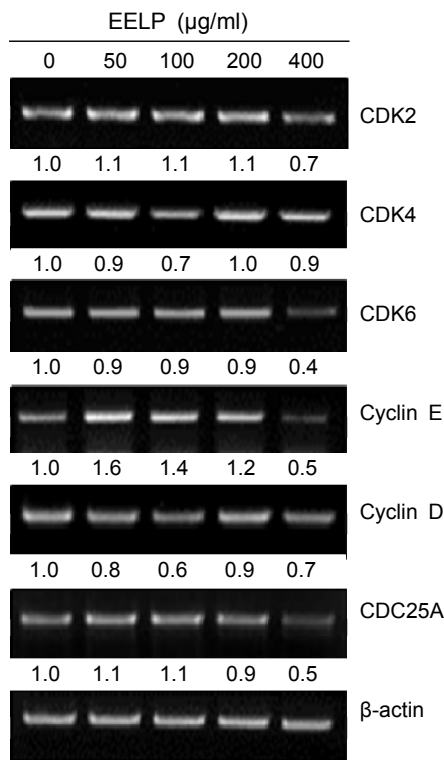


Fig. 3. Transcriptional repression of G1 checkpoint proteins by EELP in A549 cells. A549 cells were cultured and treated with indicated concentrations of EELP for 48 hr. First strand cDNA was synthesized by reverse transcriptase enzyme and PCR reaction was carried out using CDKs, cyclins and CDC25A to primers. Numerical bottom panel of each band indicates the fold change in the band intensity compared with that of control.

분석하기 위하여 세포주기 관련 인자들의 단백질 발현 정도를 Western blot analysis를 통해 확인하였다. 세포주기 조절 기전 중 하나인 종양억제유전자 p53의 경우, 인산화, 아세틸화 등을 통해 활성화되며 활성화된 p53은 CDK 저해제인 p21의 발현을 증가시킨다[29]. p21은 CDK2와 결합하여 CDK2/cyclin E complex를 저해하여 G1기에서 S기로의 세포주기 진행을 억제하는 것으로 알려져 있다[13].

또한 최근에는 또 다른 기전인 CDC25 단백질에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 다양한 암세포에서 CDC25 단백질의 과발현이 관찰되었고 이들은 oncogene으로 작용한다는 연구결과가 보고되었다[16]. CDC25 단백질 family 중 하나인 CDC25A는 CDK2의 탈인산화를 유도하여 CDK2를 활성화시키고 G1/S 전환을 통해 세포주기 진행을 촉진한다[5]. 또한 인간 비소세포성 폐암 및 hepatocellular carcinoma cell (HCC) 조직샘플에서 CDC25A의 과발현이 관찰되었으며 이것은 암세포의 증식, 혈관침투등과 연관되어 있고, CDC25A를 저해하였을 때 HCC의 성장 및 침투가 억제된다는 보고가 있다[40, 41]. 그 외에도 CDC25A의 발현 저해에 의해 암세포의 G1 arrest가 유도된다는 연구결과가 있다[4]. 이러한 CDC25 단백질들은 DNA 손상 체크포인트와의 연관성이 커서, 방사선 조사 등에 의해 이중나선에 끊김이 생긴 경우, 사람의 세포에서는 ATM/CHK2/CDC25A/CDK2 경로를 통하여 세포주기를 저해하여 손상된 DNA의 합성을 막는다[15]. 즉, 세포는 ATM 키나아제를 활성화시키고 활성화된 ATM에 의해 CHK2의 인산화가 유도되어 CHK2가 활성화된다. CHK2는 종양억제단백질로 세포분열이 너무 빠르게 일어나는 것을 저해하여 세포주기를 조절하는 단백질로 알려져 있다[6]. 활성화된 CHK2는

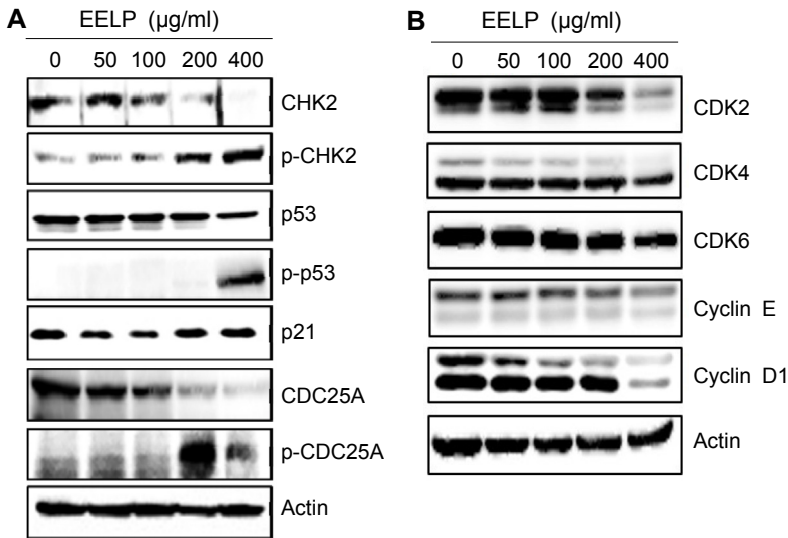


Fig. 4. Downregulation of G1 checkpoint proteins by EELP in A549 cells. Cells were treated with indicated concentrations of EELP for 48 hr. The cells were lysed and cellular proteins were then separated by SDS-PAGE, followed by Western blotting using antibodies against (A) CHK2, p-CHK2 (Thr68), p53, p-p53 (Ser20), p21, CDC25A, p-CDC25A (Ser79) and (B) CDK2, CDK4, CDK6, cyclin D1, cyclin E. Actin was used as an internal control.

p53을 인산화시켜 활성화시키고, 또한 CDC25A를 인산화시켜, 인산화된 CDC25A는 ubiquitin-dependent proteasomal degradation을 통해 제거된다[14]. 따라서 ATM/CHK2 경로를 통한 CDC25A의 분해는 손상된 세포에서의 세포주기 진행을 막는 데 중요한 역할을 하며, ATM, CHK2 등의 돌연변이에 의해 DNA 손상에 따른 CDC25A의 분해가 이루어지지 않으면 암세포로 발전할 가능성이 매우 높아진다[3]. 따라서 이러한 연구결과들은 CDC25 단백질이 중요한 세포주기 조절 인자 중 하나이며, CDC25 단백질의 조절을 통해 암세포의 세포주기를 조절할 수 있음을 시사한다.

세포주기 관련 단백질을 Western blot으로 확인한 결과, Fig. 4A에서와 같이 EELP 처리농도가 증가할수록 인산화된 CHK2가 증가하였으며, 그에 따라 활성화 형태인 p-p53의 발현이 증가하였고, 비활성화 형태인 p-CDC25A가 증가하였다. 또한 Fig. 4B에서와 같이 G1기에서 S기로의 전환을 촉진하는 단백질인 CDK2, CDK6, cyclin E, cyclin D1의 발현량이 감소하였음을 확인하였으며 이러한 결과는 앞서 관찰한 mRNA 발현 결과(Fig. 3)와 일치함을 알 수 있었다. 이와 같은 결과로부터 EELP는 CHK2를 인산화하여 그 하위시그널인 p-53과 CDC25A 탈인산화효소의 인산화를 유도하였으며, inactive form CDC25A에 의해 CDK의 활성화가 저해되어, CDK/cyclin complex 활성이 저해되어, A549 세포의 G1 arrest가 유도되었을 것으로 사료된다.

현대 의학의 발전에도 불구하고 전세계적으로 암의 발병률과 사망률은 지속적으로 증가되고 있어 기존의 항암제보다는 독성이 적고 암세포에 대한 특이성이 높은 새로운 작용기전을 가지는 항암제의 개발이 요구되고 있으며, 이에 부응하여 암의 발병기전에 관한 분자생물학적 연구 및 다양한 기전의 항암 활성을 가지는 천연물 소재에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 특히 암세포에서 특이적으로 과발현되어 있는 세포주기조절 관련 분자 등에 관한 연구결과들이 보고되면서

세포주기조절 인자를 target으로 하는 항암제에 관한 연구가 주목받고 있다. 본 연구를 통하여 *Litsea populifolia* 추출물이 뛰어난 항산화능을 가지며, 정상 폐세포주인 IMR90에서는 독성이 거의 없으며 암세포주인 A549에는 강력한 독성을 지니는 것을 확인하였다. 또한 암세포 독성의 기전이 암세포의 세포주기 조절, 즉 G1 arrest에 의한 것임을 확인하였다. 이러한 연구결과를 바탕으로 추후 EELP의 ROS 조절에 의한 항암활성에 대하여 지속적인 연구가 수행되어야 할 것이다. 아울러 본 연구결과는 *Litsea populifolia* 추출물의 세포주기 조절에 의한 항암기전을 해석하고 폐암세포의 세포주기 조절의 기전연구를 위한 중요한 기초자료가 될 것이라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 중소벤처기업부·부산광역시 지원 지역혁신센터 사업(B0010792) 동의대학교 블루바이오 소재개발 및 실용화 지원센터의 지원으로 이루어 졌습니다.

References

1. Al-Rimawi, F., Rishmawi, S., Arigat, S. H., Khalid, M. F., Warad, I. and Salah, Z. 2016. Anticancer activity, antioxidant activity, and phenolic and flavonoids content of wild *Tragopogon porrifolius* plant extracts. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2016**, 9612490.
2. Bartek, J. and Lukas, J. 2001. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett.* **490**, 117-122.
3. Bernardi, R., Liebermann, D. A. and Hoffman, B. 2000. Cdc25A stability is controlled by the ubiquitin-proteasome pathway during cell cycle progression and terminal differentiation. *Oncogene* **19**, 2447-2454.
4. Bertero, T., Gastaldi, C., Bourget-Ponzio, I., Mari, B., Mene-

- guzzi, G., Barbry, P., Ponzio, G. and Rezzonico, R. 2013. Cdc25A targeting by miR-483-3p decreases CCND-CDK4/6 assembly and contributes to cell cycle arrest. *Cell Death Differ.* **20**, 800-811.
5. Biomborg, I. and Hoffmann, I. 1999. Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G(1)/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases. *Mol. Cell Biol.* **19**, 6183-6194.
 6. Cai, Z., Chehab, N. H. and Pavletich, N. P. 2009. Structure and activation mechanism of the CHK2 DNA damage checkpoint kinase. *Mol. Cell* **35**, 818-829.
 7. Choi, I. P. 2013. Reactive oxygen species and cancer. *Hanyang Med. Rev.* **33**, 118-122.
 8. Coulonval, K., Nockstaele, L., Paternot, S. and Roger, P. P. 2003. Phosphorylations of cyclin-dependent kinase 2 revisited using two-dimensional gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **278**, 52052-52060.
 9. Devasagayam, T. P., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S. and Lele, R. D. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J. Assoc. Physicians India* **52**, 794-804.
 10. Dickinson, B. C. and Chang, C. J. 2011. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 504-511.
 11. Donzelli, M. and Draetta, G. F. 2003. Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep.* **4**, 671-677.
 12. Dorai, T. and Aggarwal, B. B. 2004. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett.* **215**, 129-140.
 13. Dulic, V., Kaufmann, W. K., Wilson, S. J., Tlsty, T. D., Lees, E., Harper, J. W., Elledge, S. J. and Reed, S. I. 1994. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* **76**, 1013-1023.
 14. Eymin, B., Claverie, P., Salon, C., Leduc, C., Col, E., Brambilla, E., Khochbin, S. and Gazeri, S. 2006. p14ARF activates a Tip60-dependent and p53-independent ATM/ATR/CHK pathway in response to genotoxic stress. *Mol. Cell Biol.* **26**, 4339-4350.
 15. Falck, J., Mailand, N., Syljuasen, R. G., Bartek, J. and Lukas, J. 2001. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* **410**, 842-847.
 16. Galaktionov, K., Lee, A. K., Eckstein, J., Draetta, G., Meckler, J., Loda, M. and Beach, D. 1995. CDC25 phosphatases as potential human oncogenes. *Science* **269**, 1575-1577.
 17. Gasparotto, D., Maestro, R., Piccinin, S., Vukosavljevic, T., Barzan, L., Sulpharo, S. and Boiocchi, M. 1997. Overexpression of CDC25A and CDC25B in head and neck cancers. *Cancer Res.* **57**, 2366-2368.
 18. GBD 2015 Risk Factors Collaborators. 2016. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* **388**, 1659-1724.
 19. Gonzalez-Burgos, E. and Gomez-Serranillos, M. P. 2012. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. *Curr. Med. Chem.* **19**, 5319-5341.
 20. Halliwell, B. H. and Gutteridge, J. M. C. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* **186**, 1-85.
 21. Hanahan, D. and Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-65.
 22. Hartwell, L. H. and Kastan, M. B. 1994. Cell cycle control and cancer. *Science* **266**, 1821-1828.
 23. Hoeijmakers, J. H. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**, 366-374.
 24. Ito, Y., Yoshida, H., Uruno, T., Takamura, Y., Miya, A., Kuma, K. K. and Miyauchi, A. 2004. Expression of cdc25A and cdc25B phosphatase in breast carcinoma. *Breast Cancer* **11**, 295-300.
 25. Jin, P., Gu, Y. and Morgan, D. O. 1996. Role of inhibitory CDC2 phosphorylation in radiation-induced G2 arrest in human cells. *J. Cell Biol.* **134**, 963-970.
 26. Kedare, S. B. and Singh, R. P. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol.* **48**, 412-422.
 27. Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuasen, R. G., Welcker, M., Bartek, J. and Lukas, J. 2000. Rapid destruction of Cdc 25A in response to DNA damage. *Science* **288**, 1425-1429.
 28. Malumbres, M. and Barbacid, M. 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 153-166.
 29. Mraz, M., Malinova, K., Kotaskova, J., Pavlova, S., Tichy, B., Malcikova, J., Stano, K. K., Smardova, J., Brychtova, Y., Doubek, M., Trbusek, M., Mayer, J. and Pospisilova, S. 2009. miR-34a, miR-29c and miR-17-5p are downregulated in CLL patients with TP53 abnormalities. *Leukemia* **23**, 1159-1163.
 30. Neergheen, V. S., Bahorun, T., Taylor, E. W., Jen, L. S. and Aruoma, O. I. 2010. Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. *Toxicology* **278**, 229-241.
 31. Niedzwiecki, A., Roomi, M. W., Kalinovsky, T. and Rath, M. 2016. Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations. *Nutrients* **8**, E552.
 32. Nilsson, I. and Hoffmann, I. 2000. Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog. Cell Cycle Res.* **4**, 107-114.
 33. O'Connor, P. M. 1997. Mammalian G1 and G2 phase checkpoints. *Cancer Surv.* **29**, 151-182.
 34. Rix, M. 2013. LITSEA POPULIFOLIA. *Curtis's Botanical Magazine* **30**, 193-200.
 35. Ryan, K. M., Phillips, A. C. and Vousden, K. H. 2001. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 332-337.
 36. Singleton, V. L. and Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic -phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol.Vitic.* **16**, 144-158.
 37. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. and Berneman, Z. N. 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* **36**, 131-149.
 38. Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, A. J. 2000. Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-310.
 39. Wu, W., Fan, Y. H., Kemp, B. L., Walsh, G. and Mao, L.

1998. Overexpression of cdc25A and cdc25B is frequent in primary non-small cell lung cancer but is not associated with overexpression of c-myc. *Cancer Res.* **58**, 4082-4085.
40. Xu, X., Yamamoto, H., Liu, G., Ito, Y., Ngan, C. Y., Kondo, M., Nagano, H., Dono, K., Sekimoto, M. and Monden, M. 2008. CDC25A inhibition suppresses the growth and invasion of human hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. Mol. Med.* **21**, 145-152.
41. Xu, X., Yamamoto, H., Sakon, M., Yasui, M., Ngan, C. Y., Fukunaga, H., Morita, T., Ogawa, M., Nagano, H., Nakamori, S., Sekimoto, M., Matsuura, N. and Monden, M. 2003. Overexpression of CDC25A phosphatase is associated with hypergrowth activity and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. *Clin. Cancer Res.* **9**, 1764-1772.
42. Zhou, B. B. and Elledge, S. J. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**, 433-439.

초록 : 인체 폐암 세포주 A549에서 *Litsea populifolia* 추출물의 항산화 및 항암활성 분석

진수정¹ · 오유나¹ · 정현영¹ · 윤희정² · 박정하² · 권현주^{1,2} · 김병우^{1,2*}

(¹동의대학교 블루바이오소재개발센터, ²동의대학교 공과대학 바이오응용공학부)

본 연구에서는 인체 폐암 세포인 A549를 사용하여 *Litsea populifolia* 에탄올 추출물(EELP)의 항산화 및 항암활성과 그 분자적 기전에 관하여 연구하였다. 먼저 EELP의 DPPH 라디칼 소거활성을 측정된 결과, IC₅₀가 11.71 µg/ml로 유의적인 항산화활성을 보였다. 또한 EELP가 인체폐암세포주인 A549와 정상 폐세포인 IMR90의 세포증식에 미치는 영향을 알아본 결과, 정상세포의 생존율에는 거의 영향을 끼치지 않은 반면, EELP 농도의존적으로 A549 세포의 성장이 저해되었으며, 세포 주기 변화를 분석한 결과 EELP에 의해 A549 세포의 강력한 G1 arrest가 유도되는 것을 확인하였다. EELP에 의해 유도되는 G1 arrest는 세포주기 조절 인자인 Cyclin D1, Cyclin E, Cyclin-dependent kinase인 CDK2와 CDK6의 mRNA 발현 감소와 더불어 단백질 발현 감소와 연관되어 있었다. 또한 EELP 처리에 의한 CDK/Cyclin complex의 발현 저해는 DNA 손상에 의해 활성화되는 CHK2의 활성화 형태인 p-CHK2의 발현 증가에 따른 p53 인산화에 따른 활성화와 CDK 활성화 효소인 CDC25A 탈인산화효소의 인산화에 따른 저해에 의해 나타나는 결과로 사료된다. 이러한 결과들로부터 EELP는 두가지 경로인 p53-의존성과 p53-비의존성(ATM/CHK2/CDC25A/CDK2) 경로를 통해 A549의 G1 arrest를 유도하여 세포 증식을 억제하는 것으로 사료된다. 본 연구결과는 EELP가 폐암에 대한 새로운 항암활성 소재로서 사용될 수 있는 가능성을 시사하며, 또한 EELP의 세포주기 조절에 의한 항암기전을 이해하고 향후 지속적 연구를 하는 데 있어서 귀중한 기초자료로 사용될 수 있을 것이다.