[UCI]I804:24011-200000239138

2010년 2월
석사학위논문

BCH에 의한 구강암 세포 성장억제 기전에서 세포주기 조절인자의 영향

조선대학교 대학원

치 의 학 과

문 인 성

2010년 2월 석사학위논문 BCH에 의한 구강암 세포 성장억제 기전에서 세포주기 조절인자의 영향 문 인 성

BCH에 의한 구강암 세포 성장억제 기전에서 세포주기 조절인자의 영향

Influence of cell cycle regulatory factors in growth inhibition mechanism of KB oral cancer cells by BCH

2010년 2월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

문 인 성

BCH에 의한 구강암 세포 성장억제 기전에서 세포주기 조절인자의 영향

지도교수 김 도 경

이 논문을 치의학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2009년 10월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

문 인 성

문인성의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 김 홍 중 인

위 원 조선대학교 교 수 국 중 기 인

위 원 조선대학교 교 수 김 도 경 인

2009년 11월 일

조선대학교 대학원

목 차

표목차 ····· iii

도목차 ····· iv

Abstract ····· v

Ⅰ. 서론 ····· 1

Ⅱ. 실험재료 및 방법 ····· 6

1. 실험재료 ····· 6

2. 세포주와 세포배양 ····· 6

3. 세포사 측정 ····· 7

4. Immunoblotting ····· 7

5. 실험자료의 통계학적 검정 ····· 8

Ⅲ. 실험결과 ····· 9

1. KB 세포에서 세포성장에 영향을 미치는 BCH의 효과 ····· 9

2. BCH에 의한 cyclin D의 활성 ····· 11

3. BCH에 의한 CDK의 활성 ····· 11

4. BCH에 의한 CDK 저해인자들의 활성 ····· 14

Ⅳ. 총괄 및 고안 ····· 16

Ⅴ. 결론 ····· 20

참고문헌 ····· 21

표 목 차

Table 1. Antiproliferative effect of BCH in KB cells ····· 9

도 목 차

Fig. 1. Time- and concentration-dependent effects of BCH on the cell viability in KB cells ····· 10

Fig. 2. Cyclin D activities by BCH treatment in KB cells ····· 12

Fig. 3. Activities of CDK4 and CDK6 by BCH treatment in KB cells ····· 13

Fig. 4. Activities of CDK inhibitors (p15, p21 and p27) by BCH treatment in KB cells ····· 15

Abstract

Influence of cell cycle regulatory factors in growth inhibition mechanism of KB oral cancer cells by BCH

Moon, In-Sung

Advisor: Prof. Kim, Do Kyung, Ph.D.

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

Objectives : Amino acid transporters are essential for the growth and proliferation in all living cells. Among the amino acid transporters, the system L amino acid transporters are the major nutrient transport system responsible for the Na^+-independent transport of neutral amino acids including several essential amino acids. The system L is divided into two major subgroups, the L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and the L-type amino acid transporter 2 (LAT2). The LAT1 is highly expressed

in cancer cells to support their continuous growth and proliferation. 2-Aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid (BCH) is a model compound for study of amino acid transporter as a system L selective inhibitor. The purpose of this study was to examine the effect of BCH on cell growth suppression in KB human oral epidermoid carcinoma cells and the influence of cell cycle regulatory factors in growth inhibition mechanism of KB cells by BCH.

Materials and methods : The effect of BCH on cell growth suppression and the influence of cell cycle regulatory factors in KB cells were examined using MTT analysis and immunoblotting.

Results : The growth of KB cells was inhibited by BCH in a concentration- and a time-dependent manner. The expression of cyclin D1 by BCH treatment was not different from the control group in KB cells. However the expression of cyclin D3 was remarkably decreased by BCH treatment. Furthermore, BCH inhibited the expression of cyclin-dependent protein kinase 6 (CDK6) in a time-dependent manner. In addition, the expression of CDK inhibitor p27 was increased by BCH treatment in KB cells, but not CDK inhibitors p21 and p15.

Conclusions : These results suggest that the BCH inhibits the growth of KB cells through the intracellular depletion of neutral amino acids for cell growth induced by inhibition of LAT1 activity. In addition, these results suggest that the BCH arrests the G1 phase of cell cycle through the inhibition of cyclin D3-CDK6 complex expression for cell cycle progression induced by increase of p27 expression in KB cells.

Ⅰ. 서 론

우리나라 인구 5명 중 1명이 암으로 사망하는 것으로 보고되고 있으며, 암 발생으로 인한 사망자 수는 해마다 증가하고 있다(1). 구강악안면 영역은 신체부위 중 가장 뚜렷한 노출부위이므로 구강악안면 영역의 암 발생 시 야기되는 외관파괴, 저작과 발음 등의 기능손상은 발전된 성형기술과 보철기술로도 원상회복이 매우 어렵다(2). Kwon 등(1)은 구강악안면 영역의 암발생에는 흡연과 음주 및 불량한 구강상태가 상협적으로 작용한다고 보고하였으며, 또한 불량한 치아상태가 구강암의 위험을 증가시키는데, 이는 바이러스 혹은 화학적 발암물질의 침입을 용이하게 하기 때문이라고 추정하였다.

구강, 인두, 후두 및 타액선을 포함하는 구강악안면 영역의 암 발생율은 전체 악성종양의 약 3 - 5%에 해당하고 그중 90% 이상이 편평상피세포암으로 보고되고 있으며, 한국에서는 그 비율이 증가하는 추세이다(3). 구강악안면 영역의 암은 다른 부위의 암에 비해 쉽게 생검할 수 있고, 치료효과의 모니터링이 다른 부위의 암과 달리 간편하여 화학 및 방사선요법 혹은 유전자요법의 대상으로 훌륭한 모델이 될 수 있다. 그럼에도 불구하고 구강악안면 영역의 암은 다른 암에 비해 그 발생기전 등 분자생물학적 접근이 가장 되어있지 않은 암 중의 하나이다. 게다가 정상 구강악안면 영역 상피세포뿐만 아니라 구강악안면 영역의 편평세포암종 세포에서 세포 내 필수영양물질인 아미노산을 수송할 수 있는 아미노산 수송체의 연구 또한 부족한 실정이다.

아미노산은 단백질 합성의 기질이 되며, 효소, 호르몬 및 신경전달물질들의 합성에 필수적이다. 세포 안에서 필요한 아미노산의 수송은 세포막에 위

치한 아미노산 수송체를 통하여 이루어진다(4).

아미노산 수송계 L은 중성아미노산을 수송하는 세포막 단백질로서 암세포를 포함한 대부분의 세포에서 중성아미노산의 주 경로가 되는 아미노산 수송계로 알려져 있다(4-6). 또한 아미노산 수송계 L은 중성아미노산 뿐만 아니라 L-dopa, melphalan, gabapentin 및 thyroid hormone 같은 아미노산 구조를 가진 약물들도 수송할 수 있으므로 약물 수송체로 간주되기도 한다(4,7-11).

Kanai 등에 의해 아미노산 수송계 L의 첫 번째 아형인 L-type amino acid transporter 1(LAT1)이 C6 glioma 세포에서 동정되었다(12). LAT1은 12회 세포막을 관통하는 막 단백질로서 leucine, isoleucine, valine, phenylalanine, tyrosine, methionine, tryptophan 및 histidine 같은 구조가 큰 중성아미노산을 수송하는 특징을 가지고 있다(12-16). LAT1은 뇌, 태반, 정소 등 그 발현하는 부위가 제한되어 있으며(12,17), 암세포와 같이 세포 내 대사가 특이적으로 항진되거나 계속적인 증식과 성장이 필수적인 세포에서 과발현되어 세포의 계속되는 성장에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(12,13,18,19). LAT1의 분자적 동정 후에 LAT1과 구조적으로 관련이 있는 아미노산 수송계 L의 두 번째 아형인 L-type amino acid transporter 2(LAT2)가 동정되었다(6,20-22). LAT1이 암세포에 과발현 된다고 알려진 것과는 달리, LAT2는 많은 정상조직에서 발현을 보이며, 구조가 큰 중성아미노산뿐만 아니라 구조가 작은 중성아미노산도 모두 수송하는 특성을 가지고 있다(21-23).

아미노산 수송체 LAT1과 LAT2의 특성을 보면, 암세포에서 과발현 되는 LAT1의 조절을 통해 암세포 성장억제를 위한 방법을 제시할 수 있다. 암세

포에서 LAT1의 활성을 억제하여 세포 내 중성아미노산의 고갈을 유도한다면 암세포 성장억제를 유도할 수 있을 것이다.

세포증식이란 정지기에 있던 세포가 세포주기를 따라 분열이 일어나면서 증식하는 것을 말한다. 세포주기는 G_0 phase(정지기), G_1 phase, S phase(DNA 합성기), G_2 phase 및 M phase(분열기)로 이루어지며, 각각의 단계들은 cyclin(activating proteins)-CDK(cyclin-dependent protein kinases) 복합체와 여러 suppressor protein들에 의해 조절된다(24-26). G_0 phase의 세포들은 G_1 phase에 있는 세포들보다 단백질 합성이 절반 이하로 감소하여, 세포의 크기만 유지하는 성장정지 상태를 보인다(24). G_0 phase에서 G_1 phase로의 진행은 platelet-derived growth factor(PDGF), fibroblast growth factor(FGF) 및 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA) 등과 같은 인자들(growth factor)이 관여하며, G_1 phase에서 S phase로의 진행에는 epidermal growth factor(EGF), insulin-like growth factor I(IGF I) 및 insulin 등과 같은 인자들(progression factor)이 관여한다고 알려져 있다(27,28).

여러 종류의 성장인자들에 의해 활성화된 신호전달물질들은 Ras, Raf, Myc, Fos나 Jun 등과 같은 원종양유전자(proto-oncogene)의 발현을 증가시키며, 다음 단계로 G_1 phase를 담당하는 G_1 phase cyclin들의 발현이 증가하게 된다(29). 포유동물 세포에서 G_1/S phase에서 특정 역할을 나타내는 G_1 phase cyclin으로는 type A, type D 및 type E 등이 있다(29). G_1 phase cyclin 중 cyclin D(cyclin D1, cyclin D2, cyclin D3)는 G_1 phase를 조절하는 중요한 조절인자로 알려져 있다(29). 즉, cyclin D는 초기의 G_1 phase 조절에 관여하며, CDK4 또는 CDK6와 결합한 후 CDK의 인산화를 유도하여 활성화

시킴으로써, 세포주기를 시작하는데 중심적인 역할을 한다(29). 이때 형성된 cyclin D-CDK 복합체가 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)과 결합하고, PCNA가 DNA polymerase를 활성화시켜 DNA 복제를 증가시키게 된다(30).

한편, cyclin E는 G_1-S 전이에 필수적인 인자이며, G_1 phase 말기에 발현되어 CDK2와 결합한 후, G_1-S phase 전이기에 CDK2의 활성도가 최고에 도달하도록 유도한다(29). Cyclin E는 S phase에 들어가면 분해효소에 의해 대사 되어 활성도가 떨어지며, 이때 분리된 CDK2는 cyclin A와 결합하여 다시 활성화 된다(29). 이와 같이 cyclin E와 cyclin A가 단계적으로 CDK2를 활성화시킴으로써 S phase에서 DNA 복제를 유도한다.

S phase가 지나면 G_1 cyclin들의 양과 활성도가 급격히 감소하면서 G_2 phase로 세포주기가 진행되며, 이때 G_1 cyclin들의 활성이 감소하지 않고 지속된다면 S phase에서 G_2 phase로의 진행이 차단되어 세포는 S phase에서 정지한다(29). 즉, G_1 cyclin들은 필요시에 발현되어 활성화되며, 그 역할이 완수되면 곧바로 분해되어야 만 정상적인 세포주기가 진행될 수 있는 것이다.

2-Aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid(BCH)는 수송체 연구에 주로 이용되는 아미노산 수송계 L의 선택적 억제제이다(12-14,22,31,32). 아미노산 수송계 L이 leucine, isoleucine, valine, phenylalanine, methionine 및 histidine 등의 필수아미노산을 포함한 중성아미노산을 수송하기 때문에, 만약 암세포에서 수송계 L이 BCH 같은 억제제에 의해 차단된다면 암세포는 세포성장과 증식에 필수적인 필수아미노산이 고갈됨으로 큰 손상을 입을 것이다. 그러나 이러한 아미노산 수송억제에 의한 세포성장 억제기전에 관한 실험적

자료는 거의 없다.

따라서 본 연구에서 사람 구강 편평세포암종 KB 세포를 이용하여 아미노산 수송계 L 억제제인 BCH의 암세포 성장억제에 미치는 효과와 세포성장억제기전에서 세포주기 조절인자들의 영향을 밝히고자 하며, 아울러 아미노산 수송체 LAT1의 억제를 통한 구강암 치료의 효용성을 제시하고자 하였다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

BCH와 N-methylthiotetrazole(MTT)은 Sigma(St Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, ECL detection kit는 Amersham Biosciences Corp.(Piscataway, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다. Anti-cyclin D1 antibody, anti-cyclin D3 antibody, anti-CDK4 antibody, anti-CDK6 antibody, anti-p15 antibody, anti-p21 antibody, anti-p27 antibody 및 anti-β-actin antibody는 Cell Signaling Technology, Inc.(Danvers, MA, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 기타 분석시약들은 analytical grade를 구입하여 사용하였다.

사람 구강 편평세포암종 KB 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 제공받아 실험에 이용하였다.

2. 세포주와 세포배양

KB 세포는 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL, Rockville, MD, USA) 및 항생제(100u/ml penicillin, 100㎍/ml streptomysin)가 함유된 37℃의 Dulbecco's Modified Eagles Medium(DMEM, Gibco BRL, Rockville, MD, USA)과 F-12 배지가 3:1로 혼합된 성장배지 하에서 배양하면서 사용하였다.

3. 세포사 측정(MTT 분석)

BCH에 의한 세포성장 억제효과를 관찰하기 위해 37℃의 성장배지 하에서 배양된 KB 세포를 수집하여 24well plate에 접종(5×10^3cell/well)하고, 접종 24시간 후 BCH 다양한 농도를 1 - 2일 처리하여 37℃에서 반응 시킨 후, 세포성장 억제효과를 MTT 분석으로 측정하였다. MTT 분석은 KB 세포에 MTT 용액을 37℃에서 4시간 처리한 후, MTT 용액을 제거하고 0.04N HCl이 함유된 isopropanol로 세포를 용해하여 570nm에서 흡광도를 측정하여 시행하였다.

4. Immunoblotting

BCH에 의한 세포성장 억제기전을 확인하기 위해 immunoblotting을 시행하였다. 10cm 배양접시에 5×10^5의 KB 세포를 접종하였다. 24시간 배양한 후, BCH 20mM을 1 - 2일 처리하여 37℃에서 반응시킨 후 세포를 수집하였다. 세포를 4℃의 PBS로 2회 세척한 후, 4℃의 lysis buffer(1% Triton X-100, 0.5mM EDTA, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5μg/ml aprotinin 및 5 μg/ml leupeptin이 포함된 PBS)에서 30분간 반응시켰다. 세포 용해물을 12,500 X g 에서 20분간 원심분리한 후, 단백질 시료를 정량하였다. 단백질 시료를 2배의 SDS sample buffer(60mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 25% glycerol, 14.4mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)에 넣고 100℃에서 5분간 변성 시킨 후, SDS-polyacrylamide gel에 전기영동한 다음

nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. Membrane을 5% fat-free dry milk-PBST buffer(PBS, 0.2% Tween-20)에서 2시간 동안 blocking하였고, PBST buffer로 15분간 3회 세척하였다. 일차항체로 anti-cyclin D1 antibody (1:1,000), anti-cyclin D3 antibody (1:1,000), anti-CDK4 antibody (1:1,000), anti-CDK6 antibody (1:1,000), anti-p15 antibody (1:1,000), anti-p21 antibody (1:1,000), anti-p27 antibody (1:1,000) 및 anti-β-actin antibody (1:2,000)를 사용하였으며, 이차항체로 horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG를 5,000배 희석하여 사용하였다. ECL detection kit를 사용하여 X-ray 필름에 현상한 후 분석하였다.

5. 실험자료의 통계학적 검정

모든 실험성적은 mean ± SEM으로 나타내었고, 각 실험군 간의 유의성 검정은 ANOVA 후에 Student's t-test를 하였으며, p-value가 0.05 미만 ($p<0.05$)의 경우에서 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

Ⅲ. 실험결과

1. KB 세포에서 세포성장에 영향을 미치는 BCH의 효과

KB 세포에서 BCH에 의한 세포성장 억제효과를 조사하기 위해 MTT 분석을 시행하였다. BCH를 0, 0.3, 1, 3, 10, 20 및 50mM의 다양한 농도로 1일과 2일 동안 KB 세포에 투여한 후 MTT 검사를 시행한 결과, BCH 0.3, 1 및 3mM의 농도에서는 대조군과 비교하였을 때 세포성장 억제의 차이를 볼 수 없었다(Fig. 1). 그러나 BCH 10, 20 및 50mM에서는 대조군과 비교하여 볼 때 뚜렷한 세포성장 억제효과를 볼 수 있었으며, 이 효과는 시간과 농도에 의존적임을 확인할 수 있었다(Fig. 1). KB 세포성장 억제에 대한 BCH의 IC_{50}은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Antiproliferative effect of BCH in KB cells

Days	IC_{50} (mM)
1 day	19.9 ± 2.7
2 days	11.7 ± 0.9

The IC_{50} values represent the mean ± SEM for three experiments.

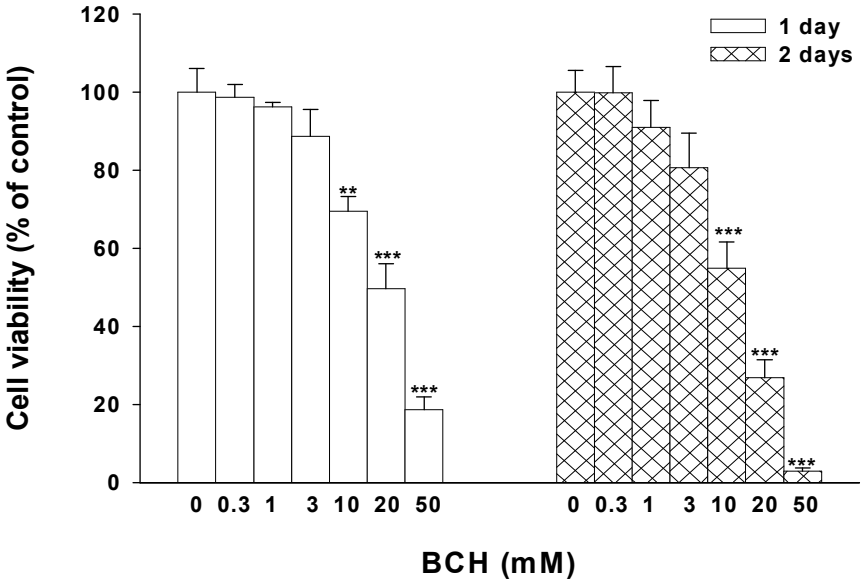

Fig. 1. Time- and concentration-dependent effects of BCH on the cell viability in KB cells. The KB cells were treated with 0, 0.3, 1, 3, 10, 20 and 50 mM BCH for 1 - 2 days. The cell viabilities were determined by the MTT assays. The percentage of cell viability was calculated as a ratio of A570 nm of BCH treated cells and untreated control cells. Each data point represents the mean ± SEM for three experiments. $^{**}P<0.01$ vs. control and $^{***}P<0.001$ vs. control (the control cells measured in the absence of BCH).

2. BCH에 의한 cyclin D의 활성

BCH가 KB 세포의 증식을 현저히 억제시키므로, 세포주기 관련인자들의 발현정도를 측정하기 위하여 immunoblotting을 시행하였다. 세포주기와 관련이 높은 인자 중 cyclin D의 발현정도를 측정하기 위해 BCH 20mM을 처리한 KB 세포의 단백질을 추출하여 확인한 결과, cyclin D1의 발현은 BCH 처리 1일과 2일군에서 대조군과 차이가 없었다(Fig. 2). 그러나 cyclin D3는 BCH를 처리하지 않은 대조군에서는 높은 발현을 보였으나, BCH 처리 1일과 2일군에서는 거의 발현하지 않았다(Fig. 2).

3. BCH에 의한 CDK의 활성

CDK4와 CDK6의 발현정도를 측정하기 위해 KB 세포에 20mM BCH를 처리한 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이 CDK4의 발현은 BCH 처리 1일과 2일군에서 대조군과 차이가 없었다. 그러나 CDK6는 BCH를 처리하지 않은 대조군에서는 높은 발현을 보였으나, BCH 처리 1일과 2일군에서 BCH 처리시간에 의존적으로 발현이 감소하였다(Fig. 3).

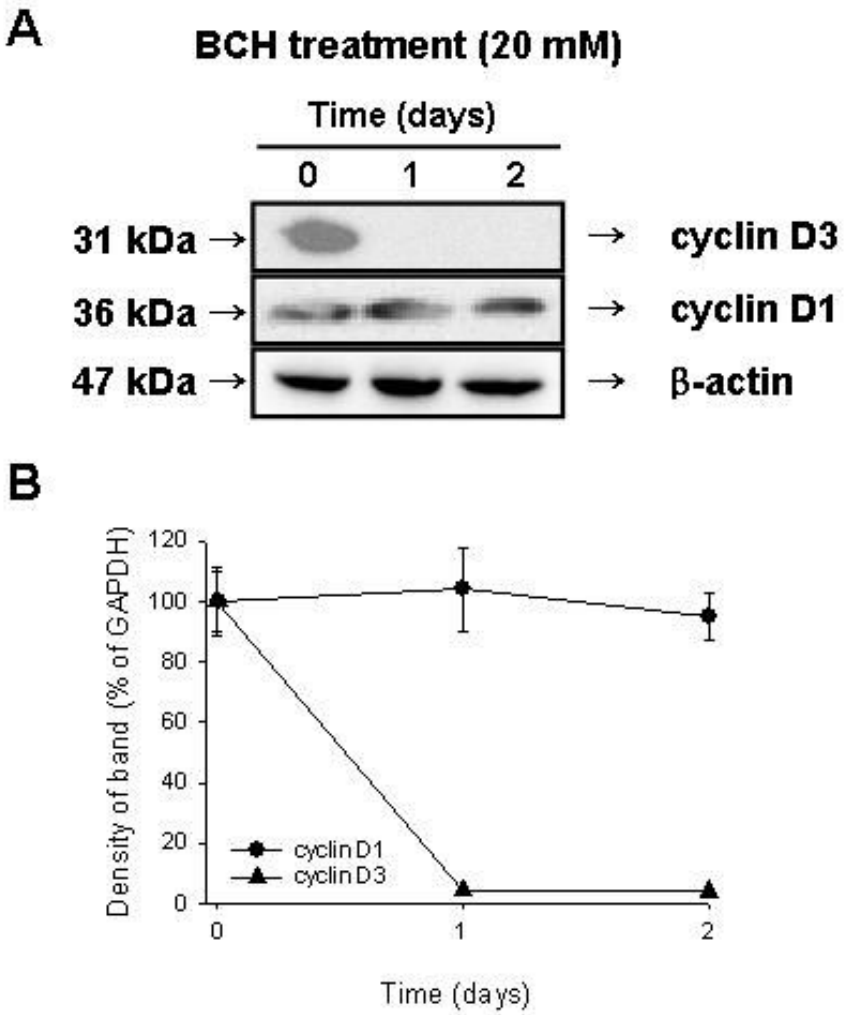

Fig. 2. Cyclin D activities by BCH treatment in KB cells. The cells were treated with BCH 20 mM for indicated time periods. The cell lysate was prepared and analyzed by Western blot analysis.

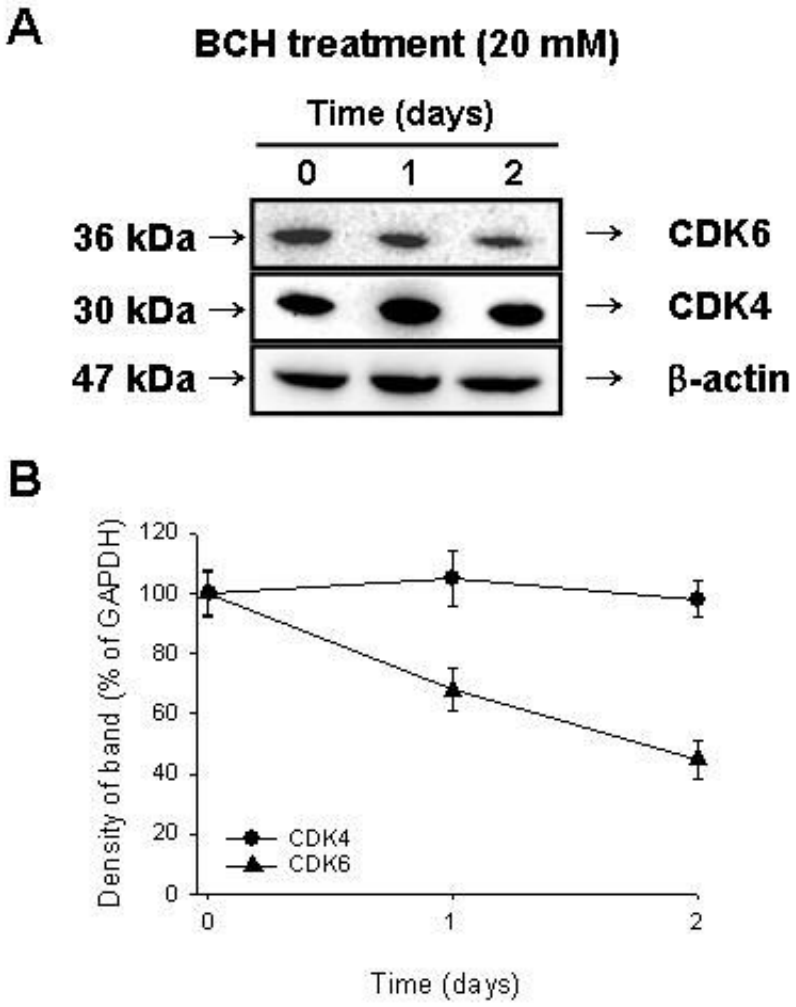

Fig. 3. Activities of CDK4 and CDK6 by BCH treatment in KB cells. The cells were treated with BCH 20 mM for indicated time periods. The cell lysate was prepared and analyzed by Western blot analysis.

4. BCH에 의한 CDK 저해인자들의 활성

CDK 저해인자인 p15, p21 및 p27의 발현정도를 측정하기 위해, BCH 20mM을 1일과 2일 처리한 KB 세포의 단백질을 추출하여 immunoblotting을 시행하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 p27은 BCH를 처리하지 않은 대조군에서는 거의 발현하지 않았으나, BCH 처리 1일과 2일군에서 BCH 처리시간에 의존적으로 발현이 현저히 증가하였다. 그러나 p21과 p15은 BCH를 처리하지 않은 대조군에서는 높은 발현을 보였으나, BCH 처리 1일과 2일군에서는 발현이 감소하였다(Fig. 4).

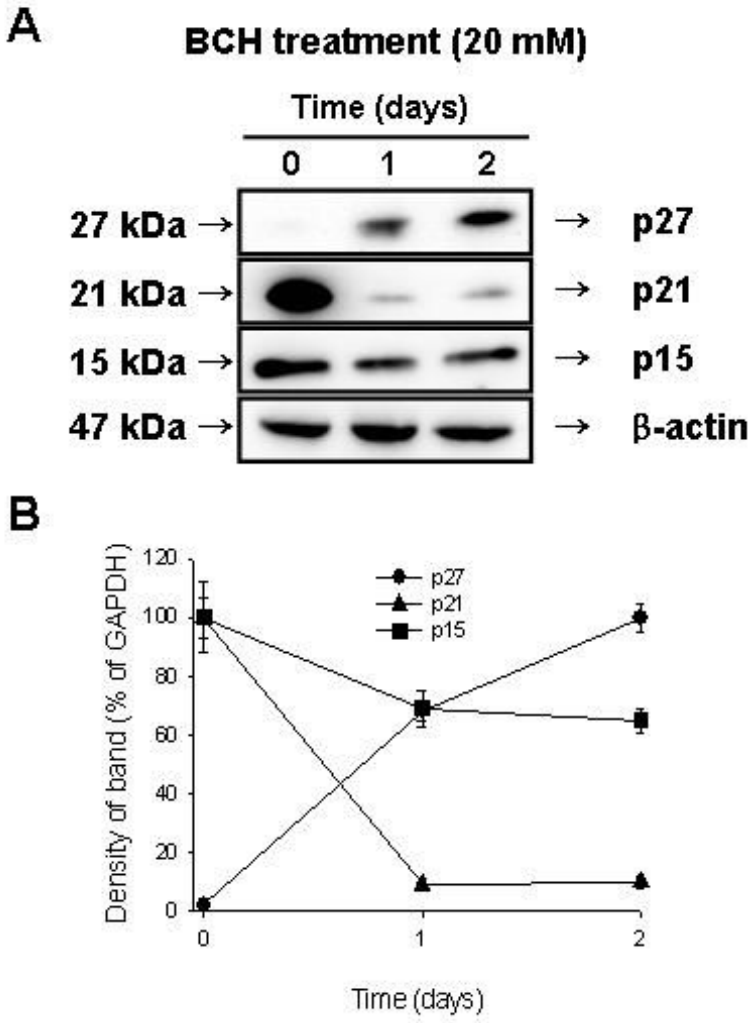

Fig. 4. Activities of CDK inhibitors (p15, p21 and p27) by BCH treatment in KB cells. The cells were treated with BCH 20 mM for indicated time periods. The cell lysate was prepared and analyzed by Western blot analysis.

Ⅳ. 총괄 및 고안

본 연구에서 사람 구강 편평세포암종 KB 세포를 이용하여 아미노산 수송계 L 억제제인 BCH의 암세포 성장억제에 미치는 효과와 세포성장 억제에서 세포주기 조절인자들의 영향을 조사하였다.

세포성장 억제효과를 조사하기 위한 MTT 실험에서, BCH는 시간과 농도에 의존적으로 KB 세포의 성장을 억제시켰다(Fig. 1). 이는 시간과 농도에 의존적으로 암세포의 성장을 억제시키는 항암효과를 지닌 여러 화합물들([6]-paradol, norcantharidin, baccatin 등)에서의 연구결과(33-35)와 일치하는 것이었다. 본 연구실의 이전 연구에서 사람 구강 편평세포암종 KB 세포에서는 아미노산 수송계 L 중에서 LAT1과 그 보조인자 4F2hc는 발현하지만 아미노산 수송계 L의 또 다른 아형인 LAT2는 발현하지 않는다고 밝혔으며, BCH에 의한 L-leucine 수송억제를 밝혀 KB 세포에서 L-leucine을 포함한 중성아미노산의 수송에는 LAT1이 중요한 기능을 하고 있다고 보고한 바 있다(36). KB 세포에서는 아미노산 수송계 L 중에서 LAT1이 존재하여 이를 통해 중성아미노산이 수송되며, 또 BCH는 시간과 농도에 의존적으로 KB 세포의 성장을 억제시켰다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때, 사람 구강 편평세포암종 KB 세포에서 BCH에 의한 세포성장 억제는 중성아미노산을 수송하는 LAT1의 활성을 BCH가 억제하여 세포성장에 필수적인 필수아미노산을 다수 포함하는 중성아미노산들의 세포 내 고갈을 유도함으로서 KB 세포의 성장억제를 유도하는 것으로 사료된다.

암세포 apoptosis 유도는 항암제 개발에 가장 유용한 전략이며, 많은 연구

자들이 암세포들의 apoptosis를 유도하는 연구를 시행하고 있다(37-40). 본 연구실의 이전 연구에서 BCH에 의한 KB 세포성장 억제기전에 apoptosis가 포함되는지를 확인하기 위하여 DNA fragmentation 분석을 시행하여, BCH에 의한 KB 세포의 성장억제 과정에 apoptosis 기전이 포함되는 것을 확인하였으며, BCH에 의해 유도되는 KB 세포 성장억제 과정에 caspase-3와 caspase-7에 의존적인 apoptosis가 포함되어 있음을 보고한 바 있다(41). 따라서 본 연구에서는 BCH에 의한 KB 세포의 성장억제 과정에서 세포주기 과정의 조절기전을 조사하였다.

최근 들어 indole-3-carbinol, isothiocyanate 및 resveratrol 등과 같은 천연물 유래 화학물질들이 암세포들에서 세포성장 억제활성을 나타낸다고 보고된 바 있으며, 이러한 효과는 세포주기에 관여하는 다양한 인자들을 변형시켜 암세포들의 apoptosis를 유도하여 성장을 억제시키는 것으로 보고되었다(40). 세포주기의 조절인자로 잘 알려진 CDK들 중 CDK4와 CDK6는 cyclin D와 함께 세포주기의 G_1 phase와 G_1-S phase에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(29,42). Cyclin D 중 cyclin D1은 원종양유전자로서 사람 암세포들에서 세포주기에 영향을 줄 수 있다고 알려져 있고, 최근의 연구들을 통해 cyclin D1과 유사한 cyclin D2의 생물학적 기능들 및 cyclin D3의 사람 암세포들에서의 중요한 역할들도 보고되었다(29). 본 연구에서도 사람 구강 편평세포암종 KB 세포에서 cyclin D1의 발현은 BCH 처리군과 대조군에서 별다른 차이가 없었으나, cyclin D3의 발현은 BCH 처리에 의해 현저히 감소하였다(Fig. 2). 또한 CDK4의 발현은 BCH 처리군과 대조군에서 별다른 차이가 없었으나, CDK6는 BCH 처리시간에 의존적으로 발현이 감소하였다(Fig. 3). 이러한 연구결과를 선행연구자들의 연구결과(29,40,42)와 같이 고찰하여 볼

때, 사람 구강 편평세포암종 KB 세포에서 아미노산 수송계 L의 선택적 억제제 BCH는 CDK6의 인산화 활성을 감소시키고 또한 cyclin D3의 발현을 감소시켜, 결국 KB 세포의 세포주기 진행을 억제시키는 것으로 사료된다.

본 연구에서 CDK의 활성억제에 중요한 역할을 하는 저해인자들의 발현을 확인하였다. CDK 저해인자는 암 억제 단백질로 알려져 있으며, 이들은 cyclin-CDK 복합체와 결합하여 인산화 활성을 억제한다고 알려져 있다(29). CDK 저해인자 p15은 세포주기 과정 중 cyclin D/CDK4 복합체 또는 cyclin D/CDK6 복합체에 관련된 pRb의 인산화를 억제하여 G_1 phase에서 S phase로의 진행을 억제시키는 것으로 알려져 있다(29). CDK 저해인자 p21 단백질은 세포주기에서 cyclin D/CDK4 복합체 또는 cyclin D/CDK6 복합체에 결합하여 인산화 활성을 억제하며, CDK 저해인자 p27은 세포주기 중 G_1 phase에서 S phase로의 과정에서 cyclin D나 cyclin E에 의존적인 인산화 활성을 억제한다(43). 본 연구에서도 p27의 발현은 BCH 처리시간에 의존적으로 증가하였으나, p21과 p15의 발현은 감소하였다(Fig. 4). 이러한 연구결과를 선행연구자들의 연구결과(29,43)와 같이 고찰하여 볼 때, KB 세포의 세포주기 과정에서 BCH는 CDK 저해인자인 p27을 증가시켜 CDK6의 활성을 감소시키는 것으로 사료된다. 그러나 BCH가 유도하는 암세포 성장억제에 관한 세포 및 분자적 기전연구는 더 추구하여야 할 과제로 생각된다.

결론적으로, 본 연구의 결과로서 사람 구강 편평세포암종 KB 세포에서 아미노산 수송계 L 억제제 BCH는 KB 세포에서 높게 발현하는 LAT1의 활성을 억제하여 세포성장에 필수적인 L-leucine 등 중성아미노산의 세포 내 고갈을 유도함으로서 KB 세포의 성장을 억제시키는 것으로 사료된다. 또한 BCH는 KB 세포에서 CDK 저해인자인 p27의 발현증가를 유도하여 CDK6와

cyclin D3의 발현을 억제시킴으로서 세포주기 중 G_1 phase를 억제시키는 것으로 사료된다. 본 연구의 결과로 LAT1 억제제를 이용한 구강암 세포 성장 억제에 관한 하나의 방향을 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

Ⅴ. 결 론

사람 구강 편평세포암종 KB 세포를 이용하여 아미노산 수송계 L 억제제인 BCH의 암세포 성장억제에 미치는 효과와 세포성장 억제기전에서 세포주기 조절인자들의 영향을 밝히기 위해, KB 세포에서 MTT 분석 및 immunoblotting을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 아미노산 수송계 L의 선택적 억제제인 BCH는 시간과 농도에 의존적으로 KB 세포의 성장을 억제시켰다.
2. KB 세포에서 cyclin D1의 발현은 BCH 처리군과 대조군에서 차이가 없었으나, cyclin D3의 발현은 BCH 처리에 의해 현저히 감소되었다.
3. KB 세포에서 CDK4의 발현은 BCH 처리군과 대조군에서 차이가 없었으나, CDK6는 BCH 처리시간에 의존적으로 발현이 감소하였다.
4. KB 세포에서 CDK 저해인자 p27의 발현은 BCH 처리시간에 의존적으로 증가하였으나, CDK 저해인자 p21과 p15의 발현은 감소하였다.

본 연구의 결과로서 사람 구강 편평세포암종 KB 세포에서 아미노산 수송계 L 억제제 BCH는 LAT1의 활성을 억제하여 중성아미노산의 세포 내 고갈을 유도함으로서 KB 세포의 성장을 억제시키는 것으로 사료된다. 또한 BCH는 KB 세포에서 p27의 발현증가를 유도하여 CDK6와 cyclin D3의 발현을 억제시킴으로서 세포주기 중 G_1 phase를 억제시키는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Kwon HK, Cha IH, Lim SJ, Choi CH, Kim BI. 2002. Risk factors for oral cancer; A case-control study. *J Kor Oral Maxillofac Surg* 28: 395-400.

2. Kim HD, Paik DI, Jung SH, Park DY, Kim JB. 2004. Factors influencing knowledge about early signs and causes of oral cancer in Korean elders. *J Korean Acad Dent Health* 28: 570-578.

3. Hong SD, Hong SP, Paik SM, Nam YW, Lee SP, Lee JI, Lim CY. 2001. p53 Alterations during 7,12-dimethylbenza(a)nthracene induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Kor J Oral Maxillofac Pathol* 25: 309-323.

4. Christensen HN. 1990. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev* 70: 43-77.

5. Silbernagl S. 1979. Renal transport of amino acids. *Klin Wochenschr* 57: 1009-1019.

6. Kanai Y, Endou H. 2001. Heterodimeric amino acid transporters: molecular biology and pathological and pharmacological relevance. *Curr*

Drug Metab 2: 339-354.

7. Gomes P, Soares-da-Silva P. 1999. L-DOPA transport properties in an immortalised cell line of rat capillary cerebral endothelial cells, RBE 4. *Brain Res* 829: 143-150.

8. Goldenberg GJ, Lam HY, Begleiter A. 1979. Active carrier-mediated transport of melphalan by two separate amino acid transport systems in LPC-1 plasmacytoma cells in vitro. *J Biol Chem* 254: 1057-1064.

9. Blondeau JP, Beslin A, Chantoux F, Francon J. 1993. Triiodothyronine is a high-affinity inhibitor of amino acid transport system L1 in cultured astrocytes. *J Neurochem* 60: 1407-1013.

10. Su TZ, Lunney E, Campbell G, Oxender DL. 1995. Transport of gabapentin, a gamma-amino acid drug, by system 1 alpha-amino acid transporters: a comparative study in astrocytes, synaptosomes, and CHO cells. *J Neurochem* 64: 2125-2131.

11. Lakshmanan M, Goncalves E, Lessly G, Foti D, Robbins J. 1990. The transport of thyroxine into mouse neuroblastoma cells, NB41A3: the effect of L-system amino acids. *Endocrinology* 126: 3245-3250.

12. Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E, Endou H.

1998. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem* 273: 23629-23632.

13. Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim DK, Segawa H, Nii T, Cha SH, Matsuo H, Fukushima J, Fukasawa Y, Tani Y, Taketani Y, Uchino H, Kim JY, Inatomi J, Okayasu I, Miyamoto K, Takeda E, Goya T, Endou H. 2001. Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1514: 291-302.

14. Uchino H, Kanai Y, Kim do K, Wempe MF, Chairoungdua A, Morimoto E, Anders MW, Endou H. 2002. Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanisms of substrate recognition. *Mol Pharmacol* 61: 729-737.

15. Mastroberardino L, Spindler B, Pfeiffer R, Skelly PJ, Loffing J, Shoemaker CB, Verrey F. 1998. Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature* 395: 288-291.

16. Pfeiffer R, Spindler B, Loffing J, Skelly PJ, Shoemaker CB, Verrey F. 1998. Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cysteine

residues involved in disulfide bond. *FEBS Lett* 439: 157-162.

17. Nakamura E, Sato M, Yang H, Miyagawa F, Harasaki M, Tomita K, Matsuoka S, Noma A, Iwai K, Minato N. 1999. 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J Biol Chem* 274: 3009-3016.

18. Sang J, Lim YP, Panzica M, Finch P, Thompson NL. 1995. TA1, a highly conserved oncofetal complementary DNA from rat hepatoma, encodes an integral membrane protein associated with liver development, carcinogenesis, and cell activation. *Cancer Res* 55: 1152-1159.

19. Wolf DA, Wang S, Panzica MA, Bassily NH, Thompson NL. 1996. Expression of a highly conserved oncofetal gene, TA1/E16, in human colon carcinoma and other primary cancers: homology to Schistosoma mansoni amino acid permease and Caenorhabditis elegans gene products. *Cancer Res* 56: 5012-5022.

20. Verrey F, Meier C, Rossier G, Kuhn LC. 2000. Glycoprotein-associated amino acid exchangers: broadening the range of transport specificity. *Pflugers Arch* 440: 503-512.

21. Pineda M, Fernandez E, Torrents D, Estevez R, Lopez C, Camps M, Lloberas J, Zorzano A, Palacin M. 1999. Identification of a membrane protein, LAT-2, that co-expressed with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small large zwitterionic amino acids. *J Biol Chem* 274: 19738-19744.

22. Segawa H, Fukasawa Y, Miyamoto K, Takeda E, Endou H, Kanai Y. 1999. Identification and functional characterization of a Na^+-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J Biol Chem* 274: 19745-19751.

23. Rossier G, Meier C, Bauch C, Summa V, Sordat B, Verrey F, Kuhn LC. 1999. LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J Biol Chem* 274: 34948-34954.

24. Pines J. 1994. The cell cycle kinases. *Semin Cancer Biol* 5: 305-313.

25. Nigg EA. 1995. Cyclin-dependent protein kinases: Key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 17: 471-480.

26. Morgan DO. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* 374: 131-134.

27. Chen MH, Chen SH, Wang QF, Chen JC, Chang DC, Hsu SL, Chen CH, Sheue CR, Liu YW. 2008. The molecular mechanism of

gypenosides-induced G1 growth arrest of rat hepatic stellate cells. *J Ethnopharmacol* 117:309-317.

28. Ben-Ze'ev A, Reiss R, Bendori R, Gorodecki B. 1990. Transient induction of vinculin gene expression in 3T3 fibroblasts stimulated by serum-growth factors. *Cell Regulation* 1: 621-636.

29. Malumbres M, Barbacid M. 2007. Cell cycle kinases in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 17: 60-65.

30. Frouin I, Montecucco A, Biamonti G, Hubscher U, Spadari S, Maga G. 2002. Cell cycle-dependent dynamic association of cyclin/Cdk complexes with human DNA replication proteins. *EMBO J* 21: 2485-2495.

31. Kim DK, Kanai Y, Choi HW, Tangtrongsup S, Chairoungdua A, Babu E, Tachampa K, Anzai N, Iribe Y, Endou H. 2002. Characterization of the system L amino acid transporter in T24 human bladder carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1565: 112-121.

32. Sloan JL, Mager S. 1999. Cloning and functional expression of a human Na^+ and Cl^--dependent neutral and cationic amino acid transporter B^{0+}. *J Biol Chem* 274: 23740-23745.

33. Keum YS, Kim J, Lee KH, Park KK, Surh YJ, Lee JM, Lee SS, Yoon JH, Joo SY, Cha IH, Yook JI. 2002. Induction of apoptosis and caspase-3 activation by chemopreventive [6]-paradol and structurally related compounds in KB cells. *Cancer Lett* 177: 41-47.

34. Miller MC 3rd, Johnson KR, Willingham MC, Fan W. 1999. Apoptotic cell death induced by baccatin III, a precursor of paclitaxel, may occur without G(2)/M arrest. *Cancer Chemother Pharmacol* 44: 444-452.

35. Kok SH, Hong CY, Kuo MY, Lee CH, Lee JJ, Lou IU, Lee MS, Hsiao M, Lin SK. 2003. Comparisons of norcantharidin cytotoxic effects on oral cancer cells and normal buccal keratinocytes. *Oral Oncol* 39: 19-26.

36. Yoon JH, Kim IJ, Kim H, Kim HJ, Jeong MJ, Ahn SG, Kim SA, Lee CH, Choi BK, Kim JK, Jung KY, Lee S, Kanai Y, Endou H, Kim DK. 2005. Amino acid transport system L is differently expressed in human normal oral keratinocytes and human oral cancer cells. *Cancer Lett* 222: 237-245.

37. Rohini G, Devi CS. 2008. Bacopa monniera extract induces apoptosis in murine sarcoma cells. *Phytother Res* 12: 1595-1598.

38. Park SE, Park C, Kim SH, Hossain MA, Kim MY, Chung HY, Son

WS, Kim GY, Choi YH, Kim ND. 2008. Korean *red ginseng* extract induces apoptosis and decreases telomerase activity in human leukemia cells. *J Ethnopharmacol* 121: 304-312.

39. Youn MJ, Kim JK, Park SY, Kim Y, Park C, Kim ES, Park KI, So HS, Park R. 2008. Potential anticancer properties of the water extract of *Inontus obliquus* by induction of apoptosis in melanoma B16-F10 Cells. *J Ethnopharmacol* 121: 221-228.

40. Kaur M, Mandair R, Agarwal R, Agarwal C. 2008. Grape seed extract induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma cells. *Nutr Cancer* 1: 2-11.

41. Kim CS, Cho SH, Chun HS, Lee SY, Endou H, Kanai Y, Kim DK. 2008. BCH, an inhibitor of system L amino acid transporters, induces apoptosis in cancer cells. *Biol Pharm Bull* 31: 1096-1100.

42. Buttitta LA, Edgar BA. 2007. Mechanisms controlling cell cycle exit upon terminal differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 19: 697-704.

43. Hsu SL, Hsu JW, Liu MC, Chen LY, Chang CD. 2000. Retinoic acid-mediated G1 arrest is associated with induction of $p27^{(Kip1)}$ and inhibition of cyclin-dependent kinase 3 in human lung squamous carcinoma CH27 cells. *Exp Cell Res* 258: 322-331.

저작물 이용 허락서

학 과	치의학과	학 번	20087244	과 정	석사
성 명	한글: 문 인 성 영문: Moon, In-Sung				
주 소	(445-779) 경기도 화성시 병점동 안화마을 우남퍼스트빌 2단지 208-1501				
연락처	E-MAIL: ddsmoon@yahoo.co.kr				
논문제목	한글 : BCH에 의한 구강암 세포 성장억제 기전에서 세포주기 조절인자의 영향 영문 : Influence of cell cycle regulatory factors in growth inhibition mechanism of KB oral cancer cells by BCH				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(○) 반대( )

2010년 2월 일

저작자: 문 인 성 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하