

2007년 2월

박사학위 논문

구강암 KB 세포에서  
5'-nitro-indirubinoxime에 의한  
세포주기 억제기전

조선대학교 대학원

치의공학과

김정석

구강암 KB 세포에서  
5'-nitro-indirubinoxime에 의한  
세포주기 억제기전

Mechanisms of Cell Cycle Arrest by  
5'-nitro-indirubinoxime in KB Oral Squamous  
Carcinoma Cells

2007년 2월 일

조선대학교 대학원

치 의 공 학 과

김 정 석

구강암 KB 세포에서  
5'-nitro-indirubinoxime에 의한  
세포주기 억제기전

지도교수 안 상 건

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로  
제출함

2006년 10월 일

조선대학교 대학원

치 의 공 학 과

김 정 석

# 김정석의 박사학위 논문을 인준함

위원장	조선대학교	교수	김	홍	중	인
위 원	동국대학교	교수	김	수	아	인
위 원	조선대학교	교수	박	주	철	인
위 원	조선대학교	교수	윤	정	훈	인
위 원	조선대학교	교수	안	상	건	인

2006년 12월 일

# 조선대학교 대학원

## 목 차

목 차	i
<i>ABSTRACT</i>	ii
I. 서 론	1
II. 연구재료 및 방법	3
1. 인디루빈 유도체 (5'-NIO)의 합성	3
2. 세포 배양	3
3. MTT 분석	4
4. Flow Cytometry 분석	4
5. Western Blot Assay	4
III. 연구결과	6
1. 구강암 KB세포에 대한 5'-NIO의 효과	6
2. 5'-NIO에 의한 세포주기 억제효과	6
3. 세포주기 관련 단백질 발현에 5'-NIO의 효과	7
4. MAPKs의 활성화에 5'-NIO의 작용	10
IV. 고 찰	11
V. 결 론	15
VI. 참고 문헌	16

# *ABSTRACT*

Mechanisms of Cell Cycle Arrest by 5'-nitro-indirubinoxime in  
KB Oral Squamous Carcinoma Cells

Kim Jeong Seok

Advisor : Prof. Sang-Gun Ahn, PhD

Department of Dental Engineering, Graduate School of Chosun University

5'-Nitro-Indirubinoxime (5'-NIO) is known to have anti-tumor effect in human cancer cells. The author finds that low concentrations of 5'-NIO irreversibly inhibits the proliferation of human KB oral squamous carcinoma cells and induces the inhibition of G1/S phase regulatory proteins. 5'-NIO-mediated G1/S specific cyclin-dependent kinases (CDKs) are mediated by two different mechanisms. First, 5'-NIO inhibits CDK4 with affecting significantly cyclin D1/D3 and p16<sup>INK4A</sup>. Second, 5'-NIO inhibits CDK2 by induction of the CDKs inhibitor, p21<sup>waf1</sup>. 5'-NIO-induced cell cycle arrest may induce apoptosis of human KB oral squamous carcinoma cells through mitochondria-dependent activation of caspase cascade. These observations together suggest that 5'-NIO may have a possible therapeutic potential to oral cancer.

# I. 서 론

인디루빈은 약용 식물인 Danggui Longhui Wan의 주요 성분으로 전통적으로 만성 골수성 백혈병을 치료하기 위하여 사용되어 온 중국 전통 약물이다<sup>1-4)</sup>. 최근에 인디루빈과 그 유도체들이 일부 kinase family에 대해 높은 선택성과 특히 cyclin-dependent kinases (CDKs)의 ATP가 결합하는 catalytic site에 결합함으로써 강력한 CDKs의 저해제로 알려지고 있으며, 이는 이들 성분이 항암치료에 이용될 수 있는 가능성을 제시하고 있다<sup>5-8)</sup>. 악성종양 세포에서 항암효과에 대한 정확한 기전은 아직 잘 알려져 있지 않지만, 세포주기 조절 유전자 또는 단백질 저해를 통해 항암효과를 보이는 것으로 믿고 있다. 이를 뒷받침하는 최근 연구로 indirubin-5'-sulfonate과 indirubin-3'-monoxime과 같은 인디루빈 유도체들이 hematopoietic Jurkat 세포와 SV40-transformed human breast epithelial HBL-100 세포에서 CDK1의 활성을 저해 할 뿐만 아니라 세포주기의 G<sub>1</sub>과 G<sub>2</sub>/M 기를 억제하는 결과가 보고되었다<sup>6,9)</sup>. 또한 또 다른 indirubin 유도체인 meisoindigo가 NB4와 U937 백혈병 세포에서 G<sub>1</sub> 세포주기 저해와 세포사를 유도함이 보고되었다<sup>10,11)</sup>. 이들 인디루빈 유도체는 다른 CDKs 저해와 함께 microtubule-binding protein인 tau의 비정상적인 hyperphosphorylation을 유도하는 glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ )에 대한 강력한 저해제로 확인되어, 한편으로는 Alzheimer 병 치료제로의 응용 가능성이 제시되고 있다<sup>12,13)</sup>. GSK 3 $\beta$ 는 WNT 신호 경로에서 중요한 조절인자로 cyclin D1과  $\beta$ -catenin 조절에 의한 세포주기 조절 뿐만 아니라 glycogen 합성에 의한 인슐린 활성조절에 관여한다<sup>14,15)</sup>. 특히 indirubin-3'-monoxime은 뉴론의 apoptosis의 중요한 조절인자인 c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase 저해할 뿐만 아니라 정상적인 중심체 (centrosome) 복제에 영향을 미치지 않고 종양 세포내 비정상적인 중심소체 (centriole)와 중심체의 복제를 선택적으로 저해함이 보고되었다<sup>16)</sup>.

이러한 연구배경을 바탕으로 강력하고 안정적인 항암 효과 물질을 찾기 위해 새로운 인디루빈 유도체를 indirubin-3'-monoxime으로부터 5'-nitro-indirubinoxime (5'-NIO)을 합성하여 그 효능을 *in vivo* 실험동물 모델에서 확인한바 있고, 또한 5'-NIO에 대한 사람 종양세포에서의 항암 효과를 조사한 결과, 기존에 알려진 인디루빈과 indirubin-3'-monoxime보다 낮은 농도에서 월등하게 종양세포를 억제하는 항암효과를 확인하였다<sup>17)</sup>.

사람의 악성종양 세포들은 비정상적인 세포주기와 이를 조절할 수 있는 checkpoint가 결여됨으로서 발생한다. 특히 세포주기에 관여하는 유전자의 돌연변이와 과발현이 비정상적인 세포 또는 악성세포로의 전환을 유도하기 때문에 암 치료의 목적으로 이들 유전자를 조절하는 연구가 많이 진행되고 있다. 구강암 또한 정확한 발생기전이 규명되지 않았지만 이들 유전적인 요인들이 매우 밀접하게 관여하고 있다. 구강암은 전체 암 발생의 5%정도를 차지하고 꾸준히 증가하는 추세에 있으며, 우리나라에서 매년 1500명의 구강암 환자가 발생하는 것으로 추정하고 있다.

따라서 이 연구에서는 5'-NIO을 구강 편평세포암종 KB 세포에 처리한 후 세포주기 유전자 및 checkpoint 조절 유전자 발현의 변화를 분석하고 구강암 세포의 성장억제와의 관련성을 연구 하였으며, 이들 연구로 새로운 인디루빈 유도체인 5'-NIO의 작용 기전을 이해할 뿐만 아니라 구강암의 치료에 활용할 수 있는 가능성을 확인하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 인디루빈 유도체 (5'-NIO)의 합성

인디루빈을 pyridine에 녹인 뒤 hydroxylamine hydrochloride (10 equiv.)을 첨가하고 80-90°C로 열을 가하면서 magnetic stirring으로 녹여주었다. Solvent는 evaporation으로 제거하고 물로 수세하였다. Cyclohexane은 선택적으로 3'-oxime을 만들어내며, Fig. 1에서처럼 indirubin 구조의 R-group을 NO<sub>2</sub>로 치환하여 5'-nitro-indirubinoxime을 합성하였다.

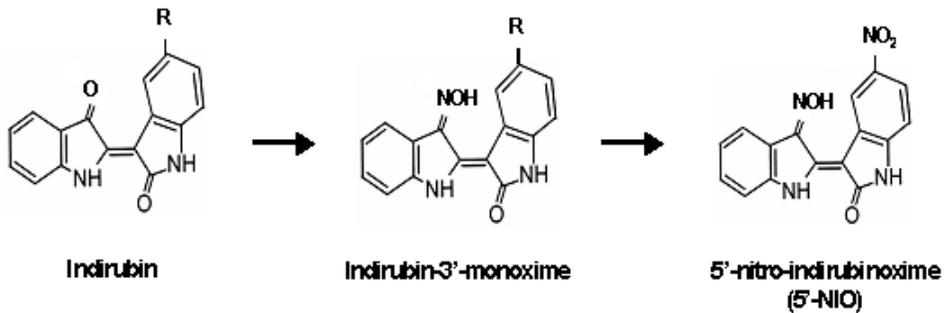


Fig. 1. Chemical structure of indirubin and 5'-nitro-indirubinoxime (5'-NIO).

### 2. 세포 배양

구강 편평세포암종 KB 세포는 ATCC (Manassa, VA)로 부터 구입하였고 5% bovine calf serum과 100 µg/ml streptomycin, 100 units/ml penicillin, 1 XMEM Non-Essential Amino Acid Solution이 포함된 Minimum Essential Medium (MEM)에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에 계대 배양하였다.

5'-nitro-indirubinoxime은 KB 세포에 정해진 시간 및 농도별로 처리하였다.

### 3. MTT 분석

5'-NIO에 대한 KB 세포의 생존율을 조사하기 위하여 6-well plate에  $3 \times 10^5$  cells/well 세포를 seeding 하고 12시간 후 1, 5, 10, 20 uM의 5'-NIO를 시간별로 처리 하였다. KB 세포를 PBS로 washing 하고 MTT가 포함된 배지에서 4시간, 37 °C에서 배양하고, plate reader를 이용하여 492 nm에 세포의 생존율을 조사하였다.

### 4. Flow Cytometry 분석

세포주기 진행과정에서 5'-NIO의 효과를 조사하기 위해 6-well plate에  $3 \times 10^5$  cells/well 세포를 seeding 하고 overnight 후 5 uM의 5'-NIO를 6, 24 및 30시간을 처리하였다. 세포를 trypsinization하여 harvest하고 4°C에서 10분간 70% ethanol로 고정하였다. 고정된 세포는 PBS로 두 번 수세하고 100 ug/ml RNase와 함께 배양한 후 40 ug/ml propidium iodide (PI)로 30분간 실온에서 염색하였다. 세포주기 분석은 Becton Dickinson Facstar flow cytometer (FACS Calibur, Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)와 Becton Dickinson CELLQuest software를 이용하였다.

### 5. Western Blot Assay

5'-NIO를 처리한 후 KB 세포를 ice-cold PBS로 수세하였다. 세포를 200 ul 2X SDS buffer로 용해하고 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel로 분리하고 PVDF membrane에 transfer 하였다. 5% skin milk solution에서 2 시간 blocking 한 후 membrane을 anti-cyclin D1/D3, p21<sup>CIP1/Waf1</sup>, CDK2/4/6, p15<sup>INK4B</sup>, p16<sup>INK4A</sup> (Cell Signal technology), anti-p53, anti-Actin (Sigma),

anti-SAPK/JNK, anti-p38, anti-ERK, anti-phospho-ERK (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)등과 실온에서 3시간 배양하였다. Membrane 은 TTBS (20 mM Tris.HCl, 8 g/l NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.6)로 3번 수 세하고, horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:1000 dilution)와 함께 실온에서 1시간 이상 배양하였다. 단백질 발현의 확인은 ECL reagents (Bio-Rad)를 사용하였다.

### Ⅲ. 연구 결과

#### 1. 구강암 KB세포에 대한 5'-NIO의 효과

구강암 세포 억제에 대한 5'-NIO의 효과를 조사하기 위해 MTT assay를 이용하여 세포의 생존율을 조사하였다. 그 결과 5'-NIO는 시간 또는 농도 의존적으로 강하게 KB 세포의 성장을 저해하는 것이 관찰되었다 (Fig 2). 1  $\mu$ M 5'-NIO를 6, 12 그리고 24시간 처리 시 KB 세포는 각각 40%, 50%, 80% 정도의 생존율이 감소하였고 10  $\mu$ M 이상의 5'-NIO 처리 시 6 시간 내에 생존율이 90% 감소하는 것을 보였다.

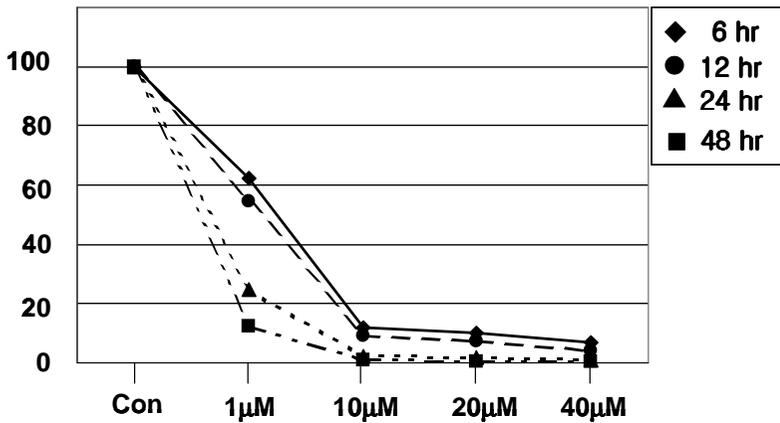


Fig. 2. Effect of 5'-NIO on KB cell proliferation.

#### 2. 5'-NIO에 의한 세포주기 억제 효과

세포주기에 미치는 5'-NIO의 효과를 조사하기 위해 flow cytometry analysis 실시하였다. 5'-NIO를 처리하지 않은 대조군 세포에서는 대부분의

G<sub>1</sub> 기 (79%)와 S 기 (12%)를 보여주고 있으나 5'-NIO 처리 후 S 기 정지를 보이고 있었다. 5'-NIO에 의해 세포주기의 G<sub>2</sub>/M 기의 감소와 부가적으로 5'-NIO 30시간 처리된 세포내에서 S 기 정지와 함께 G<sub>1</sub> 기의 억제 부분이 부분적으로 관찰되었다 (Fig 3). 이들 결과는 5'-NIO가 KB 세포의 G<sub>1</sub>/S 기를 억제함을 보여주고 있다.

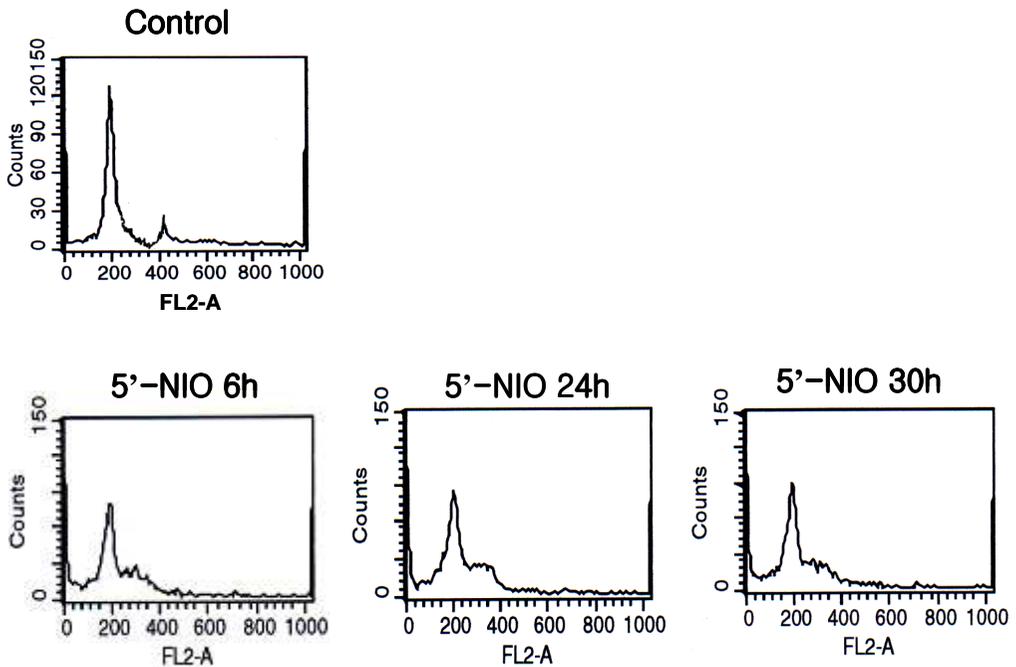


Fig. 3. Effect of 5'-NIO on cell cycle in KB cell.

### 3. 세포주기 관련단백질 발현에 대한 5'-NIO의 효과

5'-NIO는 세포주기 G<sub>1</sub>기의 활성화에 중요한자인 CDK4/6의 조절인자인 p15<sup>INK4B</sup>의 단백질 발현은 농도 의존적으로 감소한 반면, 또 다른 CDK4/6 조절인자인 p16<sup>INK4A</sup>와 CDK2의 조절인자인 p21<sup>CIP1</sup> 그리고 p21<sup>CIP1</sup>의 조절인자인 p53의 발현이 증가하였다 (Fig 4A). 흥미롭게도 이들 단백질은 낮은 농도인

1  $\mu\text{M}$  5'-NIO에 의해 강하게 발현되며, 발현된 p21<sup>CIP</sup>은 CDK2 보다는 CDK4의 발현에 영향을 주었다 (Fig. 4B). 또한 5'-NIO는 CDK4의 활성 조절인자인 cyclin D1, cyclin D3의 단백질 발현을 현저히 감소시켰다 (Fig. 4C). 이들 결과로 5'-NIO가 세포주기 조절인자인 p53과 p21<sup>CIP</sup>의 발현을 증가시켜 세포주기 활성인자인 CDK4의 발현을 억제하고, CDK4의 조절인자인 cyclin D1, cyclin D3을 저해시켜 세포주기를 억제하는 것으로 보인다.

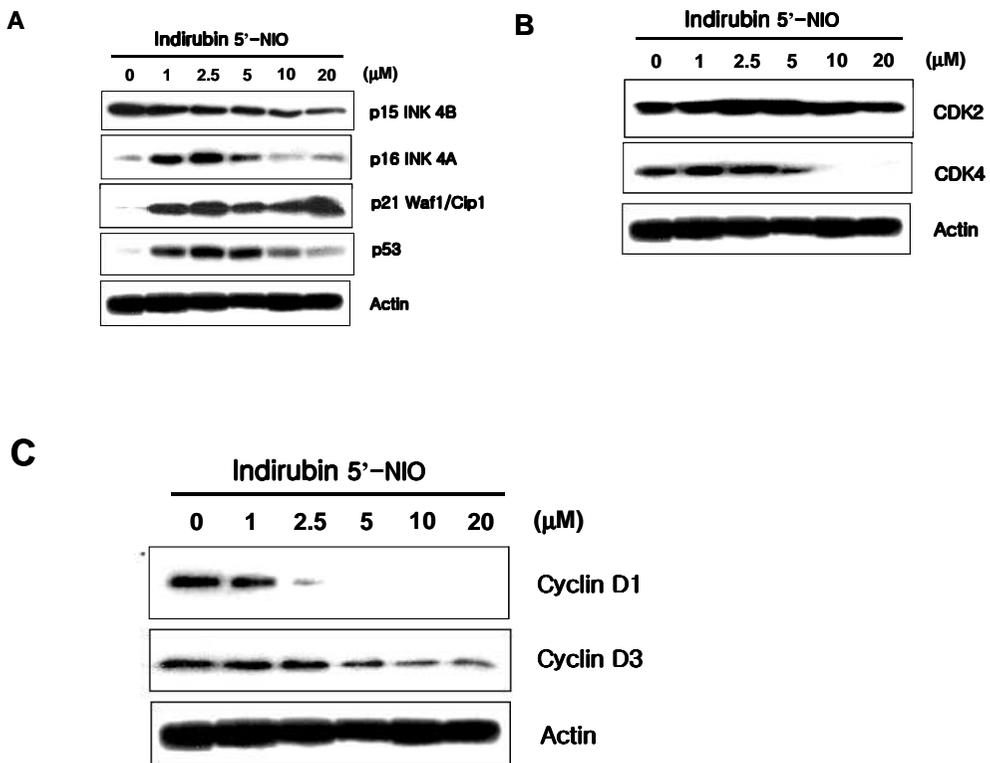


Fig. 4. Alterations of G<sub>1</sub>/S cell cycle regulatory protein expression by 5'-NIO. Protein levels of (A) CDK inhibitors (p53, p21<sup>CIP1</sup>, p15<sup>INK4B</sup> and p16<sup>INK4A</sup>), (B) CDKs (CDK2, CDK4) and (C) CDK4/6 regulators (cyclin D1, cyclin D3) detected by Western blot.

또한 세포주기 조절 단백질의 시간에 따른 발현 변화를 관찰한 결과 5'-NIO는 CDK4/6의 조절인자인 p15<sup>INK4B</sup>의 단백질 발현을 시간 의존적으로 감소한 반면, p16<sup>INK4A</sup>와 p21<sup>CIP1</sup> 그리고 p21<sup>CIP1</sup>의 조절인자인 p53의 발현이 증가하였다. 특히 p21<sup>CIP1</sup>과 p53의 발현은 6 시간 내에 강하게 발현되며, 30시간 후 정상 수준으로 감소되었다 (Fig 5A). 흥미롭게도 Fig 4B에서 높은 농도의 5'-NIO가 24시간에 CDK2의 발현에 영향을 주지 않았지만, Fig 5B에서 24시간 후에 CDK2의 발현을 억제하는 것을 보였다. 이는 5'-NIO가 세포내에서 작용하는데 있어 농도보다는 시간이 중요함을 보여주고 있다. 이러한 결과는 5'-NIO가 세포주기 조절인자인 p53과 p21<sup>CIP1</sup>의 발현을 농도, 시간 의존적으로 증가시키며, 세포주기 활성인자인 CDK4와 CDK2의 발현 억제 및 CDK4의 조절인자인 cyclin D1, cyclin D3을 저해시켜 G<sub>1</sub>/S 기의 세포주기를 억제하는 것으로 보인다.

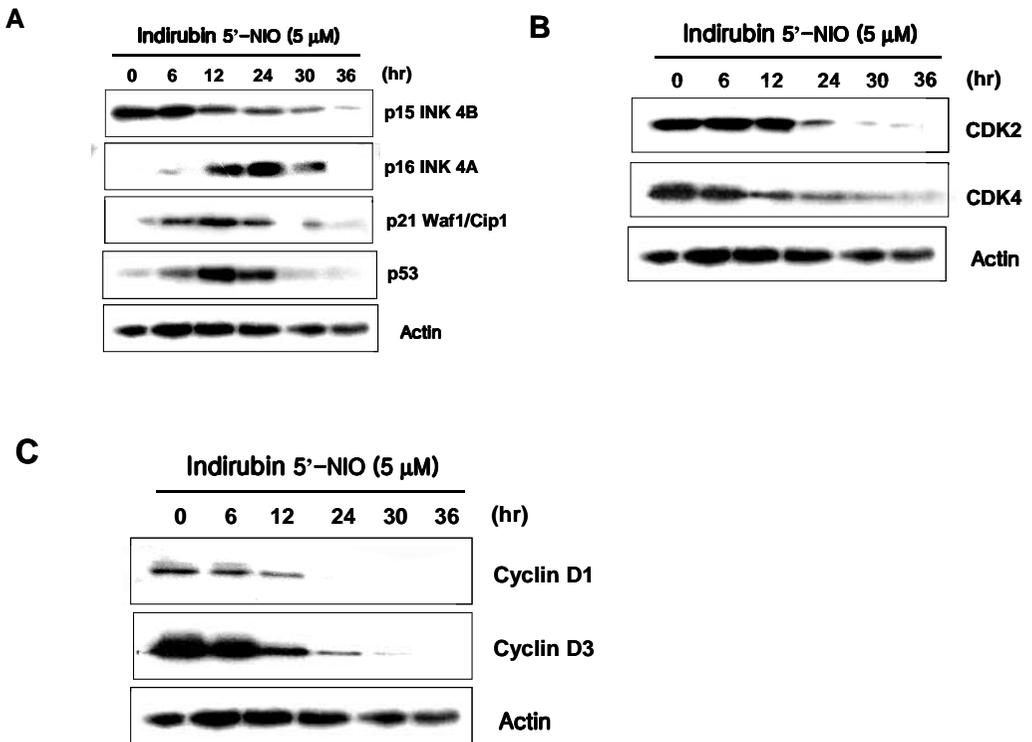


Fig. 5. Alterations of G<sub>1</sub>/S cell cycle regulatory protein expression by 5'-NIO. Protein levels of (A) CDK inhibitors (p53, p21<sup>CIP1</sup>, p15<sup>INK4B</sup> and p16<sup>INK4A</sup>), (B) CDKs (CDK2, CDK4) and (C) CDK4/6 regulators (cyclin D1, cyclin D3) detected by Western blot.

#### 4. MAPKs의 활성화에 대한 5'-NIO의 작용

5'-NIO가 MAPK pathway를 조절할 수 있는지를 조사하였다. 그 결과 SAPK/JNK은 5'-NIO 처리에 발현 및 활성화에 영향을 받지 않았으며 p38-MAPK은 약간 발현이 증가하였지만 p38-MAPK의 활성화에는 영향을 주지 않았다(data not shown). 그러나 5'-NIO가 ERK의 인산화를 시간 의존적으로 증가시킴으로써 ERK의 활성을 증가시킴을 확인하였다 (Fig. 6). 이들 결과를 통해 5'-NIO가 ERK의 활성을 유도, p53과 p21<sup>waf1/Chip1</sup> 발현을 증가시키고 CDKs를 억제시킴으로서 구강암 세포의 세포주기를 특이적으로 억제함을 확인하였다.

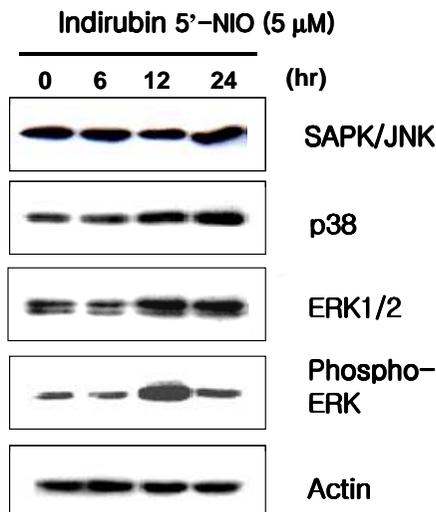


Fig 6. ERK activation by 5'-NIO.

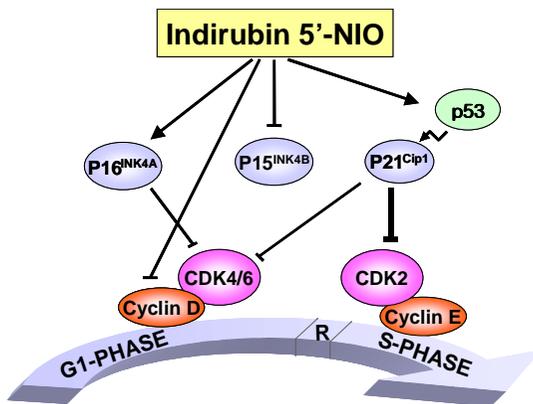
## IV. 고 찰

세포주기는 세포성장과 증식에 직접적으로 관여하는 복잡하고 특이적인 일련의 반응이다<sup>18)</sup>. 세포주기에 관여하는 주 조절인자는 cyclin-dependent kinases (CDKs), CDK의 regulatory counterpart인 cyclins 그리고 종양억제인자인 retinoblastoma (RB) 등으로 지금까지 알려진 다수의 항암 약제들의 분자 표적으로 이들 세포주기 조절기전에 관여하는 유전자 및 단백질인 것으로 확인되었다<sup>19)</sup>. 현재 세포주기를 표적으로 하는 항암 약물들은 CDK kinase 활성 저해, cyclin-CDK 상호작용 제해, ubiquitin을 이용한 cyclin의 proteolysis 조절에 초점을 맞추고 있다<sup>20)</sup>.

최근에 암치료제로 주목을 받고 있는 인디루빈은 중국 내에서 만성 골수성 백혈병 치료를 위해 사용된 Danggui Longhui Wan의 주 성분으로 항암효과가 우수한 여러 인디루빈 유도체들이 보고되고 있다. 이들 유도체들 cyclin-dependent kinase (CDK)1/cyclin B, CDK2/cyclin A, CDK2/cyclin E, GSK3 $\beta$ , 그리고 CDK5/p25 저해를 통해 여러 사람 종양세포의 성장억제효과를 가지고 있음이 확인되었다<sup>5-11)</sup>. 인디루빈을 처리한 종양세포의 세포주기는 G<sub>1</sub>/S 또는 G<sub>2</sub>/M 기에서 정지되며 그로 인해 세포증식의 저해와 세포사멸이 유도된다. 인디루빈은 CDK의 catalytic domain 내의 ATP binding pocket에 결합, 분자적 변형을 유도함으로써 CDK에 ATP의 결합을 억제하여 종양세포의 세포주기를 저해한다<sup>5,6)</sup>.

이 연구에서는 기존의 알려진 항암제보다 효능이 탁월한 항암약제를 개발하기 위해 새로운 인디루빈 유도체인 5'-NIO의 효과를 구강 편평세포암종 KB 세포에서 조사하였다. 이전 연구에서 Lee 등은 5'-NIO가 사람 폐암 세포에서 G<sub>2</sub>/M phase의 세포주기를 억제하고 p53과 마이토콘드리아 의존적으로 세포사를 유발한다고 보고 하였다<sup>21)</sup>. 그러나 5'-NIO가 어떤 기전을 통해 세포주기를 조절하는지는 입증하지 못하였다.

이 연구에서 낮은 농도의 5'-NIO가 기존의 인디루빈 그리고 그 유도체인 indirubin-3'-monoxime보다 강력하게 구강 편평세포암종의 세포주기 관련 단백질을 조절을 통해 세포성장을 저해함을 확인하였다. 5'-NIO가 p53과 p21<sup>Waf1/Cip1</sup>의 단백질 발현 조절에 관여하는 결과는 초기연구와 일치하였지만 저자는 사람 폐암 세포와는 다르게 구강 편평세포암종에서는 다른 기전을 통해 세포주기를 억제하는 것으로 확인 되었다. 이 연구결과 두 가지 경로를 통해 G<sub>1</sub>/S 기를 억제할 것으로 보인다 (Fig.7). 첫째, 5 μM 5'-NIO는 KB 세포에서 24 시간내 Cyclin D1과 D3를 현저히 감소시키고 CDK4의 발현 또한 감소시키는 반면 CDK4/6의 특이적 저해제인 p16 INK4A의 발현은 시간, 농도 의존적으로 빠르게 증가시켜 G<sub>1</sub>/S 기를 조절하는 것으로 생각되며. 둘째, 5'-NIO가 p53의 활성을 유도하고 p53이 down stream의 또 다른 보편적 CDKs 저해제인 p21<sup>Waf1/Cip1</sup>의 발현을 빠르게 유도하여 p21<sup>Waf1/Cip1</sup>의 주 표적인 CDK2의 발현을 억제함을 관찰하였다. 이들 또한 CDK4의 활성을 억제하는 것으로 추정된다.



### Cell cycle arrest

FIG. 7. Schematics of 5'-NIO-induced effects upon G<sub>1</sub>/S cell cycle and apoptosis signal transduction pathways.

이러한 결과를 통해 CDK4/6의 특이적 저해제인 p16<sup>INK4A</sup>와 p53 의존 경로에 의한 p21<sup>Waf1/Cip1</sup> 통해 G<sub>1</sub>/S 기에 관여하는 세포조절 인자가 저해 받는 것을 확인 하였다. 일반적으로 Cyclin D/CDK4와 Cyclin E/CDK2 복합체는 활성화는 G<sub>1</sub>에서 S 기로 세포주기를 조절하는 RB 단백질의 인산화를 조절하여 세포주기를 원활하게 유지한다.

최근 MAPKs가 eukaryotic 세포에서 다양한 외부자극에 반응하여 세포성장 및 세포사멸에 중요한 작용을 하고 있음이 보고되고 있다. MAPK에 대한 초기 연구는 세포가 성장인자를 인식하고 신호를 세포 안으로 전달하여 mitogen을 활성화 시키는 기전을 밝히는 과정에서 시작되었다. 세포막 안으로 성장인자의 신호가 전달되면, Grb2가 Sos에 결합되고, 이는 Ras-GDP를 Ras-GTP로 바꿔준다. 이때 Raf라는 MAPKKK(MAP kinase kinase kinase)가 인산화 되고, 활성화된 Raf는 downstream에 존재하는 MAPKK와 MAPK를 인산화 시킨다<sup>22)</sup>. 활성화된 MAPK는 핵 안으로 이동, 다양한 전사 인자를 활성화 시키고, 특정 세포주기나 성장에 관여하는 유전자의 발현을 촉진하게 된다. 특히 ERK와 p38-MAPK 경로가 세포성장 저해와 세포주기 조절에 밀접하게 연관되어 있으며, 다양한 세포 내에서 cyclin D1 과 p21<sup>CIP1</sup>의 발현을 조절한다<sup>23-25)</sup>. 저자는 5'-NIO가 MAPKs (ERK, JNK, and p38-MAPK) 활성도를 조절하는지를 조사하였다. 그 결과 흥미롭게도 5'-NIO가 ERK의 인산화를 촉진 시켰으며, 반면 JNK와 p38-MAPK의 인산화는 관찰하지 못하였다. 이들 결과를 통해 구강암 세포내에서 5'-NIO에 의해 유래된 세포주기 조절은 ERK 활성화를 통해 유도되는 것으로 생각된다.

Extracellular-signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway는 세포증식, 세포분화 그리고 세포생존과 같은 다양한 세포성 반응에 중요한 역할을 한다<sup>26)</sup>. 최근 연구를 통해 다수의 ERK 신호 관련 단백질이 확인되고 있으며, 이들 단백질에 대한 5'-NIO의 역할, 세포의 운명을 조절하는 ERK 신호와 세포주기와의 관련성의 연구는 암 연구에 매우 중요한 이슈가 될 것이다.

저자는 현재 구강암 세포에서 5'-NIO가 mitochondria-mediated pathways를 통해 세포사를 유도함을 연구하고 있다. 일반적으로 mitochondria-mediated cell death pathways는 mitochondria로부터 만들어지는 cytochrome c가 caspase cascade 과정을 통해 caspase 9을 활성화시키고 caspase 9은 caspase 3를 활성화 시킨다<sup>27-29)</sup>. 세포사의 효력인자인 caspase 3는 활성화된 caspase 7과 함께 DNA 수복에 관여하는 Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP)를 억제한다. 이들 세포사 기전에 5'-NIO의 효과를 연구 중이며 이들 5'-NIO에 대한 분자생물학적 작용기전에 대한 구체적인 연구는 효과적인 구강암 치료에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 결 론

새로운 인디루빈 유도체인 5'-NIO는 구강암 세포에서 세포주기 조절에 중요한 역할을 하는 CDKs와 Cyclin D의 발현을 현저하게 저해한 반면 CDK의 저해제인 p16<sup>INK4A</sup>와 p21<sup>Waf1/Cip1</sup>의 발현은 증가 하였고 또한 세포성장을 조절하는 신호전달효소중 하나인 ERK1/2의 활성을 유도함을 확인할 수 있었다. 5'-NIO는 종양억제인자인 p53의 발현을 현저히 증가시켜 세포주기 조절뿐만 아니라 p53 의존적으로 mitochondria 매개 세포사 경로를 촉진시킬 가능성이 높으며, 서로 다른 암 억제 기전을 동시에 유도함으로써 강력하고 효율적인 구강암 치료제로 이용될 수 있을 것이다.

## VI. 참고문헌

1. Zhang ZN, Liu EK, Zheng TL, and Li DG. Treatment of chronic myelocytic leukemia (CML) by traditional Chinese medicine and Western medicine alternately. *J Tradit Chin Med* 5: 246-8, 1985.
2. Qin GW, Xu RS. Recent advances on bioactive natural products from Chinese medicinal plants. *Med Res Rev* 18(6): 375-82, 1998.
3. Han J. Traditional Chinese medicine and the search for new antineoplastic drugs. *J Ethnopharmacol* 24(1): 1-17, 1988.
4. Ma MZ, Yao BY. Progress in indirubin treatment of chronic myelocytic leukemia. *J Tradit Chin Med.* 3(3): 245-8. 1983.
5. Moon MJ, Lee SK, Lee JW, Song WK, Kim SW, Kim JI, Cho C, Choi SJ, Kim YC. Synthesis and structure-activity relationships of novel indirubin derivatives as potent anti-proliferative agents with CDK2 inhibitory activities. *Bioorg Med Chem* 14(1): 237-46, 2006.
6. Hoessel R, Leclerc S, Endicott JA, Nobel ME, Lawrie A, Tunnah P, Leost M, Damiens E, Marie D, Marko D, Niederberger E, Tang W, Eisenbrand G, Meijer L. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nat Cell Biol* 1(1): 60-7, 1999.
7. Eisenbrand G, Hippe F, Jakobs S, Muehlbeyer S. Molecular mechanisms of indirubin and its derivatives: novel anticancer molecules with their origin in traditional Chinese phytomedicine. *J Cancer Res Clin Oncol* 130(11): 627-35, 2004.
8. Merz KH, Schwahn S, Hippe F, Muehlbeyer S, Jakobs S, Eisenbrand G. Novel indirubin derivatives, promising anti-tumor agents inhibiting cyclin-dependent kinases. *Int J Clin Pharmacol Ther* 42(11): 656-8, 2004.

9. Damiens E, Baratte B, Marie D, Eisenbrand G, Meijer L. Anti-mitotic properties of indirubin-3'-monoxime, a CDK/GSK-3 inhibitor: induction of endoreplication following prophase arrest. *Oncogene* 20(29): 3786-97, 2001.
10. Marko D, Schatzle S, Friedel A, Genzlinger A, Zankl H, Meijer L, Eisenbrand G. Inhibition of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) by indirubin derivatives in human tumour cells. *Br J Cancer* 84(2): 283-9, 2001.
11. Xiao Z, Hao Y, Liu B, Qian L. Indirubin and meisoindigo in the treatment of chronic myelogenous leukemia in China. *Leuk Lymphoma* 43(9): 1763-8, 2002.
12. Leclerc S, Garnier M, Hoessel R, Marko D, Bibb JA, Snyder GL, Greengard P, Biernat J, Wu YZ, Mandelkow EM, Eisenbrand G, Meijer L. Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 276(1): 251-60, 2001.
13. Polychronopoulos P, Magiatis P, Skaltsounis AL, Myrianthopoulos V, Mikros E, Tarricone A, Musacchio A, Roe S.M, Pearl L, Leost M, Greengard P, Meijer L. Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinases. *J Med Chem* 47(4): 935-46, 2004.
14. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12(22): 3499-511, 1998.
15. Willert K, Nusse R. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev* 8(1): 95-102, 1998.
16. Xie Y, Liu Y, Ma C, Yuan Z, Wang W, Zhu Z, Gao G, Liu X, Yuan H, Chen R, Huang S, Wang X, Zhu X, Wang X, Mao Z, and Li M. Indirubin-3'-oxime inhibits c-Jun NH2-terminal kinase: anti-apoptotic

- effect in cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett* 367: 355-9, 2004.
17. Kim SA, Kim YC, Kim SW, Lee SH, Min JJ, Ahn SG and Yoon JH. Anti-tumor Activity of Novel Indirubin Derivatives in Rat Tumor Model. *Clin Cancer Res* (in press). 2006.
18. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-77, 1996.
19. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81(3): 323-30, 1995.
20. Buolamwini JK. Cell cycle molecular targets in novel anticancer drug discovery. *Curr Pharm Des* 6(4): 379-92, 2000.
21. Lee JW, Moon MJ, Min HY, Chung HJ, Park EJ, Park HJ, Hong JY, Kim YC, Lee SK. Induction of apoptosis by a novel indirubin-5-nitro-3'-monoxime, a CDK inhibitor, in human lung cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett* 15(17): 3948-52, 2005.
22. Chang L and Karin M. Mammalian MAP kinase signaling cascades, *Nature* 410: 37-40, 2001.
23. Peter M and Herskowitz I. Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell* 79: 181-4, 1994.
24. Roovers K and Assoian RK. Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *Bioessays* 22: 818-26, 2000.
25. Balmanno K and Cook SJ. Sustained MAP kinase activation is required for the expression of cyclin D1, p21Cip1 and a subset of AP-1 proteins in CCL39 cells. *Oncogene* 18: 3085-97, 1999.
26. [Pumiglia KM](#), [Decker SJ](#). Cell cycle arrest mediated by the MEK/mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(2): 448-52. 1997.
27. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: Critical control points. *Cell* 116(2): 205-9, 2004.

28. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-12, 1998.
29. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 15(6): 725-31, 2003.

## 저작물 이용 허락서

학 과	치의공학과	학 번	20057590	과 정	박사
성 명	한글: 김 정 석      한문: 영문: Kim Jeong Seok				
주 소	경기도 수원시 장안구 연무동 246-23 세브란스치과				
연락처	E-MAIL : signyang@hanmail.net				
논문제목	한글: 구강암 KB 세포에서 5'-nitro-indirubinoxime 에 의한 세포주기 억제기전 영문: Mechanisms of cell cycle arrest by 5'-nitro-indirubinoxime in KB oral squamous carcinoma cells				

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 의사표시가 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.

2006년 12월 일

저작자: 김 정 석 (서명 또는 인)

## 조선대학교 총장 귀하