

꾸지나무 유래 화합물 Brousochalcone B의 HepG2 간암세포의 세포사멸에 미치는 영향

박진량¹ · 류형원² · 조병옥^{3*}

¹서남대학교 생명과학과, ²한국생명공학연구원 천연물의약연구센터, ³전주대학교 보건관리학과

Brousochalcone B from *Broussonetia papyrifera* Induce Apoptosis via Activation of a Caspase Cascade and Reactive Oxygen Species Production in Human HepG2 cells

Jin Ryang Park¹, Hyung Won Ryu² and Byoung Ok Cho^{3*}

¹Department of Life Science, Seonam University, Namwon-si, Jeollabuk-do 55724, Korea

²Natural Medicine Research Center, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do 28116, Korea

³Department of Health Care & Management, Jeonju University, Jeonju-si, Jeollabuk-do 55069, Korea

Abstract – The aim of this study was to investigate the mechanisms underlying apoptosis induced by a brousochalcone B (BCB) from *Broussonetia papyrifera* in HepG2 cells. The results showed that BCB treatment for 24 hr significantly inhibited cell viability in a dose-dependent manner, and induced apoptosis in HepG2 cells. More so, BCB treatment triggered the cleavage of caspase-8, -9, -3, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), increase of Bax level, and decrease of Bcl-2 expression. A general caspase inhibitor (z-VAD-fmk) blocked BCB-induced cell death. Furthermore, BCB treatment caused reactive oxygen species (ROS) production in a dose-dependent manner. In addition, an antioxidant *N*-acetylcysteine (NAC) blocked BCB-induced ROS production and cell death. Therefore, these results indicate that BCB-induced apoptosis is mediated by a caspase dependent pathway and ROS production in HepG2 cells.

Keywords – Brousochalcone B, *Broussonetia papyrifera*, Apoptosis, Caspase, Reactive oxygen species

인간의 생명을 위협하는 가장 중요한 요소 중 하나인 암은 지구상에서 특히 서양에서 높은 사망률을 보이고 있으며, 최근 우리나라에서도 서구화된 식생활, 환경오염 및 스트레스 등의 다양한 원인으로 인하여 암의 발생 및 사망률이 계속 증가하고 있다.^{1,2)} 현재까지 항암치료제 개발을 위해 천연물에서 분리한 생리활성물질이 과학계의 많은 관심과 집중을 받아왔으며, 그 중에서도 폴리페놀계 성분은 항산화, 염증 반응 치료뿐만 아니라 항암 치료제 개발을 위한 목적으로 수많은 시도가 이루어져 왔다.³⁾ 지난 수십년간의 연구에 의하면 천연물로부터 유래한 많은 폴리페놀계 성분들이 암세포의 세포사멸사(apoptosis)를 유도함으로써 항암효과를 나타낸다고 보고하고 있다.⁴⁾ 또한 최근에는 암세포에만 선택적으로 작용할 수 있는 항암제 개발에 천연물을 활용하는

연구들이 증가하고 있다.⁵⁾ 일명 프로그램화된 세포 사멸이라 불리는 apoptosis는 세포의 항상성 유지에서 매우 중요한 역할을 하며, 세포질 및 염색질 응축, 세포막 수포화 현상, 핵의 단편화 현상, apoptotic body의 형성 및 caspase 활성화 등과 같은 형태적 또는 생화학적인 변화가 수반되어지며, 이러한 과정은 세포 내부의 정교한 신호전달에 의해 조절되어진다.^{5,6)}

꾸지나무(*Broussonetia papyrifera*, paper mulberry)는 뽕나무과(Moraceae family)에 속하며, 우리나라, 중국, 태국을 비롯한 아시아, 미국 등에 폭 넓게 분포되어 있다. 전통의학에서 꾸지나무의 열매를 비롯한, 뿌리, 잎, 껍질 등이 사용되어 있으며, 통증, 부종, 이질, 백선, 탈장 등과 같은 다양한 질환의 치료에 사용되어 왔다.^{7,8)} 꾸지나무의 주요 생리활성물질로는 페놀릭 화합물, 디터페노이드, 알칼로이드 등이 알려져 있으며,⁹⁾ 이들은 지질과산화 억제, 항혈소판, 항산화, 항염, aromatase 활성 억제, PTP1B 효소 활성 억제,

*교신저자(E-mail): enzyme21@jj.ac.kr, enzyme21@naver.com
(Tel): +82-63-220-2914

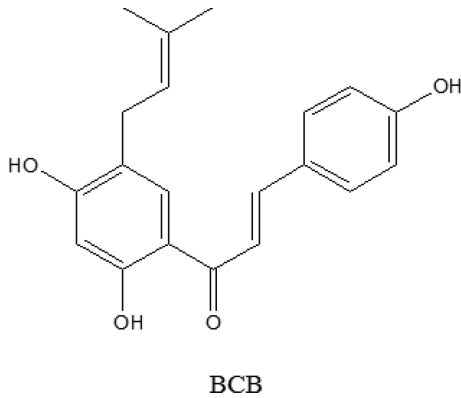


Fig. 1. Chemical structure of Brousochalcone B (BCB).

항균 및 항진균에 대한 효과 등이 보고되었다.¹⁰⁻¹⁵⁾ 또한 이전 연구에 따르면, 꾸지나무 잎에서 분리된 페놀 화합물에 에스트로겐 생물 합성 억제 활성화와 항산화 활성화에 대한 효능이 있는 것으로 나타났으며,¹⁶⁾ 최근 자료에 의하면 꾸지나무 유래 화합물인 kazinol A가 방광암 세포의 세포사멸에 우수하다고 보고되었다.¹⁷⁾ 그러나 꾸지나무 유래 화합물인 Brousochalcone B(BCB, Fig. 1)의 항암 작용에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

그러므로 본 연구는 꾸지나무 뿌리로부터 분리된 화합물인 BCB를 대상으로 암 예방 치료제로 사용하기 위한 기초자료를 제공하기 위하여 BCB가 HepG2 암세포의 증식 억제 및 apoptosis에 미치는 영향을 조사한 결과 매우 흥미로운 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료 – 본 실험에서 사용한 brousochalcone B(BCB)는 이전 연구⁹⁾에서 보고한 것처럼, 한국생명공학연구원 천연물의 약연구센터 류형원 박사가 꾸지나무 뿌리에서 분리하였고 친절히 제공하였다. 세포독성 및 세포사멸 분석 kit는 대일랩(Seoul, Korea)과 MBL International사(Nagoya, Japan)에서 각각 구입하였다. 1차 항체(caspase-3, caspase-9, caspase-8, cleaved caspase-3, cleaved caspase-8)는 Cell Signaling Technology사(Danvers, MA, USA)에서, β -tubulin은 Santa Cruz Biotechnology사(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)는 BD Pharmingen 사(San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. Caspase 저해제인 z-VAD-fmk는 R&D systemes사(Minneapolis, MN, USA)로부터 구입하였다. 2차 항체 anti-mouse IgG HRP-conjugated 항체는 Zymed사(San Francisco, CA, USA)에서 구입하였고, anti-rabbit IgG HRP-conjugated 항체와 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate(carboxy-H₂DCFDA)는 Invitrogen사(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. Caspase-

3 분석 kit와 N-acetylcysteine(NAC) 및 기타 분석급 시약은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

세포배양 – 본 실험에 사용된 세포는 인체 유래 간암세포주인 HepG2 세포로 American Type Culture Collection (ATCC)(Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 10% FBS (fetal bovine serum, Life Technology, Carlsbad, CA, USA)와 100 units/mL 페니실린, 100 μ g/mL 스트렙토마이신을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Life Technology) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.

세포독성 측정 – 세포독성은 EZ-Cytox cell viability assay kit(DAEIL lab)를 사용하여, 제조사에서 권장하는 실험방법에 따라서 측정하였다. 먼저, 간암 세포를 최종농도 5 \times 10⁴ cells/mL가 되도록 96 well plate에 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 다음, 꾸지나무 유래 화합물인 BCB를 0, 5, 10, 20, 40, 60 μ M의 농도로 첨가하여 배양하였다. 24시간이 지난 후 EZ-Cytox 시약 10 μ L를 넣고 4시간 동안 배양한 후 microplate reader(Benchmark Plus, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 480 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성은 대조군에 대한 생존율로 나타내었다.

세포사멸 분석 – 세포사멸은 MEBCYTO apoptosis kit(MBL International)를 사용하여, 제조사에서 권장하는 실험방법에 따라서 측정하였다. HepG2 간암 세포를 최종농도 1 \times 10⁵ cells/mL가 되도록 희석하여 6 well plate에 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 24시간이 지난 후, BCB 20 μ M을 well에 처리하여 24시간 배양하였다. 배양이 종료된 well에서 세포를 회수하여 PBS로 세척하고, kit에 포함된 85 μ L의 binding buffer로 다시 부유한 후, 10 μ L의 annexin V-FITC와 5 μ L의 propidium iodide를 첨가하여 실온에서 15분 동안 반응시켰다. 그런 다음 400 μ L의 binding buffer를 첨가하여 flow cytometry(Cytomics FC500, Beckman, Miami, FL, USA)를 이용하여 분석하였다.

Caspase-3 활성 분석 – Caspase-3 활성은 caspase-3 colorimetric assay kit(Sigma-Aldrich)를 사용하여, 제조사에서 권장하는 실험방법에 따라 측정하였다. 먼저, HepG2 간암 세포를 최종농도 1 \times 10⁵ cells/mL가 되도록 희석하여 100 mm dish에 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 24시간이 지난 후, BCB 10, 20 μ M을 처리하여 24시간 배양한 후 세포를 회수하여 PBS로 세척하고 cell lysis buffer를 첨가하여 얼음에서 20분간 세포를 용해한 후, 4°C, 16,000 rpm으로 20분간 원심분리 하였다. 세포 용해물에 2 mM의 Ac-DEVD-pNA를 혼합하여 37°C에서 2시간 동안 방치한 후 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot을 이용한 단백질 발현 분석 – HepG2 간암 세포를 최종농도 1 \times 10⁵ cells/mL가 되도록 희석하여 100

mm dish에 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 다음, 10, 20 μM의 BCB를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 dish에서 세포를 회수하여 PBS로 세척하고 1 mM PMSF와 proteinase inhibitor를 첨가한 NP40 cell lysis buffer(Sigma-Aldrich)를 첨가하여 얼음에서 30분간 세포를 용해한 후, 4°C, 12,000 rpm으로 20분간 원심분리하였다. 세포 용해액에 sample buffer를 섞어 5분간 끓인 후, SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후 단백질을 nitrocellulose membrane(Hybond ECL Nitrocellulose, Amersham, Bucks, UK)으로 transfer 하였다. 그런 다음 membrane을 5% skim milk로 실온에서 1시간 동안 blocking 하고 1차 항체를 처리하여 4°C에서 하루 밤 동안 반응시킨 다음, TBS-T(10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20) buffer로 10분간 3번 세척하고 2차 항체를 처리하여 실온에서 2시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 TBS-T buffer로 10분간 3번 세척하고 enhanced chemiluminescence detection system(Amersham Pharmacia, Bucks, UK)를 사용하여 특정단백질의 발현을 분석하였다.

Caspase inhibitor 처리에 의한 세포생존율 측정 - BCB 처리에 의한 HepG2 간암 세포의 사멸이 caspase에 의존하여 일어나는지를 확인하기 위해 z-VAD-fmk(R&D Systems)를 사용하여 확인하였다. HepG2 간암 세포를 최종농도 5×10⁴ cells/mL가 되도록 희석하여 96 well plate에 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 24시간이 지난 후, 20 μM의 z-VAD-fmk를 전처리하고 1시간 후에 BCB를 20 μM의 농도로 well에 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간이 지난 후 EZ-Cytox 시약 10 μL를 넣고 4시간 동안 배양한 후 microplate reader(Bio-Rad)를 이용하여 480 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

ROS 측정 - ROS 생성은 carboxy-H₂DCFDA(Invitrogen)를 사용하여 검출하였다. HepG2 간암 세포를 최종농도 1×10⁵ cells/mL가 되도록 희석하여 6 well plate에 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 24시간이 지난 후, BCB 5, 10, 20 μM 또는 1 mM의 H₂O₂를 well에 처리하여 배양하였다. 배양 1시간 후에 well에 10 μM의 carboxy-H₂DCFDA를 처리하여 20분간 배양하였다. 또한 NAC 처리에 의한 ROS 생성 억제를 확인하기 위해, HepG2 간암 세포를 최종농도 1×10⁵ cells/mL가 되도록 희석하여 6 well plate에 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 24시간이 지난 후, 2 mM의 NAC를 전처리하고 1시간 후에 BCB 20 μM을 well에 처리하여 배양하였다. 배양 1시간 후에 10 μM의 carboxy-H₂DCFDA를 처리하여 20분간 배양하였다. 배양 후 PBS로 세척하고 well에서 세포를 회수하여 flow cytometry(Cytomics FC500)를 이용하여 측정하였다.

NAC 처리에 의한 세포생존율 측정 - HepG2 간암 세포를 최종농도 5×10⁴ cells/mL가 되도록 희석하여 96 well plate에

분주한 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 24시간이 지난 후, 2 mM의 NAC를 전처리하고 1시간 후에 BCB를 20 μM의 농도로 well에 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간이 지난 후 EZ-Cytox 시약 10 μL를 넣고 4시간 동안 배양한 후 microplate reader(Bio-Rad)를 이용하여 480 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

통계분석 - 모든 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 대조군과 실험군 간의 통계적 유의성에 대한 검증은 SPSS statistics program(version 22 SPSS Inc., Chicago, IL, USA)의 one-way ANOVA를 이용한 분산분석 후 Duncan 사후 검정을 실시하였으며, 조사 항목들 간의 유의성 검증은 p<0.05 수준에서 실시하였다.

결과 및 고찰

암세포 증식 억제효과 - 먼저 HepG2 간암 세포를 대상으로 BCB가 세포증식에 미치는 효과를 조사하기 위하여 수용성 tetrazolium salt인 WST-1을 사용하여 조사하였다. HepG2 간암 세포에 BCB를 5-60 μM의 농도로 처리하여 24 시간 후에 확인한 결과 BCB의 HepG2 세포에 대한 증식 억제 효과는 5 μM에서 98.02%, 10 μM에서 85.81%, 20 μM에서 42.28%, 40 μM에서 24.76%, 60 μM에서 18.85%로 농도 의존적으로 세포증식 억제 효과가 있었다(Fig. 2A). 꾸지나무 껍질 유래 prenylflavone 계열 화합물은 유방암 세포의 성장 억제가 우수하고,¹⁸⁾ 꾸지나무 열매 유래 alkaloid 성분은 피부암, 간암, 자궁암 세포의 성장 억제에 뛰어나며,¹⁹⁾ 최근에 꾸지나무 뿌리 유래 화합물인 kazinol A는 방광암세포의 성장 억제에 뛰어나다고 보고되었다.¹⁷⁾ 본 연구 결과 또한 꾸지나무 유래 화합물인 BCB가 HepG2 간암 세포의 성장 억제가 우수하므로 간암 치료 후보 소재로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

BCB에 의한 HepG2 세포의 apoptosis 유도 - BCB에 의한 HepG2 세포증식 억제 효과가 apoptosis 유도에 의한 것인지를 알아보기 위하여 annexin V/PI 이중 염색을 하여 유세포 분석기로 조사하였다. 그 결과 BCB에 의한 apoptosis 유발을 확인할 수 있었고, BCB 20 μM을 처리하였을 때 미처리 대조군 2.8%에 비해 17.3%로 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 2B and 2C). 또한, apoptosis의 특징 중의 하나로 DNA 복구에 관여하는 단백질인 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 절단현상이 잘 알려져 있으며, apoptosis 과정 중 caspase-3에 의해 116 kDa의 단백질이 89 kDa으로 절단된다.²⁰⁾ 이에 BCB에 의해 PARP 단백질이 절단되는지를 확인한 결과 Fig. 3A에서 보는바와 같이 BCB 20 μM 처리 시 PARP 단백질 절단 현상이 뚜렷하게 나타났다. 이러한 결과들은 BCB에 의한 HepG2 간암 세포의 사멸이 apoptosis 유도와 관련되어 있음을 나타낸다.

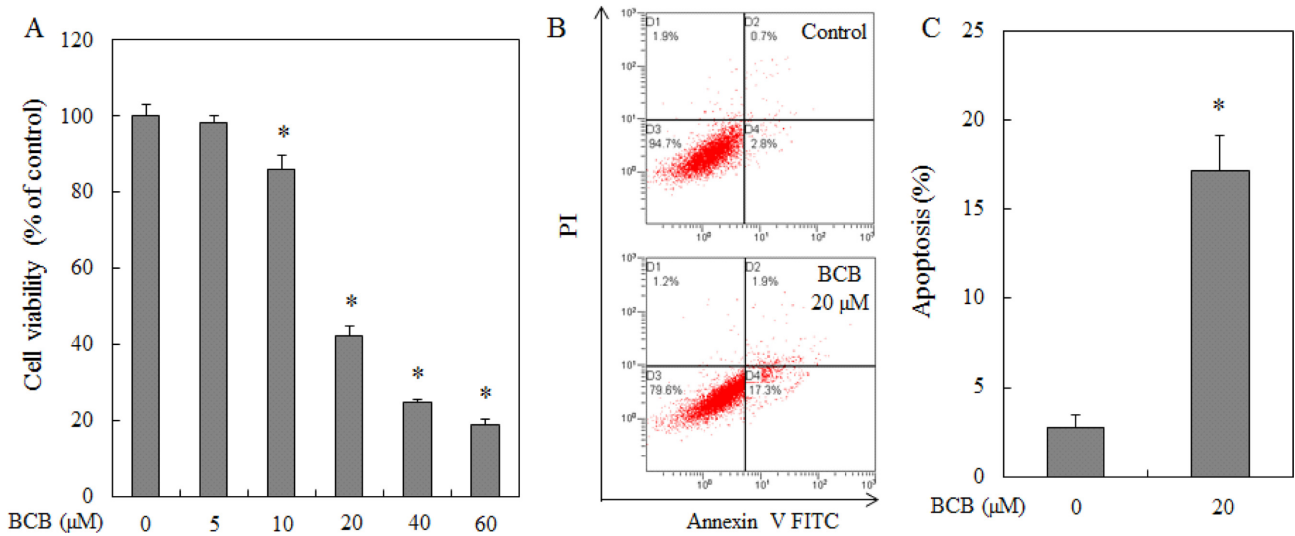


Fig. 2. BCB induces cell cytotoxicity and apoptosis in HepG2 cells. (A) Cells were treated with various concentrations of BCB for 24 hr, and cell viability was assessed using the EZ-Cytox cell viability assay kit. (B and C) Apoptosis induction. Cells were treated with 20 μM of BCB for 24 hr. Apoptotic cells were detected by flow cytometry with annexin V FITC in combination with PI staining. Data are presented as the mean±SD. *p<0.001 vs. control.

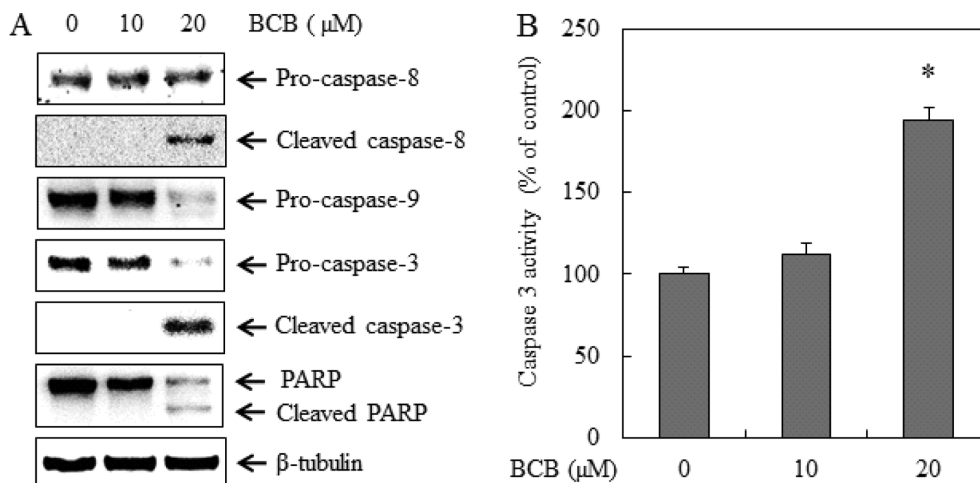


Fig. 3. BCB induces caspases activation and PARP cleavage in HepG2 cells. (A) Cells were treated with 10 or 20 μM of BCB for 24 hr. The levels of caspase-8, caspase-9, caspase-3, and cleaved PARP were analyzed by western blotting. β-Tubulin was used as a loading control. (B) BCB-induced caspase-3 activation. Caspase-3 activity was measured spectrophotometrically using a caspase-3 assay kit. Data are presented as the mean±SD. *p<0.001 vs. control.

BCB에 의한 HepG2 세포의 caspase 활성화 - Apoptotic process에서 매우 중요한 역할을 하는 caspase 단백질은 다양한 isoform이 존재하며, initiator caspase와 effector caspase로 구분된다. Caspase-8은 death 신호에 의해 활성화 되는 initiator caspase로 직접 effector caspase인 caspase-3를 활성화 하거나 또는 Bcl-2 family 단백질인 Bid를 절단하여 미토콘드리아(mitochondria)의 기능이상을 유발하고 미토콘드리아 내에 존재하는 cytochrome c를 세포질로 방출하여 apoptosome을 형성함으로써 caspase-9과 caspase-3를 활성화시킨다. 활성화된 caspase-3가 세포의 증식과 생존에 중요한 역할을 하는

PARP를 절단하거나 직접적으로 핵의 응축과 DNA를 절단하여 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있다.^{1,4,20,21)} 따라서 BCB에 의해 일어난 apoptosis가 caspase cascade와 관련되어 있는지를 western blot을 통해 확인하였다. 그 결과 caspase-8 단백질은 변화가 미미하였지만, caspase-9, -3의 protein levels은 BCB 20 μM 농도에서 감소되었으며, 활성화된 cleaved caspase-8, caspase-3의 protein levels은 BCB 20 μM 농도에서 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 3A). 또한 caspase-3의 활성을 조사한 결과 BCB 처리 후에 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 이는 BCB 처리에 의한 HepG2

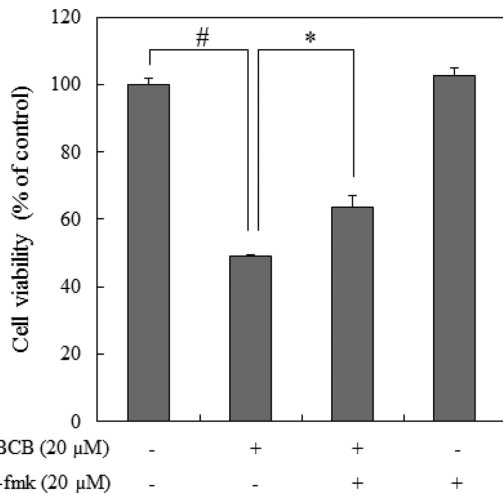


Fig. 4. Effect of caspase inhibitor (z-VAD-fmk) on BCB-induced cell death in HepG2 cells. Cells were pretreated with 20 μM of z-VAD-fmk for 1 hr and then treated with 20 μM of BCB for an additional 24 hr. Cell viability was assessed using the EZ-Cytox cell viability assay kit. Data are presented as the mean±SD. #p<0.001 vs. control, *p<0.001 vs. BCB alone.

세포의 apoptosis 유도에 caspase의 활성화가 연관되어 있음을 보여준다. 또한, BCB에 의한 세포사멸이 caspase-의존 경로를 통하여 일어나는지 general caspase inhibitor인 z-VAD-fmk를 투여하여 BCB에 의한 HepG2 세포의 세포사멸이 억제되는지 세포생존율을 측정하여 확인하였다. 그 결과 Fig. 4에 나타난 바와 같이 BCB 처리 전에 20 μM의 z-VAD-fmk를 1시간 전 처리한 군은 BCB 단독 처리 군과 비교하여 HepG2 세포의 세포생존율이 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다(p<0.001). 이러한 결과들은 BCB에 의한 apoptosis 과정은 caspase-의존 경로와 관련되어 있음을 보여준다.

Bcl-2 및 Bax 발현 양상의 변화 – Bcl-2 family 단백질은

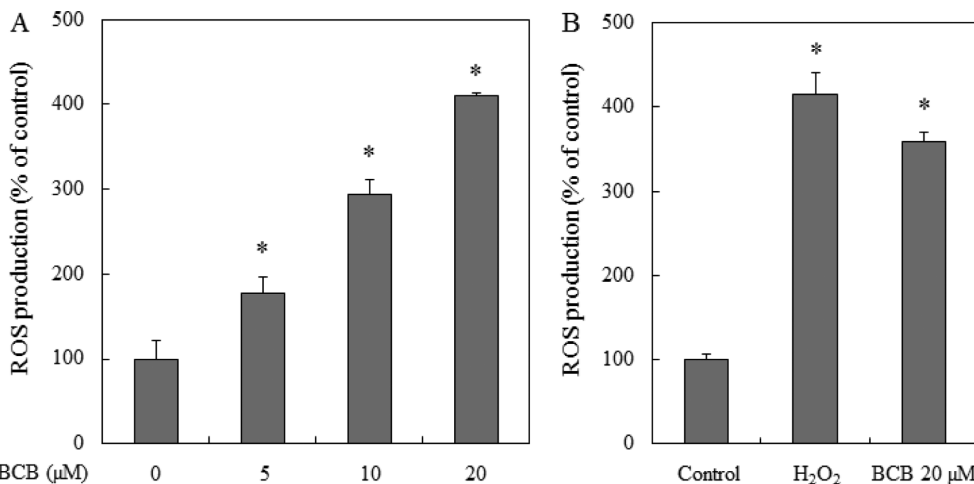


Fig. 6. Effect of BCB on intracellular ROS production in HepG2 cells. Cells were treated with 5, 10, 20 μM of BCB and/or 1 mM of H₂O₂ for 1 hr. And then the cells were incubated with 10 μM carboxy-H₂DCFDA for 20 min. ROS production was detected by flow cytometer. Data are presented as the mean±SD. *p<0.001 vs. control.

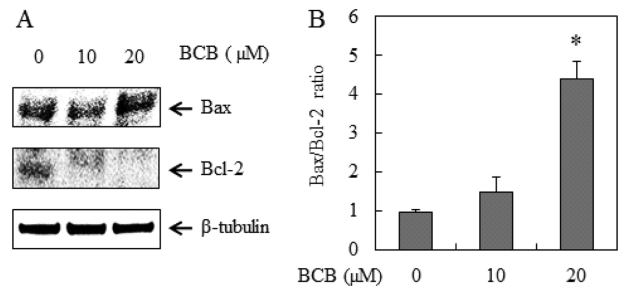


Fig. 5. Effect of BCB on Bcl-2 and Bax expression in HepG2 cells. Cells were treated with 10 or 20 μM of BCB for 24 hr. (A) The levels of Bcl-2 and Bax protein were analyzed by western blotting. β-Tubulin was used as a loading control. (B) Ratio of Bax to Bcl-2 protein. Data are presented as the mean±SD. *p<0.001 vs. control.

미토콘드리아를 통한 apoptosis에서 중요한 역할을 하며,^{22,23)} 그 중 anti-apoptosis protein인 Bcl-2와 pro-apoptosis protein인 Bax의 발현을 조사하였다. 그 결과 HepG2 세포에 BCB를 처리하면 Bcl-2의 발현은 감소하였고, Bax의 발현은 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 5A). 또한 apoptosis에서 Bax와 Bcl-2의 비율은 세포의 민감성을 나타내는 중요한 인자로 알려져 있다.²⁴⁾ 따라서 그 비율을 조사해 본 결과 Bax/Bcl-2의 발현 비율이 BCB 처리에 의해 크게 증가하는 것을 알 수 있었다(Fig. 5B). 이러한 결과는 BCB에 의한 apoptosis 과정이 미토콘드리아와 관련되어 있을 것으로 사료된다.

BCB에 의한 ROS 생성을 통한 apoptosis 유도 – ROS는 미토콘드리아의 기능장애를 유발하며, caspase-9, 3 활성화를 통해 PARP의 절단을 유발하여 결국엔 세포의 죽음을 유발한다.^{25,26)} 최근 많은 연구에 의하면 플라보노이드와 같은 천연물 유래 화합물이 ROS-미토콘드리아 의존적인 apoptosis를 유도한다고 보고되었다.²⁷⁻³⁰⁾ 따라서 ROS 생성이 BCB

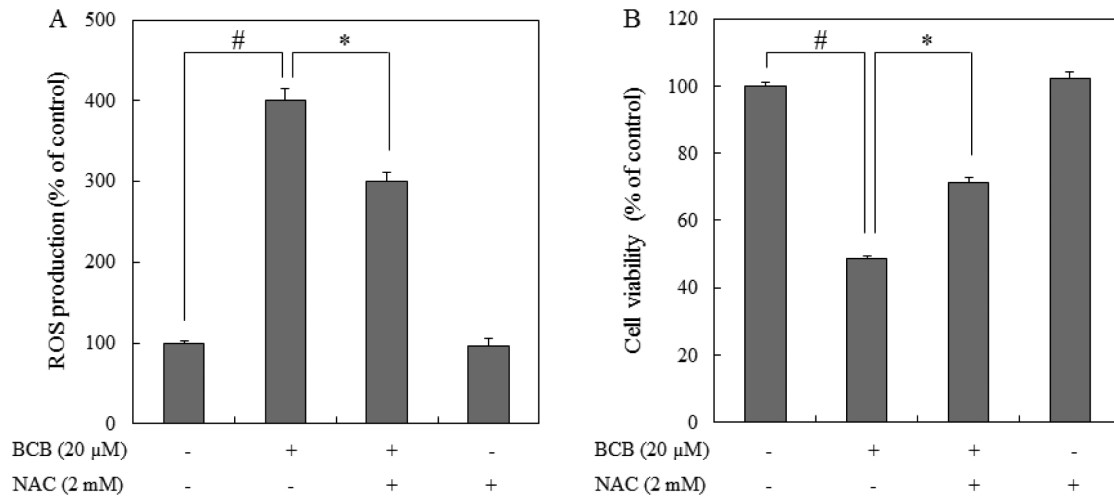


Fig. 7. Effect of NAC on BCB-induced ROS production and cell death in HepG2 cells. (A) Cells were pretreated with 2 mM of NAC for 1 hr and then treated with 20 μM of BCB for an additional 1 hr. And then the cells were incubated with 10 μM carboxy-H₂DCFDA for 20 min. ROS production was detected by flow cytometer. (B) Cells were pretreated with 2 mM of NAC for 1 hr and then treated with 20 μM of BCB for an additional 24 hr. Cell viability was assessed using the EZ-Cytox cell viability assay kit. Data are presented as the mean±SD. #p<0.001 vs. control, *p<0.001 vs. BCB alone.

에 의한 apoptosis 유도과 관련되어 있는지 증명하기 위하여 먼저 BCB를 농도별로 처리하고 세포내 ROS 생성을 확인하였다. 그 결과 Fig. 6에 나타난 바와 같이 ROS 생성이 BCB 처리 농도의존적으로 크게 증가함을 확인하였고, 양성 대조군으로 사용한 과산화수소 1 mM 처리군과 비교할 때 매우 낮은 농도에서 ROS를 유발함을 알 수 있었다. 그러나 ROS 소거제인 NAC를 전처리하였을 경우 BCB에 의해 생성된 ROS가 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 7A). 게다가 BCB에 의한 세포사멸이 ROS 생성과 연관되어 있는지를 확인하기 위하여, ROS 소거제인 NAC를 전처리하여 BCB에 의한 HepG2 세포의 세포사멸이 억제되는지 세포생존율을 측정하여 확인하였다. 그 결과 Fig. 7B에 나타난 바와 같이 BCB 처리 전에 2 mM의 NAC를 1시간 전 처리한 군은 BCB 단독 처리 군과 비교하여 HepG2 세포의 세포생존율이 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다(p<0.001). 이러한 결과들은 BCB에 의한 ROS 생성이 caspase 활성을 통한 apoptosis 과정과 밀접하게 연관되어 있을 것으로 사료된다.

결론

본 연구는 간암 세포인 HepG2에서 꾸지나무 유래 화합물인 BCB의 암세포 증식 억제 및 그 기전을 조사하였다. BCB는 HepG2 세포의 성장을 억제하였고, caspase-8, -9, -3의 활성화, PARP의 절단, Bcl-2의 발현 억제, Bax의 발현 증가에 의해 apoptosis를 유도함을 확인할 수 있었다. 또한 BCB에 의한 apoptosis 유도는 ROS 생성과 관련되어 있음을 확인하였다. 이상의 결과를 종합해볼 때 BCB는 HepG2 간

암 세포의 apoptosis를 유도하는 것으로 나타나 BCB의 항암효과 가능성을 제시하였고, 암 예방 기능성 후보 소재로서 활용이 가능할 것으로 사료된다.

인용문헌

- Kang, H. I., Kim, J. Y., Cho, H. D., Park, K. W., Kang, J. S. and Seo, K. I. (2010) Resveratrol induces apoptosis in primary human prostate cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **39**: 1119-1125.
- Park, S. Y., Kim, J. Y., Park, K. W., Kang, K. S., Park K. H. and Seo, K. I. (2009) Effects of thiosulfinates isolated from *Allium tuberosum* L. on the growth of human cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **38**: 1003-1007.
- Kim, N. (2008) Butein-induced apoptosis in human T lymphoma Jurkat cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **39**: 150-154.
- Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E. and Capaccioli, S. (2009) Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol. Res.* **59**: 365-378.
- Choi, J. H., Kim, H. I. and Lee, I. S. (2009) Effect of *Rosmarinus officinalis* L. on growth inhibition and apoptosis induction in cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **38**: 1008-1015.
- Cho, B. O., Ryu, H. W., So, Y. K., Jin, C. H., Byun, M. W., Kim, W. G. and Jeong, I. Y. (2012) *Ishige sinicola* extracts induce apoptosis via activation of a caspase cascade in human HeLa cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **41**: 901-906.
- Lin, L. W., Chen, H. Y., Wu, C. R., Liao, P. M., Lin, Y. T., Hsieh, M. T. and Ching, H. (2008) Comparison with various parts of *Broussonetia papyrifera* as to the antinociceptive and

- anti-inflammatory activities in rodents. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**: 2377-2384.
8. Sun, J., Liu, S. F., Zhang, C. S., Yu, L. N., Bi, J., Zhu, F. and Yang, Q. L. (2012) Chemical composition and antioxidant activities of *Broussonetia papyrifera* fruits. *PLoS One.* **7**: e32021.
 9. Ryu, H. W., Lee, B. W., Curtis-Long, M. J., Jung, S., Ryu, Y. B., Lee, W. S. and Park, K. H. (2010) Polyphenols from *Broussonetia papyrifera* displaying potent alpha-glucosidase inhibition. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 202-228.
 10. Ko, H. H., Yu, S. M., Ko, F. N., Teng, C. M. and Lin, C. N. (1997) Bioactive constituents of *Morus australis* and *Broussonetia papyrifera*. *J. Nat. Prod.* **60**: 1008-1011.
 11. Lin, C. N., Lu, C. M., Lin, H. C., Fang, S. C., Shieh, B. J., Hsu, M. F., Wang, J. P., Ko, F. N. and Teng, C. M. (1996) Novel antiplatelet constituents from formosan moraceous plants. *J. Nat. Prod.* **59**: 834-838.
 12. Chen, R. M., Hu, L. H., An, T. Y., Li, J. and Shen, Q. (2002) Natural PTP1B inhibitors from *Broussonetia papyrifera*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**: 3387-3390.
 13. Lee, D., Bhat, K. P., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., Pezzuto, J. M. and Kinghorn, A. D. (2001) Aromatase inhibitors from *Broussonetia papyrifera*. *J. Nat. Prod.* **64**: 1286-1293.
 14. Sohn, H. Y., Son, K. H., Kwon, C. S., Kwon, G. S. and Kang, S. S. (2004) Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. *Phytomedicine.* **11**: 666-672.
 15. Sohn, H. Y., Kwon, C. S. and Son, K. H. (2010) Fungicidal effect of prenylated flavonol, papyriflavonol A, isolated from *Broussonetia papyrifera* (L.) vent. against *Candida albicans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 1397-1402.
 16. Yang, C., Li, F., Du, B., Chen, B., Wang, F. and Wang, M. (2014) Isolation and characterization of new phenolic compounds with estrogen biosynthesis-inhibiting and antioxidant activities from *Broussonetia papyrifera* leaves. *PLoS One.* **9**: e94198.
 17. Park, S., Fudhaili, A., Oh, S. S., Lee, K. W., Madhi, H., Kim, D. H., Yoo, J., Ryu, H. W., Park, K. H. and Kim, K. D. (2016) Cytotoxic effects of kazinol A derived from *Broussonetia papyrifera* on human bladder cancer cells, T24 and T24R2. *Phytomedicine.* **23**: 1462-1468.
 18. Guo, F., Feng, L., Huang, C., Ding, H., Zhang, X., Wang, Z., Li, Y. (2013) Prenylflavone derivatives from *Broussonetia papyrifera*, inhibit the growth of breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Phytochem. Lett.* **6**: 331-336.
 19. Pang, S. Q., Wang, G. Q., Lin, J. S., Diao, Y. and Xu, R. A. (2014) Cytotoxic activity of the alkaloids from *Broussonetia papyrifera* fruits. *Pharm Biol.* **52**: 1315-1319.
 20. Chae, Y. H., Shin, D. Y., Park, C., Lee, Y. T., Moon, S. G. and Choi, Y. H. (2011) Induction of apoptosis in human colon carcinoma HCT116 cells using a water extract of *Lepidium virginicum* L. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **40**: 649-659.
 21. Tan, M. L., Ooi, J. P., Ismail, N., Moad, A. I. H. and Muhammad, T. S. T. (2009) Programmed cell death pathways and current antitumor targets. *Pharm. Res.* **26**: 1547-1560.
 22. Fulda, S. (2009) Caspase-8 in cancer biology and therapy. *Cancer Lett.* **281**: 128-133.
 23. Mellier, G., Huang, S., Shenoy, K. and Pervaiz, S. (2010) TRAILing death in cancer. *Mol. Aspects Med.* **31**: 93-112.
 24. Kim, J. E., Chung, W. Y., Chun, K. S., Lee, C. K., Park, H. J., Kim, W. B. and Park, K. K. (2010) *Pleurospermum kamtschaticum* extract induces apoptosis via mitochondrial pathway and NAG-1 expression in colon cancer cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**: 788-792.
 25. Cao, X. H., Wang, A. H., Wang, C. L., Mao, D. Z., Lu, M. F., Cui, Y. Q. and Jiao, R. Z. (2010) Surfactin induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through a ROS/JNK-mediated mitochondrial/caspase pathway. *Chem. Biol. Interact.* **183**: 357-362.
 26. Li-Weber, M. (2013) Targeting apoptosis pathways in cancer by Chinese medicine. *Cancer Lett.* **332**: 304-312.
 27. Zhu, Y., Jiang, Y., Shi, L., Du, L., Xu, X., Wang, E., Sun, Y., Guo, X., Zou, B., Wang, H., Wang, C., Sun, L. and Zhen, Y. (2017) 7-O-Geranylquercetin induces apoptosis in gastric cancer cells via ROS-MAPK mediated mitochondrial signaling pathway activation. *Biomed. Pharmacother.* **87**: 527-538.
 28. Ding, Y., Ren, K., Dong, H., Song, F., Chen, J., Guo, Y., Liu, Y., Tao, W. and Zhang, Y. (2017) Flavonoids from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves inhibit proliferation and induce apoptosis in PC-3 cells by activation of oxidative stress and mitochondrial apoptosis. *Chem. Biol. Interact.* **275**: 210-217.
 29. Wang, Q., Wang, H., Jia, Y., Pan, H. and Ding, H. (2017) Luteolin induces apoptosis by ROS/ER stress and mitochondrial dysfunction in glioblastoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **79**: 1031-1041.
 30. Su, CH., Kuo, C. L., Lu, K. W., Yu, F. S., Ma, Y. S., Yang, J. L., Chu, Y. L., Chueh, F. S., Liu, K. C. and Chung, J. G. (2017) Fisetin-induced apoptosis of human oral cancer SCC-4 cells through reactive oxygen species production, endoplasmic reticulum stress, caspase-, and mitochondria-dependent signaling pathways. *Environ. Toxicol.* **32**: 1725-1741.
- (2017. 11. 28 접수; 2017. 12. 13 심사;
2017. 12. 15 게재확정)