



## 감태나무 뿌리 추출물에 의한 대장암세포의 성장억제 및 세포사멸유도

김예언<sup>1</sup> · 문하린<sup>2</sup> · 한인화<sup>1</sup> · 윤정미<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>광주여자대학교 식품영양학과, <sup>2</sup>전남대학교 식품영양학과

### Anti-proliferative and Apoptotic Activity of Extracts of *Lindera glauca Blume* root in Human HCT116 Colorectal Cancer Cells

Yeah-Un Kim<sup>1</sup>, Ha-Rin Moon<sup>2</sup>, Inhwa Han<sup>1</sup>, Jung-Mi Yun<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Kwangju Women's University

<sup>2</sup>Department of Food and Nutrition, Chonnam National University

#### Abstract

*Lindera glauca Blume* has been used in Korean traditional medicine to treat the symptoms of paralysis, abdominal pain, speech disorders, extravasations, contusions, and pain caused by rheumatoid arthritis. We investigated the effect of *L. glauca Blume* extracts on the proliferation of colorectal cancer cells *in vitro* using HCT116 human colorectal cancer cell lines. We also investigated its mechanism of action. For this purpose, we used the MTT assay, western blotting, DNA fragmentation analysis, and flow cytometry. HCT116 cells were cultured in several concentrations of ethanol extracts of *L. glauca Blume* root (0, 50, 100 µg/mL). In this study, colon cancer cell growth was inhibited by *L. glauca Blume* root extract in a dose-dependent manner. It was associated with induction of apoptosis as assessed by nuclear fragmentation and cell cycle analysis. Apoptosis was assessed using western blotting for TNF- $\alpha$ , IL-6, NF- $\kappa$ B, Caspase-3, PARP, Bax, Bcl-2, and SIRT1. The extract also dose-dependently upregulated the expression Bax, the pro-apoptotic gene and downregulated the expression of the anti-apoptotic gene Bcl-2. Furthermore, the extract enhanced Caspase-3 activity in a dose-dependent manner. Our findings provide evidence that *L. glauca Blume* extract may mediate its anti-proliferative effect via the modulation of apoptosis.

**Key Words** : *Lindera glauca Blume*, anti-proliferative activity, apoptosis, HCT116, colorectal cancer cells

#### 1. 서 론

암은 유전적, 비유전적 원인으로 인체 면역기전이 손상되어 정상 세포가 무한증식 및 돌연변이화되어 생성된다고 보고되고 있다(Novotny & Szekeres 2003). 대장은 소화 및 흡수되고 남은 음식물이 머무르는 곳으로 많은 종류의 세균이 번식하고 있고, 특히 S상결장과 직장은 암이 생기기 쉬운 부위이다(Gustin & Brenner 2002). 국내의 대장암 발생률은 갑상선암과 위암에 이어 3위를 차지하고 있을 정도로 중요한 암종이다(Lim & Jun 2019). 특히 대장암은 다른 암들보다 증상이 늦게 나타나 통증을 느낄 때에는 거의 말기에 접어든 상태이며 대장암은 외과적 수술로 약 80%의 절제술을 시행함으로써 치료할 수 있음에도 불구하고 생존율이 50% 밖에 되지 않기 때문에 발병에 앞서 예방에 큰 관심이 집중되고 있다(Jemal et al. 2007).

최근 여러 가지 암을 예방하기 위해 전통 생약재 및 과일 채소 등 천연물 소재에서 항암 성분을 탐색하고 발굴하는 연구가 활발하게 이루어지고 있으며(Hu et al. 2016), 화학적 암 예방 식품 소재는 암세포의 증식 및 전이 등을 차단할 통해 항암 작용을 나타내는 것으로 보고된다(Sun et al. 2004; Shin et al. 2017). 비정상적인 암세포 성장을 제어하기 위해서 세포사멸 기전을 유도하는 것은 암 예방 및 암 치료의 표적이 될 수 있으며, 최근 다양한 종양 세포에서 세포사멸을 유도하는 항암제에 관한 연구들이 많이 보고되고 있다(Lowe & Lin 2000; Wenzel et al. 2000; Song et al. 2005). 대표적으로 포도 껍질에서 분리한 레스베라트롤(resveratrol)을 비롯하여 다양한 식물유래 생리활성물질 등이 있으며 이들은 여러 암 연구에서 예방 및 치료 효과를 보이고 있다(Mosmann 1983; Vermes et al. 1995). 아포토시스(apoptosis)는 병리 상태뿐만 아니라 정상 조직의 생체 항상성에 반드시

\*Corresponding author: Prof. Jung-Mi Yun, Department of Food and Nutrition, Chonnam National University, 77 yongbong-ro, Buk-gu, Gwangju, 61186, South Korea Tel: +82-62-530-1332 Fax: +82-62-530-1339 E-mail: sosung75@jnu.ac.kr

필요한 세포 자가사멸이다(Vaux & Korsmeyer 1999; Hidalgo 2003). 아포토시스는 탈수에 의한 세포 수축, 세포 내 칼슘이온 농도 증가, DNA 분절, 염색질 응축, phosphatidylserine이 세포막 밖으로 노출되는 등 다양한 생리적 현상이 동반되며 최종적으로 apoptotic body 형성과 함께 식세포 작용을 거치는 일련의 과정을 의미한다(Lee & Kim 2011). 즉, 아포토시스는 세포 형태와 내부의 생화학적 변화로 말미암아 세포가 주변에 영향을 주지 않고 죽는 것으로 정리된다. 아포토시스 경로는 extrinsic pathway와 intrinsic pathway로 구분된다(Baliga & Kumar 2003). Intrinsic pathway는 미토콘드리아 의존적인 아포토시스 과정으로서 약물, 방사선 및 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 등과 같은 여러 가지 자극 때문에 미토콘드리아 외막에 존재하는 Bcl-2 family의 발현에 영향을 주게 되면 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential, MMP)의 소실로 인해 세포질로 방출된 cytochrome c가 Apaf-1을 형성하여 caspase-9을 활성화시키고, caspase-9은 하위 신호의 caspase-3, -6, -7의 활성을 유도하는 경로이다. 그리고 extrinsic pathway는 death receptor인 Fas, TNF receptor를 경유하여 Fas-associated death domain protein (FADD), caspase-8의 활성을 일으키는 경로이다(Zou et al. 1999; Bratton et al. 2001; Baliga & Kumar 2003; Donovan & Cotter 2004; Letai 2005). Caspase-3, Bax는 아포토시스 과정을 활성화하는 단백질로, Bcl-2는 아포토시스를 억제하는 단백질로 알려졌다(Green & Reed 1998; Ashkenazi & Dixit 1999; Park et al. 2009).

대장에서의 만성염증은 대장암의 발생 증가와 높은 상관 관계를 갖으며, 이미 여러 연구에서 대장암의 발생에 있어서도 염증성 장질환이 암의 발생 및 진전에 밀접한 관련이 있음이 확인된 바 있다(Lee & Seo 2019). 이미 우리의 선행 연구에서 감태나무 추출물에 의해서 p53 gene mutation type HT-29 대장암세포 증식억제활성이 있음을 확인하였다(Kim & Yun 2015). 따라서 본 연구에서는 인체 대장암 세포주 p53-null HCT116를 가지고 암세포증식억제기전을 연구하고자 하였다.

감태나무(*Lindera glauca Blume*)은 낙엽과에 속하는 낙엽 관목으로 중국, 한국, 대만의 산악 지대에 널리 분포한다(Suh et al. 2015). 감태나무의 열매는 복통 및 언어 장애를 포함한 마비 증상을 치료하기 위한 전통생약제로 사용된다. 감태나무의 잎은 독의 영향을 막고 출혈을 막기 위한 민간 치료제로 사용하고 있다. 또한 감태나무의 뿌리는 전통적으로 류마티스 관절염으로 인한 유출, 타박상 및 통증에 대한 치료제로 의약품으로 사용하고 있다(Niu et al. 2015; Yu et al. 2017). 감태나무에서 분리된 생리활성물질로는 alkaloid, diarylpropanoids, sesquiterpenoid, flavonoid, phenolic compound와 steroid가 있으며(Seki et al. 1994; Seki et al. 1995; Chang et al. 2000; Chang et al. 2001, Huh et al. 2011;

Huh et al 2012), 최근 연구에서는 감태나무의 질소화합물과 monoterpene이 항암 활성을 나타낸다고 보고된 바 있다(Wang et al. 2011). 그 중 감태나무 가지의 메탄올 추출물이 Sulforhodamine B (SRB) 검정에서 A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, HCT-15 세포에 대해 우수한 세포 활성을 가졌다고 알려졌다(Wang et al. 2011). 감태나무에 관한 연구로는 항산화 효과(Kim et al. 2019a), 항균활성(Yang et al. 1999), LDL-항산화 활성(Huh et al. 2014), 항염 작용(Ruan et al. 2020) 등 선행연구들이 있다. 그러나 감태나무 뿌리의 항종양 활성에 대해서 보고된 바가 없다.

따라서 본 연구는 HCT116 인간 대장암 세포에 감태나무 뿌리의 에탄올 추출물을 처리함으로써 암세포 성장억제 및 그 기전으로 아포토시스 유발 등을 확인하고자 하였다.

## II. 연구 내용 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에 사용된 *Lindera glauca Blume* root (감태나무 뿌리)은 식품의약품안전처 식품원재료 데이터베이스에서 식용 가능함을 확인한 약초로서 광주광역시 광산구 월곡동 월곡시장(Gwangju, Korea) 구입하였다. 세포배양에 사용된 RPMI 1640 배지 및 fetal bovine serum (FBS), protease & phosphatase inhibitor cocktail and BCA protein assay kit는 Thermo Scientific (Waltham, USA)에서 구입하였다. NucBuster™ protein extraction kit는 Novagen (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. phosphate-buffered saline (PBS), 0.25% trypsin-EDTA는 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. DMSO, Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)는 Sigma Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 3-(4-5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), RIPA buffer는 Biosesang (seongnam, Korea)에서 구입하였다. Chemiluminescence (ECL) solution kit는 Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK)에서 구입하였다. Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), caspase-3, Bax, Bcl-2 항체는 Cell signaling (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. Interleukin-6 (IL-6), Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), SIRT1,  $\beta$ -actin 1차 항체와 2차 항체인 anti-mouse IgG-HRP, anti-goat IgG-HRP 및 anti-rabbit IgG-HRP는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA)에서 구입하였다.

### 2. 추출물의 제조

본 연구에 사용된 감태나무 뿌리는 분말 건조 시료 g당 8배의 99.9% 에탄올을 가하여 교반하였다. 교반한 용액을 환류 냉각 50°C에서 2시간 교반하여 추출의 과정을 3번거치고 여과하여 얻었다. 이렇게 얻어진 추출액을 회전진공농축기

(rotary vacuum evaporator, BUCHI Labortechnik AG, Switzerland)로 감압농축, 건조하여 고형물의 함량을 산출하였다. 감태나무 뿌리 추출물 수율(%)은 [추출 분말의 무게 (g)/처음 사용한 시료(g)]×100으로 나타내었다. 사용 때까지 -20°C에서 보관하여 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 사용하였다.

### 3. 세포배양

HCT116는 인간 대장암 유래 세포주로 한국세포주은행 (Seoul, Korea)으로부터 분양을 받아서 사용하였다. HCT116 세포배양을 위해 사용한 RPMI 1640 배지에 10% FBS를 첨가하고 미생물의 오염이나 증식을 억제하기 위해 1% penicillin을 첨가한 다음 95%의 습도가 유지되는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA)에서 배양하였다. 세포가 80% 정도 dish를 덮으면 0.25% trypsin- EDTA를 처리하여 계대 배양하여 사용하고 passage 수치가 10이 넘어가면 폐기하였다.

### 4. 세포 증식 억제능 측정

감태나무 뿌리 추출물의 HCT116 세포 증식억제 실험을 측정하기 위해 MTT assay를 실시하였다. HCT116 세포는 96 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well의 양으로 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 그 후 배지를 제거한 다음 각 시료를 RPMI 1640 배지로 희석하여 대조군에는 시료 대신 PBS를 100 µL씩 첨가하고 다른 각 well당 시료를 100 µL씩 첨가한 후 다시 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양한 후 MTT (1 mg/mL) 용액을 각각 200 µL씩 첨가하여 4시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 배양 후 formazan 형성을 현미경으로 관찰하고 바닥에 형성된 formazan 결정이 흐트러지지 않도록 주의하면서 모든 well의 배지를 제거하고 각 well에 DMSO 200 µL씩 첨가한 후 ELISA reader (Biochrom, Cambridge, UK)를 이용하여 흡광도 570 nm에서 측정하였다.

### 5. Western blot analysis

HCT116 세포를  $1 \times 10^5$  cells 밀도로 100 mm dish에 분주하여 24시간 안정화되도록 배양하였다. FBS free media로 교체해준 후 일정 농도의 감태나무 뿌리 추출물을 처리하여 48시간 배양한 다음 cell pellet을 만들었다. Total cell lysate를 만들기 위해 세포를 ice-cold PBS로 행구고, RIPA buffer [150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA (pH 8.0)]와 protease & phosphatase inhibitor cocktail, EDTA-free (Thermo Scientific, USA)를 첨가하여 교반하였다. 침전물은 10,000 rpm, 4°C, 10분간 원심분리하여 제거한 후 상층액을 취해 whole cell lysate로 사용하였다.

Nuclear lysate는 NncBuster™ Protein Extraction Kit (Novagen, San Diego, CA, USA)를 이용하여 추출하였다. Lysate의 단백질 농도는 BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)을 사용하여 정량하였다. Cell lysate를 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리한 후 nitrocellulose membrane (Invitrogen, novex, USA)에 이동시켰다. Membrane은 5% skim milk blocking buffer (20 mM Tris-Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween)에서 2시간 동안 blocking하고 1차 항체 (1:1,000~5,000 희석)를 상온에서 2시간 동안 교반하였다. 그 후 2차 항체 IgG-HRP를 첨가하여 2시간 동안 교반한 다음 ChemiDoc (BIO-RAD Laboratories, CA, USA)을 이용하여 각 단백질의 양을 탐색하였다. 단백질들의 발현 정도는 ECL solution (Amersham Pharmacia Biotech)을 사용하여 측정하였다. 분자량은 Broad-range pre-stained protein marker (Elpls, USA)와 비교, 분석하였다.

### 6. DNA 분절 현상 측정

정상 배지에서 자란 세포와 감태나무 뿌리 추출물이 처리된 배지에서 자란 세포를 모은 다음 원심분리를 이용하여 상층액을 제거하였다. 상층액이 제거된 세포에 100 µL PBS와 100 µL lysis buffer를 처리하여 ice bucket에서 30분간 반응시킨 다음 4°C, 14,000 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 분리된 상층액에 1 mg/mL의 RNase를 처리하여 37°C에서 45분 동안 반응시킨 다음 phenol:chloroform=1:1, sigma를 450 µL씩 첨가하고 14,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 추출하여 차가운 100% 에탄올과 10 M ammonium acetate를 넣고 -80°C에서 30분 이상 보관하였다. 그 후 4°C, 14,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 70% 에탄올을 넣어 다시 4°C, 14,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 건조하여 DNA sample을 만들었다. 각 DNA sample을 2.0% agarose gel에서 전기영동 시킨 후 ethidium bromide (ErBr)로 염색하여 ultra violet (UV)하에서 사진 촬영하여 DNA 분절 여부를 확인하였다.

### 7. 세포주기 측정

Sub-G1 단계의 세포 수를 측정하기 위해 세포주기 분석을 수행하였다. 세포를 6 well plate에  $1 \times 10^6$  cells/well의 양으로 분주하고, 다양한 농도의 감태나무 뿌리 추출물로 48시간 동안 처리하였다. 세포에 trypsin 처리 후 PBS로 세척한 다음 -20°C에서 밤새 70% 에탄올로 고정시켰다. 고정된 세포를 PBS로 세척하고 차가운 Propidium Iodide (PI; Sigma-Aldrich)용액에 현탁시키고, 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후 Cytomic FC500 flow cytometer (Beckman Coulter, Istanbul, Turkey)를 이용하여 세포주기를 분석하였다.

8. 통계처리

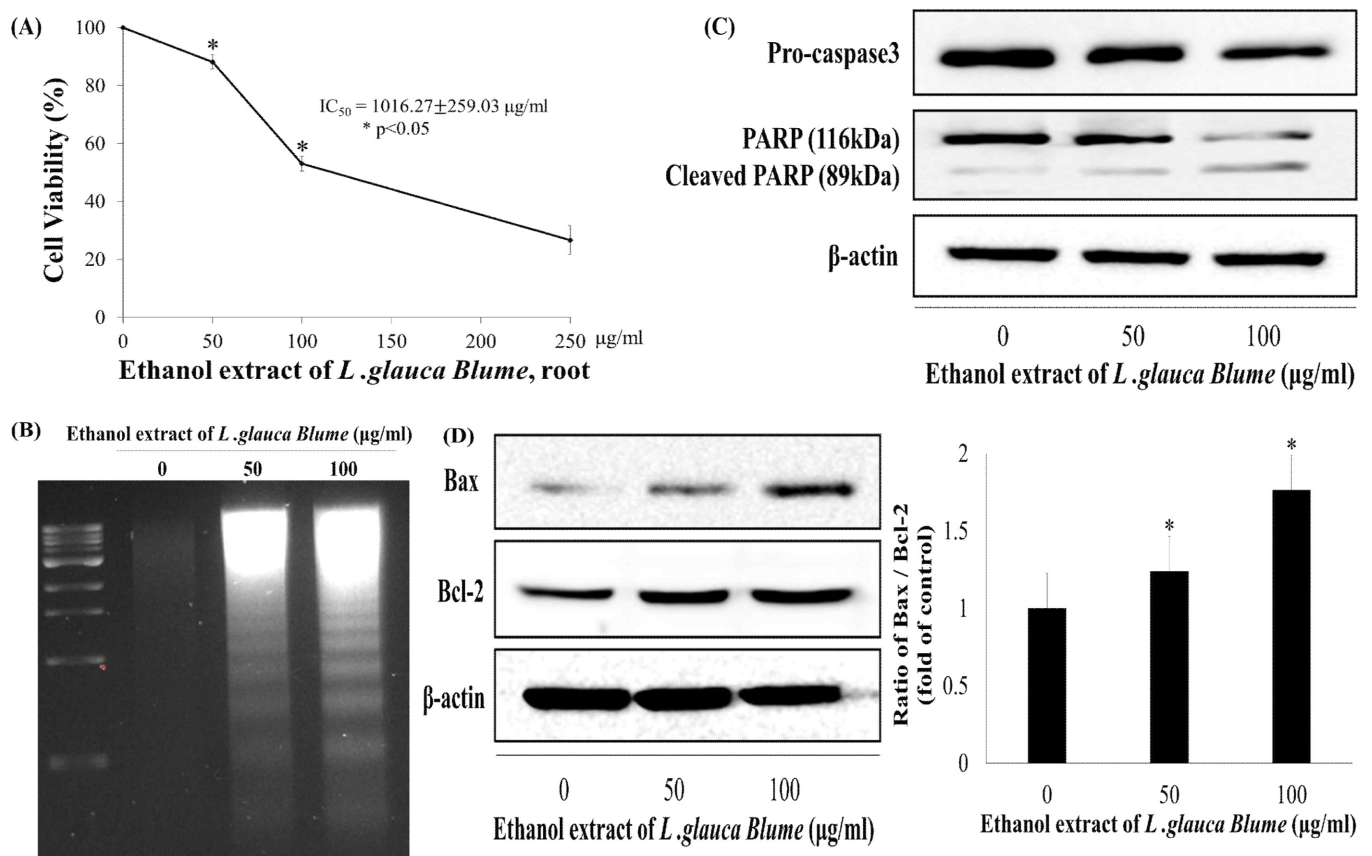
실험 결과는 3번의 반복실험 하였으며, 그 결과를 평균±표준편차로 나타내었다. 각 실험 결과의 통계적 유의성 검토하기 위해 SPSS (version 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 Student's t-test에 의하여 판정하였다. p값이 0.05 미만일 때 유의성이 있다고 판단하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 감태나무 뿌리 추출물 처리에 의한 HCT116 암세포 성장 억제효과

건조된 감태나무 뿌리 100g의 에탄올 추출 수율은 9.07%로 산출되었다. HCT116 세포 증식에 감태나무 뿌리 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위해 추출물을 0, 50, 100, 150, 200, 250 µg/mL 농도로 처리하고 48시간 동안 배양하여 조사하였다. 측정된 흡광도는 MTT가 세포에 의해 환원된 양을 나타내며, 따라서 이 값은 각 well에 살아있는 세포수와 비례한다. 추출물을 처리하지 않은 세포를 대조군으로 하였

을 때의 상대적인 세포 성장 억제능으로 나타냈다. <Figure 1A>와 같이 감태나무 뿌리 추출물 처리 농도가 증가함에 따라 HCT116 세포 생존율이 감소하는 것으로 확인하였다. IC<sub>50</sub>는 시료 농도에 따른 암세포 성장 억제능 변화 곡선으로부터 암세포를 50% 성장 억제시키는 농도를 표시한 것이다. <Figure 1A>에서 보여지는 것과 같이 HCT116 세포에서 IC<sub>50</sub>값은 1016.27±259.03 µg/mL로 HCT116 세포 성장을 억제하는 것으로 확인하였다. 우리의 연구와 유사하게 대장암 세포에 다양한 추출물을 처리하여 세포 성장을 억제하는 연구가 많이 진행되고 있다. Kim et al.(2019b)의 연구에서 대장암세포 SW480 세포에 상동나무 잎과 가지 추출물을 처리하였을 때 세포 성장을 억제하는 것을 확인하였다(Kim et al. 2019b). 또한 Jo et al.(2007)의 연구에서도 대장암세포 HT-29 세포에 만형자 추출물을 처리하였을 때 암 세포 성장을 억제 효과를 확인했다(Jo et al. 2007). 이와 같이 본 연구 결과 감태나무 뿌리는 HCT116 세포의 성장 생존율이 유의성을 가지고 농도 의존적으로 감소함을 확인함으로써 감태나무에는 이러한 생리활성을 나타내는 유용성분을 함유하



<Figure 1> Effect of *L. glauca Blume* extract on cell growth and apoptotic mechanism in HCT116 cells.

(A) Effect of *L. glauca Blume* extract on the viability of HCT116 colorectal cancer cells. Cells were treated with various concentrations of *L. glauca Blume* extract for 48 hr. Cells viability was measured by MTT assay. (B) Effect of *L. glauca Blume* extract on DNA fragmentation in HCT116 cells. (C) Effect of *L. glauca Blume* extract on PARP cleavage and caspase-3 activation in HCT116 cells. (D) Effect of *L. glauca Blume* extract treatment to HCT116 cells on the expression of Bcl-2 family proteins and Bax/Bcl-2 ratio. Mean±SD of three independent experiments. The significance was determined by a Student's t-test (\*p<0.05)



고 있을 것이라고 생각된다. 선행연구들을 보면 현재까지 감태나무에는 (+)-3-chloro-N-formylnormentanin, (+)-N-formylnormentanin, (+)-norboldin, (-)-norboldin, lysicamine, akolactone A, methylparaben, phytol, squalene,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitostenone, stigmasta-4,22-dien-3-one, 6 $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -sitostenone, 6 $\beta$ -hydroxystigmasterone,  $\beta$ -sitosteryl-D-glucoside, linderanosides A, linderanosides B, linderanoside C가 알려져 있고(Chang et al. 2000; Chang et al. 2001), 그중에서 lysicamine,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitostenone는 위암과 전립선암의 항산화 및 암세포 증식효과가 보고된바 있으며 phytol은 유방암세포의 증식 억제효과가 보고된바 있다(Liu et al. 2014; De Alencar et al.). 이렇듯 현재까지는 감태나무의 대장암 증식억제능에 관여하는 유용성분에 대해서는 더 많은 추가 연구가 필요하다.

2. 감태나무 뿌리 추출물 처리에 의한 DNA 분절 유도효과

아포토시스 진행 시 발생하는 DNA 분절은 세포 내 endonuclease가 활성화되어 DNA가 180-200 bp 길이로 절편화되며 발생하는 것으로 알려져 있다(Reed 2001). 감태나무 뿌리 추출물의 HCT116 세포의 증식억제의 기전을 연구하기 위해 DNA 분절을 확인하였다. <Figure 1B>와 같이 감태나무 뿌리 추출물에 의하여 HCT116 세포의 DNA 분절화를 관찰하였다. 감태나무 뿌리 추출물을 처리하지 않은 경우 DNA 분절이 관찰되지 않았지만 처리한 경우에는 추출물 농도(0, 50, 100  $\mu$ g/mL)가 증가함에 따라 DNA laddering 현상이 증가하여 아포토시스가 유도되었음을 알 수 있다. 생약재 및 식품 추출물을 이용하여 아포토시스 세포사멸을 확인하기 위해서 여러 연구에서는 일련의 연구로 DNA 분절을 확인한 바 있다. Lee et al.(2008)의 연구에서 아보카도 추출물을 암세포에 처리하였을 때 DNA 분절이 증가하는 것을 확인했다(Lee et al. 2008). 또한, Yoon & Kim(2008)의 연구에서는 MCF-7 유방암세포에 천련자 메탄을 추출물을 처리하였을 때 DAN 분절 현상이 농도 의존적으로 증가한 것을 확인했다(Yun & Kim 2008). 즉, 감태나무 뿌리에 의한 세포 증식 억제 효과는 아포토시스와 밀접한 연관성이 있음을 확인하였다.

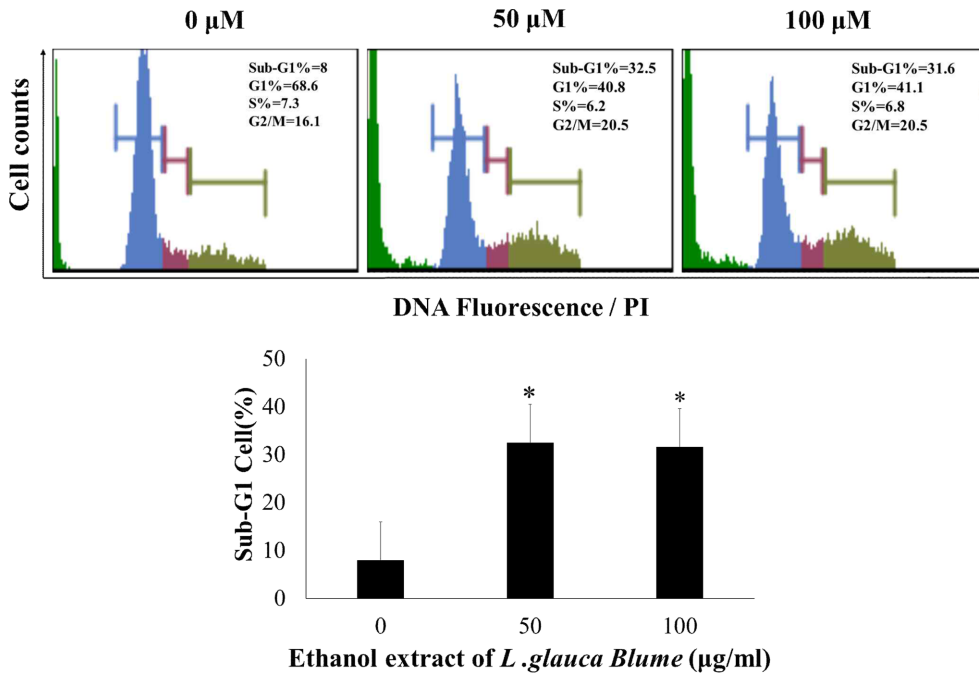
3. 감태나무 뿌리 추출물 처리에 의해 Caspase의 활성화 및 PARP분절

Caspase는 cystein protease로 아포토시스의 중요한 조절인자로 작용한다(Debatin 2004). 최근 연구에 의하면 암세포의 아포토시스를 유도하는 천연물은 caspase의 활성을 증가시키는 것으로 보고된다(Jo et al. 2005; Ye et al. 2005). Caspase는 여러 종류가 존재하며 서로 상호작용을 한다. 아포토시스 하위의 effector caspase를 활성화하는 initiator caspase에는 caspase-8와 caspase-9가 있으며, 두 caspase는 서로 다른 경로(intrinsic & extrinsic pathway)에 의해 활성화되어 그 하위 신호인 caspase-3의 활성화로 이어져 세포의

자가사멸이 일어난다(Delhalle et al. 2003). Effector caspase인 caspase-3는 PARP를 절단하여 아포토시스를 유도하는 중요한 단백질 효소 중의 하나이다(Lazebnik et al. 1994). 감태나무 뿌리 추출물 처리에 의한 caspase 활성화와 PARP의 분절을 확인하기 위하여 HCT116 세포에 추출물을 0, 50, 100  $\mu$ g/mL 농도로 처리하고 48시간 동안 배양한 후 westernblot assay를 이용하여 확인하였다. 그 결과 농도 의존적으로 pro-caspases 3의 발현이 감소하였음을 확인할 수 있었으며, 89kDa의 PARP의 cleavage도 관찰되는 것을 알 수 있었다 <Figure 1C>. 따라서 감태나무 뿌리 추출물에 의해 pro-caspases 3가 활성화되고 PARP 단백질을 분해하여 HCT116 세포의 아포토시스가 유도됨을 확인할 수 있었다. 우리의 연구결과와 유사하게 Shin et al.(2009)에 의한 연구에 따르면 흑마늘 추출물 처리 농도에 따라 pro-caspase 3 발현을 감소시키고 PARP의 분절을 유도함을 보고하였다(Shin et al. 2009). 또한 Kim et al.(2016)의 연구에서도 A549 폐암 세포에서 개똥쑥 추출물을 처리하였을 때 caspase-3 발현이 농도 의존적으로 감소되었고 PARP 분절을 유도함을 확인하였다(Kim et al. 2016). 이와 같이 본 연구의 감태나무 뿌리 추출물이 caspase-3를 활성화 시키고 PARP의 분절을 일으켜 아포토시스를 유도한 것으로 생각된다.

4. HCT116 세포의 Bcl-2와 Bax의 발현에 감태나무 뿌리 추출물 처리가 미치는 영향

Bcl-2 family는 미토콘드리아 막 투과성을 조절하는 단백질로 미토콘드리아 막에 존재하거나 세포사멸 유도 신호에 의해 미토콘드리아 막으로 이동하여 세포사멸을 조절하는 중요한 역할을 한다(Alves et al. 2007). Bcl-2 family에 속하는 Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Bax, Bad, Bak, Bid, Bcl-xs 등은 아포토시스의 경로를 조절하는 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Lee et al. 2007). Pro-apoptotic 단백질 Bax는 미토콘드리아의 막 투과성을 증가시키고, cytochrome c의 방출을 증가시킴으로써 아포토시스를 유도한다. 반면, anti-apoptotic 단백질 Bcl-2는 pro-apoptotic 단백질과 heterodimer를 형성하여 pro-apoptotic 단백질의 활성을 억제하여 아포토시스를 막는다(Korsmeyer et al. 1993). Bcl-2와 Bax의 발현 정도를 확인하기 위하여 HCT116 세포에서 추출물을 0, 50, 100  $\mu$ g/mL 농도로 처리하고 48시간 배양한 후에 westernblot assay를 이용하여 결과를 확인하였다 <Figure 1D>. 감태나무 뿌리 추출물을 농도별로 처리하였을 때 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2 단백질 발현은 농도 의존적으로 감소하였으며, pro-apoptotic 단백질 Bax의 발현 수준은 증가하는 것으로 확인하였다. 우리의 연구와 유사하게 Kim et al.(2013)의 연구에서도 HCT-15세포에 미역 발효추출물을 처리하였을 때 Bcl-2가 감소되었고, Bax는 증가한 것을 확인하였다(Kim et al. 2013). 또한 Guon et al. (2017)의 연구에서도 인체 대장암 HCT116 세포에서 우전 추출물이 농도 의존적으로 Bcl-2



<Figure 2> Effect of *L. glauca* Blume extraction treatment to HCT116 cells on cell cycle.

(A) HCT116 cells were treated with 0, 50, 100 µg/mL *L. glauca* Blume extract for 48 hr, and the cell cycle distribution was determined by using a Cytomic FC500 flow cytometer. Histograms display sub-G1, G1, S, and G2/M phase of HCT116 cell. (B) The percentage of cells undergoing apoptosis represented by Sub-G1 was plotted as a bar chart for 0, 50, 100 µg/mL respectively. Mean±SD of three independent experiments. The significance was determined by a Student's t-test (\*p<0.05)

를 감소시켰고, Bax를 증가시키는 것을 확인했다(Guon et al. 2017). Park et al. (2010)의 연구에서 인체혈구암세포에 상황버섯 추출물을 처리하였을 때 Bcl-2가 감소되었고, Bax는 증가한 것을 확인하였다(Park et al. 2010). 이와 같이 본 연구의 감태나무 뿌리 추출물이 Bcl-2가 감소시키고 Bax는 증가시킴으로서 intrinsic pathway 아포토시스를 유도한 것으로 생각된다.

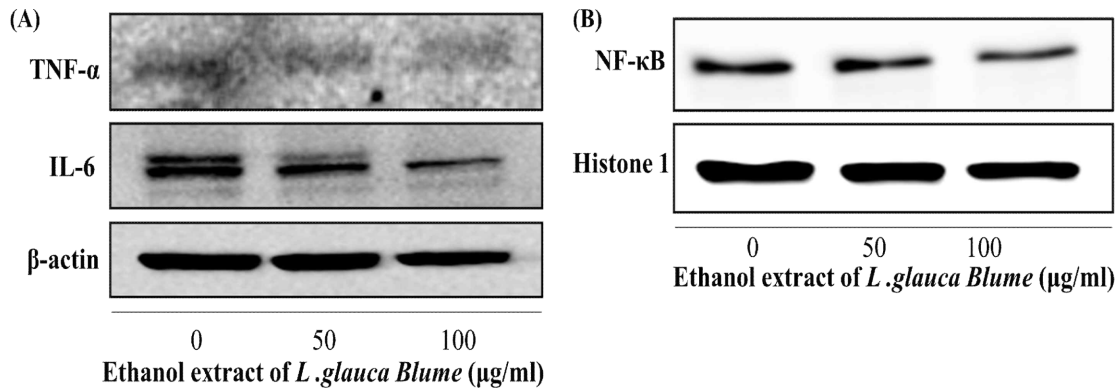
5. 감태나무 뿌리 추출물이 세포주기에 미치는 영향

아포토시스 유도는 세포주기에 따라 달라질 수 있다는 것은 잘 알려져 있다(Malumbres & Barbacid 2009). 많은 항암제가 G1, S기 및 G2/M에서 세포주기 진행을 억제하고 Sub-G1에서는 아포토시스를 유도하여 암세포증식을 억제하는 것으로 보고되고 있다(Khan et al. 2020). 또한 다양한 추출물을 이용하여 여러 암세포의 cell cycle arrest를 통해 세포증식을 억제하는 연구가 많이 진행되고 있다. Khan et al.(2020)의 연구에서 인간 전립선암 PC-3 세포에 모링가 잎 메탄올 추출물을 처리하였을 때 아포토시스를 유발하는 Sub-G1이 농도 의존적으로 증가한 것을 확인했다(Khan et al. 2020). Doan et al.(2020)의 연구에서도 인간 간암 HepG2 세포에 *Chrysophyllum cainito* 줄기 추출물을 처리하였을 때 Sub-G1이 증가하는 것을 확인했다(Doan et al. 2020). Lee et al. (2020)의 연구에서 구강암 세포에 두송 추출물을 처리하였을 때 세포 성장을 억제하는 Sub-G1이 증가하고, S기는

감소한 것을 확인했다(Lee et al. 2020). Huang et al.(2020)의 연구에서 아리수나무 추출물을 인간 간암세포에 처리하였을 때 Sub-G1이 증가한 것으로 확인했다(Huang et al. 2020). 현재 우리의 연구에서는 감태나무 뿌리 추출물이 세포주기에 미치는 영향을 알아보기 위해 HCT116 세포에 추출물을 농도별(0, 50, 100 µg/mL)로 48시간 처리하여 flow cytometry를 통해 분석하였다. 세포주기 변화를 확인한 결과 감태나무 뿌리 추출물 농도가 증가함에 따라 Sub-G1의 비율이 증가한 반면, G1 및 S기는 감소되었다<Figure 2>. 따라서 감태나무 뿌리 추출물이 HCT116세포가 농도 의존적으로 Sub-G1에서 세포 주기의 교란을 통해 아포토시스를 유발한다고 생각된다.

6. 염증성 사이토카인과 NF-κB 유전자 발현에 감태나무 뿌리 추출물의 영향

염증반응이란 대식세포를 포함한 면역세포들이 항원의 침입이나 조직손상과 같은 자극에 의해 손상 부위로 이동하여 항원을 제거하고, 손상의 결과로 생성된 물질을 제거하는 것을 말하며(Lundberg 2000), 생명체의 생존에 필수적인 기능으로 최근에는 염증반응이 신경계 퇴행 및 만성질환의 진행 초기부터 관여할 수 있으며 병리 현상의 완급을 조절하고 세포의 생존과 사멸 조절에 적극적으로 관여한다고 알려졌다(Skaper 2007; McGeer & McGeer 2008). 대식세포는 감염 초기에 생체방어에 중요한 역할을 하는 세포로 NO, 사이토



<Figure 3> Effect of *L. glauca Blume* extraction the expression anti-tumor-related proteins HCT116 cells.

(A) Effect of *L. glauca Blume* extract on inflammatory related genes TNF- $\alpha$  and IL-6 in HCT116 cells. HCT116 cells were treated with 0, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$  *L. glauca Blume* ethanol extract for 48 hr, collected and then lysed. Lysates from the cells were subjected to westernblot assay for TNF- $\alpha$ , IL-6, and  $\beta$ -actin as estimated by westernblot assay. (B) Effect of *L. glauca Blume* extract of activation of NF- $\kappa$ B in HCT116 cells. HCT116 cells were treated with 0, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$  *L. glauca Blume* ethanol extract for 48 hr, collected and then lysed. Lysates from the cells were subjected to westernblot assay for NF- $\kappa$ B and Histone 1

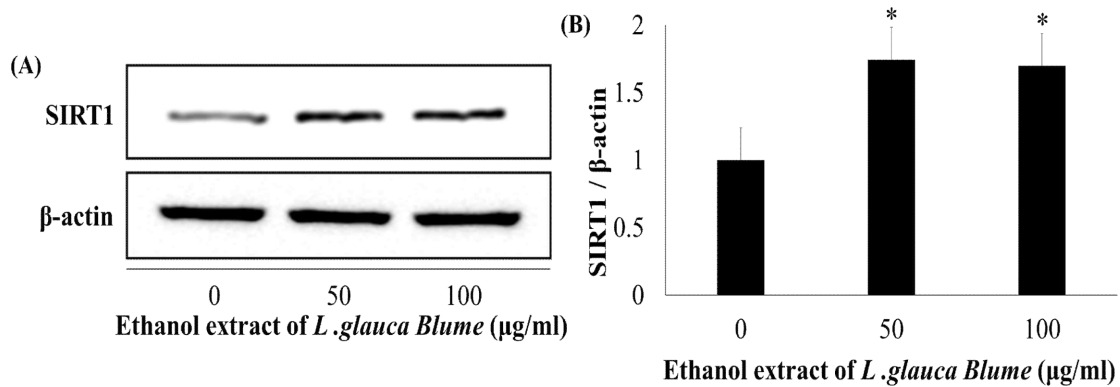
카인 등과 같은 염증 매개물질을 생산하여 염증반응에 관여하게 되는데, 정상수준의 염증반응은 생체방어로서 체내의 항상성을 유지하지만 염증 매개물질이 과량 생산되면 염증성 질환을 유발함으로써 숙주에 치명적인 결과를 초래할 수 있다(Lee et al. 2000; Rocca & FitzGerald 2002). TNF- $\alpha$ 와 IL-6는 활성화된 대식세포로부터 생성되는 대표적인 염증성 사이토카인으로서 초기 염증반응의 발달에 중요한 역할을 한다(Lin et al. 2004). TNF- $\alpha$ 는 대식세포와 비만세포 등에서 분비되며, 많은 자가 면역 질환에서 염증의 개시 및 유지에 핵심적 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 종양 세포에서는 세포 독성 작용을, 염증 세포에서는 염증 유발 작용을 하여 세포의 증식과 분화를 조절한다(Pierce et al. 2001; Delgado et al. 2003). Interleukin-6 (IL-6)는 선천면역과 적응면역 모두에서 기능을 하는 사이토카인이다. IL-6는 다기능성 사이토카인으로 림프성 혹은 비림프성 세포 즉, 단구, B세포, T세포, 혈관내피세포, 섬유모세포 등에서 생성되고 있으며 면역반응, 급성 염증반응 등에 관여한다(Kaplanski et al. 2003). NF- $\kappa$ B는 면역과 염증 반응을 조절하는 전사조절 인자로서 세포 증식이나 변형과 관련되는 세포 신호를 전달하여 TNF- $\alpha$ 와 같은 pro-inflammatory cytokine 등과 같은 다양한 자극 때문에 활성화되어 세포의 immortalization, proliferation, apoptosis 및 inflammation 등에 관여하는 유전자의 발현을 조절하고 NF- $\kappa$ B의 과도한 활성화는 암을 포함한 다양한 질병 유발과 연관되어 있다(Silverman & Maniatis 2001; Hayden & Ghosh 2004). 최근 연구에서는 사이토카인 과잉 발현이 악성 종양의 진행에도 관련되어있는 것으로 보고되고 있다(Kawamura et al. 2012). 따라서 염증 및 암 치료에 있어 pro-inflammatory cytokine의 분비량을 감소시키는 것이 중요하다. 본 연구에서는 감태나무 뿌리 추출물 처리에 의한 염증 관련 유전자 발현의 영향을 확인하기 위해 HCT116 세포에 추출물을 0, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처

리하고 48시간 배양한 후에 westernblot assay를 이용하여 확인하였다. <Figure 3A>에 제시한 바와 같이 TNF- $\alpha$ 와 IL-6는 감태나무 뿌리 추출물 처리에 따라서 농도 의존적으로 감소시켰고 염증성 사이토카인의 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 발현이 HCT116 세포 핵 내에서 추출물의 농도에 의존적으로 감소시킴을 확인하였다<Figure 3B>. 즉 감태나무 뿌리 추출물은 HCT116 세포 증식에 관여하는 염증을 저해함으로써 암 세포증식억제에 관여하는 것으로 생각된다.

### 7. 감태나무 뿌리 추출물 처리가 HCT116 세포의 SIRT1 발현에 미치는 영향

효모의 수명을 조절하는 유전자인 SIR2의 고등동물 상동 유전자(homologue)인 SIRT1 (sirtuin)은 핵에 존재하는 단백질로 NAD-의존성 탈아세틸화 효소활성을 가지고 있는데 이를 통하여 다양한 단백질을 탈아세틸화하여 세포 성장, 노화, 죽음, 대사, DNA 손상의 수복 등 다양한 세포기능의 조절을 통하여 동물의 노화와 수명, 특히 노화기의 건강 상태에 중요한 결정자로서 작용한다(Luo et al. 2000; Yeung et al. 2004). 최근 SIRT1은 항암제 등 치료제의 타겟으로 연구가 활발히 진행되고 있고(Haigis & Guarente 2006), 염증 및 암 전이를 촉진하는 NF- $\kappa$ B 경로를 억제하는 것으로 알려져 있다(Yeung et al. 2004; Wang et al. 2009). 정상상태에서 세포가 DNA 손상을 입었을 때, 종양 억제유전자인 p53은 세포주기를 정지시킨다(Amaral et al. 2010). 세포가 복구할 수 없는 손상을 입게 되면 Bax, Bcl-2, Caspase와 같은 단백질들은 발현시켜 아포토시스를 유도하는 것으로 알려져 있으므로 p53 유전자가 암의 발생과 예방 및 치료에 중심적인 역할을 하여 강조되고 있는 한편 HCT116 세포는 p53 돌연변이가 원인인 악성 종양에 해당된다(Sheu et al. 2010). 대표적인 종양 억제 유전자인 p53의 발현을 중재하는 SIRT1은 HCT116세포의 아포토시스를 일으키는 주요한 조





<Figure 4> Effect of *L. glauca Blume* extract on SIRT1 activation in HCT116 cells.

HCT116 cells were treated with 0, 50, 100 µg/mL *L. glauca Blume* extract for 48 hr, collected and then lysed. Lysates from the cells were subjected to western blot assay for SIRT1 and β-actin. Specific band intensities were measured using a densitometer and SIRT1 induction was calculated as SIRT1/β-actin ratio. Mean±SD of three independent experiments. The significance was determined by a Student's t-test (\*p<0.05)

절인자이다. 감태나무 뿌리 추출물 처리에 의한 SIRT1의 활성을 확인하기 위하여 HCT116 세포에 추출물을 0, 50, 100 µg/mL 농도로 처리하고 48시간 배양한 후에 western blot assay를 이용하여 확인하였다. <Figure 4>에 제시한 바와 같이 감태나무 뿌리 추출물의 농도가 증가함에 따라 SIRT1 단백질 발현이 증가하였다. 이러한 비슷한 경향성은 여러 추출물 연구에서 찾아볼 수 있는데 최근 야관문 추출물이 인간 대장암 HCT116 세포에서 SIRT1 발현이 증가하는 것으로 보고하였고(Zhao et al. 2016), Sung et al.에 의한 연구에 따르면 *Humulus japonicus* 추출물을 처리하였을 때 SIRT1과 p-AMPK의 발현이 증가한 것으로 알려져 있다(Sung et al. 2015). 우리의 이러한 결과는 종양 억제 유전자 발현 및 염증 관련 기전에 관여하는 SIRT1의 발현을 적어도 부분적으로 감태나무 뿌리 추출물에 의해서 조절됨을 알 수 있다.

#### IV. 요약 및 결론

본 연구는 감태나무 뿌리 추출물의 인체 대장암세포 성장 억제 효능 및 그 기전을 연구하였다. 감태나무 뿌리 추출물을 0, 50, 100 µg/mL 농도로 48시간 처리하여 암세포 증식 억제 효과를 측정하고 결과 농도 의존적으로 감소하는 것으로 확인하였다. HCT116 세포에 대한 감태나무 뿌리 추출물의 IC<sub>50</sub> 값은 1016.27±259.03 µg/mL로 확인되었다. 또한 감태나무 뿌리 추출물을 처리한 HCT116 세포에 대한 세포 성장 억제 기전을 확인한 결과 pro-caspase 3의 발현이 감소함에 따라 PARP 및 DNA 분절을 확인하고 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2를 감소시켰으며 pro-apoptotic 단백질인 Bax의 수준을 증가시키는 것으로 확인하였다. 염증 관련 유전자 TNF-α, IL-6 그리고 그 전사인자인 NF-κB는 감태나무 뿌리 추출물 처리 시 농도 의존적으로 감소하였고 유전자 SIRT1의 발현량은 증가하는 것을 확인하였다. 종합적으로, 본 연구의 결과는 감태나무 뿌리 추출물 처리에 따라 아포토시스

(apoptosis)를 통한 HCT116 암세포증식억제를 유도하는 것으로 확인하였다. 감태나무 뿌리의 기능성 소재로 활용할 수 있음을 확인하였으며 앞으로 감태나무 뿌리의 질병에 대한 효능 및 기전 연구가 지속하여야 할 것으로 생각된다.

#### 저자 정보

김예언(광주여자대학교 식품영양학과, 석사, 0000-0003-0127-0363)

문하린(전남대학교 식품영양학과, 석사과정, 0000-0003-4219-4045)

한인화(광주여자대학교 식품영양학과, 교수, 0000-0002-3671-3331)

윤정미(전남대학교 식품영양과학부, 교수, 0000-0001-6044-0647)

#### Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

#### References

Alves NL, Lier RA, Eldering E. 2007. Withdrawal symptoms on display: Bcl-2 members under investigation. Trends Immunol., 28(1):26-32

Amaral, JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM. 2010. The role of p53 in apoptosis. Discov Med., 9(45):145-152

Ashkenazi A, Dixit VM. 1999. Apoptosis control by death and decoy receptors. Curr. Opin. Cell Biol., 11(2):255-260

Baliga B, Kumar S. 2003. Apaf-1/cytochrome c apoptosome: an essential initiator of caspase activation or just a sideshow?. Cell Death Differ., 10(1):16-18

Bratton SB, Walker G, Srinivasula SM, Sun XM, Butterworth M,



- Alnemri ES, Cohen GM. 2001. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and-3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO J.*, 20(5):998-1009
- Chang YC, Chang FR, Wu YC. 2000. The constituents of *Lindera glauca*. *J. Chin. Chem. Soc.*, 47(2):373-380
- Chang YC, Chen CY, Chang FR, Wu YC. 2001. Alkaloids from *Lindera glauca*. *J. Chin. Chem. Soc.*, 48(4):811-815
- De Alencar M, Islam MT, De Lima RMT, Paz M, Dos Reis AC, Da Mata A, Filho J, Cerqueira GS, Ferreira PMP, JMC ES, Mubarak MS, Melo-Cavalcante AAC. 2019. Phytol as an anticarcinogenic and antitumoral agent: An in vivo study in swiss mice with DMBA-Induced breast cancer. *IUBMB Life.*, 71(2): 200-212
- Debatin KM. 2004. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, 53(3):153-159
- Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. 2003. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides*, 37(6):355-361
- Delhalle S, Devoix A, Schnekenburger M, Morceau F, Dicato M, Diederich M. 2003. An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1010(1): 1-8
- Doan HV, Sritangos P, Iyara R, Chudapongse N. 2020. Chrysophyllum cainito stem bark extract induces apoptosis in Human hepatocarcinoma HepG2 cells through ROS-mediated mitochondrial pathway. *PeerJ.*, 10(8):e10168
- Donovan M, Cotter TG. 2004. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.*, 1644(2-3):133-147
- Green DR, Reed JC. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science.*, 281(5381):1309-1312
- Guon TE, Jeong JS, Sook CH. 2017. Effect of Woojeon Extract on Antioxidant and Apoptosis in HCT116 Human Colon Cancer Cells. *J. Kor. Tea Soc.*, 23(3):59-65
- Gustin DM, Brenner DE. 2002. Chemoprevention of colon cancer: current status and future prospects. *Cancer Metastasis Rev.*, 21(3-4):323-348
- Haigis MC, Guarente LP. 2006. Mammalian sirtuins-emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev.*, 20(21):2913-2921
- Hayden MS, Ghosh S. 2004. Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes Dev.*, 18(18):2195-2224
- Hidalgo A. 2003. The control of cell number during central nervous syroot development in flies and mice. *Mech Dev.*, 120(11):1311-1325
- Hu X, Wang J, Xia Y, Simayi M, Ikramullah S, He Y, Cui S, Li S, Wushouer Q. 2016. Resveratrol induces cell cycle arrest and apoptosis in human eosinophils from asthmatic individuals. *Mol. Med. Rep.*, 14(6):5231-5236
- Huang CC, Hwang JM, Tsai JH, Chen JH, Lin H, Lin GJ, Yang HL, Liu JY, Yang CY, Ye JC. 2020. Aqueous Ocimum gratissimum extract induces cell apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. Medical Sci.*, 17(3):338
- Huh GW, Park JH, Kang JH, Jeong TS, Kang HC, Baek NI. 2014. Flavonoids from *Lindera glauca* Blume as low-density lipoprotein oxidation inhibitors. *Nat. Prod. Res.*, 28(11):831-834
- Huh GW, Park JH, Shrestha S, Lee YH, Ahn EM, Kang HC, Baek NI. 2011. Sterols from *Lindera glauca* Blume stem wood. *J. Appl. Biol. Chem.*, 54(4):309-312
- Huh GW, Park JH, Shrestha S, Lee YH, Ahn EM, Kang HC, Kim YB, Baek NI. 2012. New diarylpropanoids from *Lindera glauca* Bl. heartwood. *Holzforchung.*, 66(5):585-590
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. 2007. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J. Clin.*, 57(1):43-66
- Jo EH, Kim SH, Ra JC, Kim SR, Cho SD, Jung JW, Yang SR, Park JS, Hwang JW, Aruoma OI, Kim TY, Lee YS, Kang KS, Kang KS. 2005. Chemopreventive properties of the ethanol extract of chinese licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) root: induction of apoptosis and G1 cell cycle arrest in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett.*, 230(2):239-247
- Jo KJ, Yoon MY, Lee MR, Cha MR, Park HR. 2007. The anticancer effect of extracts from *Vitex rotundifolia* on human colon carcinoma cell lines. *J. Appl. Biol. Chem.*, 50(3):228-232
- Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. 2003. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol.*, 24(1):25-29
- Kawamura M, Toiyama Y, Tanaka K, Saigusa S, Okugawa Y, Hiro J, Uchida K, Mohri Y, Inoue Y, Kusunoki M. 2012. CXCL5, a promoter of cell proliferation, migration and invasion, is a novel serum prognostic marker in patients with colorectal cancer. *Eur. J. Cancer.*, 48(14):2244-2251
- Khan F, Pandey P, Ahmad V, Upadhyay TK. 2020. Moringa oleifera methanolic leaves extract induces apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest via downregulation of Hedgehog Signaling Pathway in human prostate PC-3 cancer cells. *J. Food Biochem.*, 44(8): e13338
- Kim BM, Kim GT, Kim EJ, Lim EG, Kim SY, Kim YM. 2016. The Extract from *Artemisia annua* Linné. Induces p53-independent Apoptosis through Mitochondrial Signaling Pathway in A549 Lung Cancer Cells. *J. Life Sci.*, 26(8):887-894
- Kim HN, Park GH, Kim JD, Park SB, Eo HJ, Jeong JB. 2019a. Effect of the extracts from the leaves and branches of *Sageretia thea* on  $\beta$ -catenin proteasomal degradation in human colorectal and lung cancer cells. *J. Plant Biotechnol.*, 32(2):153-159
- Kim SY, Jeong SI, Kim SZ, Shim JS, Jang SI. 2009. Effects of Continentalic from *Aralia Continentalis* on Growth Inhibition and Apoptosis Induction in Human Leukemia

- HL-60 Cells. *J Physiol & Pathol Korean Med.*, 23(6): 1314-1319
- Kim TY, Han HS, Lee YJ. 2013. Apoptosis induction of HCT-15 cells by extracts of *Undaria pinnatifida* with fermented micro-organism. *Kor. J. Herbology.*, 28(4):33-40
- Kim YS, Kim EK, Dong X, Park JS, Shin WB, Kim SJ, Go EA, Park PJ, Lim BO. 2019b. *Lindera glauca* (Siebold et Zucc.) Blume Root Extracts Protect Against tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Oxidative Stress. *J. Med. Food.*, 22(5):508-520
- Kim YU, Yun JM. 2015. Antioxidative and Antiproliferative Effects of *Lindera glauca* Blume on Human Colorectal Cancer Cells. *Korean J. Food Cook Sci.*, 44(4):635-640
- Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN. 1993. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin. Cancer Biol.*, 4(6):327-332
- Lazebnik YA, Kaufmann S, Desnoyers S, Poirier G, Earnshaw W. 1994. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature.*, 371(6495): 346-347
- Lee CC, Hsiao CY, Lee SC, Huang XF, Chang KF, Lee MS, Hsieh MC, Tsai NM. 2020. Suppression of oral cancer by induction of cell cycle arrest and apoptosis using *Juniperus communis* extract. *Biosci. Rep.*, 40(9): BSR20202083
- Lee JH, Jung SJ, Park YK. 2007. Effects of *Euphorbiae lathyridis* Semen on cell apoptosis in HCT116 human colon cancer cells. *Kor. J. Herbology.*, 22(2):65-72
- Lee S, Seo E. 2019. Effects of Rutin on Anti-inflammatory in Adipocyte 3T3-L1 and Colon Cancer Cell SE-480. *J. Korean Soc.*, 35(1):84-92
- Lee SG, Yu MH, Lee SP, Lee IS. 2008. Antioxidant activities and induction of apoptosis by methanol extracts from avocado. *J. Korea Soc. Food Sci. Nutr.*, 37(3):269-275
- Lee WK, Kim SJ. 2011. Sulforaphane-induced apoptosis was regulated by p53 and Caspase-3 dependent pathway in human chondrosarcoma, HTB-94. *J. Life Sci.*, 21(6):851-857
- Lee YS, Kim HS, Kim SK, Kim SD. 2000. IL-6 mRNA expression in mouse peritoneal macrophages and NIH3T3 fibroblasts in response to *Candida albicans*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 10(1):8-15
- Letai A. 2005. Pharmacological manipulation of Bcl-2 family members to control cell death. *J. Clin. Investig.*, 115(10): 2648-2655
- Lim SO, Jun S. 2019. Factors Influencing the Improvement in Lifestyle Among Patients with Colorectal Cancer. *Korean J. Adult Nurs.*, 31(3):325-336
- Lin HI, Chu SJ, Wang D, Feng NH. 2004. Pharmacological modulation of TNF production in macrophages. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 37(1):8-15
- Liu CM, Kao CL, Wu HM, Li WJ, Huang CT, Li HT, Chen CY. 2014. Antioxidant and anticancer aporphine alkaloids from the leaves of *Nelumbo nucifera* Gaertn. cv. *Rosaplana*. *Molecules.*, 19(11):17829-17838
- Lowe SW, Lin AW. 2000. Apoptosis in cancer. *J. Carcinog.*, 21(3): 485-495
- Lundberg IE. 2000. The role of cytokines, chemokines, and adhesion molecules in the pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. *Curr. Rheumatol. Rep.*, 2(3): 216-224
- Luo J, Su F, Chen D, Shiloh A, Gu W. 2000. Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature.*, 408(6810):377-381
- Malumbres M, Barbacid M. 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer.*, 9(3):153-166
- McGeer PL, McGeer EG. 2008. Glial reactions in Parkinson's disease. *J. Mov. Disord.*, 23(4):474-483
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.*, 65(1-2):55-63
- Niu J, Hou X, Fang C, An J, Ha D, Qiu L, Ju Y, Zhao H, Du W, Qi J. 2015. Transcriptome analysis of distinct *Lindera glauca* tissues revealed the differences in the unigenes related to terpenoid biosynthesis. *Gene*, 559(1):22-30
- Novotny L, Szekeres T. 2003. Cancer therapy: new targets for chemotherapy. *Hematology*, 8(3):129-137
- Park C, Hyun SK, Hwang HJ, Choi SH, Choi YH. 2010. Induction of apoptosis and inhibition of prostaglandin E2 production by proteoglycan of *Phellinus linteus* in U937 human leukemia cells. *Cancer Prev. Res.*, 15(1):83-91
- Park K-U, Kim JY, Seo KI. 2009. Antioxidative and cytotoxicity activities against human colon cancer cells exhibited by edible crude saponins from soybean cake. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.*, 16(5):754-758
- Pierce BT, Napolitano PG, Pierce LM, Apodaca CC, Hume Jr RF, Calhoun BC. 2001. The effects of hypoxia and hyperoxia on fetal-placental vascular tone and inflammatory cytokine production. *AM. J. Obstet. Gynecol.*, 185(5): 1068-1072
- Reed JC. 2001. Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends Mol. Med.*, 7(7):314-319
- Rocca B, FitzGerald GA. 2002. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *Int. Immunopharmacol.*, 2(5):603-630
- Ruan QF, Jiang SQ, Zheng XY, Tang YQ, Yang B, Yi T, Jin J, Cui H, Zhao Z. 2020. Pseudoguaianolactones A-C: three unusual sesquiterpenoids from *Lindera glauca* with anti-inflammatory activities by inhibiting the LPS-induced expression of iNOS and COX-2. *Chem Commun (Camb).*, 56(10):1517-1520
- Seki K, Sasaki T, Haga K, Kaneko R. 1994. Two methoxybutanolides from *Lindera glauca*. *Phytochemistry.*, 36(4): 949-951
- Seki K, Sasaki T, Wano S, Haga K, Kaneko R. 1995. Linderanolides and isolinderanolides, ten butanolides from *Lindera glauca*. *Phytochemistry.*, 40(4):1175-1181

- Sheu MJ, Chou PY, Huang CS, Tsai IC, Chien YC, Lin SY, Tsai HY, Cheng HC, Wu CH. 2010. Pipoxolan inhibits proliferation of HL-60 human leukaemia cancer cells by arresting the cell cycle at the G0/G1 phase. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 37(5-6):605-612
- Shin DY, Yoom MK, Choi YW, Gweon OC, Kim JI, Choi YH. 2009. Apoptosis induction by aged black garlic extracts in AGS human gastric carcinoma cells. *Cancer Prev. Res.*, 14(4):350-358
- Shin EJ, Chung S, Hwang JT. 2017. Effect of  $\gamma$ -oryzanol on proliferation and apoptosis of AGS human gastric carcinoma cell. *KSBB Journal*, 32(2):83-89
- Silverman N, Maniatis T. 2001. NF- $\kappa$ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev.*, 15(18): 2321-2342
- Skaper SD. 2007. The brain as a target for inflammatory processes and neuroprotective strategies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1122(1): 23-34
- Song G, Mao YB, Cai QF, Yao LM, Ouyang GL, Bao SD. 2005. Curcumin induces human HCT116 colon adenocarcinoma cell apoptosis by activating p53 and regulating apoptosis-related protein expression. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 38(12):1791-1798
- Suh WS, Kim KH, Kim HK, Choi SU, Lee KR. 2015. Three new lignan derivatives from *Lindera glauca* (Siebold et Zucc.) Blume. *Helv. Chim. Acta.*, 98(8):1087-1094
- Sun SY, Hail Jr N, Lotan R. 2004. Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. *J. Natl. Cancer Inst.*, 96(9): 662-672
- Sung B, Chung JW, Bae HR, Choi JS, Kim CM, Kim ND. 2015. *Humulus japonicus* extract exhibits antioxidative and anti-aging effects via modulation of the AMPK-SIRT1 pathway. *Exp. Ther. Med.*, 9(5):1819-1826
- Vaux DL, Korsmeyer SJ. 1999. Cell death in development. *Cell*, 96(2):245-254
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods.*, 184(1): 39-51
- Wang R, Tang S, Zhai H, Duan H. 2011. Studies on anti-tumor metastatic constituents from *Lindera glauca*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.*, 36(8):1032-1036
- Wang S, Liu Z, Wang L, Zhang X. 2009. NF- $\kappa$ B signaling pathway, inflammation and colorectal cancer. *Cell Mol. Immunol.*, 6(5):327
- Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H. 2000. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.*, 60(14):3823-3831
- Yang D, Wang F, Ren S, Zhang H, Peng J. 1999. Chemical constituents of the essential oil from the fruits of *Lindera glauca* and its antifungal activities. *Zhong yao cai.*, 22(6):295-298
- Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW. 2004. Modulation of NF- $\kappa$ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.*, 23(12):2369-2380
- Ye M, Liu JK, Lu ZX, Zhao Y, Liu SF, Li LL, Tan M, Weng XX, Li W, Cao Y. 2005. Grifolin, a potential antitumor natural product from the mushroom *Albatrellus confluens*, inhibits tumor cell growth by inducing apoptosis in vitro. *FEBS Lett.*, 579(16):3437-3443
- Yoon WK, Kim DC. 2008. Toosendan Fructus Induces Apoptotic Cell Death in MCF-7 Cell, Via the Inhibition of Bcl-2 Expression. *Obstet. Gynecol. Sci.*, 21(3):18-33
- Yu JS, Moon E, Kim KH. 2017. A new cerebroside from the twigs of *Lindera glauca* (Sieb. et Zucc.) Blume. *Bioorg. Chem.*, 74: 122-125
- Zhao Q, Kim YU, Han IH, Yun JM. 2016. Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by ethanolic extract of *Lespedeza cuneata* G. Don in human colorectal cancer HCT116 cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 45(6):911-917
- Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. 1999. An APAF-1· cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.*, 274(17):11549-11556

---

Received March 15, 2021; revised April 5, 2021; accepted April 7, 2021