

Anti-proliferative Effects and Apoptosis Induced by Chrysin or Emodin in Human Colorectal HCT116 Cells

Seung-Min Ryu, Yong-Hyun Kim, Eun-Joo Lee, Chungwook Chung and Jong-Sik Kim*

Department of Biological Sciences, Andong National University, Andong 36729, Korea

Received September 16, 2021 / Revised October 5, 2021 / Accepted October 6, 2021

In the present study, we screened candidate natural compounds which possess the strong anti-proliferative effects on human colorectal HCT116 cells using the commercial natural product library (Selleckchem, L1400) based on cell viability assay. Human colorectal cancer HCT116 cells were incubated with 50 μ M of each compound from the natural product library, and then cell viability was measured by MTT assay. From the first screening, five different kinds of natural products (chrysin, diosmetin, emodin, piperlongumine, and tanshinone I) were selected based on cell viability assay in HCT116 cells and commercial availability. All selected natural products significantly decreased cell viabilities in HCT116 cells, whereas pro-apoptotic protein NAG-1 is strongly induced by chrysin or emodin treatment. Chrysin and emodin decreased cell viability in a dose-dependent manner. Moreover, chrysin and emodin increased the expression of pro-apoptotic NAG-1 protein in a dose- and time-dependent manner. In addition, PARP cleavage induced by chrysin or emodin was recovered in part by the transfection of NAG-1 siRNA indicating that NAG-1 may be one of the genes responsible for apoptosis induced by chrysin or emodin. Overall, our findings may provide basic screening data on natural products which possess anti-proliferative activities and may help to understand the molecular mechanisms of anti-proliferative and pro-apoptotic activities mediated by chrysin and emodin.

Key words : Anti-proliferation, apoptosis, chrysin, emodin, NAG-1

서 론

파이토케미칼은 식물유래의 비영양성 화학성분으로서 항산화, 항균, 항염증 등 다양한 생리 활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다[2, 7, 23]. 이러한 파이토케미칼은 천연물의 일종으로 다른 화학적 제제에 비해 부작용이 적다는 점에서 다양한 암 모델에서 암 화학 예방법(cancer chemoprevention)과 그 작용 기전이 연구되었다[22, 26, 27]. 암 화학 예방법은 암의 발생을 예방하고 억제하기 위하여 천연물, 합성제제 및 생물학 제제를 사용하는 것이다[10]. 이러한 제제에 의한 암 화학 예방 활성의 주된 작용 기전은 암세포의 세포주기를 억제하고 apoptosis를 유도하는 것이다[5, 18].

본 연구에서는 173종의 천연물이 함유되어 있는 상업적으로 이용 가능한 천연물 library를 이용하여 대장암 HCT116 세포주를 대상으로 암세포 항 성장 활성이 있는 천연물을 선별하고자 하였다. 본 천연물 library를 이용하여 다양한 암 모델에서 항암 활성 후보 천연물을 선별하는 다양한 보고들이

있었다[9, 16, 24]. 또한, 최근에는 이 library를 이용하여 SARS-CoV-2의 main protease (M^{pro})의 저해제를 발굴하기 위한 연구결과도 발표되었다[3].

NAG-1 (NSAID-activated gene) 단백질은 TGF- β superfamily 단백질 중 하나로써 암, 비만, 염증 발생과 관련이 있는 것으로 알려진 단백질이며[21], 항암 활성이 있는 다양한 천연물에 의해 발현이 유도되며, 이러한 발현이 apoptosis와 직접적인 관련성이 있다는 연구결과들이 다수 보고되었다[15, 17, 25]. 본 연구에서는 항암 단백질 NAG-1 단백질을 지표 단백질로 활용하여 항암 활성 함유 천연물을 선별하고 이들의 작용 기전을 연구하였다.

따라서 본 연구에서는 173종의 천연물로 구성되어 있는 library로부터 암세포 항 성장 활성이 있는 천연물 선별을 위한 기초 데이터를 제공하였으며, 최종적으로는 천연물 chrysin과 emodin에 의한 암세포 항 성장 활성과 세포사멸을 확인하였으며, 항암 유전자 NAG-1 발현과의 관련성을 규명하였다.

재료 및 방법

천연물 library와 시약

본 연구에 사용한 Natural product library (Cat. No. L1400)는 Selleckchem사(Houston, TX, USA)로부터 구입하였다. 천연물 library는 총 173 종류의 천연물로 구성되어 있으며, 1차 선별과정에서 세포 생존을 측정에 사용되었다. 추가 연구를

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5798, Fax : +82-54-820-7705

E-mail : jsk@anu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

위하여 천연물인 chrysin, diosmetin, emodin, piperlongumine, 그리고 tanshinone I은 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, 각 천연물은 용매인 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, USA)에 녹여 사용하였다.

인간 대장암 세포주 HCT116 배양

인간 대장암 세포주 HCT116는 Korean Type Culture Collection (KTCC, Korea)에서 구입하였으며, 배양은 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Grand Island, NY, USA), 1% penicillin-streptomycin (Welgene, Korea)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, USA)을 사용하였다.

세포 생존율 연구

천연물 173종 및 선별된 5종의 천연물이 세포 성장에 미치는 영향을 확인하기 위해 각 조건별로 대장암 세포주 HCT116에 처리한 후 세포 생존율 연구를 수행하였다. 천연물 173종을 이용한 1차 선별과정에서는 96 well plate에 well 당 1×10^5 세포를 접종하고 24시간 동안 배양한 후, 각 시료를 24시간 동안 처리하고 MTT 용액을 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 한편, 선별된 5종의 천연물에 의한 세포 생존율 측정에서는 96 well plate에 well당 1×10^5 세포를 접종하고 24시간 동안 배양한 후, 각 시료를 조건에 따라 24시간 동안 처리하고 Cell Titer 96@ Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega, Madison, WI, USA) 용액을 각 well 당 20 μ l씩 첨가한 후 세포배양기에서 2시간 동안 반응시켰다. 각 실험에서 대조구의 경우 용매인 DMSO (Vehicle, VEH)를 처리하였다. 그 후 NanoQuant Plate™ (Tecan Trading AG, Switzerland)를 사용하여 480 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험 결과는 다섯 개의 well을 독립적으로 수행한 값의 평균을 Sigma plot program 10.0으로 분석하여 그래프로 나타내었다.

Western blot analysis

대장암 세포주인 HCT116를 6 well plate에 well 당 3.0×10^5 세포를 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 천연물을 조건에 따라 처리하였다. 천연물의 대조구로는 vehicle (VEH, 0.1% DMSO)을 처리하였다. 시료 처리 24시간 후 수확한 세포는 2X RIPA (Cell signaling, Beverly, MA, USA) 용액을 첨가한 후 sonication 실시하여 총 단백질을 제조하였다. 추출한 단백질은 Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 정량하였으며, 총 20 μ g의 단백질을 4-12% acrylamide gel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에서 전기영동한 후, 전기적으로 membrane에 transfer 시켰다. 1차 항체로는 NAG-1, PARP와 Actin 항체를 사용하였고, 2차 항체는 HRP-conjugated rabbit antibody와 HRP-conjugated mouse antibody를 사용하였다. 한편, Actin은 모든 Western blot 실험에서 loading control로 사용하였다. 모든 항체는 Santa Cruz사(Santa

Cruz, CA, USA) 혹은 Cell signaling사(USA)에서 구입하였으며, 1차 항체는 4°C에서 overnight 처리하였고, 2차 항체를 3시간 동안 반응시켰다. 그 후 enhanced chemiluminescence kit (ECL™, Amersham, Pittsburgh, PA, USA)을 이용하여 반응시킨 후 C-DIGIT (LI-COR, Lincoln, NE, USA)를 이용하여 확인하였다.

siRNA transfection

대장암 세포주 HCT116를 약 24시간 동안 배양한 후 serum free DMEM에 Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 10 μ l와 10 pmol NAG-1 siRNA (Bioneer, Daejeon, Korea) 6 μ l를 혼합하여 transfection 하였다. 대조구로는 β -gal siRNA (Bioneer)를 사용하였다. 4시간 후 FBS가 첨가된 DMEM 배지로 교환한 뒤 24시간 동안 transfection을 한 후 50 μ M chrysin 혹은 emodin을 24시간 동안 처리하였다. 천연물의 대조구로는 vehicle (VEH, 0.1% DMSO)을 처리하였다. 수확한 단백질은 Western blot analysis 실시하여 각 단백질의 발현 양을 확인하였다.

통계처리

모든 실험은 최소한 3회 이상 반복 실험을 실시하였으며 실험 결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었고, 각 실험 결과의 유의성 검토는 시료가 포함되지 않은 대조구와 비교하여 student's t-test에 의해 판정하였으며 $p < 0.05$ 일 때 유의성이 있다고 판단하였다.

결과 및 고찰

천연물 library로부터 암세포 항성장 활성 함유 천연물 선별

천연물 173종으로 구성되어 있는 Selleckchem사의 Natural product library로부터 암세포 항 성장 활성을 가지고 있는 천연물을 선별하기 위하여, 대장암 세포주 HCT116에 각 천연물을 50 μ M의 농도로 24시간 처리한 후 세포 생존율 연구를 수행하였다. 한편, 대조구의 경우 vehicle (VEH, 0.1% DMSO)을 처리하였다. 그 결과, 대조구와 비교하여 90% 이상의 세포 생존율을 보여주는 천연물이 6종, 90% 이하 70% 이상의 세포 생존율을 보여주는 천연물이 62종, 70% 이하 50% 이상의 생존율을 보여주는 천연물이 82종, 그리고 50% 이하의 세포 생존율을 보여주는 천연물이 23종으로 확인되었다(Table 1). 이 중 본 연구에 사용한 5종의 천연물인 chrysin, diosmetin, emodin, piperlongumine 그리고 tanshinone I이 각각 순서대로 대조구에 비해 54.8%, 57.9%, 50.9%, 6.0% 그리고 55.6%의 세포 생존율을 보여 주는 것으로 확인되었다. 5가지의 천연물을 선별한 이유는 암세포 생존율을 감소시키면서 동시에 LPS로 활성화된 RAW264.7 세포에서 nitric oxide 생산을 억제하는 천연물(data not shown) 중 상업적 이용 가능성을 고려하여

Table 1. The results of cell viability assay using natural product library in HCT116 cells

Num.	Sample	Cell viability (%)	Num.	Sample	Cell viability (%)
1	Docetaxel	94.0	53	Morin Hydrate	74.7
2	Ginkgolide B	83.1	54	Oleanolic Acid	57.0
3	Lovastatin	52.7	55	Phlorizin	63.8
4	Andrographolide	79.4	56	Celastrol	7.4
5	Baicalin	102.7	57	Curcumin	38.5
6	Cryptotanshinone	61.1	58	Esculin	57.19
7	Formononetin	71.2	59	Asiatic Acid	4.4
8	Honokiol	4.0	60	Chlorogenic Acid	56.4
9	Luteolin	106.4	61	Emodin	50.9
10	Naringin	85.7	62	Gynostemma Extract	67.8
11	Oxymatrine	83.0	63	Kinetin	53.9
12	Paclitaxel	85.4	64	Myricetin	53.5
13	Resveratrol	85.1	65	Oridonin	3.8
14	(-)-Epigallocatechin Gallate	92.2	66	Piperine	68.2
15	Apigenin	103.0	67	Costunolide	17.0
16	Bergenin	77.9	68	Daidzein	62.9
17	Cyclosporin A	53.8	69	Aloe-emodin	51.4
18	Ferulic Acid	76.4	70	Azomycin	60.5
19	Hyodeoxycholic acid (HDCA)	79.0	71	Chrysin	54.8
20	Magnolol	4.4	72	Enoxolone	29.2
21	Neohesperidin Dihydrochalcone (Nhdc)	80.8	73	Hesperetin	69.1
22	Paeonol	76.4	74	L-(+)-Rhamnose Monohydrate	59.9
23	2-Methoxyestradiol (2-MeOE2)	74.2	75	Myricitrin	61.4
24	Reserpine	83.7	76	Orotic acid (6-Carboxyuracil)	65.0
25	(+)-Usniacin	71.0	77	Puerarin	60.0
26	Arbutin	71.4	78	Genistein	63.8
27	Berberine chloride	47.4	79	Cyclocytidine HCl	56.4
28	Cytisine	70.4	80	Amygdalin	55.5
29	Glycyrrhizin (Glycyrrhizic Acid)	70.2	81	Baicalein	73.1
30	Icariin	69.4	82	Cinchonidine	55.3
31	(+)-Matrine	77.8	83	Fisetin	55.2
32	Neohesperidin	77.4	84	Hesperidin	53.5
33	(-)-Parthenolide	5.7	85	Limonin	81.0
34	Vincristine sulfate	96.4	86	Nalidixic acid	74.0
35	Hydrocortisone	71.5	87	Osthole	61.0
36	3-Indolebutyric acid (IBA)	72.5	88	Quercetin Dihydrate	82.6
37	Artemether	71.7	89	Rutaecarpine	45.5
38	Bilobalide	74.7	90	Sinomenine	73.6
39	Dihydroartemisinin (DHA)	63.1	91	Ursolic Acid	28.1
40	gossypol-Acetic acid	12.5	92	Diosmetin	57.9
41	Indole-3-carbinol	75.8	93	Naringin Dihydrochalcone	78.0
42	Methyl-Hesperidin	81.6	94	Dihydromyricetin	75.7
43	Nobiletin	53.3	95	Genipin	76.5
44	Phloretin	74.4	96	Guanosine	72.9
45	Artemisinin	61.7	97	Catharanthine	61.3
46	Progesterone	62.2	98	Xylitol	73.8
47	4-Methylumbelliferone (4-MU)	60.3	99	Xanthohumol	3.6
48	Artesunate	51.2	100	Rutin	66.4
49	Caffeic Acid	59.1	101	Synephrine	65.7
50	DL-Carnitine HCl	61.6	102	Vanillylacetone	71.7
51	Gramine	72.4	103	D-Mannitol	70.7
52	Kaempferol	84.3	104	Polydatin	66.5

Table 1. Continued

Num.	Sample	Cell viability (%)	Num.	Sample	Cell viability (%)
105	Sodium Danshensu	70.2	140	Doxycycline Hyclate	72.5
106	Geniposidic acid	62.1	141	Abscisic Acid (Dormin)	85.9
107	Inosine	71.5	142	Shikimic Acid	77.7
108	Schisandrin B (Sch B)	69.4	143	Taxifolin (Dihydroquercetin)	77.7
109	Gallic acid	67.9	144	Aloin	73.8
110	Halofuginone	45.5	145	Indirubin	75.1
111	Salicin	65.6	146	Naringenin	75.7
112	Tangeretin	59.9	147	Curcumol	65.8
113	Xanthone	71.3	148	Apocynin	68.0
114	Gastrodin	65.6	149	Idebenone	3.9
115	Quercetin	77.6	150	Bergapten	68.3
116	Isoliquiritigenin	72.0	151	Santacruzamate A (CAY10683)	61.3
117	Astragaloside A	62.8	152	Silibinin	64.0
118	Forskolin	65.7	153	Tetrahydropapaverine HCl	65.6
119	Triptolide (PG490)	55.1	154	Biochanin A	71.2
120	(+)-Bicuculline	60.9	155	Lappaconite HBr	65.8
121	Cucurbitacin B	17.1	156	Salidroside	58.0
122	Sclareol	17.2	157	Paeoniflorin	56.6
123	Tanshinone I	55.6	158	Rotundine	54.4
124	Yohimbine HCl	58.1	159	Vanillin	55.4
125	Hematoxylin	65.6	160	Diacerein	43.8
126	Sesamin	56.9	161	Licochalcone A	4.0
127	Sophocarpine	57.4	162	L-Glutamine	57.7
128	Ipriflavone (Osteofix)	62.4	163	Silymarin	57.7
129	Scopolamine HBr	66.2	164	Troloxerutin	60.0
130	Hyoscyamine	85.7	165	Dioscin	3.8
131	Piperlongumine	6.0	166	L-carnitine	58.9
132	Sclareolide	75.3	167	Palmitate chloride	52.7
133	Tanshinone IIA	38.8	168	Geniposide	52.0
134	5-hydroxytryptophan (5-HTP)	75.5	169	Synephrine HCl	58.6
135	Hordeanine	86.0	170	N ⁶ -methyladenosine (m ⁶ A)	54.8
136	Sorbitol	76.2	171	Calcium D-Panthenate	56.8
137	Chrysophanic Acid	78.6	172	Oleuropein	61.9
138	(S)-10-Hydroxycamptothecin	61.9	173	L-Arginine HCl (L-Arg)	60.8
139	5-Aminolevulinic acid HCl	72.3			

선별하였다. Chrysin은 벌꿀이나 프로폴리스에 주로 함유되어 있는 플라보노이드의 일종으로써 다양한 생리 활성 및 약리학적 특성을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며[13], 다양한 암 모델에서 암세포 성장을 억제하거나 다양한 기전에 의해 세포 사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다[8, 10, 20]. 또한, chrysin이 HCT116 세포주에서 세포주기를 억제하며, migration 활성을 억제한다는 보고가 있었다[19]. Diosmetin은 감귤류 flavonoid의 일종으로써 최근 HCT116 세포주에서 mitotic disruption을 통하여 세포사멸을 유도한다는 보고가 있었다[11]. Emodin은 대황과 같이 한약재에 사용되는 식물의 활성 성분으로써, HCT116 세포주에서 미토콘드리아 세포사멸 경로를 통해 세포사멸을 유도하였다[1]. 후추과의 일종인 펄발(*Piper longum* L.) 유래의 alkaloid 성분인 piperlongumine은

HCT116 세포주에서 세포사멸을 유도하며, 세포사멸에 JNK 신호 경로가 관여되어 있다고 보고 된 바 있다[4]. 단삼 유래의 페놀성 성분의 하나인 Tanshinone I은 HCT116 세포주에서 ROS-매개 p38 MAPK의 인산화가 세포사멸에 영향을 준다는 보고가 있었다[12].

선별된 5종의 천연물에 의한 세포 생존율 측정 및 항암 단백질 NAG-1 발현 확인

1차 선별과정에서 선정된 5종의 천연물을 각각 구입하여 1차 선별과정과 동일한 조건에서 각 천연물을 처리한 후 세포 생존율을 측정하였으며, 대조구의 경우 vehicle (VEH, 0.1% DMSO)을 처리하였다. 다만, 1차 선별과정에서는 MTT 용액을 이용하여 세포 생존율을 측정할 반면, 2차 확인 과정에서는

MTS 용액을 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 2차 확인 결과, chrysin (CRS), diosmetin (DSM), emodin (EMD), piperlongumine (PLG), 그리고 tanshinone I (TSN)이 각각 순서

대로 대조구에 비해 73.3%, 74.7%, 56.8%, 24.0% 그리고 44.2%의 세포 생존율을 보여주어(Fig. 1A), 비록 1차 선별 결과와 세포 생존율의 수치에는 차이가 있으나 5종의 천연물 모두

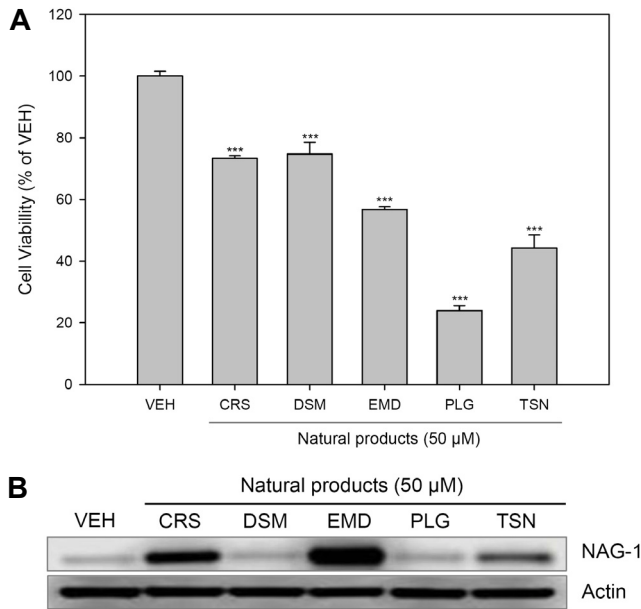


Fig. 1. Effects of five different kinds of natural products on cell viability and NAG-1 expression in HCT116 cells. (A) HCT116 cells were incubated with 50 μM of chrysin (CRS), diosmetin (DSM), emodin (EMD), piperlongumine (PLG) or tanshinone I (TSN) for 24 hr, whereas 0.1% DMSO (vehicle, VEH) was treated as a control. Cell viability was measured using MTS assay. Values indicate means ± SD (n=4). ****p*<0.001 vs VEH. (B) HCT116 cells were treated with 50 μM of each natural product for 24 hr. Cell lysates were prepared and Western blot was performed using NAG-1 and Actin antibodies.

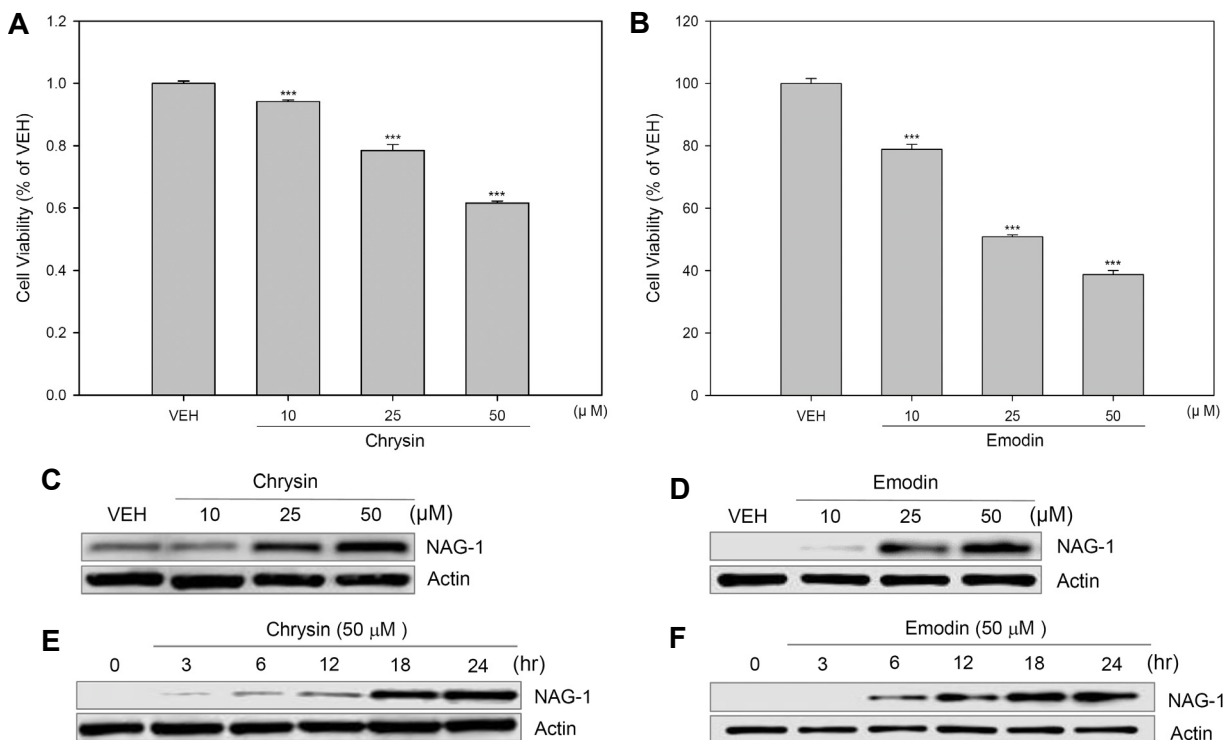


Fig. 2. Decrease of cell viability and up-regulation of NAG-1 protein by chrysin or emodin in HCT116 cells. (A, B) HCT116 cells were incubated with 10, 25, and 50 μM of chrysin (CRS) or emodin (EMD) for 24 hr, whereas 0.1% DMSO (VEH) was treated as a control. Cell viability was measured using MTS assay. Values indicate means ± SD (n=4). ****p*<0.001 vs VEH. (C, D) HCT116 cells were incubated with various concentrations of chrysin or emodin for 24 hr. Western blot was performed by using NAG-1 and Actin antibodies. (E, F) HCT116 cells were incubated with 50 μM chrysin or emodin and collected at the different time points. Western blot was done using NAG-1 or Actin antibodies.

대조구에 비해 비슷한 양상으로 높은 대장암 세포의 항 성장 활성을 보여 주는 것으로 확인되었다.

선별된 5종류의 천연물에 의한 pro-apoptotic 단백질 중 하나인 NAG-1의 발현을 확인한 결과 chrysin과 emodin에 의해서만 발현이 현저하게 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 1B). 이후 chrysin과 emodin에 의한 농도별 세포 생존율과 농도별, 시간별 처리에 따른 항암 단백질 NAG-1의 발현을 확인하였으며, chrysin과 emodin에 의한 세포사멸과 NAG-1 발현과의 관련성을 규명하고자 하였다.

Chrysin과 emodin에 의한 세포 생존율 측정 및 NAG-1 단백질의 증가

Chrysin과 emodin을 농도별로 24시간 처리하고, 대조구로는 vehicle (VEH, 0.1% DMSO)을 처리한 후 세포 생존율을 측정하였다. Fig. 2A, Fig. 2B에서 보는 바와 같이 chrysin과 emodin을 각각 10, 20, 50 μ M의 농도로 24시간 처리한 결과 세포 생존율이 처리한 천연물 농도의존적으로 세포 생존율이 감소함을 확인하였다. 동일한 처리 조건에서 chrysin과 emodin을 농도별로 처리한 후 항암 단백질 NAG-1의 발현을 확인하였으며, loading control로써 Actin의 발현을 확인하였다. 그 결과 Fig. 2C, Fig. 2D에서 보는 바와 같이 10, 20, 50 μ M의 농도로 처리한 chrysin과 emodin에 의해서 농도 의존적으로 NAG-1의 발현이 증가됨을 확인하였다. 또한, 50 μ M의 chrysin과 emodin을 시간대별로 처리한 결과 NAG-1의 발현이 처리시간이 증가됨에 따라 발현이 증가되며, 특히 두 천연물 모두 18시간 처리군에서부터 급격히 증가됨을 확인하였다(Fig. 2E, Fig. 2F). 따라서, chrysin과 emodin에 의한 세포생존율 감소 경향이 NAG-1 단백질의 발현증가와 비슷한 양상으로 이루어진다는 것을 확인하였다.

NAG-1 siRNA transfection에 의한 세포사멸의 회복

Chrysin과 emodin에 의한 항암 단백질 NAG-1의 발현 증가와 apoptosis 유도와의 직접적인 관련성을 확인하기 위하여 NAG-1 siRNA를 이용하여 증명하였다. 그 결과 Fig. 3A, Fig. 3B에서 보는 바와 같이, NAG-1 siRNA를 transfection 한 경우 β -gal siRNA를 transfection 한 대조구에 비해 chrysin과 emodin의 처리에 의한 NAG-1 단백질의 발현 감소는 물론 apoptosis의 지표 단백질인 PARP cleavage가 현저하게 감소됨을 확인하였다. 이러한 결과는 chrysin과 emodin에 의해 유도되는 apoptosis 현상이 chrysin과 emodin에 의해 발현이 증가되는 NAG-1의 발현과 직접적인 관련이 있음을 시사한다. 이러한 연구결과는 이전 연구에서 연잎 에탄올 추출물과 연 유래 순수물질인 neferine에 의해 유도되는 apoptosis가 NAG-1 단백질 발현 유도와 직접적인 관련이 있음을 보고한 논문[6]과 유사한 결과로 생각된다.

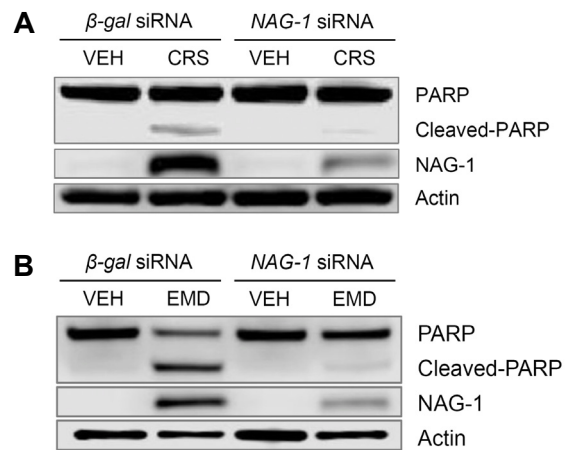


Fig. 3. Recovery of apoptosis induced by chrysin or emodin after NAG-1 siRNA transfection in HCT116 cells. (A) β -gal or NAG-1 siRNA was transfected into HCT116 cells. After 24 hr transfection, cells were treated with vehicle (VEH, 0.1% DMSO) or 50 μ M chrysin. After 24 hr treatment, cell lysates were prepared and Western blot analysis was done using PARP, NAG-1 or Actin antibodies. (B) β -gal or NAG-1 siRNA was transfected into HCT116 cells. After 24 hr transfection, cells were treated with vehicle (VEH, 0.1% DMSO) or 50 μ M emodin. After 24 hr treatment, total proteins were prepared and subjected to Western blot analysis using PARP, NAG-1 and Actin antibodies.

종합적으로 본 연구에서는 대장암 세포주 HCT116에서 173종의 천연물 처리에 의한 세포 생존율에 대한 기초 데이터를 제공하였으며, 이 중 천연물 chrysin과 emodin에 의해 유도되는 apoptosis가 항암 단백질 NAG-1의 발현 유도와 직접적인 관련이 있음을 확인하였다. 이러한 연구결과는 천연물 chrysin과 emodin에 의한 항암 활성의 작용 기전을 이해하는 데 도움을 줄 것으로 판단된다. 향후 chrysin과 emodin에 의한 항염증, 항비만 활성 등 다양한 생리활성과 작용 기전에 대한 연구를 진행함으로써, 식이가능한 천연물 chrysin과 emodin의 다양한 활용 가능성을 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 성과는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2018R1D1A1B07050673).

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Arulmozhi, P., Vijayakumar, S. and Kumar, T. 2018. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of some medicinal plants against selected pathogenic microorganisms. *Microb. Pathog.* **123**, 219-226.
- Chen, C. Y., Kao, C. L. and Liu, C. M. 2018. The cancer prevention, anti-inflammatory and anti-oxidation of bioactive phytochemicals targeting the TLR4 signaling pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2729.
- Jin, Z., Du, X., Xu, Y., Deng, Y., Liu, M., Zhao, Y., Zhang, B., Li, X., Zhang, L., Peng, C., Duan, Y., Yu, J., Wang, L., Yang, K., Liu, F., Jiang, R., Yang, X., You, T., Liu, X., Yang, X., Bai, F., Liu, H., Liu, X., Guddat, L. W., Xu, W., Xiao, G., Qin, C., Shi, Z., Jiang, H., Rao, Z. and Yang, H. 2020. Structure of M(pro) from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature* **582**, 289-293.
- Khor, C. Y. and Khoo, B. Y. 2020. PPAR α plays an important role in the migration activity, and the expression of CYP2S1 and CYP1B1 in chrysin-treated HCT116 cells. *Biotechnol. Lett.* **42**, 1581-1595.
- Kim, D. H., Shin, E. A., Kim, B., Shim, B. S. and Kim, S. H. 2018. Reactive oxygen species-mediated phosphorylation of p38 signaling is critically involved in apoptotic effect of Tanshinone I in colon cancer cells. *Phytother. Res.* **32**, 1975-1982.
- Kim, Y. H., Lee, E. J., Chung, C. W., Sohn, H. Y., Park, J. Y. and Kim, J. S. 2019. Anti-proliferative and pro-apoptotic activities of *Nelumbo nucifera* and neferine in human colorectal HCT116 cells. *J. Life Sci.* **29**, 1080-1085.
- Koosha, S., Mohame, Z., Sinniah, A. and Alshawsh, M. A. 2019. Investigation into the molecular mechanisms underlying the anti-proliferative and anti-tumorigenesis activities of diosmetin against HCT-116 human colorectal cancer. *Sci. Rep.* **9**, 5148.
- Li, W., Wen, C., Bai, H., Wang, X., Zhang, X., Huang, L., Yang, X., Iwamoto, A. and Liu, H. 2015. JNK signaling pathway is involved in piperlongumine-mediated apoptosis in human colorectal cancer HCT116 cells. *Oncol. Lett.* **10**, 709-715.
- Li, Y. W., Xu, J., Zhu, G. Y., Huang, Z. J., Lu, Y., Li, X. Q., Wang, N. and Zhang, F. X. 2018. Apigenin suppresses the stem cell-like properties of triple-negative breast cancer cells by inhibiting YAP/TAZ activity. *Cell Death Discov.* **4**, 105.
- Mani, R. and Natesan, V. 2018. Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. *Phytochemistry* **145**, 187-196.
- Min, K. W., Liggett, J. L., Silva, G., Wu, W. W., Wang, R., Shen, R. F., Eling, T. E. and Baek, S. J. 2016. NAG-1/GDF15 accumulates in the nucleus and modulates transcriptional regulation of the Smad pathway. *Oncogene* **35**, 377-388.
- Ranjan, A., Ramachandran, S., Gupta, N., Kaushik, I., Wright, S., Srivastava, S., Das, H., Srivastava, S., Prasad, S. and Srivastava, S. K. 2019. Role of phytochemicals in cancer prevention. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 4981.
- Ryu, S., Lim, W., Bazer, F. W. and Song, G. 2017. Chrysin induces death of prostate cancer cells by inducing ROS and ER stress. *J. Cell Physiol.* **232**, 3786-3797.
- Shapira, N. 2017. The potential contribution of dietary factors to breast cancer prevention. *Eur. J. Cancer Prev.* **26**, 385-395.
- Sporn, M. B. 1976. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer Res.* **36**, 2699-2702.
- Wang, Y. C., Wu, D. W., Wu, T. C., Wang, L., Chen, C. Y. and Lee, H. 2018. Dioscin overcome TKI resistance in EGFR-mutated lung adenocarcinoma cells via down-regulation of tyrosine phosphatase SHP2 expression. *Int. J. Biol. Sci.* **14**, 47-56.
- Woo, S. M., Min, K. J., Kim, S., Park, J. W., Kim, D. E., Chun, K. S., Kim, Y. H., Lee, T. J., Kim, S. H., Choi, Y. H., Chang, J. S. and Kwon, T. K. 2014. Silibinin induces apoptosis of HT29 colon carcinoma cells through early growth response-1 (EGR-1)-mediated non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 (NAG-1) up-regulation. *Chem. Biol. Interact.* **211**, 36-43.
- Wu, K., Na, K., Chen, D., Wang, Y., Pan, H. and Wang, X. 2018. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 on *Ganoderma lucidum* polysaccharides-induced apoptosis of human prostate cancer PC-3 cells. *Int. J. Oncol.* **53**, 2356-2368.
- Xie, M. J., Ma, Y. H., Miao, L., Wang, Y., Wang, H. Z., Xing, Y. Y., Xi, T. and Lu, Y. Y. 2014. Emodin-provoked oxidative stress induces apoptosis in human colon cancer HCT116 cells through a p53-mitochondrial apoptotic pathway. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **15**, 5201-5205.
- Xu, D., Jin, J., Yu, H., Zhao, Z., Ma, D., Zhang, C. and Jiang, H. 2017. Chrysin inhibited tumor glycolysis and induced apoptosis in hepatocellular carcinoma by targeting hexokinase-2. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **36**, 44.
- Xu, Y., Tong, Y., Ying, J., Lei, Z., Wan, L., Zhu, X., Ye, F., Mao, P., Wu, X., Pan, R., Peng, B., Liu, Y. and Zhu, J. 2018. Chrysin induces cell growth arrest, apoptosis, and ER stress and inhibits the activation of STAT3 through the generation of ROS in bladder cancer cells. *Oncol. Lett.* **15**, 9117-9125.
- Yang, C. S. and Wang, H. 2016. Cancer preventive activities of tea catechins. *Molecules* **21**, 1679.
- Yang, M. H., Kim, J., Khan, I. A., Walker, L. A. and Khan, S. I. 2014. Nonsteroidal anti-inflammatory drug activated gene-1 (NAG-1) modulators from natural products as anti-cancer agents. *Life Sci.* **100**, 75-84.
- Zhang, B., Wang, X., Deng, J., Zheng, H., Liu, W., Chen, S., Tian, J. and Wang, F. 2019. p53-dependent upregulation of miR-16-2 by sanguinarine induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* **459**, 50-58.
- Zhang, Y. J., Gan, R. Y., Li, S., Zhou, Y., Li, A. N., Xu, D. P. and Li, H. B. 2015. Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases. *Molecules* **20**, 21138-21156.
- Zhao, Y., Hu, X., Zuo, X. and Wang, M. 2018. Chemopreven-

tive effects of some popular phytochemicals on human colon cancer: a review. *Food Funct.* **9**, 4548-4568.

27. Zhu, F., Du, B. and Xu, B. 2018. Anti-inflammatory effects

of phytochemicals from fruits, vegetables, and food legumes: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **58**, 1260-1270.

초록 : Chrysin과 emodin에 의한 대장암 세포 항 성장 활성 및 세포사멸

류승민 · 김용현 · 이은주 · 정정욱 · 김종식*

(국립안동대학교 생명공학부)

본 연구에서는 시판하는 천연물 library (Selleckchem, L1400)로부터 암세포 항 성장 활성을 보여주는 천연물을 선별하였다. 즉, 인간 대장암 세포주인 HCT116에 50 μ M의 각 천연물을 처리한 후 세포 생존율을 측정하였다. 1차 선별과정을 통하여 5종의 천연물(chrysin, diosmetin, emodin, piperlongumine, tanshinone I)을 선별하였다. 5종의 천연물에 의한 NAG-1 단백질의 발현을 확인한 결과 chrysin과 emodin에 의해서 발현이 현저하게 증가하였다. 또한, chrysin과 emodin은 농도의존적으로 세포 생존율을 감소시켰으며, chrysin과 emodin은 항암 단백질인 NAG-1의 발현을 농도 및 시간 의존적으로 증가시켰다. 게다가, chrysin과 emodin 처리에 의해 증가된 PARP cleavage가 NAG-1 siRNA transfection에 의해서 감소됨을 확인함으로써, chrysin과 emodin에 의한 세포사멸과 NAG-1의 발현 증가가 직접적인 관련이 있음을 증명하였다. 따라서, 본 연구결과는 암세포 항 성장 활성을 보여주는 천연물 선별에 대한 기초 데이터를 제공해 주며, chrysin과 emodin에 의한 암세포 항 성장 활성 및 세포사멸의 기전을 이해하는 데 도움을 줄 것으로 판단된다.