



Original Article / 원저

비기환, 대칠기탕 및 목향빈랑환 열수 추출물에 의한 인간 간세포암종 HepG2 세포의 세포사멸 유도에 미치는 자가포식의 역할

박상은¹, 홍수현², 최영현^{2*}

¹동의대학교 한의과대학 간계내과학교실, ²동의대학교 한의과대학 생화학교실

The Role of Autophagy on the Induction of Apoptosis by Water Extracts of Bigihwan, Daechilgitang and Mokwhyangbinranghwan in HepG2 Human Hepatocellular Carcinoma Cells

Sang Eun Park¹, Su Hyun Hong², Yung Hyun Choi^{2*}

¹Department of Korean Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dong-eui University

²Department of Biochemistry, College of Korean Medicine, Dong-eui University

ABSTRACT

Objectives : In this study, the anticancer activity of water extracts of three herbal medicine formulas, Bigihwan (BGH), Daechilgitang (DCGT) and Mokwhyangbinranghwan (MHBHRH) listed in Donguibogam, was evaluated in HepG2 cells, a human hepatocellular carcinoma cell line.

Methods : We investigated whether the cell viability of HepG2 cells was inhibited by the treatment of water extracts of three prescriptions, and whether their viability inhibitory effect was related to the induction of apoptosis. In addition, the role of autophagy on the induction of apoptosis by the treatment of these extracts was investigated.

Results : The anticancer activity of the three water extracts on HepG2 cells was due to induction of apoptosis, not necrosis. Among them, BGH activated the caspase-dependent intrinsic apoptosis pathway associated with mitochondrial dysfunction. However, autophagy was induced more than 2-fold in DCGT-treated HepG2 cells, and the anticancer activity of DCGT was enhanced 1.5-fold in the presence of an autophagy inhibitor, but was attenuated in BGH and MHBHRH-treated cells.

Conclusion : The results of this study indicate that DCGT-induced autophagy was involved in the inhibition of apoptosis, whereas autophagy by BGH and MHBRH was related to induction of apoptosis.

Key words : Hepatocellular carcinoma cells, Bigihwan, Daechilgitang, Mokwhyangbinranghwan, apoptosis, autophagy

I. 서론

간암은 전 세계적으로 가장 흔한 악성 종양 중 하나로써 암 관련 사망의 두 번째 주요 원인이다^{1,2)}. 원발성 간암의 대부분을 차지하는 간세포암종(Hepatocellular carcinoma)은 그 발병률과 사망률이 계속 증가하고 있으며, 이는 높은 재발률 및 전이와 관련성이 매우 깊다^{2,3)}. 그동안 기초 및 임상 수준에서 간세포암종의 형성 기전에 관한 연구가 상당한 진전을 이루었으며, 현재 간세포암종 치료는 주로 외과적 중재와 종합적인 치료법을 기반으로 한다. 그러나 다른 종양에 비하여 간세포암종의 발병 후 급속한 진행은 치료 과정에서 수술 요건을 충족시키기 어려운 요인으로 작용한다^{4,5)}. 또한, 방사선 및 화학 요법에 대한 낮은 민감도와 중재 요법의 한계 및 높은 재발률은 간세포암종 환자의 낮은 생존율과 연관성이 있으며, 이를 해결하기 위한 적절한 치료약물이나 접근방법이 미비하다^{4,6)}. 아울러 간세포암종 세포에서 관찰되는 세포사멸(apoptosis) 및 자가포식(autophagy)의 저항성이 이에 관한 원인으로 작용한다⁷⁾.

세포사멸은 간 발달 및 재생 중에 비정상적인 세포를 제거하기 위한 생리학적인 방법이며, 이와 동반된 자가포식은 세포사멸을 촉진하거나 그 반대로 작용하기도 한다^{8,9)}. 다른 종양 세포에서처럼, 간암세포의 증식 및 사멸은 세포 신호전달 캐스케이드(cell signaling cascades)에 속하는 인자들과 수용체 및 이들의 하위 신호계에 의해 정교하게 조절된다. 이 과정의 조절 장애는 일반적으로 증식 신호의 활성화와 사멸 과정의 억제로 이어져 친종양성을 나타내어 암세포의 생존 및 지속적인 증식으로 이어진다^{10,11)}. 따라서 교란된 세포사멸 조절은 간세포암종을 포함한 암 발병의 주요 원인 인자이며, 간세포암종의 진행과 예후를 조절하는데 사용할 수 있는 새롭고 효과적인 치료법을 찾는 것이 요구된다^{7,12)}.

특히, 기존의 화학 및 방사선 요법의 세포 독성을 고려할 때 보다 선택적인 암세포 표적화와 부작용이 적은 대체 요법의 적용이 절실히 요구된다.

본 연구실에서는 그동안 다양한 인체 암종과 연관된 전통 처방전들의 항암 활성 및 관련 기전 연구를 수행하여 왔다. 특히 최근 간암세포의 증식 억제를 위하여 현대의학적인 간암의 범주에 속하는 처방전으로 분류될 수 있는 비기환(肥氣丸, Bigihwan), 대칠기탕(大七氣湯, Daechilgithang) 및 목향빙랑환(木香檳榔丸, Mokwhyangbinranghwan)을 선정하여, 그들의 선정 근거와 추출물들의 항암 활성을 보고한 바 있다^{13,14)}. 선행 연구 결과를 요약하면, 이들 에탄올 추출물에 의한 인체 간세포암종인 Hep3B 세포에서의 항암 활성은 비기환에서 가장 높게 나왔고, 열수 추출물 또한 유사한 결과가 나타났으며 이는 세포사멸 유도 및 밀접한 관련성이 있었다. 그러나 자가포식 유도는 에탄올 추출물 중에서는 비기환이 가장 높게 나타났으나¹³⁾, 열수 추출물에서는 오히려 대칠기탕 추출물이 처리된 세포에서 높게 나타났¹⁴⁾. 이는 각 처방전의 추출 조건에 따른 생리활성 성분의 차이에 의한 것이겠지만, 간세포암종의 종류에 따른 각 추출물의 항암 활성 차이 또한 고려해야 할 사항이다. 따라서 본 연구에서는 Hep3B 세포처럼 인체 간세포암종이지만, 다른 유전적 배경을 가진 HepG2 세포에서 이들 처방전 열수 추출물의 항암 활성을 비교하였다. Hep3B 세포와 HepG2 세포의 가장 큰 차이점은 종양 억제 유전자 p53의 유무로서 HepG2 세포는 정상적으로 p53이 발현되는 반면 Hep3B 세포는 p53이 발현되지 않는 세포주이다¹⁵⁾. 선행 연구들에 의하면, 간세포암종에서의 자가포식은 p53 의존적인 현상일 수 있지만, 세포사멸에 대한 역할은 항암 활성 유도제에 따라 서로 다르게 작용하기도 한다¹⁶⁻¹⁹⁾. 따라서 본 연구에서는 상기에서 언급한 3가지 처방전 열수 추출물의 항암 활성을 HepG2 세포를 대상으로 재조사하

*Corresponding author: Yung Hyun Choi, Department of Biochemistry, College of Korean Medicine, Dong-eui University, 52-57, Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan, 47227, Republic of Korea.

Tel : +82-51-890-3319, Fax : +82-51-890-3333, E-mail : choiyh@deu.ac.kr

•Received : April 14, 2022 / Revised : May 11, 2022 / Accepted : May 16, 2022

여 이들 추출물에 의한 세포사멸 유도에 미치는 자가포식의 역할을 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 각 처방전 열수 추출물의 준비

본 연구에 사용된 3가지 처방전의 열수 추출물은 선행 방법¹⁴⁾에 준하여 준비하였다. 각 처방전 구성 약재는 동의대학교 한방병원에서 구입하였으며, 구성 약재는 Table 1에 제시하였다(Table 1). 각 처방전은 3시간 동안 100°C에서 끓인 후 불순물을 제거하고 각 추출물들(water extracts of Bigihwan, BGH; Daechilgitang, DCGT; Mokhyangbinranghwan, MHBRH)을 동결건조시켰다.

2. 세포배양 및 약물처리

American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 분양받은 HepG2 세포는 37°C 및 5% CO₂ 조건의 배양기에서 10%의 fetal bovine serum과 1%의 penicillin/streptomycin이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)을 이용하여 배양하였으며, 세포배양에 사용된 재료들은 모두 WelGENE Inc. (Gyeongsan, Republic of Korea)에서 구입하였다. 각 처방전의 열수 추출물을 HepG2 세포에 처리하기 위하여 다양한 농도의 추출물을 단독으로 24시간 동안 처리하거나, 세포 독성이 없는 적정 농도의 necrostatin-1 (NEC, 200 μM, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA), *N*-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone (z-VAD-fmk, 50 μM, Calbiochem, Inc., San Diego, CA, USA), bafilomycin A1 (Baf A1, 5 μM, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 및 3-methyladenine (3MA, 1 mM, Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 1시간 전 처리 후, 각 처방전의 열수 추출물 처리하여 24시간 동안 배양하였다.

3. 세포 생존율 측정 및 형태변화 관찰

상기에서 언급한 조건에서 배양된 HepG2 세포의 생존율을 조사하기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 수행하였다. 이를 위하여 처리가 끝난 well에 적정량의 MTT 용액(0.5 mg/ml, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 넣은 후 37°C 및 5% CO₂조건의 배양기에서 2

시간 반응시키고 배지를 제거하였다. 각 well에 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 첨가하여 생성된 formazan을 녹인 후, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군 흡광도의 값을 기준으로 백분율로 제시하였다. 각 처방전 열수 추출물의 처리에 따른 HepG2 세포의 형태변화는 도립현미경 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 하에서 관찰하였다.

4. 세포사멸 및 자가포식 유도의 정량적 평가

다양한 조건에서 배양된 HepG2 세포에서 유도된 세포사멸의 정도를 정량적으로 평가하기 위하여 Annexin V Apoptosis Detection Kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 사용하였다. 이를 위하여 처리가 완료된 세포를 0.05% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)로 부유시킨 후, 5분간 2,000 rpm의 원심분리로 세포를 모으고 binding buffer를 넣은 후 제조사의 지침에 따라 annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC)/propidium iodide (PI) 용액을 처리하여 반응시켰다. 20분간 반응시킨 후 flow cytometer (Becton Dickinson)를 이용하여 annexin V-positive 세포의 빈도를 산출하였다. 아울러 Cyto-ID[®] Autophagy Detection Kit (Enzo Life Sciences Inc, Farmingdale, NY, USA)를 사용하여 자가포식이 유발된 세포의 빈도를 측정하였다. 이를 위하여 처리가 완료된 세포에 Cyto-ID 염색 용액을 넣고 20분간 상온에서 반응시킨 후 flow cytometer에 적용시켜 자가포식 유발 빈도를 측정하였다.

5. 단백질 발현 분석

세포사멸 및 자가포식 조절 관련 단백질들의 발현을 조사하기 위하여 Western blot analysis를 수행하였다. 처리가 완료된 세포로부터 단백질을 분리하기 위하여 lysis buffer (0.5% Triton, 50 mM β-glycerophosphate (pH 7.2), 2 mM MgCl₂, 0.1 mM sodium vanadate, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 2 μg/ml leupeptin, 4 μg/ml aprotinin 및 0.1 mM phenylmethylsulfonylurea)를 사용하였으며, 세포질 및 미토콘드리아 단백질의 분리를 위해서는 Active Motif, Inc. (Carlsbad, CA, USA)에서 구입한 mitochondrial/

cytoplasmic fractionation kit를 사용하였다. 분리된 단백질은 Bradford protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 정량한 후, Laemmli sample buffer (Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 이용하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 전기영동을 위한 샘플을 제조하였다. 전기영동으로 분리된 단백질을 polyvinylidene difluoride membrane (Thermo Fisher Scientific)으로 전이시킨 후, 분석 대상 단백질의 1차 항체 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA, Sigma-Aldrich Chemical Co. 및 Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) 및 해당 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)와 반응시켰으며, 사용된 항체에 관한 정보는 Table 2에 제시하였다. 반응이 끝난 membrane에서의 단백질 발현은 enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 검출하였다.

6. 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential, MMP)의 측정

다양한 조건에서 배양된 세포의 미토콘드리아 활성 변화를 위한 MMP의 측정을 위하여 6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide (JC-1)를 이용하였다. 이를 위하여 처리가 끝나 세포에 10 μ M의 JC-1 (Sigma-Aldrich Chemical Co.)을 처리하여 암실에서 20분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 세포를 모아 phosphate-buffered saline으로 부유시킨 후 MMP의 변화를 정량적으로 비교하기 위하여 제조사의 지침에 따라 flow cytometer를 이용하였다.

7. Caspase-3 활성 분석

각각의 약물 추출물이 처리된 조건에서 24시간 배양된 HepG2 세포의 caspase-3 활성 측정을 위하여 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입한 caspase-3 assay kit를 사용하였다. 제조사의 지침에 따라 처리가 끝난 세포에서 추출된 단백질(150 μ g)에 fluorogenic peptide 기질(100 μ M, Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-p-nitroaniline)이 함유된 extraction buffer (50 μ l)와 혼합하였다. 이들을 2시간 동안 37°C에서 반응시킨 후, 기질에서 유리된 p-nitroaniline의 농도를 ELISA reader를 이용하여 405 nm의 흡광도에서 측정하였다. 추출물의 처리에 따른 caspase-3 활성의 정도는 대조군 대비 상대치로 제시하였다.

8. 통계 분석

실험 결과의 유의성 분석을 위하여 GraphPad Prism® (Version 5.0, Graphpad Inc., San Diego, CA, USA)을 이용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test 실시한 후 Tukey test로 사후 검증하여 유의적 차이를 판단하였다. 통계 분석 결과는 평균±표준편차로 제시하였으며, $p < 0.05$ 값을 유의한 값으로 처리하였다.

III. 결과

1. 비기환, 대칠기탕 및 목향빈랑환 열수 추출물이 HepG2 세포의 증식 및 세포사멸에 미치는 영향

HepG2 세포의 증식에 미치는 3가지 처방전 열수 추출물의 영향을 조사하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 이를 위하여 각 추출물이 함유된 배지에서 24시간 배양된 HepG2 세포의 세포 생존율을 조사하였다. Fig. 1A의 결과에서 알 수 있듯이, 각 추출물의 처리 농도 증가에 따라 HepG2 세포의 생존율은 점차 감소하였으며, 대칠기탕 및 목향빈랑환의 열수 추출물이 처리된 HepG2 세포에서의 생존율 저하는 유사한 경향성을 보여 주었지만, 비기환은 이들이 비하여 상대적으로 항암 활성이 높음을 알 수 있었다.

다음은 3가지 열수 추출물 처리에 의한 HepG2 세포의 생존율 저하가 세포사멸 유도과 연관되어 있는지를 조사하였다 이를 위하여 Annexin V Apoptosis Detection Kit를 이용하여 상기와 동일한 조건에서 배양된 세포를 대상으로 세포사멸 유도의 정도를 flow cytometer로 정량적으로 조사한 결과, 비기환 처리군에서의 세포사멸 유도 증가가 대칠기탕 또는 목향빈랑환 처리군에 비하여 처리 농도 의존적으로 높게 관찰되었다(Fig. 1B). 아울러 비기환이 처리된 조건에서 HepG2 세포의 밀도 감소와 배지로의 부유된 세포의 증가가 관찰되었다(Fig. 1C). 또한, 각 추출물 처리에 따른 Hep3B 세포의 세포 생존율 저하가 세포괴사(necrosis)가 아닌 세포사멸에 의한 것임을 확인하기 위하여 세포괴사 억제제인 NEC를 사용하였다. 이를 위하여 세포 독성이 없는 범위에서의 NEC (200 μ M)를 1시간 동안 전처리한 후, 3가지 추출물을 추가로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. Fig. 2에 나타난 결과에 의하면, 3가지 열수 추출물에 의한 세포 생존율 및 세포사멸 유도에는 NEC가 존재하는 조건에서도 유의적인 변화가 없었다.

2. HepG2 세포에서 주요 세포사멸 인자의 활성화에 미치는 비기환, 대칠기탕 및 목향빈랑환 열수 추출물의 영향

3가지 처방전 열수 추출물 처리에 따른 세포사멸 유도에 대한 감수성의 차이와 세포사멸 조절인자들의 발현 변화와의 연관성을 조사하였다. Fig. 3A에 나타난 Western blotting 결과에 의하면, Bax의 발현이 비기환이 처리된 HepG2 세포에서는 처리 농도 의존적으로 매우 증가한 반면, Bcl-2의 발현은 현저히 감소하였다. 비록 약간의 발현 차이는 있지만, 대칠기탕 및 목향빈랑환은 상대적으로 두 단백질의 발현 변화에 미치는 영향은 다소 미비하였다. 또한 MMP의 변화를 평가한 결과, 대칠기탕 및 목향빈랑환 처리군에 비하여 비기환 처리군에서 높은 MMP 소실이 관찰되었다(Fig. 3B). 또한, 비기환 추출물이 처리된 HepG2 세포에서 cytochrome *c*의 발현이 세포질에서 증가된 반면, 미토콘드리아에서는 감소되어 세포질로의 cytochrome *c*유리가 증가하였음을 알 수 있다(Fig. 3C). 아울러 Fig. 3A에서 알 수 있듯이, 대표적인 활성화형 caspase-3의 기질 단백질인 PARP의 단편화가 비기환 추출물이 처리된 세포에서 관찰되었다. 이는 caspase-3의 활성화 증가의 결과에 의한 것이라 추론되며, Fig. 3D에 나타난 바와 같이, caspase-3의 활성이 대칠기탕 및 목향빈랑환 추출물 처리군에 비하여 비기환 추출물 처리군에서 가장 높게 관찰되었다. 그리고, Fig. 4A 및 B의 결과에서 알 수 있듯이, 비록 목향빈랑환 추출물 처리군에서 유의적이지는 않았지만, 세포 생존율 억제 및 세포사멸 유도가 다소 완화되었으며, 비기환 및 대칠기탕 추출물의 처리군에서는 *z*-VAD-fmk에 의하여 유의적인 생존율의 개선과 세포사멸 억제 효과가 관찰되었다.

3. 비기환, 대칠기탕 및 목향빈랑환 열수 추출물이 HepG2 세포의 자가포식에 미치는 영향

Hep3B 세포에서 확인된 3가지 처방전 추출물의 자가포식 유도 현상이 열수 추출물에 의하여 HepG2 세포에서도 유도되는지 확인하기 위하여 Cyto-ID® Autophagy Detection Kit를 사용하여 각 추출물 처리에 따른 자가포식 유도의 정도를 정량적으로 비교하였다. Fig. 5A에 나타난 flow cytometry 결과에 의하면, HepG2 세포에서 3가지 추출물 중에서 대칠기탕 처리군에서 자가포식의 유도가 가장 높게 나타났다. 그리고 비기환과 목향빈랑환 열수 추출물 처리군에서는 유사한

경향성을 보여주었으며, 이는 대칠기탕 열수 추출물 처리군에 비하여 상대적으로 매우 낮은 결과이다. 그리고, LC3의 발현과 LC3-II로의 전환이 비기환 및 목향빈랑환 열수 추출물 처리군에 비하여 대칠기탕 열수 추출물 처리군에서 가장 높게 관찰되었으며, p62의 발현 변화 또한 이와 유사한 경향성을 보여주었다(Fig. 5B).

다음은 이상에서 관찰된 추출물 처리에 따른 HepG2 세포에서 자가포식 유도가 항암 활성화에 어떤 역할을 하는지를 조사하였다. 이를 위하여 초기 자가포식 억제제인 3-MA와 자가포식 소체와 리소좀의 결합을 억제하는 후기 자가포식 억제제인 Baf A1이 3가지 추출물에 의한 HepG2 세포의 세포 생존력 억제 및 세포사멸 유도에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 6A에 나타난 결과에 의하면, 3-MA와 Baf A1이 존재하는 조건에서 비기환 및 목향빈랑환 열수 추출물 처리에 의한 세포사멸이 유의적으로 억제되었으나, 대칠기탕 추출물에 의한 세포사멸은 오히려 증가하였다. 또한, 비기환 및 목향빈랑환 열수 추출물 처리에 의한 세포 생존율의 억제는 3-MA와 Baf A1의 전처리에 의하여 다소 개선되는 효과를 보였지만, 대칠기탕 추출물에 의해서는 더욱 감소되었다(Fig. 6B).

IV. 고찰

본 연구의 결과에 의하면, HepG2 세포에 대한 항암 활성화에서 비기환 추출물이 대칠기탕 및 목향빈랑환에 비하여 높게 나타났으며, 이는 선행 연구에서 나타난 Hep3B 세포에서의 결과와 유사하였으며¹⁴⁾, HepG2 세포를 이용한 에탄올 추출물 처리군에서도 대칠기탕 및 목향빈랑환에 비하여 비기환의 항암활성이 높았던 결과와도 잘 일치되었다¹³⁾. 아울러 3가지 처방전 열수 추출물 처리에 의한 세포 생존율의 저하는 세포사멸 유도에 의한 것이며, 세포괴사와는 연관이 없음을 의미한다. 이러한 결과는 3가지 처방전의 에탄올 추출물이 처리된 HepG2 세포와 열수 추출물이 처리된 Hep3B 세포에서 관찰되었던 항암 활성^{13,14)}이 모두 세포사멸 유도에 의한 것이었음을 암시하는 것이다.

선행 연구에 의하면, Hep3B 세포에서 관찰된 3가지 처방전 열수 추출물 처리에 의한 세포사멸의 유도는 미토콘드리아(mitochondria) 및 퍼옥시좀(peroxisome)이 관여하는 미토파지(mitophagy)와 펙소파지(pexophagy) 유도 가능성과 연관이 있었다¹⁴⁾. 또한, Hep3B 세포에서

이들 에탄올 추출물의 처리는 미토콘드리아 매개 내재적 세포사멸 유도 경로(mitochondria-mediated intrinsic apoptosis pathway)의 활성화 가능성이 제시된 바 있다¹³⁾. 세포사멸 유도는 다양한 조절인자들의 활성화에 의하여 결정되며, 여기에는 세포사멸의 촉진과 억제에 관여하는 인자들의 균형이 핵심 요인으로 작용한다. 특히 내재적 세포사멸 경로는 미토콘드리아의 활성화 조절에 핵심적인 작용을 하는 Bcl-2 family에 속하는 유전자들의 발현이 주요 결정 인자로 작용한다^{20,21)}. Bcl-2 family에 속하는 Bax는 대표적인 세포사멸 촉진 인자로서 발현의 증가에 따라 미토콘드리아 외막으로 이동한 후 pore를 형성하여 미토콘드리아 외막과 내막 사이에 존재하는 cytochrome c를 세포질로의 유출을 유도하지만, Bcl-2와 같은 세포사멸 억제 단백질은 이를 억제하는 작용을 한다^{22,23)}. 한편 Bax의 발현 증가에 따른 세포질로의 cytochrome c유리는 MMP의 소실에 의한 결과이며, MMP의 소실은 미토콘드리아의 기능이 손상되었음을 나타내는 지표이다^{24,25)}. 본 연구의 결과에 의하면, 비기환 처리군에서 대칠기탕 및 목향빈랑환 처리군에 비하여 MMP 소실이 가장 높게 관찰되었으며, 이는 Bcl-2 family에 속하는 Bax와 Bcl-2 발현의 차이에 의한 결과임을 시사한다.

잘 알려진 바와 같이, 세포질로의 cytochrome c유리에 따른 내재적 세포사멸 유도 경로의 활성화는 caspase-9의 활성화 촉진에 의해 caspase-3을 활성화형으로 전환시킨다^{26,27)}. 이러한 caspase cascade의 활성화는 궁극적으로 세포 생존에 필수적인 PARP를 포함한 caspase 기질 단백질의 분해를 유발하여 세포사멸을 종결한다^{28,29)}. 이러한 정형화된 세포사멸 경로와 잘 일치되게 비기환 추출물이 처리된 세포에서 PARP의 단편화가 유도되었으며 이는 caspase-3의 활성화 증가의 결과에 의한 것이라 추론된다. 이상의 결과는 HepG2 세포에서 비기환 추출물 처리에 의한 세포사멸은 caspase 활성화 의존적으로 일어날 수 있음을 암시한다. 따라서 pan-caspase 억제제인 z-VAD-fmk 가 존재하는 조건에서 각 추출물 처리에 따른 세포 생존율의 억제와 세포사멸의 유도가 어떻게 변하는지를 조사하였으며, z-VAD-fmk에 의하여 유의적인 생존율의 증가 및 세포사멸 차단 효과가 나타났다. 이는 본 연구에 사용된 3가지 처방전에 의한 HepG2 세포의 세포사멸 유도는 최소한 caspase 의존적인 현상일 것임을 뒷받침하여 주는 결과이다. 다만, Bcl-2 family 단백질, PARP의 단편화, MMP 소실 및

cytochrome c의 발현 변화가 비기환 추출물 처리군에 비하여 대칠기탕 및 목향빈랑환 추출물 처리군에서 큰 변화가 없는 것은 그들의 항암 활성이 상대적으로 낮기 때문에 나타난 현상일 것이다.

항암 활성을 가지는 천연물의 처리에 따른 세포사멸 유도에는 자가포식 현상이 동반되는 경우가 많으며, 이는 세포사멸 유도에 관여하거나 또는 억제 기능을 가지기도 한다^{30,31)}. 본 연구에서 사용한 3가지 처방전의 에탄올 및 열수 추출물에 의한 Hep3B 세포에서의 세포사멸 유도에는 자가포식이 동반되었음이 보고된 바 있다^{13,14)}. 현재 *in vitro*간세포암종 연구에 가장 많이 사용되는 Hep3B 세포와 HepG2 세포에서의 세포사멸과 연관된 자가포식 유도 기전은 많은 부분에서 차이가 나며, 이는 종양 억제 유전자 p53을 포함한 두 세포주의 유전적 배경의 차이와 연관성이 있는 것으로 보고되고 있다^{17,32,33)}. 본 연구의 결과에 의하면, 비기환과 목향빈랑환 처리군에 비하여 대칠기탕 처리군에서 자가포식이 높게 유도되었다. 자가포식은 세포의 항상성 유지를 위해 세포 내에서 기능이 손상된 세포 구성성분이나 불필요한 외부 유입물 등의 제거와 재활용 과정으로 이들을 세포 내에서 이중 막으로 둘러싸서 격리시키기 위해 자가포식 소체(autophagosome)를 형성한다^{30,34)}. 자가포식 소체는 리소좀(lysosome)과 융합하여 분해 대상 성분들을 분해해야 하는데, 이 과정에서 LC3-I이 LC3-II로 가공되어 자가포식 소체 막으로 전이되어야 한다^{31,35)}. 아울러 SQSTM1로도 알려진 p62는 자가포식 리소좀 경로를 통해 불필요한 성분들의 제거를 위해 모집하는 선택적 자가포식 수용체이며 자가포식 플럭스(autophagic flux)의 예측 인자이다^{36,37)}. 따라서 본 연구에서 나타난 LC3과 p62의 발현 변화와 자가포식 억제제를 이용한 결과에서 비기환과 목향빈랑환에 비하여 대칠기탕 추출물 처리군에서의 자가포식 유도는 세포 생존을 위한 수단임을 알 수 있다.

이상의 결과에 의하면 본 연구에 사용된 3가지 처방전 중, HepG2 간암세포에서의 항암 활성은 대칠기탕과 목향빈랑환 열수 추출물에 비하여 비기환 열수 추출물에서 가장 높게 나타났으며, 이는 Hep3B 세포에서의 결과 뿐만 아니라 그들의 에탄올 추출물에 의한 결과와도 유사하였다^{13,14)}. 특히 비기환 처리에 의한 HepG2 세포의 세포 생존을 저하는 세포괴사가 아닌 미토콘드리아 기능 손상과 연관된 caspase 의존적 내재적 세포사멸 경로 활성화에 의한 것이었다. 아울러 대칠기탕

추출물에 의한 자가포식은 세포사멸 억제에 관여하는 반면, 비기환과 목향빈랑환 추출물에 의한 자가포식은 세포사멸 유도와의 연관성이 있는 것으로 추측된다. 그동안 몇몇 선행 연구에서 HepG2 세포에서의 세포사멸에 동반된 자가포식은 p53 의존적일 수 있음이 제시되었다¹⁶⁻¹⁹). 그러나 본 연구에서 정상 p53 유전자를 가진 HepG2 세포¹⁵)에서 사용된 3가지 처방전의 열수 추출물은 p53의 발현이 유도하지 않았다(data not shown). 특히 간세포암종에서 다른 종양에 비하여 항암 활성을 지닌 약물처리에 따른 자가포식은 활성산소종(reactive oxygen species)의 생성 여부와 phosphatidylinositol-3 kinase/AKT, AMP-activated protein kinase 및 mitogen activated protein kinase 등을 포함한 세포 내 많은 신호 전달계에 의하여 조절되며^{16,17,38,39}), 이는 천연물을 이용한 항암제 발굴의 표적이 되고 있기 때문에^{7,40}), 이들 신호계에 미치는 연구의 필요성이 요구된다. 따라서 본 연구의 결과는 각 처방전 추출물에 함유되어 있는 생리활성 성분들의 분석과 이들이 간암세포의 증식에 미치는 영향에 관한 추가적인 연구를 위한 자료로 활용될 것이다.

V. 결론

본 연구에서는 비기환, 대칠기탕 및 목향빈랑환 열수 추출물의 항암 활성을 인간 간세포암종 세포주인 HepG2 세포에서 조사하였다. 이를 위하여 3가지 처방전의 열수 추출물 처리에 따른 HepG2 세포의 세포 생존력 억제 여부를 평가하였으며, 이러한 항암 활성이 세포사멸 유도와의 연관성이 있는지를 조사하였다. 또한, 이들 추출물 처리에 의한 세포사멸 유도에 미치는 자가포식의 역할을 조사하였으며, 세포사멸 및 자가포식 유도에 핵심적으로 관여하는 인자들의 역할을 평가하였다. 본 연구의 결과에 의하면, 3가지 열수 추출물에 의한 HepG2 세포에 대한 항암 활성은 세포괴사가 아닌 세포사멸 유도와의 밀접한 연관성이 있었다. 그중 비기환이 세포사멸 유도에 가장 효과적이었으며, 이는 미토콘드리아의 기능 손상과 연관된 caspase 의존적 내인성 세포사멸 경로의 활성화에 기인한 것이었다. 그러나 자가포식은 대칠기탕이 처리된 세포에서 가장 높게 유도되었으며, 자가포식 저해제들이 존재하는 조건에서는 대칠기탕의 항암 활성이 증가된 반면 비기환 및 목향빈랑환 처리군에서는 억제되었다. 따라서 대칠기탕 추출

물에 의한 자가포식은 세포사멸 억제에 관여하는 반면, 비기환과 목향빈랑환 추출물에 의한 자가포식은 세포사멸 유도와의 연관성이 있는 것으로 추측된다.

References

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71:209-49.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68:394-424.
3. Ikeda M, Morizane C, Ueno M, Okusaka T, Ishii H, Furuse J. Chemotherapy for hepatocellular carcinoma: Current status and future perspectives. *Jpn J Clin Oncol.* 2018;48:103-14.
4. Yang JD, Heimbach JK. New advances in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma. *BMJ.* 2020;371:m3544.
5. Villanueva A. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2019;380:1450-62.
6. Grandhi MS, Kim AK, Ronnekleiv-Kelly SM, Kamel IR, Ghasebeh MA, Pawlik TM. Hepatocellular carcinoma: From diagnosis to treatment. *Surg Oncol.* 2016;25:74-85.
7. García-Pras E, Fernández-Iglesias A, Gracia-Sancho J, Pérez-Del-Pulgar S. Cell death in hepatocellular carcinoma: Pathogenesis and therapeutic opportunities. *Cancers (Basel).* 2021;14:48.
8. Chen J, Wang X, Xia T, Bi Y, Liu B, Fu J, Zhu R. Molecular mechanisms and therapeutic implications of dihydromyricetin in liver disease. *Biomed Pharmacother.* 2021;142:111927.
9. Allaire M, Rautou PE, Codogno P, Lotersztajn S. Autophagy in liver diseases: Time for translation? *J Hepatol.* 2019;70:985-98.
10. Sun EJ, Wankell M, Palamuthusingam P, McFarlane C, Hebbard L. Targeting the PI3K/Akt/mTOR

- pathway in hepatocellular carcinoma. *Biomedicines*. 2021;9:1639.
11. Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: A mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut*. 2005; 54:1024-33.
 12. Hu B, An HM, Wang SS, Chen JJ, Xu L. Preventive and therapeutic effects of Chinese herbal compounds against hepatocellular carcinoma. *Molecules*. 2016;21:142.
 13. Kim SY, Hong SH, Choi SH, Cheong J, Choi YH. The anti-cancer effects of Bigihwan, Daechilgithang, and Mokwhyangbinranghwan ethanol extracts in human hepatocellular carcinoma cells. *J Life Sci*. 2020;30:460-67.
 14. Kim MY, Lee H, Hong SH, Park C, Choi YH. Comparison of anti-cancer potentials of water extracts of Bigihwan, Daechilgithang and Mokwhyangbinranghwan in human hepatocellular carcinoma cells. *Herbal Formula Sci*. 2020;28: 15-27.
 15. Qiu GH, Xie X, Xu F, Shi X, Wang Y, Deng L. Distinctive pharmacological differences between liver cancer cell lines HepG2 and Hep3B. *Cytotechnology*. 2015;67:1-12.
 16. Yu MH, Tsai MC, Wang CC, Wu SW, Chang YJ, Wu CH, Wang CJ. Mulberry leaf polyphenol extract and rutin induces autophagy regulated by p53 in human hepatoma HepG2 cells. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14:1310.
 17. Kim SM, Ha SE, Lee HJ, Rampogu S, Vetrivel P, Kim HH, Venkataram Gowda Saralamma V, Lee KW, Kim GS. Sinensetin induces autophagic cell death through p53-related AMPK/mTOR signaling in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Nutrients*. 2020;12:2462.
 18. Cheng KC, Wang CJ, Chang YC, Hung TW, Lai CJ, Kuo CW, Huang HP. Mulberry fruits extracts induce apoptosis and autophagy of liver cancer cell and prevent hepatocarcinogenesis *in vivo*. *J Food Drug Anal*. 2020;28:84-93.
 19. Lee Y, Kwon YH. Regulation of apoptosis and autophagy by luteolin in human hepatocellular cancer Hep3B cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;517:617-22.
 20. Lalier L, Vallette F, Manon S. Bcl-2 family members and the mitochondrial import machineries: The roads to death. *Biomolecules*. 2022;12:162.
 21. Glab JA, Cao Z, Puthalakath H. Bcl-2 family proteins, beyond the veil. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2020;351:1-22.
 22. Guerra-Castellano A, Márquez I, Pérez-Mejías G, Díaz-Quintana A, De la Rosa MA, Díaz-Moreno I. Post-translational modifications of cytochrome *c* in cell life and disease. *Int J Mol Sci*. 2020; 21:8483.
 23. Burke PJ. Mitochondria, bioenergetics and apoptosis in cancer. *Trends Cancer*. 2017;3:857-70.
 24. Bock FJ, Tait SWG. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21:85-100.
 25. Kalpage HA, Bazyljanska V, Recanati MA, Fite A, Liu J, Wan J, Mantena N, Malek MH, Podgorski I, Heath EI, Vaishnav A, Edwards BF, Grossman LI, Sanderson TH, Lee I, Hüttemann M. Tissue-specific regulation of cytochrome *c* by post-translational modifications: Respiration, the mitochondrial membrane potential, ROS, and apoptosis. *FASEB J*. 2019;33:1540-53.
 26. Boice A, Bouchier-Hayes L. Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2020;1867:118688.
 27. Ugarte-Urbe B, García-Sáez AJ. Apoptotic foci at mitochondria: in and around Bax pores. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2017;372:20160217.
 28. Dadsena S, King LE, García-Sáez AJ. Apoptosis regulation at the mitochondria membrane level. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2021;1863: 183716.
 29. Henning RJ, Bourgeois M, Harbison RD. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and PARP inhibitors: Mechanisms of action and role in cardiovascular disorders. *Cardiovasc Toxicol*. 2018;18:493-506.
 30. Chmurska A, Matczak K, Marczak A. Two faces of autophagy in the struggle against cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22:2981.

31. Thorburn A. Crosstalk between autophagy and apoptosis: Mechanisms and therapeutic implications. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2020;172:55–65.
32. Yang J, Sun Y, Xu F, Liu W, Hayashi T, Mizuno K, Hattori S, Fujisaki H, Ikejima T. Autophagy and glycolysis independently attenuate silibinin-induced apoptosis in human hepatocarcinoma HepG2 and Hep3B cells. *Hum Exp Toxicol.* 2021;40:2048–62.
33. Lou LL, Cheng ZY, Guo R, Yao GD, Song SJ. Alkaloids from *Juglans mandshurica* maxim induce distinctive cell death in hepatocellular carcinoma cells. *Nat Prod Res.* 2019;33:911–4.
34. Condello M, Pellegrini E, Caraglia M, Meschini S. Targeting autophagy to overcome human diseases. *Int J Mol Sci.* 2019;20:725.
35. Urbańska K, Orzechowski A. The secrets of alternative autophagy. *Cells.* 2021;10:3241.
36. Fan X, Huang T, Tong Y, Fan Z, Yang Z, Yang D, Mao X, Yang M. p62 works as a hub modulation in the ageing process. *Ageing Res Rev.* 2022;73:101538.
37. Islam MA, Sooro MA, Zhang P. Autophagic regulation of p62 is critical for cancer therapy. *Int J Mol Sci.* 2018;19:1405.
38. Yang W, Su J, Li M, Li T, Wang X, Zhao M, Hu X. Myricetin induces autophagy and cell cycle arrest of HCC by inhibiting MARCH1-regulated Stat3 and p38 MAPK signaling pathways. *Front Pharmacol.* 2021;12:709526.
39. Xie L, Li M, Liu D, Wang X, Wang P, Dai H, Yang W, Liu W, Hu X, Zhao M. Secalonic acid-F, a novel mycotoxin, represses the progression of hepatocellular carcinoma *via* MARCH1 regulation of the PI3K/AKT/ β -catenin signaling pathway. *Molecules.* 2019;24:393.
40. Zheng Y, Zhang W, Xu L, Zhou H, Yuan M, Xu H. Recent progress in understanding the action of natural compounds at novel therapeutic drug targets for the treatment of liver cancer. *Front Oncol.* 2022;11:795548.

Table 1. Composition of Bigihwan, Daechilgithang and Mokwhyangbinranghwan

	Herbal medicine	Scientific name	Amount (g)
Bigihwan (肥氣丸)	Bupleuri Radix (시호, 柴胡)	<i>Bupleurum falcatum</i> L.	40 g
	Coptidis Rhizoma (황련, 黃連)	<i>Coptis japonica</i> (Thunb) Makino	28 g
	Machili Cortex (후박, 厚朴)	<i>Magnolia officinalis</i>	20 g
	Prickly ash (화초, 花椒)	<i>Zanthoxylum americanum</i> Mill. [Rutaceae]	16 g
	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma (감초, 甘草)	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	12 g
	Ginseng Radix (인삼, 人參)	<i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer	10 g
	Laminaria Thallus (곤포, 昆布)	<i>Laminaria japonica</i> Areschoung	10 g
	Curcumae Rhizoma (아출, 莪朮)	<i>Curcuma phaeocaulis</i> Valetton	10 g
	Hoelen (Poria) (백복령, 白茯苓)	<i>Poria cocos</i> (Schw.) Wolf.	6 g
	Gleditsiae Spina (조협, 阜莢)	<i>Gleditsia sinensis</i> Lam.	6 g
	Crotonis Semen Pulvis (파두상, 巴豆霜)	<i>Croton tiglium</i> L.	2 g
	Zingiberis Rhizoma (진강, 乾薑)	<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	2 g
Aconiti Radix (천오두, 川烏頭)	<i>Aconitum carmichaelii</i> Debx.	0.8 g	
Daechilgithang (大七氣湯)	Curcumae Rhizoma (아출, 莪朮)	<i>Curcuma phaeocaulis</i> Valetton	4 g
	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma (감초, 甘草)	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	4 g
	Citri Unshii Pericarpium (진피, 陳皮)	<i>Citrus unshiu</i> Markovich	4 g
	Sparganii Rhizoma (삼릉, 三稜)	<i>Sparganium erectum</i> L.	4 g
	Pogostemonis Herba (곽향, 藿香)	<i>Pogostemon cablin</i> Benth.	4 g
	Citri Unshius Pericarpium Immaturus (청피, 靑皮)	<i>Citrus unshiu</i> Markovich	4 g
	Alpiniae Fructus (익지인, 益智仁)	<i>Alpinia oxyphylla</i> Miquel	4 g
	Cyperi Rhizoma (향부자, 香附子)	<i>Cyperus rotundus</i> L.	4 g
	Platycodi Radix (길경, 桔梗)	<i>Platycodon grandiflorum</i> A. DC.	4 g
	Cinnamomi Cortex (육계, 肉桂)	<i>Cercidiphyllum japonicum</i> Sieb. et Zucc.	4 g
	Zizyphi Fructus (대조, 大棗)	<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i>	2
	Ginger Rhizomes (생강, 生薑)	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	3 slices

Mokwhyangbinranghwan (木香檳榔丸)	Rhei Radix et Rhizoma (대황, 大黃)	<i>Rheum palmatum</i> L.	160 g
	Scutellariae Radix (황금, 黃芩)	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi.	80 g
	Pharbitidis Semen (흑축, 黑丑)	<i>Pharbitis nil</i> (L.) Choisy	80 g
	Arecae Semen (빈랑, 檳榔)	<i>Areca catechu</i> L.	40 g
	Aucklandiae Radix (목향, 木香)	<i>Aucklandia lappa</i> Decne.	40 g
	Coptidis Rhizoma (황련, 黃連)	<i>Coptis japonica</i> (Thunb) Makino	40 g
	Cyperi Rhizoma (향부자, 香附子)	<i>Cyperus rotundus</i> L.	40 g
	Aurantii Fructus (지각, 枳殼)	<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.	40 g
	Angelicae gigantis Radix (당귀, 當歸)	<i>Angelica gigas</i> Nakai	40 g
	Citri Unshii Pericarpium (진피, 陳皮)	<i>Citrus unshiu</i> Markovich	40 g
	Citri Unshius Pericarpium Immaturus (청피, 靑皮)	<i>Citrus unshiu</i> Markovich	40 g
	Phellodendri Cortex (황백, 黃柏)	<i>Phellodendron amurense</i> Ruprecht	40 g
Curcumae Rhizoma (아출, 莪朮)	<i>Curcuma phaeocaulis</i> Valetton	40 g	

Table 2. List of primary and secondary antibodies used for immunoblotting

Antibodies	Supplier	Item No.	Dilution
Bax	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-4780	1:1,000
Bcl-2	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-7382	1:1,000
PARP*	Santa Cruz Biotechnology, Inc.		1:1,000
cytochrome <i>c</i>	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-7159	1:1,000
COX VI*	Cell Signaling Technology	#11967	1:500
LC3*	Sigma-Aldrich Chemical Co.	ABC929	1:1,000
p62	Cell Signaling Technology	#5114	1:1,000
actin	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-1615	1:2,000
goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-2005	1:1,500
goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-2004	1:1,500

*PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; COX VI, cytochrome *c*, cytochrome oxidase subunit VI; LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)

Figure legends

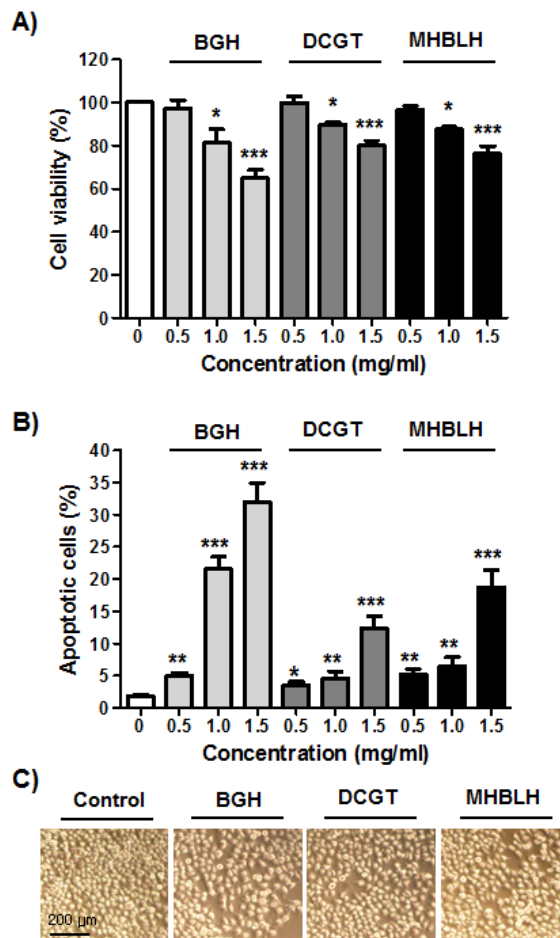


Fig. 1. Inhibition of cell viability and induction of apoptosis by water extracts of Bigihwan (BGH), Daechilgitang (DCGT) and Mokwhyangbinranghwan (MHLH) in HepG2 cells. Cells were treated with different concentrations of BGH, DCGT and MHLH for 24 h. (A) After treatment, cell viability was measured by the MTT assay. (B) The percentages of apoptotic cells by annexin V and PI staining were expressed as a percentage of the total number of annexin V-positive cells. Data are expressed as the mean \pm SD (* p < 0.05 and *** p < 0.001 compared to untreated cells). (C) Morphological changes in cells treated with 1.5 mg/ml of each extract were captured using a phase-contrast microscope (Scale bar: 200 μ m).

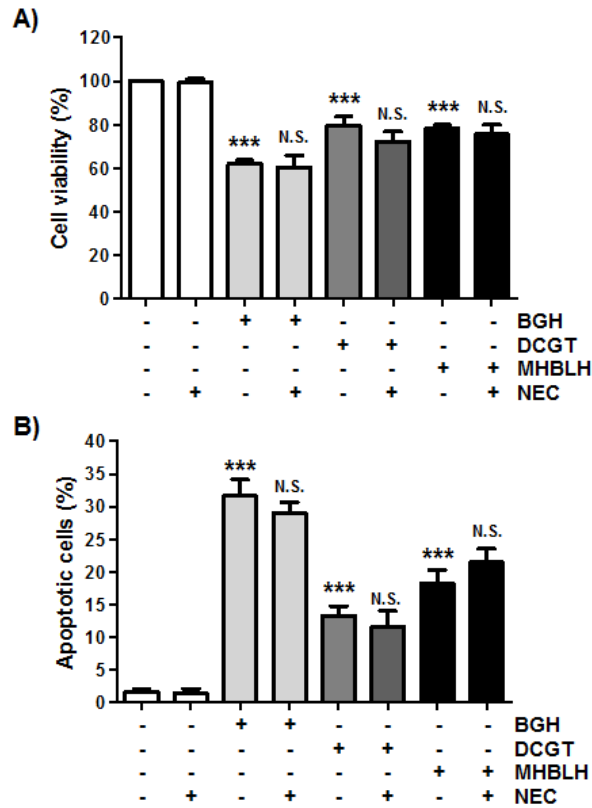


Fig. 2. Effects of necrostatin-1 (NEC), a necrosis inhibitor, on cell survival inhibition and apoptosis induction by BGH, DCGT and MHBRLH in HepG2 cells. Cells were pre-treated with 200 μ M NEC for 1 h, and maintained in the presence or absence of 1.5 mg/ml BGH, DCGT and MHBRLH for 24 h. (A) Cell viability was measured by the MTT assay. (B) The populations of apoptotic cells were determined by expressing the numbers of annexin V-positive cells. The data are presented as the mean \pm SD of three independent experiments (***p* < 0.001 compared to control; N.S., not significant compared to treated cells).

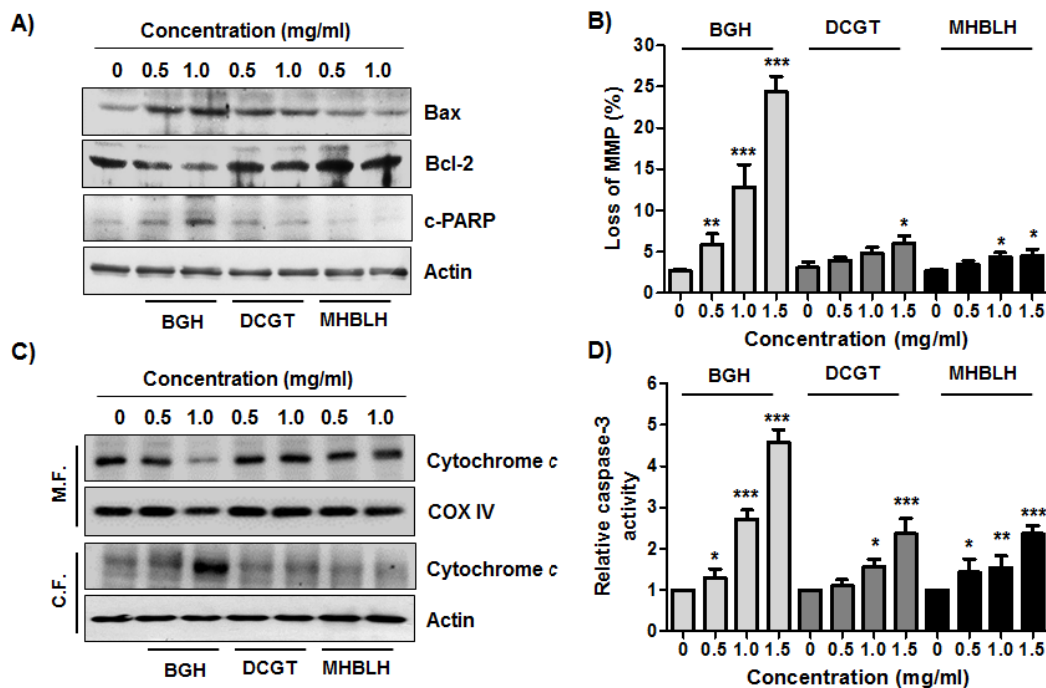


Fig. 3. Effects of BGH, DCGT and MHLH on the expression of Bax, Bcl-2, PARP and cytochrome *c*, the levels of MMP and activity of caspase-3 in HepG2 cells. Cells were stimulated with the indicated concentrations of BGH, DCGT and MHLH for 24 h. (A) After treatment, Western blotting with total protein isolated from cells was performed using the indicated antibodies and ECL detection system. Actin was used as an internal control. (B) The cells were stained with JC-1 and then changes of MMP were determined by a flow cytometer. (C) Expression levels of cytochrome *c* using cytoplasmic and mitochondrial fractions were investigated by Western blot analysis. Actin and COX VI in each protein extract were presented as loading controls. (D) The activity of caspase-3 was examined using a colorimetric caspase-3 assay kit. (B and D) The data indicated the mean \pm SD (* p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001 compared to untreated cells).

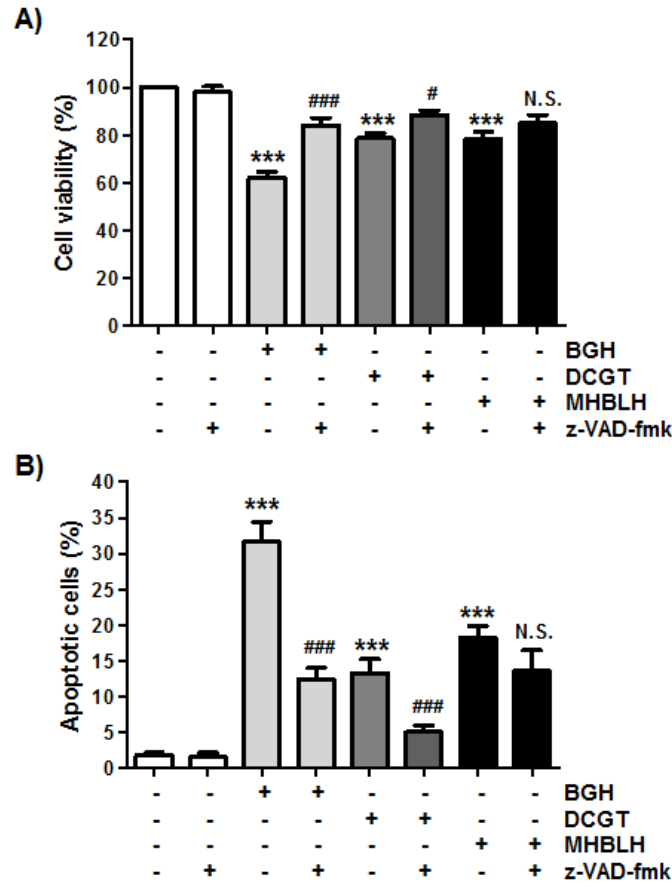


Fig. 4. Effects of a pan-caspase inhibitor, z-VAD-fmk, on cell survival inhibition and apoptosis induction by BGH, DCGT and MHLRH in HepG2 cells. Cells were pre-treated with 50 μ M z-VAD-fmk for 1 h, and maintained in the presence or absence of 1.5 mg/ml BGH, DCGT and MHLRH for 24 h. (A) Cell viability was measured by the MTT assay. (B) The populations of apoptotic cells were determined by expressing the numbers of annexin V-positive cells. The data are presented as the mean \pm SD of three independent experiments (***p* <0.001 compared to control; #*p* <0.05 and ###*p* <0.001 compared to treated cells; N.S., not significant compared to treated cells).

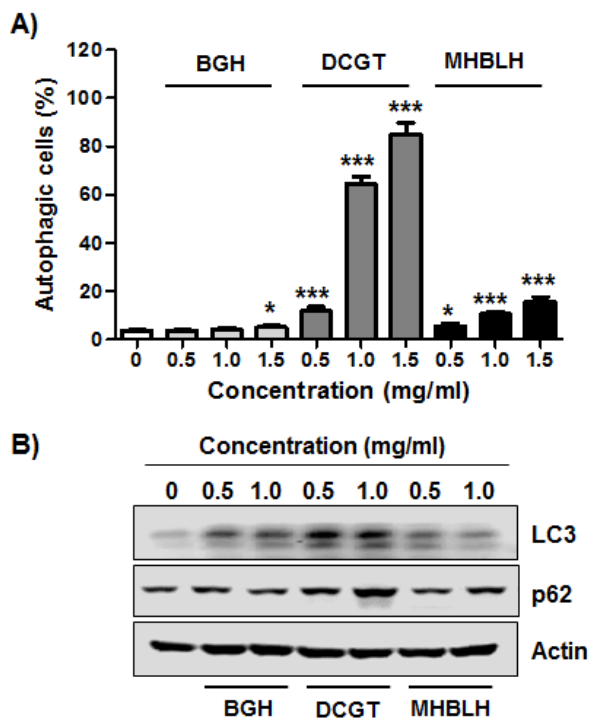


Fig. 5. Induction of autophagy by BGH, DCGT and MHLBH in HepG2 cells. Cells were treated with different concentrations of BGH, DCGT and MHLBH for 24 h. (A) After treatment, cells were stained with Cyto-ID, and analyzed by flow cytometry. The frequencies of autophagic cells were presented. Each bar indicated the mean \pm SD (* p < 0.05 and *** p < 0.001 compared to untreated cells). (B) Western blotting with total protein isolated from cells was performed using the indicated antibodies and ECL detection system. Actin was used as an internal control.

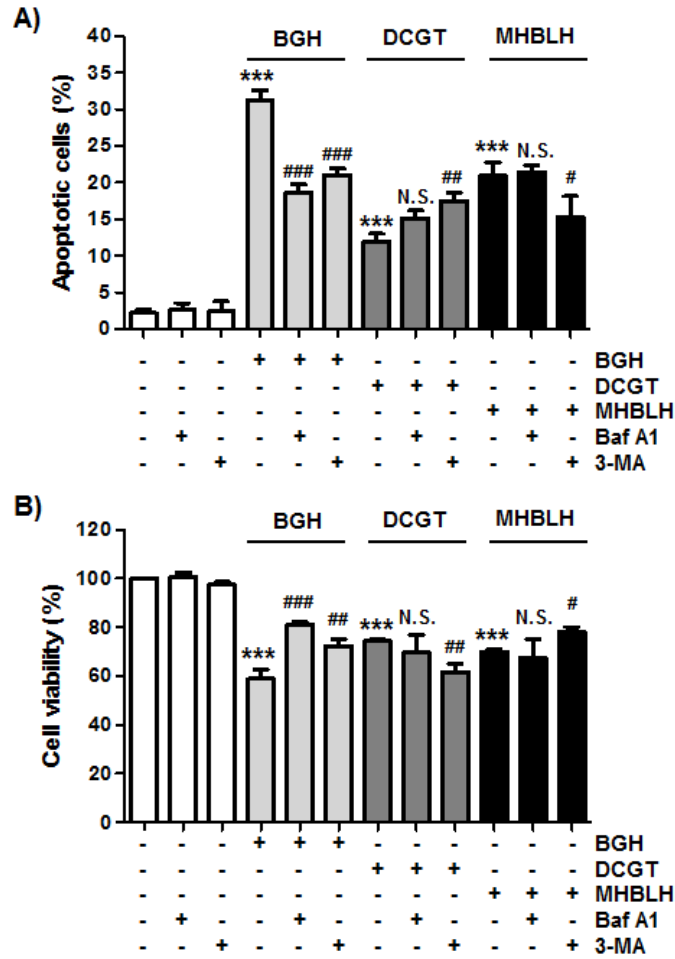


Fig. 6. Effects of autophagy inhibitors, Baf A1 and 3-MA, on cell survival inhibition and apoptosis induction by BGH, DCGT and MHLRH in HepG2 cells. Cells were pre-treated with 5 μ M Baf A1 or 1 mM 3-MA for 1 h, and cultured in the presence or absence of 1.5 mg/ml BGH, DCGT and MHLRH for 24 h. (A) Cell viability was measured by the MTT assay. (B) The populations of apoptotic cells were determined by expressing the numbers of annexin V-positive cells. The data are presented as the mean \pm SD of three independent experiments (** p <0.001 compared to control; # p <0.05, ## p <0.01 and ### p <0.001 compared to treated cells; N.S., not significant compared to treated cells).