

Induction of Apoptosis by β -Lapachone in Hep3B Human Hepatocellular Carcinoma Cells Is Caspase-Dependent and Associated with Inactivation of PI3K/Akt Signaling

Jae Im Kwon¹, Yung Hyun Choi^{1,2,3*} and Hyun Hwangbo^{1,2*}

¹Anti-Aging Research Center, Dong-eui University, Busan 47340, Korea

²Basic Research Laboratory for the Regulation of Microplastic-Mediated Diseases, Dong-eui University, Busan 47227, Korea

³Department of Biochemistry, Dong-eui University College of Korean Medicine, Busan 47227, Korea

Received January 4, 2024 / Revised February 1, 2024 / Accepted February 1, 2024

β -Lapachone is a natural quinone compound originally obtained from the bark of the lapacho tree (*Tabebuia vellanadae*), which has been used in traditional medicine in several South and Central American countries for treating various diseases. Although β -lapachone has been reported to have potent anticancer activity in many types of cancer cells, its effect on the proliferation of hepatocellular carcinoma (HCC) cells is still unclear. Therefore, in this study, we investigated the effect of β -lapachone on the proliferation of human HCC Hep3B cells. According to our results, the decrease in cell viability of Hep3B cells caused by β -lapachone was closely related to the induction of apoptosis, which was confirmed through changes in nuclear morphology and flow cytometry. In addition, in Hep3B cells treated with β -lapachone, the expression of Bcl-2, an anti-apoptotic factor, was decreased, while the expression of Bax, an apoptosis inducer, was increased, and the activity of the caspase cascade was also increased. However, in the presence of a pan-caspase inhibitor, β -lapachone-induced apoptosis was weakened, indicating that the induction of apoptosis by β -lapachone was caspase-dependent. Moreover, β -lapachone treatment activated extracellular-regulated kinase (ERK) signaling while inhibiting activation of the phosphoinositide 3 kinase (PI3K)/Akt pathway. Furthermore, the effect of the ERK inhibitor on suppressing the induction of apoptosis by β -lapachone was minimal, and the PI3K inhibitor significantly increased β -lapachone-induced apoptosis. The findings from this study will contribute to a better understanding of the anticancer activity of β -lapachone in HCC cells.

Key words : Apoptosis, ERK, Hep3B cells, PI3K/Akt, β -lapachone

서 론

인체에 유익한 효능을 지니는 자연계 존재하는 많은 천연 생리활성 물질은 신약 개발의 원천이며, 특히 다수의 항암제가 다양한 출처의 천연물에서 유래된 것이다[4, 36]. 따라서 항암 활성이 있는 천연물의 지속적인 탐색과 항암 기전을 밝히는 과정은 새로운 항암제의 발굴을 위한 가장 기본적인 과정이다. 대부분의 항암 활성을 가지는 천연물은 정상 세포에는 큰 영향을 주지 않으면서 암세포의 증식 억제와 동시에 세포사멸(apoptosis)을 유도하는 특

징을 가진다[3, 16]. 세포사멸의 개시는 자극의 종류에 따라 세포막 죽음의 수용체 매개 외인성(membrane death receptor-mediated extrinsic) 및 미토콘드리아 매개 내인성 세포사멸 경로(mitochondria-mediated intrinsic apoptotic pathways)로 크게 구분된다. 이 두 가지는 caspase 활성화 의존적인 경로이며, 세포 내 다양한 신호 전달계에 의하여 조절된다[7, 19]. 그 중 thioredoxin (Trx)과 이의 환원에 관여하는 Trx reductase (TrxR)로 구성된 Trx/TrxR 시스템은 암세포의 증식에서 산화-환원 신호(redox signals)로서 핵심적인 역할을 한다[15, 24]. 이들은 다양한 유형의 암세포에서 높은 수준으로 발현되어 있으며, 암세포 표현형을 유지하는 데 필수적인 역할을 한다[11, 12]. 따라서 TrxR 억제를 기반으로 한 항암 활성 잠재력을 지닌 천연물의 발굴에 대한 관심이 증대되고 있다[12, 21].

DNA 분자의 비틀림 및 굴곡 변형의 변화에 요구되는 DNA topoisomerase 억제제로 알려진 β -lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphtho[1,2-b]pyran-5,6-dione)은 아마존 열대우림과 중남미 지역에 자생하는 식물인 *Tabe-*

*Corresponding authors

Tel : +82-51-890-3319, Fax : +82-51-893-3333

E-mail : choiyh@deu.ac.kr (Yung Hyun Choi)

Tel : +82-51-890-3319, Fax : +82-51-893-3333

E-mail : hhyun@deu.ac.kr (Hyun Hwangbo)

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.

*buia vellanedae*의 껍질에서 분리된 생리활성물질로서 천연 퀴논 화합물(quinone compound)의 일종이다[2, 27]. β -lapachone의 항암 활성은 NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1)의 생체환원적 활성화(bioreductive activation)와 밀접한 관련이 있다[9, 43, 47]. 그리고 NQO1 조절제로서 β -lapachone은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성 의존적 세포 내 신호계를 활성화하여 암세포 선택적 세포주기의 흐름은 차단하고 세포사멸을 유도하며 전이를 억제한다[8, 14, 17, 27, 37, 40, 53, 54]. 최근 Zhang 등[56]의 보고에 의하면, β -lapachone은 TrxR의 활성 저해를 통해 산화적 스트레스를 증가시켜 인간 전골수성 백혈병(pro-myelocytic leukemia) HL-60 세포의 세포사멸을 촉진시켰다. 반면, TrxR의 과발현은 β -lapachone의 항암 활성을 감소시켰으며, TrxR의 활성 억제는 β -lapachone의 항암 활성을 증가시켰다. 이는 β -lapachone의 세포 내 산화-환원 신호전달의 교란이 TrxR를 통하여 이루어지고 있음을 의미하며, β -lapachone의 항암 활성에 Trx 신호계가 핵심적인 역할을 한다는 결과를 잘 지지해준다[17, 18]. 본 연구실의 선행 결과에 의하면, 항암 활성을 지닌 morin이나 sulforaphane과 같은 천연물은 TrxR의 활성을 저해할 수 있었다[20, 22]. 이러한 TrxR 활성 억제 효능을 가지는 신규 천연물들과 선택적 TrxR 저해제의 병용 처리는 TrxR의 활성이 높은 암 치료에 새로운 항암 치료법으로 활용 잠재력이 높을 수 있음을 시사한다. 그러나 다른 암 세포에 비하여 Trx의 발현이 높은 것으로 알려진 간암 세포에서 β -lapachone의 항암 활성은 여전히 미비한 실정이다[39]. 그러므로 본 연구는 TrxR 저해제와 동시 처리에 의하여 항암 활성을 증가시킬 수 있는 천연물 발굴의 일환으로 간세포암종 Hep3B 세포에서 β -lapachone 처리에 따른 항암 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 β -lapachone의 처리

본 연구에서 사용된 Hep3B 세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, 10%의 fetal bovine serum과 1%의 penicillin/streptomycin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 이용하여 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다. 세포배양에 필요한 재료들은 모두 WelGENE Inc. (Gyeongsan, Republic of Korea)에서 구입하였다. β -lapachone은 Biomol (Plymouth Meeting, PA, USA)에서 구입하였으며, 100% 에탄올에 녹여 10 mM의 stock solution을 만든 후 세포배양 DMEM 배지에 희석하여 Hep3B 세포에 처리하였다.

세포 생존율 측정

β -lapachone 처리에 따른 Hep3B 세포의 세포 생존율 분

석을 위해 6-well plate (1.3×10^5 cells/well)에 세포를 DMEM에서 24시간 배양 후, 다양한 농도의 β -lapachone이 포함된 DMEM 배지에서 처리하여 24시간 동안 배양하거나 3.5 μ M의 β -lapachone을 처리하여 제시된 시간 동안 배양하였다. 아울러 pan-caspase 억제제인 *N*-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone (z-VAD-fmk, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA), phosphoinositide 3 kinase (PI3K) 억제제인 LY294002 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 및 extracellular-regulated kinase (ERK) 억제제인 PD98059 (Cell Signaling Technology)를 세포독성이 없는 적정 농도로 DMEM 배지에 희석하여 1시간 전처리후 3.5 μ M의 β -lapachone을 처리하여 24시간 동안 추가 배양하였다. 처리가 끝난 세포에 2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액을 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 반응시키고, dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich Chemical Co.)을 첨가하여 10분 동안 형성된 formazan을 용해하였다. 이어서 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) microplate reader (Molecular devices, San Jose, CA, USA)를 사용하여 540 nm에서 광학 밀도를 측정하여 세포 생존율을 평가하였다.

세포 형태 관찰

β -lapachone 처리에 따른 Hep3B 세포의 형태 변화는 3.5 μ M의 β -lapachone을 적정 시간 동안 처리 후, 위상차 현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 하에서 관찰하였다. 또한, 핵의 형태적 변화를 관찰하기 위해서는 β -lapachone이 처리된 세포를 phosphate-buffered saline (PBS) 용액으로 수세 후, 4% formaldehyde 용액(Sigma-Aldrich Chemical Co.)으로 상온에서 10분간 고정하였다. 고정된 세포를 4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 용액으로 10분간 염색 후, PBS로 수세 후 형광 현미경(Carl Zeiss) 하에서 핵의 형태적 변화를 비교하였다.

세포사멸 유도의 정량적 평가

β -lapachone이 처리된 Hep3B 세포에서 유도된 세포사멸의 정도를 평가하기 위하여 Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 사용하였다. 이를 위하여 β -lapachone이 처리된 세포를 PBS로 세척 후 20분 동안 4°C에서 75% 에탄올로 고정시켰다. 제조사의 지침에 따라 고정된 세포를 annexin V/propidium iodide (PI) 용액으로 암조건에서 20분 동안 염색하고, 유세포 분석기(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 세포사멸이 유도된 세포(annexin-V⁺/PI⁺ 및 annexin-V⁺/PI⁻)의 빈도로 산출하였다. 아울러 z-VAD-fmk, LY294002 및 PD98059가 β -lapachone에 의한 세포사멸 유도에 미치는 영향을 분석하기 위하여서는 β -lapachone 처리 1시간

전에 적정 농도의 이들 억제제를 전처리 후, β -lapachone를 24시간 동안 처리한 후 유세포 분석을 수행하였다.

mRNA 발현 분석

β -lapachone 처리된 Hep3B 세포에서 세포사멸 조절 관련 유전자들의 발현을 전사 수준에서 조사하기 위하여 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 수행하였다. 이를 위하여 상기와 동일한 조건에서 배양된 Hep3B 세포의 총 RNA를 TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific)로 추출하였다. 추출된 RNA를 조사 대상 유전자의 primer (Table 1)와 AccuPower[®] RT-PCR PreMix & Master Mix (Daejeon, Republic of Korea) 및 Mastercycler[®] nexus-PCR Thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 사용하여 증폭하였다. 증폭된 산물들을 ethidium bromide (EtBr, Thermo Fisher Scientific)이 함유된 1.5% agarose gel을 사용하여 전기 영동으로 분리 후 ultraviolet 하에서 발현 변화를 관찰하였다.

단백질 발현 분석

Western blot 분석에 의한 β -lapachone이 처리된 Hep3B

세포에서 세포사멸 및 세포 내 신호계의 조절에 미치는 주요 단백질들의 발현 변화를 조사하기 위하여 세포 내 총단백질을 RIPA Buffer (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA)로 추출하였다. 추출된 단백질은 Quick Start[™] Bradford Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)로 정량 후, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel을 이용하여 전기 영동으로 분리하였다. Gel에 분리된 단백질은 polyvinylidene fluoride membrane (Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA)으로 이동시키고, 4°C에서 12시간 이상 검출 대상 단백질의 1차 항체와 반응시키고 실온에서 2차 항체(Peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin, Amersham Corp., Arlington Heights, IL, USA)와 2시간 반응시켰다. 이어서 membrane을 ECL[™] Detection Reagents (Sigma-Aldrich Chemical Co.)와 반응시키고, Fusion Solo S (Vilber Lourmat, Torcy, France)로 각 단백질의 발현 정도를 관찰하였다. Western blot 분석을 위해 사용된 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA), BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA), 및 Abcam Inc. (Cambridge, UK)에서 구입하였다(Table 2).

Table 1. Primer sequences used for RT-PCR in this study

Gene	Sense	Antisense
Bax	5'-ATG GAC GGG TCC GGG GAG-3'	5'-TCA GCC CAT CTT CTT CCA-3'
Bcl-2	5'-CAG CTG CAC CTG ACG-3'	5'-ATG CAC CTA CCC AGC-3'
Bcl-xL	5'-CGG GCA TTC AGT GAC CTG AC-3'	5'-TCA GGA ACC AGC GGT TGA AG-3'
GAPDH*	5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'	5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'

*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Table 2. List of antibodies used in this study

Antibody	Species raised	Dilution	Product Code	Source
Bcl-2	Mouse monoclonal	1:1000	sc-509	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Bax	Mouse monoclonal	1:1000	sc-7480	Santa Cruz Biotechnology Inc.
caspase-8	Mouse monoclonal	1:1000	sc-56070	Santa Cruz Biotechnology Inc.
caspase-9	Mouse monoclonal	1:1000	sc-56076	Santa Cruz Biotechnology Inc.
caspase-3	Rabbit polyclonal	1:1000	#9662	Cell Signaling Technology Inc.
PARP	Mouse monoclonal	1:1000	sc-8007	Santa Cruz Biotechnology Inc.
p-ERK	Mouse monoclonal	1:500	AB-10895978	BD Biosciences
ERK	Mouse monoclonal	1:1000	AB-397529	BD Biosciences
p-JNK	Mouse monoclonal	1:500	sc-6254	Santa Cruz Biotechnology Inc.
JNK	Mouse monoclonal	1:1000	sc-7345	Santa Cruz Biotechnology Inc.
p-p38 MAPK	Mouse monoclonal	1:500	sc-166182	Santa Cruz Biotechnology Inc.
p38 MAPK	Mouse monoclonal	1:1000	sc-81621	Santa Cruz Biotechnology Inc.
p-PI3K	Mouse monoclonal	1:500	ab86714	Abcam Inc.
PI3K	Mouse monoclonal	1:1000	sc-1637	Santa Cruz Biotechnology Inc.
p-Akt	Mouse monoclonal	1:500	ab81283	Abcam Inc.
Akt	Mouse monoclonal	1:1000	sc-271149	Santa Cruz Biotechnology Inc.
actin	Mouse monoclonal	1:1000	sc-47778	Santa Cruz Biotechnology Inc.

Caspase 활성 측정

다양한 농도의 β -lapachone이 24시간 처리된 Hep3B 세포에서 caspase-3, -8 및 -9의 활성을 조사하기 위해서는 R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA)에서 구입한 ELISA assay kit를 사용하였다. 이를 위하여 처리가 끝난 세포를 모아 제조사의 지침에 준하여 kit에 제공된 용해 완충액을 사용하여 세포를 용해시키고, 각 처리군에서 추출된 동일한 양의 단백질을 각 caspase의 기질에 함유된 reaction buffer와 혼합하여 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후, ELISA microplate reader를 사용하여 405 nm에서의 흡광도를 측정하여 대조군에 대한 상대치로 각 caspase의 활성을 제시하였다.

미토콘드리아 막 전위 분석

β -lapachone 처리에 따른 Hep3B 세포의 미토콘드리아 활성 변화를 조사하기 위하여 미토콘드리아 막 전위 (mitochondrial membrane potential, MMP, $\Delta\psi_m$)를 분석하였다. 이를 위하여 z-VAD-fmk, LY294002 및 PD98059가 함유된 배지에서 1시간 배양된 Hep3B 세포에 β -lapachone을 24시간 처리하였으며, 처리된 세포들을 PBS로 수세 후 37°C에서 10 μ M 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide (JC-1, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액으로 20분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 상층액을 제거하고, 유세포 분석기를 이용하여 JC-1 aggregate 및 monomer의 비율을 산출하였으며, 전체 세포에서 JC-1

monomer를 나타낸 세포의 빈도를 MMP가 소실된 세포로 간주하였다.

통계 처리

본 연구에서 얻은 결과들의 유의성을 판정하기 위하여 GraphPad Prism® (Graphpad Inc., San Diego, CA, USA)을 사용하였으며, Tukey's test로 사후 검정하여 $p < 0.05$ 값을 통계적으로 유의한 값으로 처리하였다.

결과 및 고찰

Hep3B 세포의 세포 생존율 및 세포사멸에 미치는 β -lapachone의 영향

β -lapachone이 Hep3B 간암 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 다양한 농도의 β -lapachone을 24시간 처리하거나, 3.5 μ M의 β -lapachone을 적정시간 동안 처리 후 MTT 분석을 실시하였다. NAD(P)H 의존성 세포 산화 환원 효소의 활성을 기반으로 한 MTT 분석 결과에 의하면, 2 μ M의 β -lapachone 처리군까지는 대조군에 비하여 유의적인 세포 생존율 감소는 없었다. 그러나 3 μ M 이상의 β -lapachone을 처리한 경우, 처리 농도의 증가에 따라 세포 생존율이 유의적으로 감소하였으며, 3.5 μ M의 β -lapachone이 처리된 Hep3B 세포에서 처리 6시간 후부터 세포 생존율이 현저히 감소하였다(Fig. 1A 및 B). 또한, β -lapachone의 처리 농도가 증가할수록 Hep3B 세포는 세포의

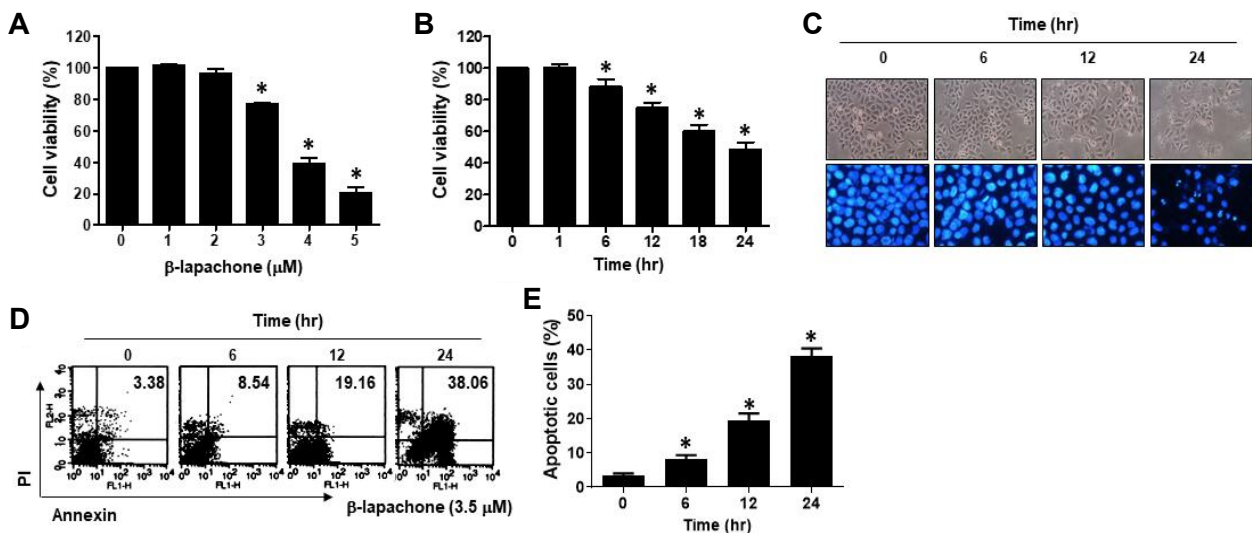


Fig. 1. Inhibition of cell viability and induction of apoptosis by β -lapachone in Hep3B cells. The chemical structure of β -lapachone is presented in (A). The cells were seeded and then treated with various concentrations of β -lapachone for 24 hr (A) or 3.5 μ M β -lapachone for the indicated times (B-E). (A and B) After treatment, cell viability was determined by MTT assay. Values are the means \pm SD of data from three independent experiments ($p < 0.05$ versus β -lapachone non-treated cells). (C) The morphological changes of the cells were observed under a phase-contrast microscope (magnification 200x). After DAPI staining, changes in nuclear morphology were observed under a fluorescence microscope (magnification 400x). (D and E) Quantitative evaluation of apoptosis by β -lapachone treatment was performed using annexin V/PI staining and flow cytometry. Values are the means \pm SD ($p < 0.05$ versus β -lapachone non-treated cells).

형태가 위축되거나 부착력을 상실하여 부유 세포가 증가하였다(Fig. 1C). β -lapachone에 의한 이러한 생존율의 억제와 세포의 형태적 변화가 세포사멸 유도과 관련이 있는지 확인하기 위한 DAPI 염색의 결과, β -lapachone 처리 농도가 증가할수록 세포사멸이 유도된 핵에서 관찰되는 염색질의 응축(chromatin condensation)과 세포 사멸체(apoptotic body) 형성이 증가되었다. 또한 annexin V/PI 염색에 의한 유세포 분석 결과, β -lapachone의 농도 증가에 따른 세포사멸 정도가 유의적으로 증가하였다(Fig. 1D 및 E). 따라서 β -lapachone이 Hep3B 간암 세포의 세포 생존율 억제는 HepG2 및 SK-Hep1 간암 세포의 세포 생존율 억제와 유사하게 세포사멸 유도에 의한 것임을 알 수 있다[34, 52].

β -lapachone에 의한 Hep3B 세포의 세포사멸 유도에서 Bcl-2 계열 인자들의 역할

β -lapachone 처리에 따른 Hep3B 세포의 세포사멸 유도와 연관된 기전 연구를 위하여 Bcl-2 계열 단백질(Bcl-2 family proteins)의 발현에 미치는 β -lapachone의 영향을 조사하였다. Bcl-2 계열 단백질 중, Bax는 미토콘드리아 외막 투과성(mitochondrial outer membrane permeabilization)을 증가시켜 미토콘드리아 내막과 외막 사이에 존재하는 cytochrome c의 세포질로의 유출을 유도하여 caspase cascade 활성을 통한 미토콘드리아 매개 내인성 세포사멸 경로 개시에 관여하며, Bcl-2와 같은 세포사멸 억제 인자들

은 이들의 작용을 억제한다[29, 44]. Fig. 2A 및 B의 RT-PCR 및 Western blot 분석의 결과, β -lapachone의 처리 시간 증가에 따라 Bax의 발현은 전사 및 번역 수준에서 증가하였으나, Bcl-2의 발현은 감소하였다. 이러한 결과는 흑색종 암 세포주 B16F10 세포에서 관찰된 경우와 동일하였다[27], 또한, AGS 위암 세포, 인간 자궁경부암종 HeLa 세포, 방광암 T24 세포 등에서 보고된 경우와 유사하였다[31, 46, 54]. 특히, β -lapachone에 의한 골수성 백혈병(myeloid leukemia) 세포의 세포사멸이 Bcl-2의 과발현에 의하여 차단되었다는 선행 연구의 결과[42]는 β -lapachone 처리에 의한 Hep3B 세포의 세포사멸 유도에도 Bax/Bcl-2 발현 비율의 증가가 크게 관여하였음을 의미한다. 한편, 미토콘드리아 외막 투과성의 증가는 MMP의 소실에 따른 것이며, MMP의 소실은 미토콘드리아 기능 손상의 지표이다[1, 26]. 따라서 β -lapachone이 처리된 Hep3B 세포의 MMP 변화를 JC-1 염색을 통해 분석하였으며, Fig. 3A 및 B의 유세포 분석 결과, β -lapachone은 MMP의 유의적인 소실을 유발하였다. 이러한 결과는 β -lapachone 처리에 의한 Bax/Bcl-2 발현 비율의 증가로, 미토콘드리아 기능 손상에 따른 세포질로의 cytochrome c 방출에 의한 내인성 세포사멸 경로의 활성화에 기여하였다고 해석된다[32, 34].

Hep3B 세포에서 β -lapachone에 의한 caspase 의존적 세포사멸 유도

한편 cysteine-aspartic proteases에 속하는 caspase는 미토

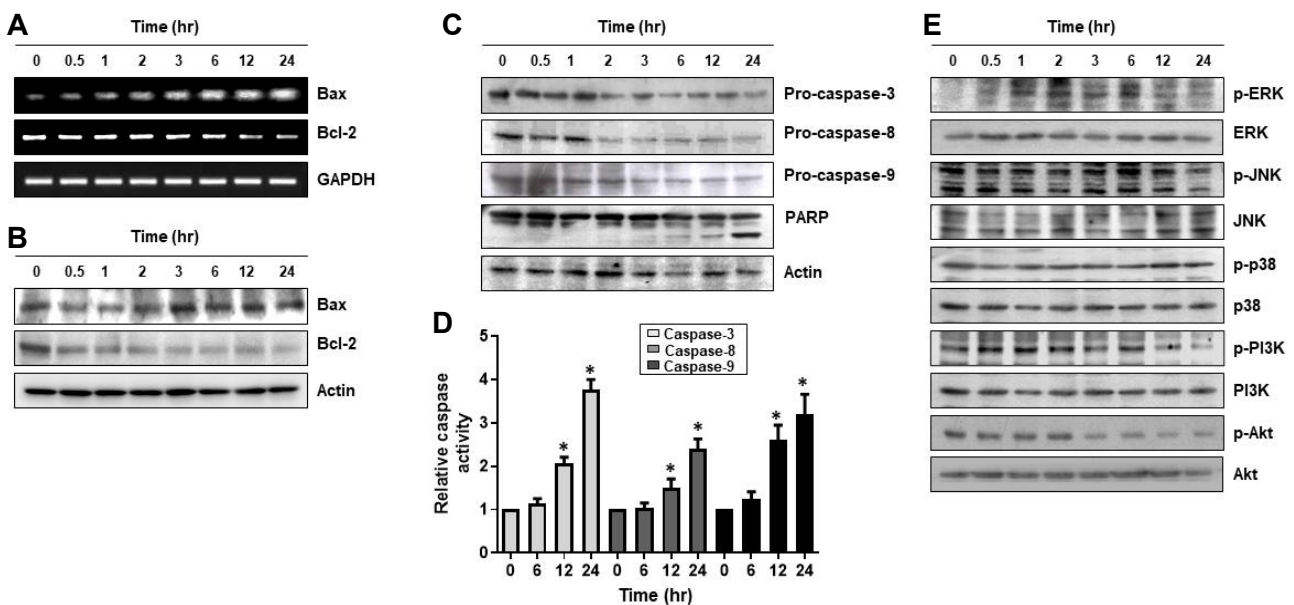


Fig. 2. Effects of β -lapachone on key regulators of apoptosis and intracellular signalings in Hep3B cells. The cells were seeded and then treated with 3.5 μ M β -lapachone for different times. (A) RT-PCR was performed using the extracted RNA and the indicated primers. (B, C and E) Cell lysates were subjected to Western blot analysis with the indicated anti-bodies. Actin was used as a loading control. (D) The activities of the three indicated caspases were measured using commercially available assay kits. Values are the means \pm SD (* p <0.05 versus β -lapachone non-treated cells).

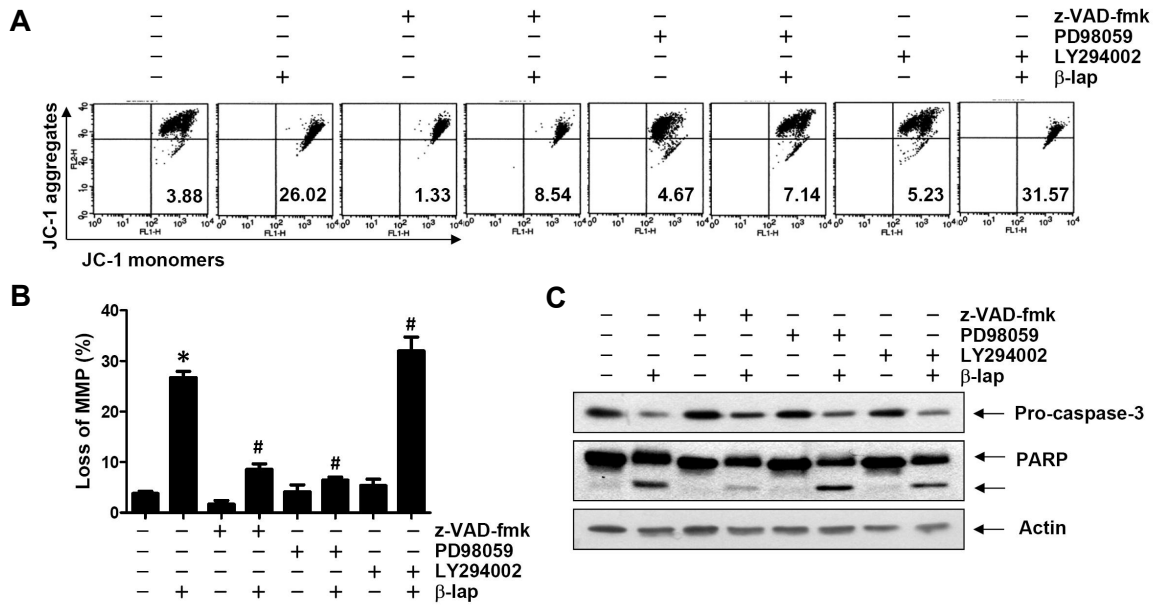


Fig. 3. Effect of inhibitors of caspase, PI3K, and ERK on β -lapachone-induced loss of mitochondrial function in Hep3B cells. Cells were cultured for 1 hr in medium containing z-VAD-fmk (pan-caspase inhibitor), LY294002 (PI3K inhibitor), and PD98059 (ERK inhibitor) and then treated with β -lapachone for 24 hr. (A) After JC-1 staining, changes in MMP were measured using flow cytometry. (B) Values are the means \pm SD (* p <0.05 versus β -lapachone non-treated cells; # p <0.05 versus β -lapachone-treated cells). (C) Cell lysates were subjected to Western blot analysis with anti-pro-caspase-3 and PARP anti-bodies. Actin was used as a loading control.

콘드리아 기능 손실과 연관된 내인성 세포사멸 경로와 죽음 수용체에 의해 개시되는 외인성 세포사멸 경로에서도 세포사멸 유도에 필수적으로 관여한다. 그중, caspase-8과 caspase-9는 외인성 및 내인성 세포사멸의 개시 caspase에 속하며, caspase-3은 대표적인 효과기 caspase로 분류된다[10, 19]. 다발성 골수종(multiple myeloma)과 위암 세포 등에서 β -lapachone 처리에 의한 세포사멸에서도 이들의 활성이 모두 관여함이 보고된 바 있었기에[13, 54] β -lapachone에 의한 Hep3B 세포의 세포사멸에서 이들의 활성 변화를 관찰하였다. Fig. 2C의 Western blot 분석의 결과에 의하면, β -lapachone이 처리된 Hep3B 세포에서 이들 3가지 caspase의 비활성형 단백질의 발현이 β -lapachone 처리 시간 증가에 따라 모두 감소하였다. 비활성형 caspase의 발현 감소는 활성형으로 전환이 증대되었음을 의미하기 때문에 그들의 효소적 활성 변화를 정량적으로 평가한 결과, β -lapachone이 처리된 Hep3B 세포에서 이들 3가지 caspase 활성이 처리 농도 증가에 따라 유의적으로 증가하였다(Fig. 2D). Caspase-3과 같은 효과기 caspase는 세포 생존에 필요한 다양한 단백질을 분해하여 세포사멸이 발생한다. 효과기 caspase의 대표적인 기질인 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)는 염색질의 구조 안정화, 전사, 복제, 재조합 및 DNA 복구를 비롯한 다양한 세포 과정에서 중요한 역할을 담당하며, PARP의 단편화는 caspase cascade에 의한 세포사멸이 유도의 바이오 마커로 활용된

다[51, 57]. 다양한 암세포주를 이용한 선행 연구에서 보고된 바와 같이[13, 27, 38], 본 연구에서도 β -lapachone이 처리된 Hep3B 세포에서 PARP의 단편화가 유도되었다. 한편, 외인성 세포사멸 개시자인 caspase-8은 Fas 수용체 세포사멸 신호 전달 경로에서 세포사멸 촉진 Bcl-2 계열 구성원(pro-apoptotic Bcl-2 family member)인 Bid에 의하여 활성화되어 caspase-3 활성화에 기여하였다[5]. β -lapachone에 의한 Hep3B 세포의 세포사멸 유도에 caspase의 활성이 필수적인 역할을 하는지를 조사하기 위하여, pan-caspase 억제제인 z-VAD-fmk를 이용하였다. Fig. 3C의 결과에 의하면, z-VAD-fmk가 전처리된 세포에 β -lapachone을 처리한 경우, β -lapachone에 의한 비활성형 caspase-3의 발현 감소가 억제되어 궁극적으로 PARP의 단편화가 억제되었다. 아울러 MMP의 소실도 억제되어 caspase의 활성 차단은 미토콘드리아 기능 손실의 차단 효과에도 관여하였음을 알 수 있다. 또한, β -lapachone에 의한 Hep3B 세포의 세포사멸 유도가 caspase의 활성 억제로 의의적으로 억제되었고(Fig. 4A 및 B), 감소한 세포 생존율도 대조군 수준으로 회복되었으며(Fig. 4C), 이는 구강암, 위암 및 전립선 암세포의 선행 결과와 유사하였다[9, 33, 54]. 따라서 본 연구의 결과는 β -lapachone이 Hep3B 세포의 세포사멸 유도에는 caspase 의존적 내인성 경로와 외인성 경로의 활성이 모두 관여하고 있음을 알 수 있다.

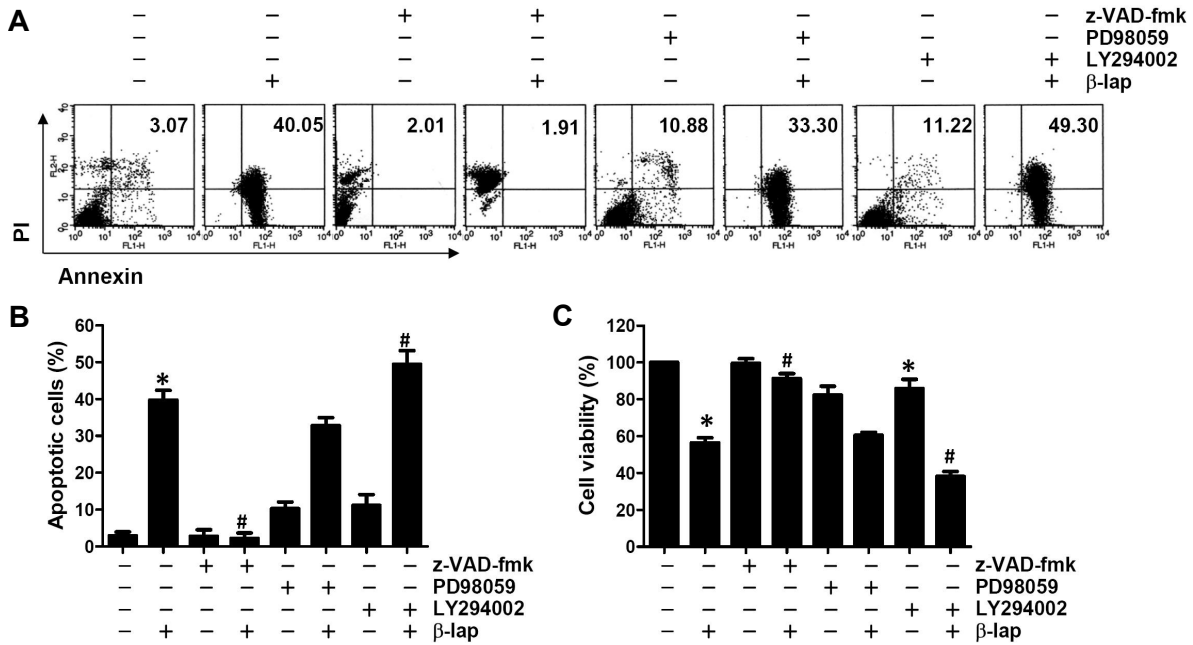


Fig. 4. Effect of inhibitors of caspase, PI3K, and ERK on β-lapachone-induced apoptosis and inhibition of survival in Hep3B cells. Cells pretreated for 1 hr with z-VAD-fmk (pan-caspase inhibitor), LY294002 (PI3K inhibitor), and PD98059 (ERK inhibitor) were treated with β-lapachone for 24 hr. (A and B) Quantitative evaluation of apoptosis was performed using annexin V/PI staining and flow cytometry. Values are the means ± SD ($p < 0.05$ versus β-lapachone non-treated cells; # $p < 0.05$ versus β-lapachone-treated cells). (C) Cell viability was determined by MTT assay. ($p < 0.05$ versus β-lapachone non-treated cells; # $p < 0.05$ versus β-lapachone-treated cells).

β-lapachone에 의한 Hep3B 세포의 세포사멸 유도에서 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 신호 전달계의 영향

세포 내 주요 신호계 중, MAPKs는 serine/threonine 특이적 kinase로서 다양한 자극에 대해 세포사멸을 포함한 세포의 증식과 분열, 유전자 발현, 분화 등 다수의 생물학적 기능 조절에 핵심적으로 관여한다[45, 55]. 세포사멸 측면에서 이들은 양면성을 가지지만, 일반적으로 C-Jun N-terminal kinase (JNK)와 p38 MAPK는 세포 내, 외 스트레스에 반응하여 세포 생존과 사멸의 균형을 맞추는 데 중요한 역할을 하며, 궁극적으로 caspase 활성화로 수렴되어 세포사멸 유도에 더 많이 관여하는 반면, ERK는 이와 반대 작용을 하는 것으로 알려져 있다[48, 49]. 최근 Jung 등[25]은 HCT116 대장암 세포에서 β-lapachone에 의한 세포사멸 유도에 p38 MAPK의 발현이 증가하였음을 보고한 바 있으나 세포사멸 유도에서 p38 MAPK의 역할은 분명하지 않다. 이에 반하여 Kee 등[27]은 β-lapachone이 처리된 B16F10 흑색종 세포에서 JNK, p38 MAPK 및 JNK의 인산화가 모두 증가하는 것으로 나타났으며, 이들 인산화의 억제제는 세포사멸 억제에 따른 세포 생존율을 회복시켰다. 이는 β-lapachone에 암세포의 세포사멸에 MAPKs 신호 전달계의 활성이 관여하고 있음을 보여주는 결과이다. 그리고, DU145 인간 전립선 암세포에서도 2가지 MAPKs의

인산화가 증가되었지만[17], 자궁경부선암종 HeLa 세포에서는 JNK와 p38 MAPK의 인산화 증가만이 관찰되었다[33]. 따라서 β-lapachone에 의한 Hep3B 세포의 세포사멸 유도에도 MAPKs 신호 전달계가 관여하는지를 조사하였으며, Hep3B 세포에서는 ERK의 총 단백질 발현은 변화 없이 인산화가 β-lapachone의 처리 1시간 이내부터 증가하였다가 6시간 이후부터는 감소하였다. 그러나 JNK와 p38 MAPK의 인산화와 그들의 총 단백질 발현에는 큰 변화가 없었다(Fig. 2E). 이는 다른 암세포와는 달리 Hep3B 세포에는 ERK의 활성화가 β-lapachone에 의한 세포사멸 유도에 관여할 가능성이 있음을 의미하는 결과이다. 따라서 β-lapachone에 의한 ERK의 활성화 Hep3B 세포의 세포사멸에 어떤 역할을 하는지를 조사하기 위하여 ERK 억제제인 PD98059가 존재하는 조건에서 β-lapachone를 처리하였다. Fig. 3A 및 B에 나타난 결과에서 알 수 있듯이, β-lapachone에 의한 MMP의 소실이 z-VAD-fmk가 전처리된 세포에서처럼 PD98059의 전처리에 의하여 유의적으로 억제되었으나, 비활성형 caspase-3 및 PARP의 발현 변화에는 큰 변화가 없었다. 그리고 β-lapachone에 의한 세포사멸과 세포 생존율의 억제가 PD98059의 전처리에 의하여 유의적인 효과를 나타내었다(Fig. 4). 즉, Hep3B 세포에서 β-lapachone에 의한 ERK 활성화의 억제는 미토콘드리아 기능 손상 차단에는 다소 기여하였지만 세포사멸의 억제

에는 큰 영향을 주지 못하였는데, 이는 아마도 ERK 활성화가 β -lapachone 처리에 의한 초기 현상이기에 나타난 결과로 유추된다. 그러나 ERK의 활성화 억제가 MMP의 소실을 차단하였음에도 불구하고 왜 세포사멸의 억제에는 큰 영향을 주지 못한 이유에 대한 기전 연구가 추가로 필요하다.

β -lapachone에 의한 Hep3B 세포의 세포사멸 유도에서 PI3K/Akt 신호 전달계의 영향

PI3K/Akt 신호계는 MAPKs와 함께 세포의 증식과 세포사멸 유도에 큰 영향을 미치는 세포 내 신호 전달 시스템이다. 이 신호계는 세포 내, 외 신호에 반응하여 대사, 증식, 세포 생존, 성장 및 혈관 신생을 촉진하는 역할을 담당한다[28]. 많은 암종에서 PI3K/Akt 신호 경로는 과도하게 활성화되어 세포사멸을 감소시키고 증식을 증가시키기 때문에 암 치료의 표적으로 중요성이 매우 높다[23, 41]. β -lapachone의 약리적 효능과 PI3K/Akt 신호계에 연관된 연구는 Moon 등[35]에 의하여 최초로 보고되었는데, 그들의 결과에 의하면, BV2 소교세포(microglia)에서 lipopolysaccharide에 의한 염증성 반응을 β -lapachone이 유의적으로 억제하였으며, 이는 Akt 인산화의 억제와 연관성이 있었다. 이 결과는 Lee 등[30]과 Park 등[40]에 의한 *in vivo* 신경염증 모델 및 쥐의 일차 성장교세포 모델에서도 확인이 되었다. PI3K/Akt 신호계와 암세포의 세포사멸과 연관된 β -lapachone의 연구에서, D'Anneo 등[6]은 인간 망막 모세포종 Y79 세포에서 paclitaxel과 β -lapachone에 의한 세포사멸 상승 효과에는 Akt 활성화 저하가 관여함을 제시한 바 있다. 본 연구실에서도 AGS 위암 세포에서 β -lapachone에 의한 세포사멸에는 PI3K/Akt 신호계의 비활성화가 관여하며, PI3K의 억제제(LY290042)는 β -lapachone에 의한 세포사멸을 더욱 증가시켰음을 밝힌 바 있다[54]. 그리고, Yang 등[53]은 유방암에서 β -lapachone에 의한 상피에서 중간엽으로의 전이(epithelial-to-mesenchymal transition)의 차단에도 Akt의 비활성화가 관여함을 보고한 바 있다. 따라서 Hep3B 세포에서도 β -lapachone에 의한 세포사멸 유도에도 PI3K/Akt 신호계가 관여하는지를 조사하였으며, Fig. 2E에 제시된 바와 같이 β -lapachone의 처리 시간이 증가함에 따라 PI3K와 Akt의 인산화형이 점차 감소하였지만 그들의 총 단백질 수준에는 큰 변화가 없었다. 또한, PI3K의 억제제(LY290042)를 이용한 PI3K/Akt 신호계를 인위적으로 차단한 결과, MMP의 소실은 더욱 증대되었으며, β -lapachone에 의해 줄어든 비활성 caspase-3의 발현과 PARP의 단편화도 유지되었다(Fig. 3). 그리고, β -lapachone와 PI3K의 억제제가 동시에 처리된 Hep3B 세포에서 세포사멸과 세포 생존을 억제하는 β -lapachone 단독 처리군에 비하여 더욱 증가하였다. 따라서 이러한 결과는 β -lapachone 처리에 의한 PI3K/Akt 신호계의 활성화 억제는 세포

사멸 유도에 핵심적인 역할을 하고 있음을 시사한다.

본 연구에서는 Hep3B 간암 세포에서 β -lapachone에 의한 세포사멸 유도 관련 기본적인 기전 연구의 결과를 제시하였다. 현재까지 β -lapachone이 Trx가 높게 발현되는 간암 세포의 Trx/TrxR 시스템에 미치는 연구는 수행되지 않았다. 본 연구에서 밝힌 TrxR 저해제에 의한 간암 세포의 세포사멸 유도에는 PI3K/Akt 신호계의 비활성화가 관여하며[20], ROS 의존적인 가능성이 매우 높다[50]. 따라서 본 연구의 결과는 선택적 TrxR 저해제에 의한 항암 활성을 증대시킬 수 있는 β -lapachone의 항암 잠재력을 확인한 것이다.

감사의 글

이 성과는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No.RS-2023-00213236).

The Conflict of Interest Statement

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

References

1. Alam, M., Ali, S., Mohammad, T., Hasan, G. M., Yadav, D. K., Hassan, M. I. 2021. B cell lymphoma 2: A potential therapeutic target for cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 10442.
2. Alanazi, A. D., Ben Said, M. 2022. Plant bioactive ingredients in delivery systems and nanocarriers for the treatment of leishmaniasis: An evidence-based review. *Iran. J. Parasitol.* **17**, 458-472.
3. Barot, S., Patel, H., Yadav, A., Ban, I. 2023. Recent advancement in targeted therapy and role of emerging technologies to treat cancer. *Med. Oncol.* **40**, 324.
4. Chirumbolo, S., Björklund, G., Lysiuk, R., Vella, A., Lenchyk, L., Upyr, T. 2018. Targeting cancer with phytochemicals via their fine tuning of the cell survival signaling pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 3568.
5. Contadini, C., Ferri, A., Cirotti, C., Stupack, D., Barilà, D. 2023. Caspase-8 and tyrosine kinases: A dangerous liaison in cancer. *Cancers (Basel)* **15**, 3271.
6. D'Anneo, A., Augello, G., Santulli, A., Giuliano, M., di Fiore, R., Messina, C., Tesoriere, G., Vento, R. 2010. Paclitaxel and β -lapachone synergistically induce apoptosis in human retinoblastoma Y79 cells by downregulating the levels of phospho-Akt. *J. Cell Physiol.* **222**, 433-443.
7. Derakhshan, A., Chen, Z., Van Waes, C. 2017. Therapeutic small molecules target inhibitor of apoptosis proteins in cancers with deregulation of extrinsic and intrinsic cell death pathways. *Clin. Cancer Res.* **23**, 1379-1387.

8. Dias, R. B., de Araújo, T. B. S., de Freitas, R. D., Rodrigues, A. C. B. D. C., Sousa, L. P., Sales, C. B. S., Valverde, L. F., Soares, M. B. P., Dos Reis, M. G., Coletta, R. D., Ramos, E. A. G., Camara, C. A., Silva, T. M. S., Filho, J. M. B., Bezerra, D. P., Rocha, C. A. G. 2018. β -Lapachone and its iodine derivatives cause cell cycle arrest at G2/M phase and reactive oxygen species-mediated apoptosis in human oral squamous cell carcinoma cells. *Free Radic. Biol. Med.* **126**, 87-100.
9. Eisenbeis, V. B., Qiu, D., Gorka, O., Strotmann, L., Liu, G., Prucker, I., Su, X. B., Wilson, M. S. C., Ritter, K., Loenarz, C., Groß, O., Saiardi, A., Jessen, H. J. 2023. β -lapachone regulates mammalian inositol pyrophosphate levels in an NQO1- and oxygen-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **120**, e2306868120.
10. Espinosa-Oliva, A. M., García-Revilla, J., Alonso-Bellido, I. M., Burguillos, M. A. 2019. Brainiac caspases: Beyond the wall of apoptosis. *Front. Cell Neurosci.* **13**, 500.
11. Gencheva, R., Arnér, E. S. J. 2022. Thioredoxin reductase inhibition for cancer therapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **62**, 177-196.
12. Ghareeb, H., Metanis, N. 2020. The thioredoxin system: A promising target for cancer Drug development. *Chemistry* **26**, 10175-10184.
13. Gupta, D., Podar, K., Tai, Y. T., Lin, B., Hideshima, T., Akiyama, M., LeBlanc, R., Catley, L., Mitsiades, N., Mitsiades, C., Chauhan, D., Munshi, N. C., Anderson, K. C. 2002. β -Lapachone, a novel plant product, overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Exp. Hematol.* **30**, 711-720.
14. Han, Y., Shi, D., Li, J. 2019. Inhibition of nasopharyngeal carcinoma by β -lapachone occurs by targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR)/PI3K/AKT pathway, reactive oxygen species (ROS) production, and autophagy induction. *Med. Sci. Monit.* **25**, 8995-9002.
15. Hasan, A. A., Kalinina, E., Tatarskiy, V., Shtil, A. 2022. The thioredoxin system of mammalian cells and its modulators. *Biomedicines* **10**, 1757.
16. Hashem, S., Ali, T. A., Akhtar, S., Nisar, S., Sageena, G., Ali, S., Al-Mannai, S., Therachiyil, L., Mir, R., Elfaki, I., Mir, M.M., Jamal, F., Masoodi, T., Uddin, S., Singh, M., Haris, M., Macha, M., Bhat, A. A. 2022. Targeting cancer signaling pathways by natural products: Exploring promising anti-cancer agents. *Biomed. Pharmacother.* **150**, 113054.
17. He, T., Banach-Latapy, A., Vernis, L., Dardalhon, M., Chanet, R., Huang, M. E. 2013. Peroxiredoxin 1 knock-down potentiates β -lapachone cytotoxicity through modulation of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase signals. *Carcinogenesis* **34**, 760-769.
18. He, T., Hatem, E., Vernis, L., Huang, M. E. 2014. Peroxiredoxin 1 knockdown sensitizes cancer cells to reactive oxygen species-generating drugs - an alternative approach for chemotherapy. *Free Radic. Biol. Med.* **75**, S13.
19. Hounsell, C., Fan, Y. 2021. The Duality of caspases in cancer, as told through the fly. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 8927.
20. Hwangbo, H., Kim, S. Y., Lee, H., Park, S. H., Hong, S. H., Park, C., Kim, G. Y., Leem, S. H., Hyun, J. W., Cheong, J., Choi, Y. H. 2020. Auranofin enhances sulforaphane-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma Hep3B cells through inactivation of the PI3K/Akt signaling pathway. *Biomol. Ther. (Seoul)* **28**, 443-455.
21. Hwangbo, H., Lee, H., Cheong, J. H., Choi, Y. H. 2022. Recent research trends for thioredoxin reductase-targeted anticancer therapy. *J. Life Sci.* **32**, 63-69.
22. Hwang-Bo, H., Lee, W. S., Nagappan, A., Kim, H. J., Panchanathan, R., Park, C., Chang, S. H., Kim, N. D., Leem, S. H., Chang, Y. C., Kwon, T. K., Cheong, J. H., Kim, G. S., Jung, J. M., Shin, S. C., Hong, S. C., Choi, Y. H. 2019. Morin enhances auranofin anticancer activity by up-regulation of DR4 and DR5 and modulation of Bcl-2 through reactive oxygen species generation in Hep3B human hepatocellular carcinoma cells. *Phytother. Res.* **33**, 1384-1393.
23. Iida, M., Harari, P. M., Wheeler, D. L., Toulany, M. 2020. Targeting AKT/PKB to improve treatment outcomes for solid tumors. *Mutat. Res.* **819-820**, 111690.
24. Jastrzab, A., Skrzydlewska, E. 2021. Thioredoxin-dependent system. Application of inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **36**, 362-371.
25. Jung, E. J., Kim, H. J., Shin, S. C., Kim, G. S., Jung, J. M., Hong, S. C., Kim, C. W., Lee, W. S. 2023. β -Lapachone exerts anticancer effects by downregulating p53, lys-acetylated proteins, TrkA, p38 MAPK, SOD1, caspase-2, CD44 and NPM in oxaliplatin-resistant HCT116 colorectal cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 9867.
26. Kaloni, D., Diepstraten, S. T., Strasser, A., Kelly, G. L. 2023. BCL-2 protein family: attractive targets for cancer therapy. *Apoptosis* **28**, 20-38.
27. Kee, J. Y., Han, Y. H., Kim, D. S., Mun, J. G., Park, S. H., So, H. S., Park, S. J., Park, R., Um, J. Y., Hong, S. H. 2017. β -Lapachone suppresses the lung metastasis of melanoma via the MAPK signaling pathway. *PLoS One* **12**, e0176937.
28. Khezri, M. R., Jafari, R., Yousefi, K., Zolbanin, N. M. 2022. The PI3K/AKT signaling pathway in cancer: Molecular mechanisms and possible therapeutic interventions. *Exp. Mol. Pathol.* **127**, 104787.
29. King, L. E., Hohorst, L., García-Sáez, A. J. 2023. Expanding roles of BCL-2 proteins in apoptosis execution and beyond. *J. Cell Sci.* **136**, jcs260790.
30. Lee, E. J., Ko, H. M., Jeong, Y. H., Park, E. M., Kim, H. S. 2015. β -Lapachone suppresses neuroinflammation by modulating the expression of cytokines and matrix metalloproteinases in activated microglia. *J. Neuroinflammation* **12**, 133.
31. Lee, J. I., Choi, D. Y., Chung, H. S., Seo, H. G., Woo, H. J., Choi, B. T., Choi, Y. H. 2006. β -Lapachone induces growth inhibition and apoptosis in bladder cancer cells by modulation of Bcl-2 family and activation of caspases. *Exp. Oncol.* **28**, 30-35.
32. Li, Y. Z., Li, C.J., Pinto, A. V., Pardee, A. B. 1999. Release of mitochondrial cytochrome C in both apoptosis and ne-

- crisis induced by β -lapachone in human carcinoma cells. *Mol. Med.* **5**, 232-239.
33. Lien, Y. C., Kung, H. N., Lu, K. S., Jeng, C. J., Chau, Y. P. 2008. Involvement of endoplasmic reticulum stress and activation of MAP kinases in β -lapachone-induced human prostate cancer cell apoptosis. *Histol. Histopathol.* **23**, 1299-1308.
 34. Liu, T. J., Lin, S. Y., Chau, Y. P. 2002. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase activation attenuates β -lapachone-induced necrotic cell death in human osteosarcoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **182**, 116-125.
 35. Moon, D. O., Choi, Y. H., Kim, N. D., Park, Y. M., Kim, G. Y. 2007. Anti-inflammatory effects of β -lapachone in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Int. Immunopharmacol.* **7**, 506-514.
 36. Nainu, F., Frediansyah, A., Mamada, S. S., Permana, A. D., Salampe, M., Chandran, D., Emran, T. B., Simal-Gandara, J. 2023. Natural products targeting inflammation-related metabolic disorders: A comprehensive review. *Heliyon* **9**, e16919.
 37. Pardee, A. B., Li, Y. Z., Li, C. J. 2002. Cancer therapy with β -lapachone. *Curr. Cancer Drug Targets* **2**, 227-242.
 38. Park, E. J., Min, K. J., Lee, T. J., Yoo, Y. H., Kim, Y. S., Kwon, T. K. 2014. β -Lapachone induces programmed necrosis through the RIP1-PARP-AIF-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma SK-Hep1 cells. *Cell Death Dis.* **5**, e1230.
 39. Park, J. H., Kim, Y. S., Lee, H. L., Shim, J. Y., Lee, K. S., Oh, Y. J., Shin, S. S., Choi, Y. H., Park, K. J., Park, R. W., Hwang, S. C. 2006. Expression of peroxiredoxin and thioredoxin in human lung cancer and paired normal lung. *Respirology* **11**, 269-275.
 40. Park, J. S., Lee, Y. Y., Kim, J., Seo, H., Kim, H. S. 2016. β -Lapachone increases phase II antioxidant enzyme expression via NQO1-AMPK/PI3K-Nrf2/ARE signaling in rat primary astrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **97**, 168-178.
 41. Peng, Y., Wang, Y., Zhou, C., Mei, W., Zeng, C. 2022. PI3K/Akt/mTOR pathway and its role in cancer therapeutics: Are we making headway? *Front. Oncol.* **12**, 819128.
 42. Planchon, S. M., Wuerzberger-Davis, S. M., Pink, J. J., Robertson, K. A., Bornmann, W. G., Boothman, D. A. 1999. Bcl-2 protects against β -lapachone-mediated caspase 3 activation and apoptosis in human myeloid leukemia (HL-60) cells. *Oncol. Rep.* **6**, 485-492.
 43. Qadir, M. I., Iqbal, M. S., Khan, R. 2022. β -lapachone: A promising anticancer agent with a unique NQO1 specific apoptosis in pancreatic cancer. *Curr. Cancer Drug Targets.* **22**, 537-540.
 44. Qian, S., Wei, Z., Yang, W., Huang, J., Yang, Y., Wang, J. 2022. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Front. Oncol.* **12**, 985363.
 45. Shillingford, S. R., Bennett, A. M. 2023. Mitogen-activated protein kinase phosphatases: No longer undruggable? *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **63**, 617-636.
 46. Siripong, P., Hahnvajjanawong, C., Yahuafai, J., Piyaviriyakul, S., Kanokmedhakul, K., Kongkathip, N., Ruchirawat, S., Oku, N. 2009. Induction of apoptosis by rhinacanthone isolated from *Rhinacanthus nasutus* roots in human cervical carcinoma cells. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 1251-1260.
 47. Starcher, C. L., Pay, S. L., Singh, N., Yeh, I. J., Bhandare, S. B., Su, X., Huang, X., Bey, E. A., Motea, E. A., Boothman, D. A. 2020. Targeting base excision repair in cancer: NQO1-bioactivatable drugs improve tumor selectivity and reduce treatment toxicity through radiosensitization of human cancer. *Front. Oncol.* **10**, 1575.
 48. Tikkanen, R., Nikolic-Paterson, D. J. 2019. Mitogen-activated protein kinases: Functions in signal transduction and human diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 4844.
 49. Wagner, E. F., Nebreda, A. R. 2009. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 537-549.
 50. Wen, C., Wang, H., Wu, X., He, L., Zhou, Q., Wang, F., Chen, S., Huang, L., Chen, J., Wang, H., Ye, W., Li, W., Yang, X., Liu, H., Peng, J. 2019. ROS-mediated inactivation of the PI3K/AKT pathway is involved in the antitumor effects of thioredoxin reductase-1 inhibitor chaetocin. *Cell Death Dis.* **10**, 809.
 51. Wen, X., Lin, Z. Q., Liu, B., Wei, Y. Q. 2012. Caspase-mediated programmed cell death pathways as potential therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* **45**, 217-224.
 52. Woo, H. J., Park, K. Y., Rhu, C. H., Lee, W. H., Choi, B. T., Kim, G. Y., Park, Y. M., Choi, Y. H. 2006. β -Lapachone, a quinone isolated from *Tabebuia avellanae*, induces apoptosis in HepG2 hepatoma cell line through induction of Bax and activation of caspase. *J. Med. Food* **9**, 161-168.
 53. Yang, Y., Zhou, X., Xu, M., Piao, J., Zhang, Y., Lin, Z., Chen, L. 2017. β -lapachone suppresses tumour progression by inhibiting epithelial-to-mesenchymal transition in NQO1-positive breast cancers. *Sci. Rep.* **7**, 2681.
 54. Yu, H. Y., Kim, S. O., Jin, C. Y., Kim, G. Y., Kim, W. J., Yoo, Y. H., Choi, Y. H. 2014. β -Lapachone-induced apoptosis of human gastric carcinoma AGS cells is caspase-dependent and regulated by the PI3K/Akt pathway. *Biomol. Ther. (Seoul)* **22**, 184-192.
 55. Yue, J., López, J. M. 2020. Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 2346.
 56. Zhang, J., Xu, Q., Ma, D. 2022. Inhibition of thioredoxin reductase by natural anticancer candidate β -lapachone accounts for triggering redox activation-mediated HL-60 cell apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* **180**, 244-252.
 57. Zhou, Z., Xu, S., Jiang, L., Tan, Z., Wang, J. 2022. A systematic pan-cancer analysis of CASP3 as a potential target for immunotherapy. *Front. Mol. Biosci.* **9**, 776808.

초록 : Hep3B 인간 간암세포에서 caspase 의존적이며 PI3K/Akt 신호전달의 불활성화와 관련된 β -lapachone의 세포사멸 유도

권재임¹ · 최영현^{1,2,3*} · 황보현^{1,2*}

(¹동의대학교 항노화연구소, ²동의대학교 미세플라스틱 매개 질환 제어 기초연구실, ³동의대학교 한의과대학 생화학교실)

β -lapachone은 다양한 유형의 질병을 치료하기 위해 남미 및 중미 지역의 전통 의학에서 널리 사용되어 온 *Tabebuia vellanadae*의 껍질에서 분리된 천연 퀴논 화합물의 일종이다. β -lapachone은 여러 유형의 암세포에서 강력한 항암 활성을 갖는 것으로 보고되었지만, 간세포암종 세포의 증식에 대한 효과는 아직 불분명하다. 따라서 본 연구에서는 β -lapachone 인간 간세포암종 Hep3B 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하였으며, 본 연구의 결과에 의하면, β -lapachone 처리에 의한 Hep3B 세포의 세포생존을 감소는 세포사멸 유도와 밀접한 관련이 있었다. 또한, β -lapachone이 처리된 Hep3B 세포에서는 항세포사멸 인자인 Bcl-2의 발현이 감소한 반면, 세포사멸 유도 인자인 Bax의 발현은 증가하였으며, 이는 caspase cascade의 활성 증가와 연관성이 있었다. 그러나 pan-caspase 억제제가 존재하는 경우 β -lapachone에 의해 유발된 세포사멸은 약화되었으며, 이는 β -lapachone에 의한 세포사멸 유도가 caspase 의존적인 현상임을 의미한다. 아울러, β -lapachone의 처리는 ERK 경로를 활성화시키면서 PI3K/Akt 경로의 활성을 억제하였으며, β -lapachone 유도 세포사멸에 ERK 억제제의 효과는 미미했지만, PI3K 억제제는 β -lapachone에 의해 유도된 세포사멸을 유의하게 증가시켰다. 비록 생체 내 동물 모델에서의 확인이 필요하지만, 본 연구의 결과는 간세포암종 세포에서 β -lapachone의 항암 활성을 이해하는 데 유용한 자료로 활용될 것이다.