

# 상동나무(*Sageretia thea*) 가지추출물의 대장암세포에서 NF- $\kappa$ B 신호전달 활성화를 통한 세포사멸 유도활성

김정동<sup>1</sup>, 박수빈<sup>1</sup>, 어현지<sup>2</sup>, 박광훈<sup>3</sup>, 정진부<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>국립안동대학교 생약자원학과, 대학원생, <sup>4</sup>교수, <sup>2</sup>국립산림과학원 산림약용자원연구소, 박사후연구원, <sup>3</sup>연구사

## Induction of Apoptosis by *Sageretia thea* Branch Extracts through Activation of NF- $\kappa$ B Signaling Pathway in Human Colorectal Cancer Cells

Jeong Dong Kim<sup>1</sup>, Su Bin Park<sup>1</sup>, Hyun Ji Eo<sup>2</sup>, Gwang Hun Park<sup>3</sup> and Jin Boo Jeong<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate Student and <sup>4</sup>Professor, Department of Medicinal Plant Resources, Andong National University, Andong 36729, Korea

<sup>2</sup>Post-doc and <sup>3</sup>Researcher, Forest Medicinal Resources Research Center, National Institute of Forest Science, Yeongju 36040, Korea

**Abstract** - In this study, we evaluated the inhibitory effect against cell growth and potential molecular mechanism of 100% ethanol extracts of branch from *Sageretia thea* in human colorectal cancer cells, HCT116. Ethanol dose-dependently extracts of STB significantly suppressed the growth of HCT116 cells through apoptosis. STB activated NF- $\kappa$ B signaling pathway through I $\kappa$ B- $\alpha$  proteasomal degradation and inducing p65 accumulation in nucleus. The inhibition of GSK3 $\beta$  by LiCl didn't affect STB mediated degradation I $\kappa$ B- $\alpha$  but STB mediated p65 accumulation in nucleus. In addition, STB phosphorylated GSK3 $\beta$ . Based on these findings, STB may be a potential candidate for the development of anti-cancer agents for human colorectal cancer.

**Key words** - Apoptosis, Cancer chemoprevention, Colorectal cancer, NF- $\kappa$ B signaling, *Sageretia thea*

### 서 언

암은 전세계적으로 생명을 위협하는 질병이며, 증가하고 있는 인류의 기대수명에 큰 장애물로 여겨지고 있다(Bray *et al.*, 2018; Jung *et al.*, 2018). 그 중 대장암은 세번째로 흔한 악성종양이면서 네번째 주요 사망원인으로 유전적, 환경적인 요소로 인해 높은 발병률과 사망률을 보이고 있으며, 2018년에는 약 180만건의 발병과 약 88만명이 사망하는 사례가 그 예이다(Arghi *et al.*, 2019; Yaghoubi *et al.*, 2019). 최근 대장암에 대한 Fluorouracil, Capecitabine, Cetuximab와 같은 항암제를 이용한 화학적 치료나 외과적 절제 수술이 효과적인 치료법으로 알려져 있다(Hassanzadeh, 2011; Meyerhardt and Mayer,

2005). 하지만 기존의 방사선이나 화학요법과 같은 항암치료법들은 변비, 골수 억제, 점막염, 구토, 구역, 탈모증, 우울증 및 피로와 같은 부작용을 유발할 수 있다(Irmak *et al.*, 2019). 이에 대한 대안으로 식물에서 추출한 보완대체제의 사용이나 기존의 치료법에 한의학적 치료법을 응용한 치료방법이 증가하고 있다(Wang *et al.*, 2012). 식물보완대체제의 예로 소엽맥문동(*Ophiopogon japonicus*), 노빌계(*Dendrobium nobile*), 만삼(*Codonopsis pilosula*), 현삼(*Scrophularia ningpoensis*) 그리고 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 등이 있다(Cheng *et al.*, 2018). 그 외 많은 식물보완대체제 중 중국 자두로 알려져 있는 상동나무(*Sageretia thea*)는 갈매나무과(Rhamnaceae)의 상록수로 한국과 중국에서 전통한방의 약용식물로서 간염과 발열 치료제로 쓰여왔다(Hyun *et al.*, 2015). 최근 상동나무의 기능성 연구에 따르면, 상동나무 가지와 잎 추출물은 NF- $\kappa$ B 신호전달과

\*교신저자: E-mail jjb0403@anu.ac.kr  
Tel. +82-54-820-7757

MAPK 신호전달의 활성 억제와 HO-1 특정 단백질 발현 유도를 통하여 항염증 활성을 나타낸다고 보고되었다(Kim *et al.*, 2019c). 또한 상동나무 가지와 잎 추출물의 HO-1 단백질 발현 유도와 세포생육 관련 단백질인 cyclin D1의 GSK3 $\beta$  의존성 단백질 분해를 통해 인간 대장암 세포의 세포사멸을 유도한다고 보고되었으며(Kim *et al.*, 2019b), 대장암 세포와 폐암 세포에 대해 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호전달경로의 핵심단백질인  $\beta$ -catenin의 분해 유도를 통해 세포 사멸을 유도한다고 보고되었다(Kim *et al.*, 2019a). 대장암과 같은 암세포 생육 관련 신호전달경로와 항암 약물 개발을 위한 분자 메커니즘 구명은 암 연구에 있어 중요한 목표이며 관련 표적 탐색으로 환자의 예후를 연장시킬 수 있는 표적요법의 중요성이 대두되고 있다(Bi *et al.*, 2006; Hassanzadeh, 2011). 메커니즘 중에서도 NF- $\kappa$ B 신호전달은 인간의 다양한 암들의 진행이나 발달에 관여한다고 알려져 있으며 암 세포에서의 proapoptosis 및 antiapoptosis 조절에서 NF- $\kappa$ B 신호전달의 역할은 많은 연구의 대상이 되었다(Hassanzadeh, 2011; Bours *et al.*, 2000). NF- $\kappa$ B 신호전달의 활성화가 apoptosis를 억제한다고 널리 알려져 있지만 일부 상황에서 Fas, Fas-ligand와 같은 apoptosis 유도 유전자 발현을 자극하여 apoptosis를 유도하는 역할을 한다고 보고되었다(Perkins and Gilmore, 2006). 그 예로 NF- $\kappa$ B 신호전달 활성화를 통한 항염증 활성을 가지는 NSAID 치료제가 암세포에 대한 세포생육 억제활성 또한 NF- $\kappa$ B 신호전달 활성화를 통해 유도한다고 보고된 바 있다(Jeong *et al.*, 2013). 본 연구에서는 상동나무의 NF- $\kappa$ B 신호전달을 통한 인간 대장암 세포생육 억제활성에 대해 평가하기 위해 상동나무 가지 추출물의 대장암 세포에 대한 NF- $\kappa$ B 신호전달 조절 활성을 통한 세포생육 억제활성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 연구에서 대장암 세포 배양을 목적으로 사용된 배지인 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F-12 1 : 1 modified medium (DMEM/F-12)는 Lonza (Morrison, NJ, USA)에서 구매하였다. 단백질분해 억제제인 MG132, 특정 효소 활성 억제제인 PD98059, SB203580, SP600125, LY294002, LiCl 및 BAY11-7082와 세포생육 억제효능을 평가하기 위한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사에서 구매하였다. western blot 분석을 위해 사용된 항체인 Cleaved

PARP, I $\kappa$ B- $\alpha$ , P65, GSK3 $\beta$ , phosph-GSK3 $\beta$ , TBP, actin은 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구매되었다.

### 추출물 제조

본 연구에서 사용된 시료인 상동나무 가지는 국립산림과학원 산림 약용 자원연구소로부터 제공받아 연구를 진행하였다. 상동나무의 확증표본(표본번호: FM.J.S. 20180510-01)은 국립산림과학원 산림 약용 자원연구소에 보관하고 있으며 이는 산림 약용 자원연구소의 손호준 박사의 식물학적 동정을 거쳤다. 상동나무 가지 20 g을 0, 10, 20, ..., 100%의 ethanol 400 mL과 함께 7일 동안 추출한 후 원심분리하여 농도별 Ethanol 추출물을 회수하였다. 회수한 상동나무 가지 ethanol 추출물들은 감압 환류 냉각장치(N-1110S, EYELA, Tokyo, Japan)를 사용하여 40 $^{\circ}$ C 이하의 중탕에서 농축하여 동결건조 하였다. 건조된 Ethanol 추출물들은 -80 $^{\circ}$ C의 냉동고에 보관하여 본 연구를 위한 시료로 사용되었다. 상동나무 가지 추출물들은 본 연구에서 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해하여 사용되었으며, 대조군이 DMSO를 0.1%를 초과하지 않도록 하였다.

### 세포 생육 억제활성 측정

분석을 위해 사용된 인간 대장암 세포인 HCT116은 한국세포주은행에서 구매하였으며, HCT116 세포는 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin 이 포함된 DMEM/F-12 배지로 5% CO<sub>2</sub> 하로 유지한 조건에서 배양하였다. HCT116 세포의 세포생육 억제활성을 측정하는 데에 MTT assay를 이용하였다. HCT116세포는 96 well plate에서 well 당 1  $\times$  10<sup>5</sup> cells로 24시간 배양 후 상동나무 가지 ethanol 추출물들을 ethanol 추출 농도 및 각 추출물의 농도별로 24 시간 동안 처리하였다. 처리 24시간 후 각 well에 MTT (1 mg/mL) 용액 50  $\mu$ L씩 첨가하여 2시간 동안 배양시킨 후, 상등액을 제거하여 형성된 formazan만을 남겼다. 상등액이 제거된 formazan에 DMSO를 100  $\mu$ L를 각각의 well에 첨가하여 formazan이 보이지 않도록 녹인 후 UV/Visible spectrophotometer (Xma-3000PC, Human Corporation Co., Seoul, Korea)를 이용하여 흡광도를 570 nm에서 측정하였다.

### SDS-PAGE 및 Western blot 분석

대장암 세포인 HCT116로부터 단백질 추출을 하기 위해, 시료처리 후 세포를 4 $^{\circ}$ C에서 유지된 1  $\times$  phosphate-buffered saline (PBS)로 2회 세척하여 회수하였다. Protease inhibitor cocktail

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)과 phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 포함된 NP-40 lysis buffer (GenDEPOT, Katy, TX, USA)를 4°C 하에 30분 반응시켜 원심 분리 후 상등액을 취하였다. 상등액을 취하여 얻은 단백질은 Bicinchoninic acid protein assay (Pierce Biotechnology Inc., Waltham, MA, USA)로 정량분석을 실시하였다. 정량분석 후 동일량의 단백질을 12% SDS-acrylamide gel로 전기영동을 하여 PVDF membrane (BioRad, Hercules, CA, USA)에 이동시킨 후 5% non-fat dry milk을 사용하여 상온에서 1시간 동안 blocking 하였다. Blocking 후, 5% non-fat dry milk에 용해시킨 1차 항체를 4°C 하에 16시간 동안 membrane에 반응시킨 후, membrane을 0.05% tween-20이 포함된 tris-buffered saline (TBS-T)로 5분간 3회 세척하였다. 세척 후 2차 항체를 5% non-fat dry milk에 용해시켜 상온에서 membrane에 1시간 반응시켰다. 1시간 후 TBS-T로 5분 간격으로 3회 세척하여 membrane은 ECL western blotting substrate (Amersham Biosciences Co., Little Chalfont, England)를 이용하여 단백질을 확인하였다.

### 통계분석

본 연구의 결과는 3 회 반복하여 측정하였으며 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었다. Student's t-test (EXCEL, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA)로 처리 간 유의성을 검증하여 0.05 미만의 p-value 값일 경우, 통계상으로 유의하다고 판단하였다.

## 결과 및 고찰

### STB의 HCT116세포에 대한 apoptosis유도를 통한 세포생육 억제활성

상동나무 가지(STB)의 대장암 세포인 HCT116 세포에 대한 세포생존 억제유도활성을 평가하기 위해 농도별 ethanol에 추출한 STB 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 HCT116세포에 24시간 처리하여 MTT assay를 통해 확인하였다. 그 결과, 40% ethanol 추출물을 처리한 구간부터 유의적으로 세포생존이 억제되었으며 100% ethanol 추출물을 처리한 구간에서 현저하게 세포생존이 억제됨을 확인하였다(Fig. 1A). 세포는 세포사멸이 일어나면 세포 간의 접촉이 떨어지며 기포가 생기며 점차 chromatin의 응축이 진행된다(Wyllie *et al.*, 1981). 그리하여 우리는 농도별 ethanol로 추출된 STB를 HCT116에 처리한 다음, STB가 대장암세포 HCT116세

포의 chromatin응축을 유도하는지 확인하였다. 그 결과에서 STB의 ethanol 추출 농도에 따라 유의적으로 세포 내의 chromatin 응축을 동반하여 세포가 수축하였음을 확인하였다(Fig. 1A). 그리고 HCT116세포에 100% ethanol로 추출된 STB (STB-E100)를 농도별로 24시간 처리한 결과, STB-E100은 농도 의존적으로 HCT116세포의 생존이 억제되었고, 세포 내에서 기포가 생기며 chromatin응축이 일어나며 세포가 수축하는 것을 확인하였다(Fig. 1B). HCT116 세포에 STB-E100 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 시간별로 처리한 결과, 24시간 처리한 구간에 현저하게 HCT116세포의 생존이 억제되었으며 세포 내 chromatin응축은 시간이 경과함에 따라 점차 일어나 24시간에서 세포수축이 일어났음을 확인하였다(Fig. 1C). Apoptosis는 세포 내에 진행되는 세포사멸에 대한 자연적인 메커니즘이다. 암세포는 apoptosis를 회피하는 특징이 있으며 apoptosis 조절기능 상실은 암세포의 생존을 오래 지속시키며 세포의 과증식을 유도하기 때문에 암예방에 있어 apoptosis는 중요한 메커니즘 중 하나이다(Pfeffer and Singh, 2018). HCT116세포에 대한 STB-E100의 세포생존 억제활성이 apoptosis유도에 의한 것인지 평가하기 위해 apoptosis 관련 단백질 cleaved PARP 발현을 조사하였다. HCT116세포에 STB-E100을 농도별로 24시간 처리한 결과, 농도 의존적으로 cleaved PARP 단백질 수준 증가를 보였으며(Fig. 1D), STB-E100 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 시간별로 처리하여 조사한 결과, 처리 후 24시간에 현저하게 cleaved PARP 발현이 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 1E). 본 결과들은 STB-E100은 HCT116세포에 대한 세포생존 억제활성을 유의적으로 나타내며, 이는 STB-E100의 세포 내 apoptosis유도를 통한 세포생존 억제활성임을 의미한다.

### HCT116세포에서 STB의 P65 핵내 전이를 통한 NF- $\kappa$ B 신호 전달 활성화

세포생육에 관여하는 신호전달 경로는 MAPK, PI3K-Akt, NF- $\kappa$ B 신호전달 등이 있다(Lin *et al.*, 2010). 그 중 NF- $\kappa$ B 신호전달은 암세포의 생육과 발달 그리고 증식에 관여하며 분자세포 수준에서 유전자 발현과 apoptosis를 조절한다(Hassanzadeh, 2011; Lin *et al.*, 2010). 일반적으로 NF- $\kappa$ B 신호전달 활성화는 세포사멸을 억제하지만 세포 내에 세포사멸에 관여하는 암 치료에 잠재적 신호전달 표적으로 간주되기도 한다(Dolcet *et al.*, 2005, Jeong *et al.*, 2013). NF- $\kappa$ B 신호전달이 활성화되면 NF- $\kappa$ B복합체의 구성인자 중 P65가 핵내로 전이된다고 알려져 있다(Kole *et al.*, 2011). HCT116세포에서 STB-E100의 NF- $\kappa$ B 활성화를 평가하기 위해 STB-E100의 p65 핵내 전이유도를 조사하

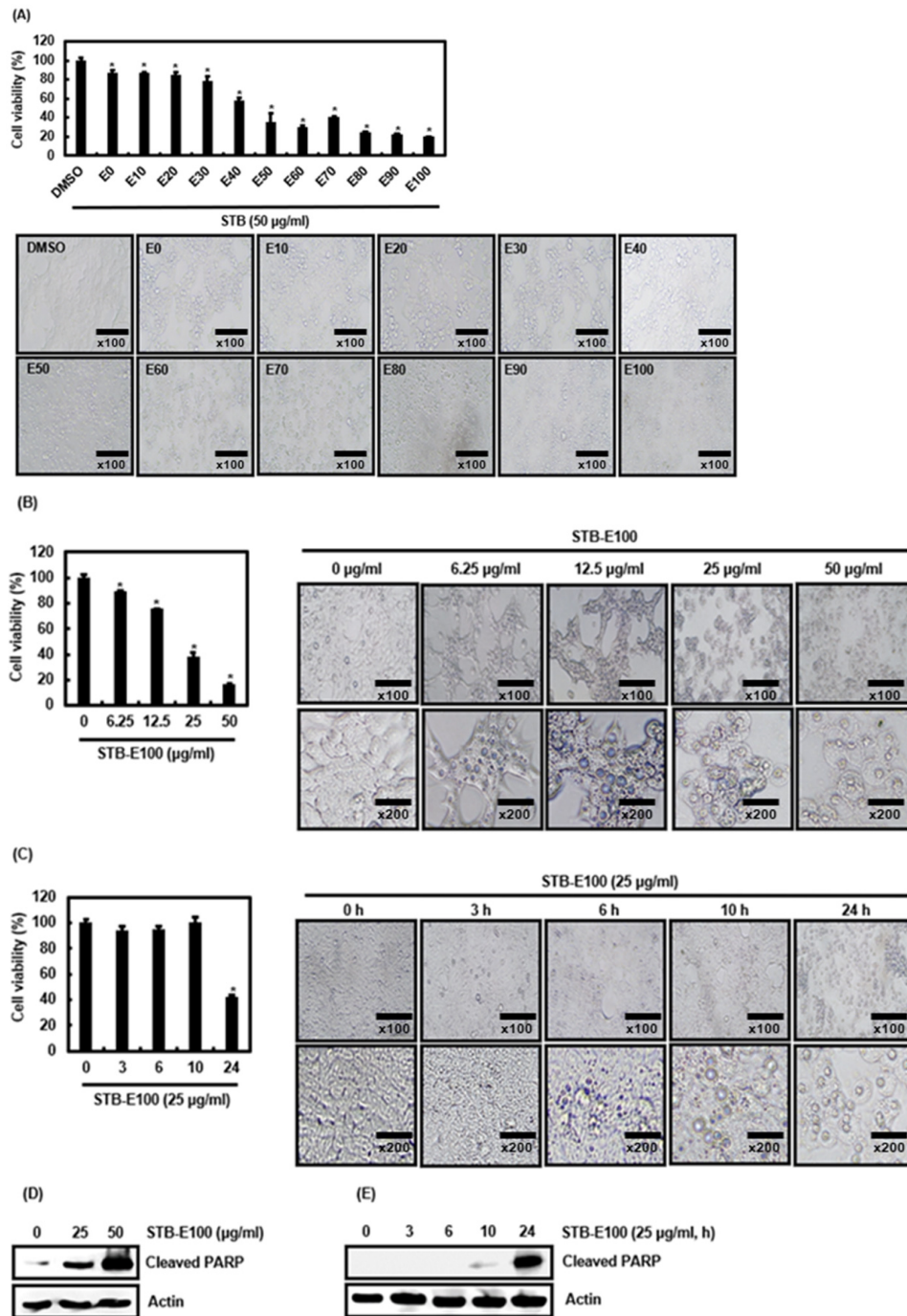


Fig. 1. Effect of STB on the cell growth in HCT116 cells. (A) HCT116 cells were treated with ethanol dose-dependently extracts of STB (50 µg/mL) for 24 h. (B and D) HCT116 cells were treated with STB-E100 at the indicated concentrations for 24 h. (C and E) HCT116 cells were treated with STB-E100 (25 µg/mL) for the indicated times. Western blot analysis was performed against Cleaved PARP. Actin was used as internal controls for Western blot.  $p < 0.05$  compared to cell without STB.

였다. HCT116세포에서 STB-E100 25 µg/mL을 시간별로 처리한 후 핵내 P65 단백질 수준을 확인한 결과, 처리 후 6시간부터 유의적으로 p65가 핵내 전이가 되었음을 확인하였다(Fig. 2A). p65

는 평소 NF- $\kappa$ B 복합체에 구성되어 있으면서 I $\kappa$ B- $\alpha$ 와 결합한 형태이지만 외부자극을 통한 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해로 p65의 핵내 전이가 일어난다고 알려져 있다(Lin *et al.*, 2010). HCT116세포에서

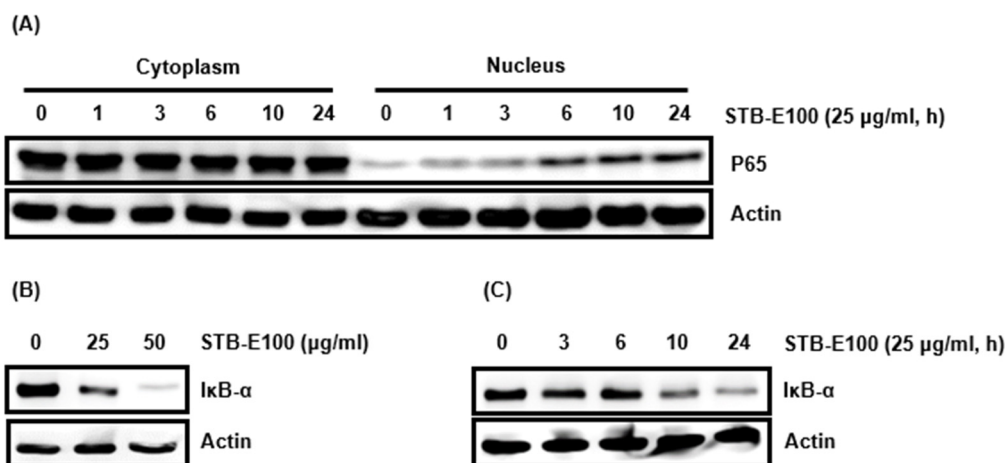


Fig. 2. Effect of STB-100 on NF- $\kappa$ B activation in HCT116 cells. (A and C) HCT116 cells were treated with STB-E100 (25  $\mu$ g/mL) for the indicated times. (B) HCT116 cells were treated with STB-E100 at the indicated concentrations for 24 h. Western blot analysis was performed against I $\kappa$ B- $\alpha$  and P65. Actin was used as internal controls for Western blot.

STB-E100의 I $\kappa$ B- $\alpha$  분해를 평가하기 위해 세포질에서의 단백질 수준감소를 조사하였다. HCT116세포에서 STB-E100를 농도별로 24시간 처리한 결과, 농도의존적으로 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 단백질 수준 감소가 나타났으며(Fig. 2B), STB-E100 25  $\mu$ g/mL을 시간별로 처리한 결과, 처리 후 10시간부터 유의적으로 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 단백질 수준 감소가 나타난다는 것을 확인하였다(Fig. 2C). 본 결과들은 STB-E100는 p65의 핵내 전이유도를 통해 NF- $\kappa$ B 신호전달을 활성화시키며 p65의 핵내 전이는 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 단백질 수준감소로 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해를 통해 나타난다는 것을 추정할 수 있다.

#### STB-E100의 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 인산화를 통한 단백질 분해 유도활성

HCT116세포에서 STB-E100의 I $\kappa$ B- $\alpha$  단백질 수준감소가 단백질 분해로 인한 수준감소인지 평가하기 위해 HCT116세포에 단백질 분해 억제제인 MG132 10  $\mu$ M를 2시간 전처리한 후 STB-E100 25  $\mu$ g/mL을 14시간 처리하여 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 단백질 수준을 조사하였다. 그 결과, STB-E100을 처리한 구간에서는 I $\kappa$ B- $\alpha$  단백질 수준감소가 나타났지만 MG132와 STB-E100을 함께 처리한 구간에서 단백질 수준감소가 줄어들었다는 것을 확인하였다(Fig. 3A). HCT116세포에 단백질 분해 억제제인 MG132 20  $\mu$ M를 2시간 전처리한 후 STB-E100 25  $\mu$ g/mL을 6시간 처리한 결과, STB-E100을 처리한 구간에서는 P65 핵내 전이가 나타났지만 MG132와 STB-E100을 함께 처리한 구간에서 P65 핵내 전이가 줄어들었다는 것을 확인하였다(Fig. 3B). 자극을 받아 NF- $\kappa$ B 신호전달이 활성화되면 I $\kappa$ B- $\alpha$ 는 인산화를 통해 단백질 분해가 일어난다(Park *et al.*, 2018). HCT116세포에서 STB-E100

의 I $\kappa$ B- $\alpha$  인산화를 평가하기 위해 HCT116세포에 STB-E100 25  $\mu$ g/mL를 시간별로 처리하여 확인한 결과, 처리 후 1시간부터 인산화가 일어나 6시간부터 현저하게 일어났다가 24시간 줄어들었다(Fig. 3C). 본 결과들은 HCT116세포에서 STB-E100의 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 인산화를 통한 단백질 분해가 일어나며 이로 인해 P65 핵내 전이를 유도한다는 것을 의미한다.

#### HCT116세포에서 STB-E100의 GSK3 $\beta$ 의존성 P65 핵내 전이 유도활성

NF- $\kappa$ B 신호전달의 활성화는 MAPKs, PI3K/Akt 등 다양한 신호전달의 관여로 일어난다고 알려져있다(Dolcet *et al.*, 2005, Moon *et al.*, 2018). HCT116세포에서 STB-E100의 의해 P65 핵내 전이 유도과 관련된 kinase를 구명하기 위해, HCT116세포에 ERK1/2 억제제인 PD98059 (20  $\mu$ M), p38 억제제인 SB203580 (20  $\mu$ M), JNK 억제제인 SP600125 (20  $\mu$ M), IKK 억제제인 BAY11-7082 (20  $\mu$ M), GSK3 $\beta$  억제제인 LiCl (20 mM) 그리고 PI3K 억제제인 LY294002 (20  $\mu$ M)를 각각 2시간 동안 전처리 후, STB-E100 25  $\mu$ g/mL을 6시간 동안 처리하고 P65 핵내 전이를 확인하였다. 그 결과, LiCl이 처리된 HCT116세포에서는 STB-E100의 P65 핵내 전이 유도가 줄어들었으나(Fig. 3D) PD98059, SB203580, SP600125, BAY11-7082, LY294002이 처리된 HCT116 세포에서는 STB-E100가 유도하는 P65 핵내 전이가 줄어들지 않았다(Fig. 4A-C, 4E and F). 본 결과들은 STB-E100의 P65 핵내 전이 유도가 GSK3 $\beta$  의존성이라는 것을 의미한다.

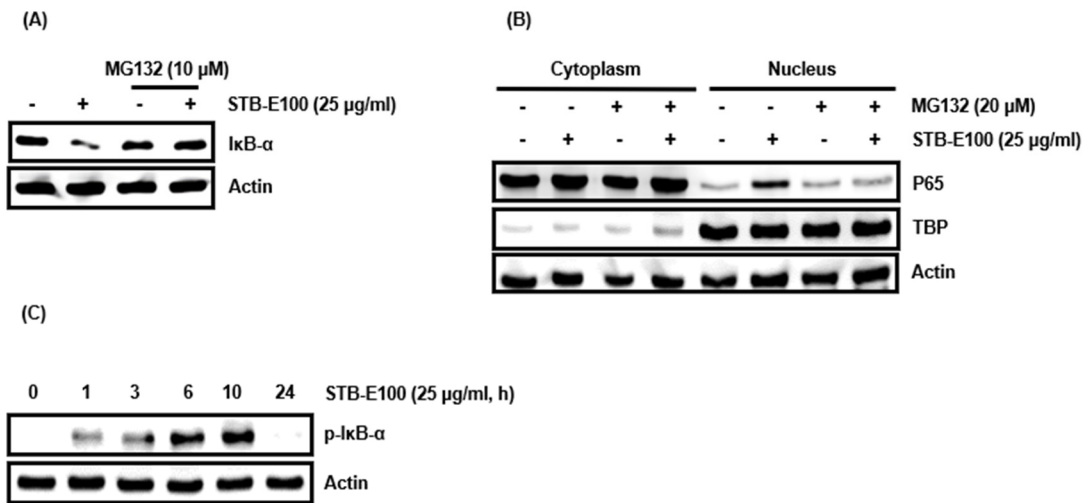


Fig. 3. Effect of STB-E100 on I $\kappa$ B- $\alpha$  proteasomal degradation through I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylation in HCT116 cells. (A) HCT116 cells were pretreated with MG132 (10  $\mu$ M) for 2 h and then co-treated with STB-E100 (25  $\mu$ g/ml) for 14 h. (B) HCT116 cells were pretreated with MG132 (20  $\mu$ M) for 2 h and then co-treated with STB-E100 (25  $\mu$ g/ml) for 6 h. (C) HCT116 cells were treated with STB-E100 (25  $\mu$ g/ml) for the indicated times. Western blot analysis was performed against I $\kappa$ B- $\alpha$ , p-I $\kappa$ B- $\alpha$  and P65. Actin and TBP were used as internal controls for Western blot.

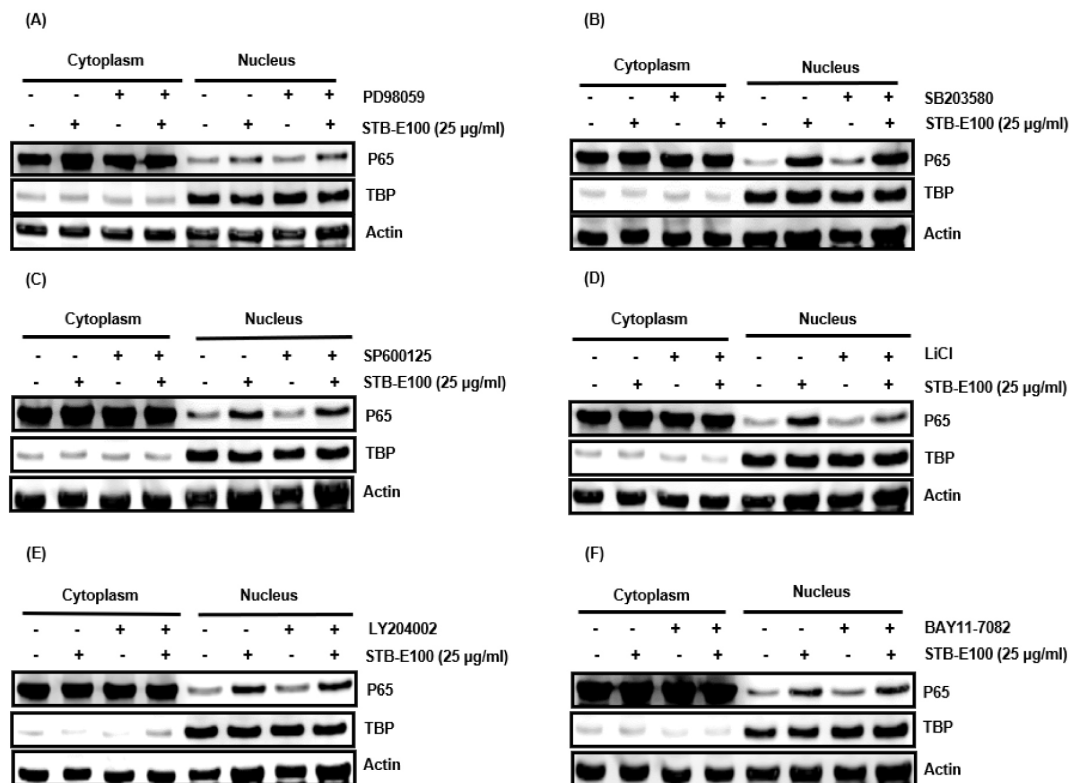


Fig. 4. Effect of MAPKs, IKK, PI3K and GSK3 $\beta$  on P65 accumulation to nucleus by STB-E100 in HCT116 cells. (A-F) HCT116 cells were pretreated with PD98059 (20  $\mu$ M), SB203580 (20  $\mu$ M), SP600125 (20  $\mu$ M), BAY11-7082 (20  $\mu$ M), LY294002 (20  $\mu$ M) and LiCl (20 mM) for 2 h, and then co-treated with STB-E100 (25  $\mu$ g/ml) for 6 h. Western blot analysis was performed against p65. Actin and TBP were used as internal controls for Western blot.

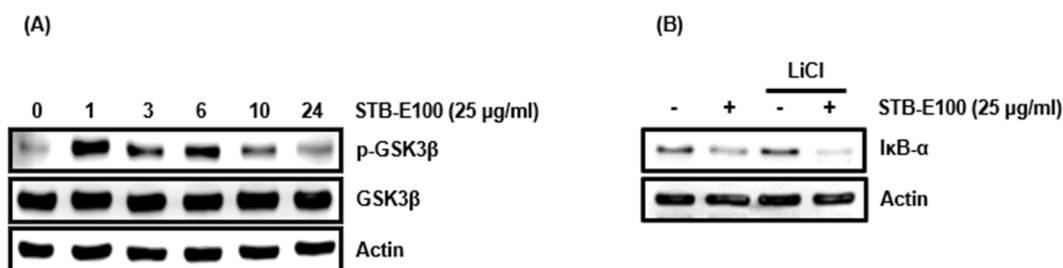


Fig. 5. Effect of STB-E100 on GSK3 $\beta$  activation and I $\kappa$ B- $\alpha$  proteasomal degradation through GSK3 $\beta$  activation in HCT116 cells. (A) HCT116 cells were treated with STB-E100 (25  $\mu$ g/mL) for the indicated times. (B) HCT116 cells were pretreated with LiCl (20 mM) for 2 h, and then co-treated with STB-E100 (25  $\mu$ g/mL) for 14 h. Western blot analysis was performed against I $\kappa$ B- $\alpha$ , p-GSK3 $\beta$  and GSK3 $\beta$ . Actin was used as internal controls for Western blot.

### STB-E100의 HCT116세포에서 GSK3 $\beta$ 활성화 유도활성

앞서 HCT116세포에서 STB-E100의 P65 핵내 전이 유도가 GSK3 $\beta$  의존성을 확인하였다. GSK3 $\beta$ 는 NF- $\kappa$ B 신호전달의 전사 복합체 수준에 영향을 주어 NF- $\kappa$ B 신호전달의 활성화를 용이하게 한다(Hoeflich *et al.*, 2000). 다양한 세포의 성장 신호 전달경로 뿐만 아니라 apoptosis에도 관여하는 GSK3 $\beta$ 는 인산화를 통해 활성화된다(Yun *et al.*, 2009). HCT116세포에서 STB-E100이 GSK3 $\beta$ 를 활성화시키는지 평가하기 위해 HCT116 세포에 STB-E100 25  $\mu$ g/mL을 시간별로 처리하였다. 그 결과, 처리 후 1시간부터 현저하게 GSK3 $\beta$ 가 인산화 되었고 점차 줄어들었다(Fig. 5A). HCT116 세포에서 STB-E100의 GSK3 $\beta$  활성화가 I $\kappa$ B- $\alpha$  단백질 분해에 관여하는지 평가하기 위해 GSK3 $\beta$  억제제인 LiCl (20 mM)을 각각 2시간 동안 전처리 후, STB-E100 25  $\mu$ g/mL을 14시간 동안 처리하고 I $\kappa$ B- $\alpha$  단백질 수준을 확인하였다. 그 결과, LiCl을 HCT116세포에서 STB-E100의 I $\kappa$ B- $\alpha$  단백질 수준 감소는 줄어들지 않았다(Fig. 5B). 본 결과들을 미뤄볼 때, HCT116세포에서 STB-E100은 GSK3 $\beta$ 를 활성화시켜 p65 핵내 전이를 유도하지만 STB-E100의 I $\kappa$ B- $\alpha$  단백질 분해는 GSK3 $\beta$  의존성이 아니라는 것을 확인하였다.

### 적 요

본 연구에서 상동나무 가지 추출물(STB-E100)은 대장암 세포에서 세포사멸을 유도하여 세포생육을 억제하였다. 또한 I $\kappa$ B- $\alpha$  인산화를 통한 I $\kappa$ B- $\alpha$  단백질 분해를 유도하며 이로 인해 P65 핵내 전이를 유도하여 NF- $\kappa$ B 신호전달을 활성화시킨다. NF- $\kappa$ B 신호전달 활성화는 GSK3 $\beta$  활성화를 통해 P65 핵내 전이를 유도에 의한 것이지만 I $\kappa$ B- $\alpha$ 분해는 GSK3 $\beta$  의존성이 아니다. 상동나무 가지 추출물은 이러한 신호전달 활성화를 통해 세

포사멸을 유도하여 대장암의 세포생육을 억제한다. 본 결과를 바탕으로 상동나무 가지가 암 예방 및 치료를 목적으로 한 표적 요법에서 항암제 개발의 잠재적 활용 소재로서 이용 가능하다고 사료된다. 그러나 대장암 세포에서 상동나무 가지 추출물에 의해 유도된 NF- $\kappa$ B 신호전달 작용기전을 좀 더 구체적으로 구명할 필요가 있고 대장암에 대한 세포사멸과 작용기전의 정확한 관련성을 조사하기 위해 추가적인 연구가 필요하다.

### 사 사

본 연구는 한국연구재단 이공분야 기초연구사업 지역대학우수과학자 지원사업(NRF-2016R1D1A3B03931713)과 중점연구소지원사업(NRF-2018R1A6A1A03024862)의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

### Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

### References

- Arghi, M., I. Soerjomataram, M. Jenkins, J. Brierley, E. Morris, F. Bray and M. Arnold. 2019. Global trends in colorectal cancer mortality: Projections to the year 2035. *Int. J. Cancer.* 144:2992-3000.
- Bi, X., Q. Lin, T.W. Foo, S. Joshi, T. You, H.M. Shen, C.N. Ong, P.Y. Cheah, K.W. Eu and C.L. Hew. 2006. Proteomic analysis of colorectal cancer reveals alterations in metabolic pathways. *Mol. Cell. Proteom.* 5(6):1119-1130.
- Bours, V., M.B. Alj, A.C. Hellin, P. Viatour, P. Robe, S. Delhalle,

- V. Benoit and M.P. Merville. 2000. Nuclear factor- $\kappa$ B, Cancer, and Apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 60:1085-1090.
- Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre and A. Jemal. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 68:394-424.
- Cheng, Y.Y., C.H. Hsieh, T.H. Tsai. 2018. Concurrent administration of anticancer chemotherapy drug and herbal medicine on the perspective of pharmacokinetics. *J. Food Drug Anal.* 26:S88-S95.
- Dolcet, X., D. Llobet, J. Pallares and X. Matias-Guiu. 2005. NF- $\kappa$ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.* 446:475-482.
- Hassanzadeh, P. 2011. Colorectal cancer and NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench* 4(3):127-132.
- Hoeflich, K.P., J. Luo, E.A. Rubie, M.S. Tsao, O. Jin and J.R. Woodgett. 2000. Requirement for glycogen synthase kinase-3  $\beta$  in cell survival and NF- $\kappa$ B activation. *Nature* 406:86-90.
- Hyun, T.K., S.C. Song, C.K. Song and J.S. Kim. 2015. Nutritional and nutraceutical characteristics of *Sageretia theezans* fruit. *J. Food Drug Anal.* 23:742-749.
- Irmak, Z., O. Tanriverdi, H. Odemis and D.D. Uysal. 2019. Use of complementary and alternative medicine and quality of life of cancer patients who received chemotherapy in Turkey. *Complement. Ther. Med.* 44:143-150.
- Jeong, J.B., X. Yang, R. Clark, J.E. Choi, S.J. Baek and S.H. Lee. 2013. A mechanistic study of the proapoptotic effect of tolfenamic acid: involvement of NF- $\kappa$ B activation. *Carcinogenesis* 34(10):2350-2360.
- Jung, K.W., Y.J. Won, H.J. Kong and E.S. Lee. 2018. Cancer statistics in Korea: Incidence, mortality, survival, and prevalence in 2015. *Cancer Res. Treat.* 50(2):303-316.
- Kim, H.N., G.H. Park, J.D. Kim, S.B. Park, H.J. Eo and J.B. Jeong. 2019a. Effect of the extracts from the leaves and branches of *Sageretia thea* on  $\beta$ -catenin proteasomal degradation in human colorectal and lung cancer cells. *Korean J. Plant Res.* 32(2):153-159.
- Kim, H.N., G.H. Park, S.B. Park, J.D. Kim, H.J. Eo, H.J. Son, J.H. Song and J.B. Jeong. 2019b. Extracts from *Sageretia thea* reduce cell viability through inducing cyclin D1 proteasomal degradation and HO-1 expression in human colorectal cancer cells. *BMC Complement. Altern. Med.* 19:43.
- Kim, H.N., G.H. Park, S.B. Park, J.D. Kim, H.J. Eo, H.J. Son, J.H. Song and J.B. Jeong. 2019c. *Sageretia thea* inhibits inflammation through suppression of NF- $\kappa$ B and MAPK and activation of Nrf2/HO-1 signaling pathways in RAW264.7 cells. *Am. J. Chin. Med.* 47(2):385-403.
- Kole, L., B. Giri, S.K. Manna, B. Pal and S. Ghosh. 2011. Biochanin-A, an isoflavone, showed anti-proliferative and anti-inflammatory activities through the inhibition of iNOS expression, p38-MAPK and ATF-2 phosphorylation and blocking NF- $\kappa$ B nuclear translocation. *Eur. J. Pharmacol.* 653:8-15.
- Lin, Y., L. Bai, W. Chen, and S. Xu. 2010. The NF- $\kappa$ B activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* 14(1):45-55.
- Meyerhardt, J.A. and R.J. Mayer. 2005. Systemic therapy for colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 352:476-87.
- Moon, S.M., S.A. Lee, J.H. Hong, J.S. Kim, D.K. Kim and C.S. Kim. 2018. Oleamide suppresses inflammatory responses in LPS-induced RAW264.7 murine macrophages and alleviates paw edema in a carrageenan-induced inflammatory rat model. *Int. Immunopharmacol.* 56:179-185.
- Park, S.B., G.H. Park, Y.R. Um, H.N. Kim, H.M. Song, N.H. Kim, H.S. Kim and J.B. Jeong. 2018. Wood-cultivated ginseng exerts anti-inflammatory effect in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Int. J. Biol. Macromol.* 116:327-334.
- Perkins, N.D. and T.D. Gilmore. 2006. Good cop, bad cop: The different faces of NF- $\kappa$ B. *Cell Death Differ.* 13:759-772.
- Pfeffer, C.M. and A.T.K. Singh. 2018. Apoptosis: A target for anticancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 19(2):448.
- Wang, H., T.O. Khor, L. Shu, Z. Su, F. Fuentes, J.H. Lee and A.N.T. Kong. 2012. Plants against cancer: A review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 12:1281-1305.
- Wyllie, A.H., G.J. Beattie and A.D. Hargreaves. 1981. Chromatin changes in apoptosis. *Histochem J.* 681-692.
- Yaghoubi, N., A. Soltani, K. Ghazvini, S.M. Hassanian and S.I. Hashemy. 2019. PD-1/ PD-L1 blockade as a novel treatment for colorectal cancer. *Biomed. Pharmacother.* 110:312-318.
- Yun, S.I., H.Y. Yoon, S.Y. Jeong and Y.S. Chung. 2009. Glucocorticoid induces apoptosis of osteoblast cells through the activation of glycogen synthase kinase 3 $\beta$ . *J. Bone Miner. Metab.* 27:140-148.

(Received 3 July 2020 ; Revised 25 July 2020 ; Accepted 28 July 2020)