

Apoptosis Induction by *Dendropanax morbiferus* Leaves Extract in Human Breast Cancer Cells SK-BR-3 through MAPK Pathway

Gi Hwan Jung¹, Sung Hyun Kim¹, Joong Seok Woo¹, Eun Seon Yoo¹, Jae Han Lee¹, So Hee Han¹, Soo Hyun Jung¹, Sae Man Kim², Eun Gee Kim², Man Jae Shin², Ho Min Cho³ and Ji Youn Jung^{1*}

¹Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, Chungcheongnam-do 32439, Korea

²DPBioPharm, Wolmuncheon-ro, Wabu-eup, Namyangju-si, Gyeonggi-do 12213, Korea

³APResearch, Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34186, Korea

Received June 25, 2021 / Revised September 2, 2021 / Accepted September 3, 2021

Dendropanax morbiferus leaves (DPL) has been used as a medicine since ancient times in various diseases such as inflammation, diabetes, and cancer. In particular, it has been found to have anticancer effects on several types of cancer cells, but the anticancer effect on breast cancer cells SK-BR-3 has not yet been revealed. Therefore, in this study, DPL caused proliferation inhibition in breast cancer cells SK-BR-3 and the anticancer effect by inducing apoptosis was confirmed, through an *in vitro* experiment. In order to examine the effect of DPL on cell viability, MTT assay was performed to confirm a significant decrease in the concentration of cell viability. DAPI staining was performed to examine the effect of DPL on cellular morphological changes and increase of apoptotic bodies. To supplement this, an increase in the apoptosis rate was also confirmed through flow cytometry after staining with annexin V/PI. Western blot was performed to confirm apoptosis-related proteins. DPL increased the expression of Cleaved-PARP, Bax whereas decreased the expression of Bcl-2. Changes in the expression levels of MAPK pathway proteins p-ERK1/2, p-JNK, and p-p38 were also confirmed, and a significant increase in p-p38 was observed. These results indicated that DPL induced apoptosis, through p-p38 MAPK signal pathway in SK-BR-3 breast cancer cells.

Key words : Apoptosis, breast cancer, *Dendropanax morbifera*, MAPK pathway, SK-BR-3

서 론

암은 전 세계적으로 주요 공중 보건 문제임과 동시에 주요 사망 원인 중 하나로 한국에서도 암이 사망 원인 중 27.8%로 가장 높은 비율을 차지하고 있고, 그중 유방암은 여성에서 두 번째로 발병률이 높은 암종이다[18]. 유방암 세포는 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체 및 HER2의 유무에 따라 해당하는 수용체를 차단하는 약물로 더 효과적인 치료법을 수행할 수 있으며 유방암의 표준 치료법에는 수술, 화학 요법, 방사능 요법, 내분비 요법, 표적 요법 및 기타 보충 요법이 포함된다[28]. 하지만 이러한 전통적인 치료법의 대부분은 환자의 삶의 질에 영향을 미치는 부작용을 유발한다[4, 12]. 때문에 오늘날 천연 유래 약물을 이용한 화학 요법은 낮은 독성과 높은 효율성으로 적은 부작용을 기대할 수 있어 유방암의 치료법으로 좋은 선택이 될 수 있다[31].

황칠나무(*Dendropanax morbifera*)는 두릅나무과에 속한 상록활엽수로 한국 전라남도 도서 해안지역 및 제주도에 분포하고 있다. 황칠나무의 수액은 목공예품 제작 시 표면 가공 또는 색을 칠할 때 사용하며 민간에서는 황칠나무 추출물을 약재로 혈행 개선, 면역력 강화, 당뇨 등에 사용하였다[22]. 최근 연구에서는 GC (Gas Chromatograph)/MS (Mass Spectrometer)를 사용하여 황칠나무에서 32종류의 물질을 확인하였다. 그중 두 개의 환 구조를 갖고 sesquiterpene에 속하는 β -selinene을 가장 많이 함유하고 있으며 capnellane-8-one은 두 번째로 많은 양을 포함한다고 보고되었다[10]. 또한 황칠나무 추출물은 항암작용[15], 항산화 및 미백작용[24, 29], 항염증[16], 당뇨[2] 등에 효과가 있다고 알려져 있다.

Apoptosis는 세포 사멸 프로그램으로 유전자 수준에서 조절되며 DNA 손상과 같이 발달 중 발생하는 손상된 세포를 효율적으로 제거한다. Apoptosis의 과정은 복잡하고 많은 신호 전달 경로를 포함하며 caspase를 매개로 외인성 또는 내인성 경로를 통해 세포에서 유발된다. 두 경로는 effector apoptotic caspase를 활성화하여 형태학적 및 생화학적 세포 변화를 일으켜 apoptosis의 특성을 유발한다[30]. Apoptosis 조절 인자 중 Bcl-2 family는 pro-apoptotic 및 anti-apoptotic intrinsic pathway를 조절하는 단백질 family로 미토콘드리아 막 투과를 매개하여 apoptosis의 시발점으로서 기능한다[1, 13].

*Corresponding author

Tel : +82-41-330-1526, Fax : +82-41-330-1529

E-mail : wangza@kongju.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.

Mitogen-activated protein kinase (MAPKs) 경로는 apoptosis의 신호 전달 경로 중 하나이며 extracellular signal-regulated protein kinase (ERK), stress-activated c-Jun N-terminal kinase (JNK), and p38 kinase MAPK로 세 가지 유형이 있다. 이 단백질들은 암세포의 성장과 분화를 방해하는 서로 다른 작용을 한다[11]. ERK1/2은 세포의 증식과 생존에 관여하는 반면 JNK, p-38은 삼투압의 변화, DNA 손상, UV (ultraviolet rays) 및 염증성 사이토카인과 같은 다양한 스트레스에 반응한다. Apoptosis는 이러한 스트레스에 노출된 p38 MAPK 활성화의 주요 결과 중 하나이며 Bax, Bim과 같은 pro-apoptosis 단백질들의 활성화에 영향을 미친다[6, 8, 21].

본 연구에서는 황칠나무 잎 추출물(DPL)을 유방암 세포 SK-BR-3에 여러 가지 농도로 처리했을 때 증식이 억제되는 것을 관찰하였으며 DPL이 유방암 세포에서 일으키는 apoptosis가 p-p38 MAPK pathway를 통해 유도된다는 것 또한 확인하였다.

재료 및 방법

황칠나무추출물 제조

본 실험에서 사용된 *Dendropanax moribifera* leaves는 제주도에 채집되었다. 채취한 *Dendropanax moribifera* leaves 100 g을 분쇄한 후 실온에서 40% ethanol과 3차 증류수를 4:6의 비율로 10일 동안 발효시킨 뒤 열수 추출하였다. 추출한 용액을 Whatman No.1 디스크 종이를 사용하여 여과하였다. 추출액을 회전식 진공 증발기(R-220; BUCHI corporation, New Castle, DE, USA)를 이용하여 감압 농축한 후 다시 끓여서 *Dendropanax moribifera* leaves의 추출물(DPL)을 얻었다. 추출물은 20% ethanol 첨가 후 냉장보관하였다. 그 후 실험에서는 D.W에 10배 희석한 뒤 사용하였다.

세포 및 재료

유방암 세포(SK-BR-3 human breast cancer cells)는 한국세포주은행(Jongno-gu, Seoul, Korea)에서 구입하였다. RPMI-1640은 Welgene (Gyeongsan, Gyeongsangbuk-do, Korea)에서 구입하였다. FBS (fetal bovine serum), penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA는 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. ECL detection reagents는 Promega (Fitchburg, Wisconsin, USA)에서 구입하였다. Cell lysis buffer는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. 본 실험에서 사용한 일반적인 시약은 Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. FITC annexin V Apoptosis Detection Kit는 BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. Rabbit IgG, PARP, Bax, p-ERK1/2, t-ERK, p-JNK, t-JNK, p-p38, t-p38은 Cell signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. Bcl2는 Novus Biologicals (Colorado,

Littleton, USA)에서 구입하였으며 mouse IgG, β -actin은 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 구입하였다.

세포 배양

SK-BR-3는 5% FBS, 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 RPMI-1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂가 유지되는 incubator에 배양하였다. 플라스크에 세포가 80~90% 정도 되었을 때 PBS를 사용하여 세척 후 trypsin-EDTA를 처리하여 계대 배양하였다. 배지는 2~3일마다 교환해 주었다.

세포 생존율 측정

세포 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylthiazolium bromide (MTT) assay를 통하여 측정하였다. SK-BR-3를 96-well plate의 각 well에 2×10⁴ cell/ml씩 분주하여 RPMI-1640 배지에서 24시간 동안 37°C, 5% CO₂가 유지되는 incubator에 배양하였다. 그 후 DPL을 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000 μ g/ml로 처리하여 24시간 동안 incubator에 배양하였다. 24시간 후 PBS에 1 mg/ml로 녹인 MTT solution (thiazolyl blue tetrazolium bromide)을 각 well에 40 μ l씩 처리하여 2시간 동안 incubator에 배양하였다. 그 후 각 well에 DMSO를 100 μ l씩 처리하여 formazan을 완전히 용해하였다. 이후 흡광도는 ELISA reader (Hercules, CA, USA)에서 595 nm로 측정하였다.

세포의 형태학적 변화 관찰

세포의 형태학적 변화는 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 염색을 통하여 측정하였다. SK-BR-3를 60 mm dish에 2×10⁵ cell/ml로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후 DPL을 SK-BR-3에 0, 200, 300 μ g/ml로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 4% paraformaldehyde solution을 처리하여 15분 동안 고정시킨 뒤 DAPI solution을 처리하여 형광현미경 (Thornwood, NY, USA)으로 200배 시야에서 관찰하였다.

유세포 분석을 통한 apoptosis 관찰

Apoptosis rate는 FITC-Annexin V Apoptosis Detection Kit (San Diego, CA, USA)로 측정하였다. Annexin V/propidium iodide (PI) 염색을 위해 SK-BR-3에 DPL을 0, 200, 300 μ g/ml로 처리하였다. 24시간 뒤 세포를 PBS로 세척 후 trypsin-EDTA로 세포를 수거하였다. 수거한 세포는 1X binding buffer를 사용하여 1×10⁵ cell/ml로 현탁하였다. 이후 Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated annexin V와 phycoerythrin (PE)-conjugated propidium iodide를 100 μ l 당 5 μ l씩 첨가하여 15분간 반응시킨 후 유세포 분석을 통해 측정하였다. Apoptosis rate는 annexin V positive cell의 백분율로 정량화하였다.

Western blot 분석

유방암 세포 SK-BR-3를 1×10^6 cell/ml로 24시간 배양한 뒤 0, 200, 300 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 DPL을 처리한 후 다시 24시간 동안 배양하였다. 그 후 trypsin-EDTA를 사용하여 세포를 수거하였다. 수거한 세포는 cell lysis buffer를 첨가하여 4°C에서 20분간 반응시켰다. 20분 후 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 취해 cell lysate로 사용하였다. Cell lysate의 단백질 농도는 Bradford assay를 사용하여 측정하였다. Cell lysate를 12% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)로 분리한 후 nitrocellulose membranes (Hercules, CA, USA)으로 이동시켰다. Membrane은 5% skim milk-TBST (20 mM Tris HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에서 2시간 동안 blocking한 뒤, 측정하고자 하는 1차 항체를 1:1,000으로 희석 후 첨가하여 4°C에서 overnight 하였다. 그 후 rabbit IgG 또는 mouse IgG를 1:1,000으로 희석한 뒤 첨가하여 2시간 동안 반응시켰다. 그 후 ECL detection reagents를 사용하여 현상하였고, density는 Image J Launcher (provided by NCBI)를 통해 측정했다.

통계분석

결과는 평균 \pm 표준편차(S.D)로 표시된다. 대조군과 DPL 처리군의 평균값의 차이는 Dunnett's t-test를 이용한 one-way analysis of variance (ANOVA)로 평가되었다. $*p < 0.05$ 는 통계적으로 유의한 차이를 나타내는 것으로 간주된다.

결 과

유방암 세포의 생존 능력에 대한 DPL의 영향

유방암 세포 SK-BR-3에서 DPL에 의한 세포 생존율을 확인하기 위하여 DPL을 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 씩 24시간 동안 처리하여 MTT assay를 진행

하였다. 그 결과 200 $\mu\text{g/ml}$ 부터 대조군 대비 유의적인 세포 생존율의 감소를 보였다(Fig. 1). 이후 실험은 MTT assay의 결과에 따라 0, 200, 300 $\mu\text{g/ml}$ 로 농도를 설정하여 수행하였다.

DPL에 의한 유방암 세포의 형태학적 변화

DPL에 의한 유방암 세포의 형태학적 변화에 대한 영향을 알아보기 위하여 DAPI 염색을 진행하였다. SK-BR-3에 DPL을 0, 200, 300 $\mu\text{g/ml}$ 로 24시간 동안 처리하였다. 염색 후 DAPI 시약에 반응한 apoptotic body를 counting 하여 apoptosis가 유도된 세포를 정량화하고 분석한 결과 2.0, 10.4, 25.4%로 apoptotic cell이 농도의존적으로 대조군 대비 유의하게 증가하였다(Fig. 2).

DPL에 의한 유방암 세포의 apoptosis 비율의 변화

유방암 세포의 apoptosis 비율에 대해 DPL이 미치는 영향을 확인하기 위하여 annexin V/PI 염색을 진행하였다. SK-BR-3에 DPL을 0, 200, 300 $\mu\text{g/ml}$ 로 24시간 동안 처리한 뒤 annexin V와 propidium iodide 염색 후 유세포 분석을 수행하였다. Apoptosis 비율은 annexin V 양성 세포의 비율로 측정하였다. 분석 결과 12.8, 14.8, 20.0%로 apoptosis 비율이 농도의존적으로 대조군 대비 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 3).

유방암 세포에서 DPL이 apoptosis 경로 단백질 발현에 미치는 영향

DPL이 유방암 세포의 단백질 발현도에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Western blot을 진행하였다. 유방암 세포 SK-BR-3에 DPL 0, 200, 300 $\mu\text{g/ml}$ 로 24시간 동안 처리하여 수거한 단백질로 Western blot을 수행하였다. 그 결과 농도가 증가함에 따라 cleaved PARP과 Bax의 증가와 Bcl-2의 감소를 확인하였다(Fig. 4A).

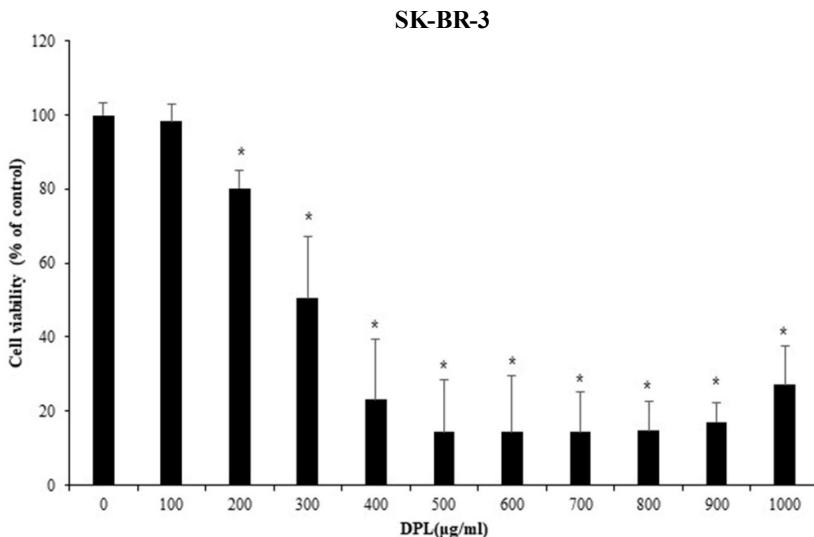


Fig. 1. Effect of DPL on cell viability. SK-BR-3 were treated with DPL (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000 $\mu\text{g/ml}$, 24 hr) and cell viability was determined by MTT assay. The results are shown as means \pm standard error (SE) of three independent experiments performed in triplicate. Significance was determined by Student's *t* test, $*p < 0.05$, compared with the control.

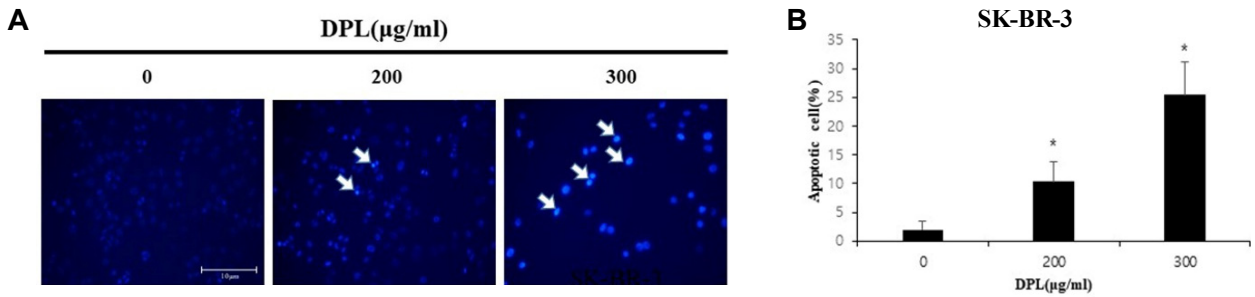


Fig. 2. (A) Effect of DPL on Cell Morphological Changes. SK-BR-3 cells were treated with DPL (0, 200, 300 µg/ml, 24 hr) and apoptotic bodies were stained with 1x DAPI solution. Cell morphological characteristics were analyzed using a fluorescence microscope (scale bar, 10 µm). (B) The bar graph represents the average of four fields under a fluorescence microscope, and the percentage of DAPI-positive cell among all cells. The results are shown as means ± standard error (SE) of three independent experiments performed in triplicate. Significance was determined by Student's *t* test, **p*<0.05, compared with the control.

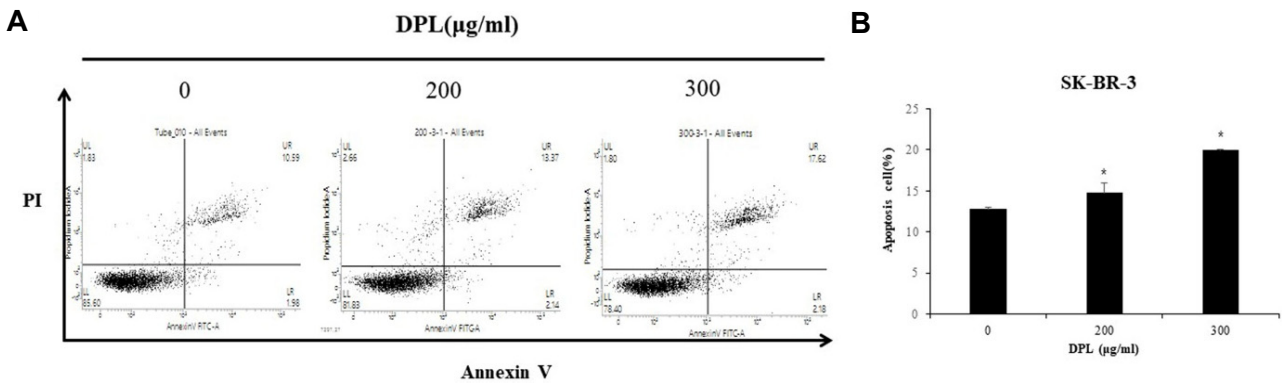


Fig. 3. (A) Effect of DPL on ratio change of apoptotic cells. SK-BR-3 cells were seeded for 24 hr and treated with DPL (0, 200, 300 µg/ml, 24 hr). Cells were collected and stained with annexin V/PI and then analyzed through flow cytometry. (B) Bar graph represent percentage of apoptotic cells. The results are shown as means ± standard error (SE) of three independent experiments performed in triplicate. Significance was determined by Student's *t* test, **p*<0.05, compared with the control.

유방암 세포에서 DPL이 MAPK 경로 단백질 발현에 미치는 영향

앞서 apoptosis 관련 단백질들의 발현 확인에 이어 MAPK 경로를 통하여 apoptosis가 유도되는지 알아보기 위해 Western blot을 진행하였다. MAPK 경로를 진행시키는 주요 단백질인 ERK1/2, JNK, p38의 변화를 확인하였으며 그 결과 농도가 증가함에 따라 대조군과 대비하여 p-p38, p-JNK의 증가와 p-ERK1/2의 감소를 확인하였다(Fig. 4B).

고찰

황칠나무 잎은 약재로써 혈행 개선, 면역력 강화, 당뇨 치료 등의 용도로 민간에서 사용되어 왔으며 또한 간암, 선암, 인간 골육종 등 여러 가지 암종에 대한 apoptosis 효과가 보고되어 있다[7, 34]. 하지만 DPL의 유방암 세포 SK-BR-3에 대한 세포 사멸 효과는 아직 보고되지 않았다. 따라서 본 연구는 DPL이 유방암 세포 SK-BR-3의 증식 억제에 미치는 영향과 그 역제가

apoptosis에 의해 발생한 것인지, 또 어떤 경로로 인해 작용하였는지 *in vitro* 실험을 통해 확인하였다.

유방암 세포 SK-BR-3의 생존 능력에 대한 DPL의 영향은 MTT assay를 통해 측정되었다. DPL을 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000 µg/ml로 24시간 처리하였으며 그 결과 세포의 생존율은 200 µg/ml 부터 유의적으로 감소하는 것을 볼 수 있다. Apoptosis는 여러 가지 형태학적인 변화를 가지고 발생하게 되는데 그중 apoptotic body는 DNA 분열에 의해 발생하는 핵과 염색질 응축에 의해 만들어지게 된다 [3, 27]. 따라서 DAPI staining을 통한 apoptotic body 관찰은 앞서 일어난 cell death가 apoptosis에 의한 것인지 확인할 수 있다. DPL 0, 200, 300 µg/ml로 24시간 처리된 SK-BR-3는 대조군과 비교했을 때 각각 2.0, 10.4, 25.4%로 농도의존적으로 apoptotic body의 비율이 증가하는 것을 볼 수 있다.

DNA의 분절이 일어나 apoptosis가 유도되면 세포의 막 투과성이 높아지며, 이에 따라 annexin V/PI와 같은 염색약을 이용하여 핵의 염색을 통해 apoptosis가 일어난 세포들을 관

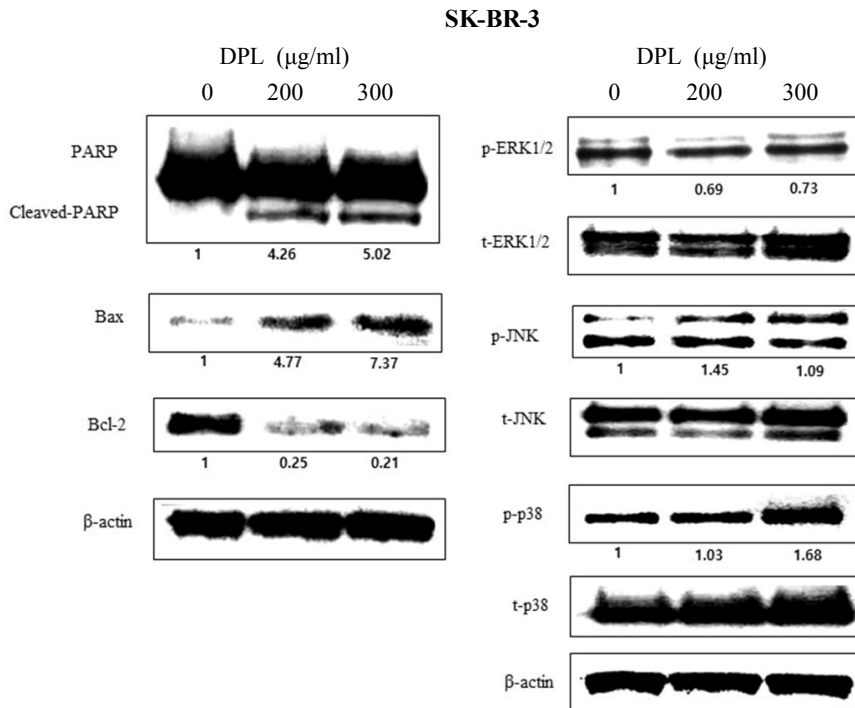


Fig. 4. Effect of DPL on the expression of (A) apoptosis-related proteins and (B) MAPK pathway-related proteins. SK-BR-3 were treated with DPL (0, 200, 300 µg/ml, 24 hr) and harvested to measure level of apoptotic proteins; cleaved PARP, Bcl-2, Bax and MAPK pathway proteins; ERK1/2, JNK, and p38 were analyzed by Western blotting. β-actin was used as a loading control.

찰할 수 있다[28]. Annexin V는 세포막의 구성성분인 인지질에 결합되어 early apoptotic cell과 late apoptotic cell을 염색시킨다[14]. 반면 PI는 일차적으로 세포의 핵에 접근하여 late apoptotic cell과 necrotic cell을 염색시킨다[32]. Apoptosis의 비율을 확인하기 위해 SK-BR-3에 DPL을 0, 200, 300 µg/ml로 24시간 처리하고 annexin V와 PI로 염색시킨 뒤 유세포분석을 통해 관찰하였다. 그 결과 Apoptotic cell의 비율은 대조군 대비 12.8, 14.8, 20%로 농도의존적으로 비율이 증가하였다. 그러므로 DPL은 apoptosis 유도를 통해 SK-BR-3의 증식을 억제하는 것으로 사료된다.

Apoptosis에 의한 세포의 죽음은 크게 외인성 경로와 내인성 경로로 나눌 수 있다. Mitochondria-dependent pathway는 Bcl-2계열 단백질을 통해 발생하는데, 이것은 내인성 경로의 중요한 조절자이며 미토콘드리아 막의 투과성 변화를 억제하거나 촉진한다[9, 25]. Bcl-2 계열 단백질은 pro-apoptotic proteins인 Bax, Bad, Bid와 anti-apoptotic proteins인 Bcl-2, Bcl-XL로 구성되어 있다[33]. 이에 따라 apoptosis의 발현은 pro-apoptotic proteins와 anti-apoptotic proteins의 비율에 의해 조절된다[20]. 또한, PARP은 세포 내 DNA 수리 역할을 하는 중요한 단백질로 DNA 손상이 일어났을 때 caspase-dependent cell death에 관여하고 cleaved-PARP의 형태로 나타나게 된다. 따라서 cleaved-PARP은 apoptosis의 중요한 표지자이다[5, 26]. Western blot에서 cleaved PARP과 pro-apoptotic proteins인 Bax는 농도의존적으로 증가하였으며 anti apoptotic cell인 Bcl-2는 DPL처리 군에서 감소하였다. 따라서 DPL은 cleaved-PARP과 Bax를 증가시키고 Bcl-2를 감소시킴으로

내인성 경로에 의한 apoptosis를 유도하는 것으로 보인다.

MAPKs는 serine/threonine kinases로 유사분열, 유전자 발현, 신진대사 등의 세포 활동을 조절하며 크게 ERK1/2, JNK, p38로 이루어져 있다[36]. ERK1/2는 광범위하게 발현되고 세포분열과 세포의 생존에 관여한다. 또한 스트레스에 반응하여 apoptosis를 억제하고 방사선 자극이나 종양괴사인자(TNF)에 의해 유도된다[19, 35]. JNK는 전사의 중요한 조절자이고 p38은 환경적 스트레스와 염증성 사이토카인 등에 의해 활성화된다[17]. DPL이 처리된 SK-BR-3에서 p-ERK1/2는 대조군과 비교하여 중농도와 고농도 모두 감소한 반면 p-JNK의 발현은 두 농도군에서 대조군보다 증가하였다. 하지만 p-ERK1/2, p-JNK 모두 중농도와 고농도 간의 큰 차이는 보이지 않았다. 반면 p-p38은 농도의존적으로 크게 증가하였다. Lee et al. [23]은 인간 골수성 백혈병 세포 U937에 *Dendropanax morbifera* 줄기 추출물을(0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 12 and 24 hr) 처리하고 Western blot을 통해 MAPK 경로 단백질인 p-ERK, p-JNK, p-p38의 변화를 관찰했다. 그들은 0.5-6시간 동안 p-ERK, p-JNK, p-p38의 증가, 24시간에서는 p-ERK, p-JNK, p-p38이 모두 반대로 감소하는 것을 확인했다. 이번 연구에서는 SK-BR-3에 DPL을 24시간 처리했을 때 p-p38이 Lee et al. [23]과 다르게 증가하는 것으로 보아 DPL에 의한 SK-BR-3에서의 apoptosis는 p-p38 MAPK 경로를 통해 유발된다고 사료된다.

결론적으로 이번 연구의 결과는 DPL의 apoptosis 유도를 통해 유방암 세포 SK-BR-3의 증식을 억제한다는 것을 입증했다. Cleaved PARP과 Bax의 증가와 Bcl-2의 감소에 의해 apoptosis가 유도되었다. 또한 DPL에 의해 유도된 apoptosis는 p-

p38 MAPK 경로와 관련이 있는 것으로 생각된다. 이러한 세포 사멸 효과를 통해 DPL은 유방암 치료의 천연 유래 물질로써 큰 가치가 있다는 것을 보여준다.

The Conflict of Interest Statement

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

References

- Adams, J. M. and Cory, S. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**, 1324-1337.
- An, N. Y., Kim, J. E., Hwang, D. and Ryu, H. K. 2014. Anti-diabetic effects of aqueous and ethanol extract of *Dendropanax moribifera* Leveille in streptozotoin-induced diabetes model. *J. Nutr. Health* **47**, 394-402.
- Battistelli, M. and Falcieri, E. 2020. Apoptotic bodies: particular extracellular vesicles involved in intercellular communication. *Biology* **9**, 21.
- Boyages, J. 2017. Radiation therapy and early breast cancer: current controversies. *Med. J. Aust.* **207**, 216-222.
- Bressenot, A., Marchal, S., Bezdetnaya, L., Garrier, J., Guillemin, F. and Plénat, F. 2009. Assessment of apoptosis by immunohistochemistry to active caspase-3, active caspase-7, or cleaved PARP in monolayer cells and spheroid and subcutaneous xenografts of human carcinoma. *J. Histochem. Cytochem.* **57**, 289-300.
- Chang, L. and Karin, M. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**, 37-40.
- Choi, H. J., Park, D. H., Song, S. H., Yoon, I. S. and Cho, S. S. 2018. Development and validation of a HPLC-UV method for extraction optimization and biological evaluation of hot-water and ethanolic extracts of *Dendropanax moribifera* leaves. *Molecules* **23**, 650.
- Cuadrado, A. and Nebreda, A. R. 2010. Mechanisms and functions of p38 MAPK signaling. *Biochem. J.* **429**, 403-417.
- Danial, N. N. and Korsmeyer, S. J. 2004. Cell death: critical control points. *Cell* **116**, 205-219.
- Da Rocha, A. B., Lopes, R. M. and Schwartzmann, G. 2001. Natural products in anticancer therapy. *Curr. Opin. Pharmacol.* **1**, 364-369.
- Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O. and Kolch, W. 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* **26**, 3279-3290.
- Gao, S., Li, X., Ding, X., Qi, W. and Yang, Q. 2017. Cepharranthine induces autophagy, apoptosis and cell cycle arrest in breast cancer cells. *Cell Physiol. Biochem.* **41**, 1633-1648.
- Giam, M., Huang, D. C. S. and Bouillet, P. 2008. BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene* **27**, S128-S136.
- Hammill, A. K., Uhr, J. W. and Scheuermann, R. H. 1999. Annexin V staining due to loss of membrane asymmetry can be reversible and precede commitment to apoptotic death. *Exp. Cell Res.* **251**, 16-21.
- Hyun, T. K., Kim, M. O., Lee, H., Kim, Y., Kim, E. and Kim, J. S. 2013. Evaluation of anti-oxidant and anti-cancer properties of *Dendropanax moribifera* Léveille. *Food Chem.* **141**, 1947-1955.
- Hyun, T. K., Ko, Y. J., Kim, E. H., Chung, I. M. and Kim, J. S. 2015. Anti-inflammatory activity and phenolic composition of *Dendropanax moribifera* leaf extracts. *Ind. Crops Prod.* **74**, 263-270.
- Johnson, G. L. and Lapadat, R. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**, 1911-1912.
- Jung, K. W., Won, Y. J., Oh, C. M., Kong, H. J., Lee, D. H. and Lee, K. H. 2017. Cancer statistics in Korea: incidence, mortality, survival, and prevalence in 2014. *Cancer Res. Treat.* **49**, 292.
- Kitagawa, D., Tanemura, S., Ohata, S., Shimizu, N., Seo, J., Nishitai, G. and Katada, T. 2002. Activation of extracellular signal-regulated kinase by ultraviolet is mediated through Src-dependent epidermal growth factor receptor phosphorylation: its implication in an anti-apoptotic function. *J. Biol. Chem.* **277**, 366-371.
- Kroemer, G. 1997. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat. Med.* **3**, 614-620.
- Ichijo, H. 1999. From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene* **18**, 6087-6093.
- Lee, C., Yang, M. and Moon, J. O. 2019. Antioxidant and hepatoprotective effects of the ethanol extract of *Dendropanax moribifera* Leveille on the T-Butyl Hydroperoxide-Induced HepG2 cell damages. *Kor. J. Pharmacog.* **50**, 32-36.
- Lee, J. W., Park, C., Han, M. H., Hong, S. H., Lee, T. K., Lee, S. H. and Choi, Y. H. 2013. Induction of human leukemia U937 cell apoptosis by an ethanol extract of *Dendropanax moribifera* Lev. through the caspase-dependent pathway. *Oncol. Rep.* **30**, 1231-1238.
- Lee, M. K., Lee, I. S. and Lee, J. S. 2013. For the utilization of native plant resources as high-value materials: evaluation on demelanizing activity of *Dendropanax moribifera* in Bogildo. *J.K.I.* **25**, 227-240.
- Lhee, H. Y., Lee, K. B., Kim, H., Chae, S. W. and Park, M. H. 2005. Apoptosis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Res. Clin. Pract.* **24**, 366-374.
- Luo, H., Liang, H., Chen, J., Xu, Y., Chen, Y., Xu, L. and Tang, H. 2017. Hydroquinone induces TK6 cell growth arrest and apoptosis through PARP 1/p53 regulatory pathway. *Environ. Toxicol.* **32**, 2163-2171.
- Nagata, S. 2000. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.* **256**, 12-18.
- Nag, S., Kuske, R. R., Vicini, F. A., Arthur, D. W. and Zwicker, R. D. 2001. Brachytherapy in the treatment of breast cancer. *Oncology (Williston Park, NY)* **15**, 195-202.
- Park, S. A., Park, J., Park, C. I., Jie, Y. J., Hwang, Y. C., Kim, Y. H. and Park, S. N. 2013. Cellular antioxidant activity and whitening effects of *Dendropanax moribifera* leaf extracts. *Hanguk Misaengmul Saengmyong Konghakhoe Chi* **41**, 407-415.
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A. and D'Orazi, G. 2016. Apoptosis as anticancer mechanism: function and

- dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)* **8**, 603.
31. Rates, S. M. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicol* **39**, 603-613.
 32. Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D. and Barreda, D. R. 2011. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J. Vis. Exp.* **50**.
 33. Singh, R., Letai, A. and Sarosie, K. 2019. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 175-193.
 34. Song, J. H., Kang, H. B., Kim, J. H., Kwak, S., Sung, G. J., Park, S. H. and Choi, K. C. 2018. Antiobesity and cholesterol-lowering effects of *Dendropanax morbifera* water extracts in mouse 3T3-L1 Cells. *J. Med. Food* **21**, 793-800.
 35. Tran, S. E., Holmström, T. H., Ahonen, M., Kähäri, V. M. and Eriksson, J. E. 2001. MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 16484-16490.
 36. Yue, J. and López, J. M. 2020. Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 2346.

초록 : 유방암 세포에서 황칠나무 잎 추출물의 MAPK 경로를 통한 apoptosis 유도

정기환¹ · 김성현¹ · 우중석¹ · 유은선¹ · 이재한¹ · 한소희¹ · 정수현¹ · 김세만² · 김은지² · 신만재² · 조호민³ · 정지윤^{1*}

(¹공주대학교 특수동물학과, ²DPBioPharm, ³에이피리서치)

황칠나무 잎 추출물(DPL)은 염증, 당뇨병, 암 등 다양한 질병에 예로부터 약으로 사용되어 왔다. 특히 여러 종류의 암세포에 세포사멸 효과가 있는 것으로 밝혀졌지만 유방암 세포 SK-BR-3에 대한 세포사멸 효과는 아직 밝혀지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 *in vitro* 실험을 통해 DPL이 유방암 세포 SK-BR-3에서의 증식 억제와 apoptosis를 통한 세포사멸 효과를 확인하였다. DPL이 세포 생존율에 미치는 영향을 조사하기 위해 MTT 분석을 수행했고 세포 생존율이 농도의존적으로 감소하는 것을 확인했다. DAPI 염색은 DPL에 의해 발생한 세포 형태학적 변화와 apoptotic body의 증가에 미치는 영향을 조사하기 위해 수행되었다. 이를 보완하기 위해 annexin V/PI 염색 후 유세포 분석을 통해 세포 apoptosis 비율의 증가를 확인했다. Apoptosis 관련 단백질들을 확인하기 위해 Western blot을 수행하였으며, cleaved-PARP과 pro-apoptosis 단백질인 Bax의 증가와 anti-apoptosis 단백질인 Bcl-2의 감소를 확인하였다. MAPK 경로 단백질 p-ERK1/2, p-JNK 및 p-p38의 발현 수준의 변화도 확인하였으며 p-p38의 유의미한 증가가 관찰되었다. 본 연구 결과에 따르면 DPL은 유방암 세포 SK-BR-3에서 p-p38 MAPK 경로 조절을 통해 세포사멸 효과를 유도하는 것으로 사료된다.