

도깨비부채(*Rodgersia podophylla*) 잎 추출물의 인간 암세포의 β -catenin 분해 유도 활성

김하나¹, 김정동¹, 손호준², 박광훈², 어현지³, 정진부^{4*}

¹국립안동대학교 생약자원학과, 대학원생, ⁴교수, ²국립산림과학원 산림약용자원연구소, 연구사, ³박사후연구원,

Anti-Cancer Activity of the Leaf Extracts of *Rodgersia podophylla* through β -catenin Proteasomal Degradation in Human Cancer Cells

Ha Na Kim¹, Jeong Dong Kim¹, Ho-Jun Son², Gwang Hun Park², Hyun Ji Eo³ and Jin Boo Jeong^{4*}

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

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

Abstract - In this study, we evaluated the effect of *Rodgersia podophylla* leaf extracts (RPL) on β -catenin level in human cancer cells. RPL dose-dependently inhibited cell proliferation in SW480, A549, MDA-MB-231, PC-3 and AsPC-1 cells. RPL dramatically decreased β -catenin protein level in all cancer cells. However, decreased level of β -catenin mRNA expression was observed in A549 and AsPC-1 cells. In addition, RPL dramatically attenuated cyclin D1 mRNA expression in all cancer cells. MG132 decreased the downregulation of β -catenin protein level induced by RPL in all cancer cells, while RPL-induced downregulation of β -catenin was inhibited by the inhibition of GSK-3 β by LiCl in MDA-MB-231 cells. RPL phosphorylated β -catenin and GSK-3 β . In addition, the inhibition of GSK-3 β by LiCl attenuated RPL-induced β -catenin phosphorylation. Based on these findings, RPL may be a potential candidate for the development of chemopreventive or therapeutic agents for human cancer.

Key words - Anticancer activity, β -Catenin, Cancer chemoprevention, *Rodgersia podophylla*

서 언

도깨비부채(*Rodgersia podophylla*)는 범의귀과에 속하는 여러해살이풀로써 중국, 일본 및 한국(경기도 이북지역)에 분포하며, ‘담룡천’이라는 이름의 한약재로 장염 및 세균성 이질 치료와 발열증상에 대한 해열의 목적으로 사용되어 왔다(Chin *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2006). 최근 연구에 따르면, 도깨비부채는 항염증활성을 나타내고, 활성산소에 의해 야기되는 간 손상을 보호하였다(Chin *et al.*, 2004; Chin *et al.*, 2006). 또한, 도깨비부채는 멜라닌 생성을 억제한다고 보고되었다(Choi *et al.*, 2006; Kong *et al.*, 2007).

전 세계적으로 주요 사망 원인 암은 한국에서 1983년 이래 국가의 주요 공중 보건 문제로 여겨져 왔다(Jung *et al.*, 2019). 매년 한국에서 22만 명 이상 암 진단을 받고, 4명 중 1명은 암으로 사망한다고 보고되고 있다(Jung *et al.*, 2018). β -catenin은 생리적 항상성에 중심적인 역할을 하는 다기능 단백질로 알려져 있으나, β -catenin의 과도한 발현은 암을 포함한 다양한 질병을 초래한다고 보고되고 있다(Shang *et al.*, 2017). 정상세포에서의 β -catenin 수준은 Axin, adenomatous polyposis coli (APC), glycogen synthase kinase 3 (GSK3), casein kinase 1 (CK1) 그리고 β -transducin repeat-containing protein (β -TrCP)로 구성된 파괴복합체에 의해 조절된다. 이 복합체는 β -catenin의 serine-45, threonine-41, serine-37 및 serine-33의 인산화를 매개하여 연속적인 유비퀴틴화 및 단백질 분해를 유도한다

*교신저자: jjb0403@anu.ac.kr

Tel. +82-54-820-7757

(Nusse and Clevers, 2017). 그러나 비 정상적인 Wnt의 활성화는 파괴복합체를 억제하여 β -catenin의 축적을 유도하고, 축적된 β -catenin은 핵 내로 전이되어 T cell-specific transcription factor (TCF)/LEF-1와 binding하여 cyclin D1과 c-myc과 같은 발암단백질의 발현을 유도한다(Nusse and Clevers, 2017). 그리하여, Wnt/ β -catenin 신호전달경로의 핵심단백질인 β -catenin의 발현을 억제할 수 있는 항암제 개발이 요구되고 있다(Shang *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2019).

도깨비부채의 항암활성과 그 작용기전에 대한 연구가 미비하여 본 연구에서는 도깨비부채의 암세포의 생육에 미치는 영향과 β -catenin 단백질 발현 조절활성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

인간 암세포의 배양을 위한 배지인 DMEM/F-12는 Lonza (Morristown, NJ, USA)에서 구매하였다. 단백질분해효소 억제제인 MG132, GSK-3 β 억제제인 LiCl 그리고 세포생육 측정을 위한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사에서 구입하였다. 그리고 Western blot을 활용한 단백질 분석을 위한 항체인 β -catenin, p- β -catenin, GSK-3 β , p-GSK-3 β 및 actin은 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다.

추출물 제조

본 실험에 사용된 시료인 도깨비부채(*R. podophylla*) 잎은 경북 풍기에 위치한 국립산림과학원 산림약용자원연구소로부터 제공받았다. 도깨비부채의 표준본(표본번호: IDRP20181011-01-08)은 국립산림과학원 산림약용자원연구소의 손호준박사의 식물학적 동정 후, 국립산림과학원 산림약용자원연구소에 보관하고 있다. 도깨비부채 잎 20 g을 70% 에탄올 400 mL을 가하여 상온에서 교반하면서 3일 동안 추출하고, 원심분리하여 70% 에탄올 추출물을 회수하였다. 도깨비부채 잎 에탄올 추출물은 40°C 이하의 중탕에서 감압 환류 냉각장치(N-1110S, EYELA, Tokyo, Japan)로 감압농축 후 동결건조하여 약 3.7 g (회수율: 18.5%)의 에탄올 추출물의 얻었다. 동결건조된 추출물은 -80°C의 냉동고에 보관하면서 분석을 위한 시료로 사용되었다. 도깨비부채 잎(RPL) 추출물은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해하여 실험에 사용되었고, 대조군은 DMSO를 0.1%를 초

과하지 않는 범위에서 사용하였다.

세포 생육 억제활성 측정

본 연구에서 사용된 대장암세포 SW480, 폐암세포 A549, 유방암세포 MDA-MB-231, 전립선암세포 PC-3 그리고 췌장암세포 AsPC-1은 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, 각각의 세포는 10% FBS, 100 U/mL penicillin과 100 μ g/mL streptomycin이 포함된 DMEM/F-12 배지로 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양되었다. RPL의 암세포 생육억제는 MTT assay로 측정하였다. 각각의 암세포를 96-well plate에 well 당 1×10^4 cells로 24 시간 배양한 후, RPL을 농도별 처리하고 24시간 동안 배양시켰다. 24시간 후 각각의 well에 MTT 용액(1 mg/mL)을 50 μ L씩 첨가하고 2시간 반응시킨 후, 상등액을 제거하고 DMSO를 100 μ L씩 각각의 well에 첨가하여 녹인 후 UV/Visible spectrophotometer (Xma-3000PC, Human Corporation Co., Seoul, Korea)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

세포에서 RNA를 추출하기 위해서 세포를 4°C에서 유지된 $1 \times$ PBS로 2회 세척한 후, RNeasy Mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 1 μ g의 total RNA를 Verso cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. PCR은 PCR Master Mix Kit (Promega Co., Madison, WI, USA)를 이용하여 수행되었고, 사용된 primer는 Table 1과 같다.

SDS-PAGE 및 Western blot 분석

세포로부터 단백질을 추출하기 위해, 처리 후 세포를 4°C에서 유지된 $1 \times$ phosphate-buffered saline (PBS)로 2회 세척

Table 1. Sequence of oligonucleotide primers used for RT-PCR

Gene Name	Sequence
β -catenin	■ Forward: 5'-cccactaatgtccagcgcttt-3'
	■ Reverse: 5'-aatccactggtgaaccaagc-3'
Cyclin D1	■ Forward: 5'-aactacctgaccgcttct-3'
	■ Reverse: 5'-ccactgagctgttcacca-3'
GAPDH	■ Forward: 5'-accagaagactgtggatgg-3'
	■ Reverse: 5'-ttctagaccgagctcaggt-3'

한 후, protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich Co.)과 phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich Co.)이 포함된 NP-40 lysis buffer (GenDEPOT, Katy, TX, USA)를 4°C에서 1시간 처리하여 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 Bicinchoninic acid protein assay (Pierce Biotechnology Inc., Waltham, MA, USA)로 정량분석 후, 동일량의 단백질을 8% SDS-acrylamide gel로 전기영동하고 PVDF membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 이동시킨 후 5% non-fat dry milk로 상온에서 1시간 동안 blocking 하였다. 1시간 후, 1차 항체를 5% non-fat dry milk에 용해시켜 4°C에서 16시간 동안 반응시킨 후 membrane을 0.05% tween-20이 포함된 tris-buffered saline (TBS-T)로 5분간 3회 세척하였다. 그 후 2차 항체는 5% non-fat dry milk에 용해시켜 membrane에 상온에서 1시간 처리하였고, TBS-T로 5분간 3회 세척 후 membrane은 ECL western blotting substrate (Amersham Biosciences Co., Little Chalfont, England)를 이용하여 단백질을 확인하였다.

통계분석

모든 결과는 3 회 반복 측정 후 평균 ± 표준편차로 나타내었고,

처리간 유의성은 Student's *t*-test로 검증하여 p-value 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판정하였다(Microsoft Excel 2010, Microsoft, Redmond, WA, USA).

결과 및 고찰

RPL의 암세포에 대한 세포생육억제활성

RPL의 대장암, 폐암, 유방암, 전립선암 및 췌장암 세포에 대한 세포생육억제 활성을 평가하기 위해 대장암세포인 SW480, 폐암세포인 A549, 유방암세포인 MDA-MB-231, 전립선암세포 PC-3 그리고 췌장암세포 AsPC-1에 RPL을 농도별로 24시간 처리 후, MTT assay를 이용하여 RPL의 세포생육억제 활성을 평가하였다. RPL은 SW480세포의 생육을 25 µg/mL에서 12.8%, 50 µg/mL에서 37.5%, 100 µg/mL에서 47.8% 정도 억제하였다. 그리고 RPL은 A549세포의 생육을 25 µg/mL에서 13.5%, 50 µg/mL에서 35.3%, 100 µg/mL에서 69.9% 정도 억제하였다. MDA-MB-231와 PC-3세포에서 RPL은 각각 25 µg/mL에서 30.4%와 35.2%, 50 µg/mL에서 41.9%와 46.9%, 100 µg/mL에서 55.1%와 57.8% 정도 억제하였다. 또한 RPL은 AsPC-1세

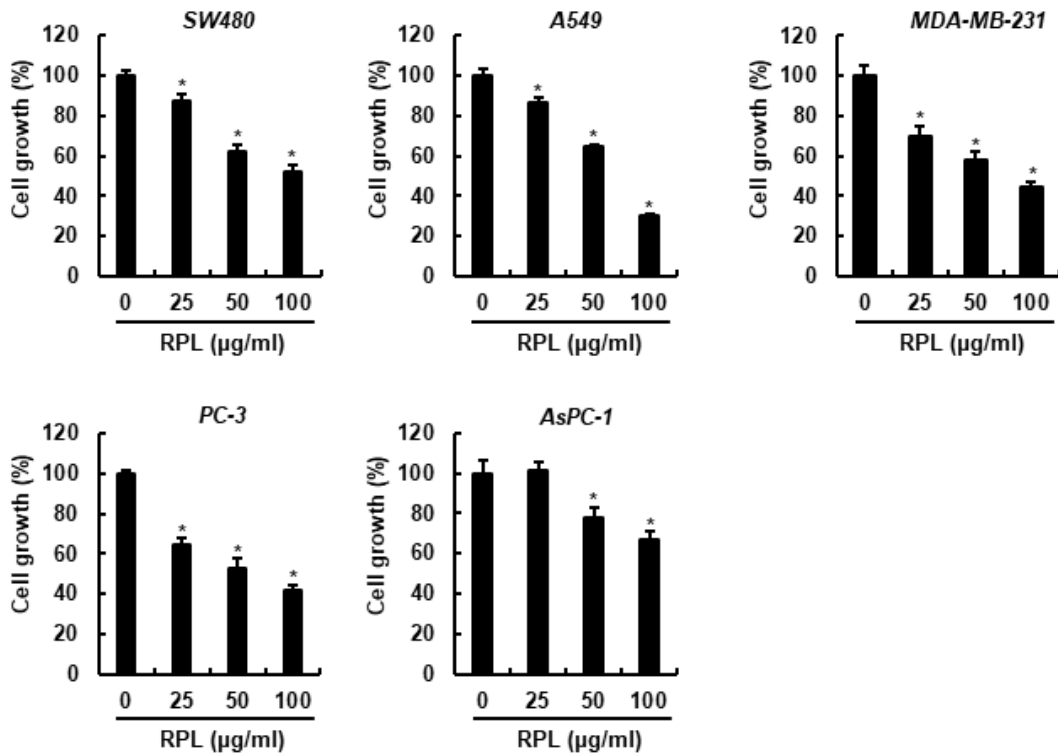


Fig. 1. Effect of RPL on the cell growth in human cancer cells. Cell growth was evaluated by MTT assay at 24 h after RPL treatment. **p* < 0.05 compared to cell without RPL.

포의 생육을 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 22.3%, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 33.4% 정도 억제하였다.

RPL의 암세포에서 β -catenin 단백질 및 유전자 발현 조절 활성

암세포에서 과도한 β -catenin의 발현은 세포증식과 관련된 c-myc, cyclin D1, MMP2 그리고 MMP9 등의 발현을 증가시켜 암세포의 증식 및 침윤과 전이를 촉진시킨다고 알려져 있다(He *et al.*, 1998; Neth *et al.*, 2006; Neth *et al.*, 2007; Tetsu and McCormick, 1999). RPL이 암세포의 β -catenin 단백질 수준에 미치는 영향을 평가한 결과, RPL은 SW480, A549, MDA-MB-231, PC-3 및 AsPC-1에서 β -catenin 단백질 수준을 농도의존적으로 감소시켰고(Fig. 2A), 암세포의 β -catenin 단백질은 RPL처리 3시간째부터 감소하기 시작하였다(Fig. 2B). RPL의 β -catenin 수준 감소 유도활성이 β -catenin의 전사활성 조절에 기인한 것인지 평가하기 위해, RPL처리 24시간 후, 암세포의

β -catenin mRNA 발현을 조사하였다. 그 결과, RPL은 SW480, MDA-MB-231과 PC-3세포에서 β -catenin mRNA의 발현에는 영향이 없었으나, A549와 AsPC-1세포의 β -catenin mRNA 발현은 억제하는 것을 나타냈다(Fig. 2C). 그러나 RPL은 모든 암세포에서 cyclin D1 mRNA를 억제시켰다(Fig. 2C). 본 결과를 미루어 볼 때, RPL은 A549와 AsPC-1세포에서는 β -catenin mRNA 발현 억제를 통해 β -catenin 단백질을 감소시키고, SW480, MDA-MB-231과 PC-3세포에서는 β -catenin 단백질의 분해를 유도하는 것으로 판단된다.

RPL의 암세포에서 β -catenin 단백질 분해 유도 활성

비정상적인 Wnt 신호전달의 활성화 또는 β -catenin 및 β -catenin 파괴복합체의 체세포 유전자 돌연변이에 의한 β -catenin 단백질의 안정화는 종양형성을 유도한다고 알려져 있다(Johnson *et al.*, 2005; Morin *et al.*, 1997). 그리하여, β -catenin의 분해는 항암제 개발을 위한 중요한 분자타겟으로 여

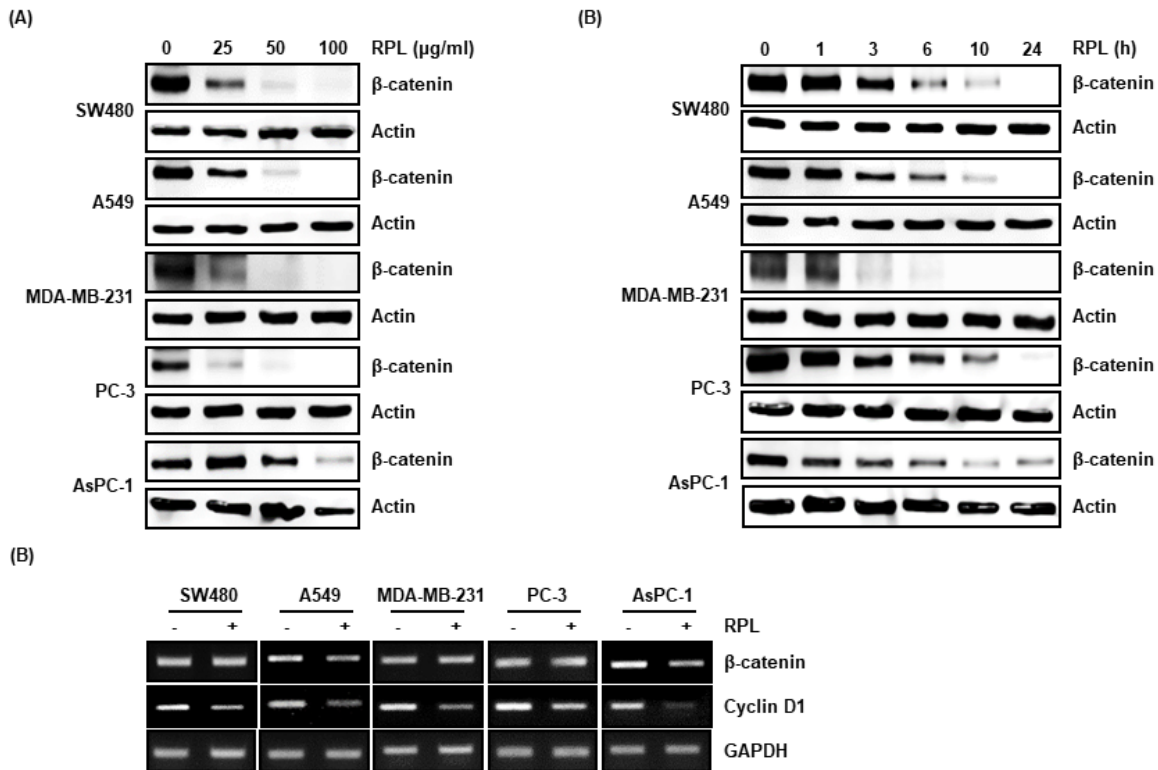


Fig. 2. Effect of RPL on β -catenin and cyclin D1 expression human cancer cells. (A) Human cancer cells were treated with RPL at the indicated concentrations for 24 h. (B) Human cancer cells were treated with RPL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for the indicated times. (A and B) Western blot analysis was performed against β -catenin. Actin was used as internal controls for Western blot. (C) Human cancer cells were treated with RPL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h. RT-PCR was performed against β -catenin or cyclin D1. GAPDH was used as internal controls for RT-PCR.

겨지고 있다(Shang *et al.*, 2017). RPL의 β -catenin 분해 유도 활성을 평가하기 위해, 각각의 암세포에 단백질 분해 억제제인 MG132를 2시간 전처리 후 RPL을 처리하여 Western blot을 활용하여 β -catenin 단백질을 확인한 결과, MG132가 처리되지 않은 세포에서는 RPL에 의한 β -catenin 단백질 수준 감소가 확인되었으나 MG132가 처리된 세포에서는 β -catenin 단백질의 감소가 나타나지 않았다(Fig. 3). 본 결과를 미루어 볼 때, RPL은 β -catenin의 단백질 분해를 유도하는 것으로 판단된다.

β -catenin의 분해는 GSK-3 β 에 의해 야기되는 β -catenin의 serine-45, threonine-41, serine-37 및 serine-33의 인산화로 개시되는데, 이것은 β -catenin의 유비퀴틴화-의존성 분해에 중요한 역할을 한다(Liu *et al.*, 2002). 그리하여, RPL의 β -catenin 분해 유도활성에 대한 GSK-3 β 의 영향을 평가하기 위해, 각각의 암세포에 GSK-3 β 억제제인 LiCl을 2시간 전 처리 후 RPL을 처리하여 Western blot을 활용하여 β -catenin 단백질을 확인한 결과, SW480, A549, PC-3 및 AsPC-1세포에서는 LiCl처리 유무에 관계없이 RPL은 β -catenin의 분해를 유도하였다(Fig. 3). 본 결과를 미루어 볼 때, SW480, A549, PC-3 및 AsPC-1세포에서의 RPL에 의한 β -catenin의 분해는 GSK-3 β 비의존성인 것으로 판단된다. 그러나 MDA-MB-231세포에서 LiCl의 처리는 RPL에 의해 유도되는 β -catenin의 분해를 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 3). 본 결과는 RPL은 MDA-MB-231

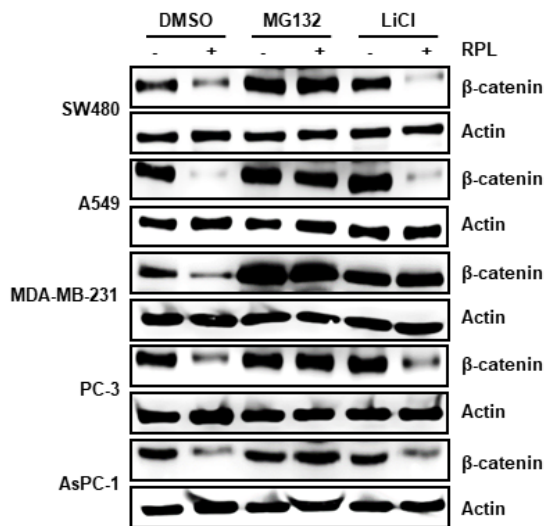


Fig. 3. Effect of RPL on β -catenin proteasomal degradation in human cancer cells. The cells were pretreat with 20 μ M of MG132 or 20 mM of LiCl for 2 h and then co-treated with RPL (100 μ g/mL) for 6 h. Western blot analysis was performed against β -catenin. Actin was used as an internal control.

세포에서 GSK-3 β 의 활성화를 유도하여 β -catenin의 분해를 야기하는 것으로 판단된다.

RPL의 MDA-MB-231세포에서 GSK-3 β 활성화를 통한 β -catenin 인산화 유도

MDA-MB-231세포에서 RPL이 GSK-3 β 의존적으로 β -catenin의 분해를 유도하는 것을 확인하였고, GSK-3 β 에 의한 β -catenin의 인산화는 β -catenin의 분해와 밀접한 관련이 있기 때문에(Li *et al.*, 2012) RPL의 β -catenin 인산화에 미치는 영향을 조사하였다. MDA-MB-231 세포에서 β -catenin의 인산화는 RPL처리 40분부터 급격하게 증가하였고(Fig. 4A), LiCl 처리에 의한 GSK-3 β 의 억제는 RPL처리에 의해 야기되는 β -catenin의 인산화를 억제시켰다(Fig. 4B). 또한 RPL은 GSK-3 β 의 활성형인 p-GSK-3 β 인산화를 유도하였다. 본 결과를 미루어 볼 때, RPL은 GSK-3 β 활성화 통해 β -catenin의 인산화를 유도하고, 이것은 RPL에 의한 β -catenin 분해와 관련이 있는 것으로 판단된다.

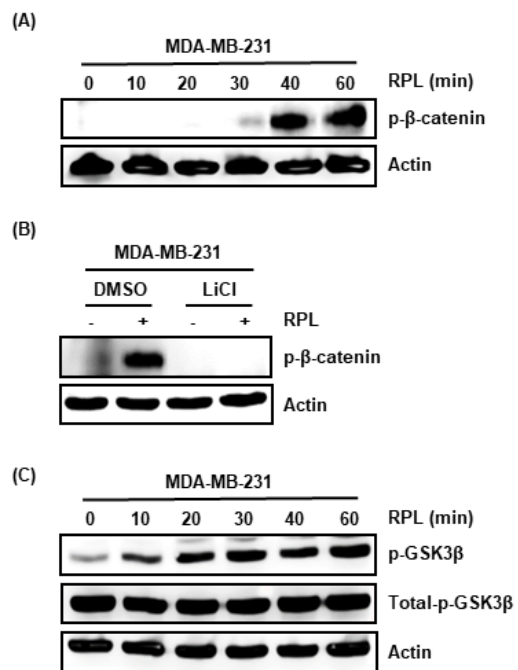


Fig. 4. Effect of RPL on β -catenin phosphorylation in MDA-MB-231 cells. (A and C) The cells were treated with RPL (100 μ g/mL) for the indicated times. (B) The cells were pretreat with 20 mM of LiCl for 2 h and then co-treated with RPL (100 μ g/mL) for 60 min. Western blot analysis was performed against p- β -catenin, p-GSK-3 β or GSK-3 β . Actin was used as an internal control.

적 요

이상의 연구 결과로 미루어 볼 때, 도깨비부채 잎(RPL)은 β -catenin의 분해 유도를 통해 대장암, 유방암, 폐암, 전립선암 및 췌장암 세포의 생육을 억제하는 것으로 나타났다. 본 결과는 도깨비부채 잎의 항암을 위한 대체보완소재 및 천연 항암제 개발을 위한 소재로 활용이 가능할 것으로 판단된다. 그러나 추가적 연구를 통해 도깨비 부채 잎의 항암 활성물질의 분석연구가 필요할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 한국연구재단 이공분야 기초연구사업 지역대학우 수과학자 지원사업(NRF-2016R1D1A3B03931713)과 중점연구 소지원사업(NRF-2018R1A6A1A03024862)의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

References

- Chin, Y.W., S.W. Lim, Y.C. Kim, S.Z. Choi, K.R. Lee and J. Kim. 2004. Hepatoprotective flavonol glycosides from the aerial parts of *Rodgersia podophylla*. *Planta Med.* 70:576-577.
- Chin, Y.W., E.Y. Park, S.Y. Seo, K.D. Yoon, M.L. Ahn, Y.G. Suh, S.G. Kim and J. Kim. 2006. A novel iNOS and COX-2 inhibitor from the aerial parts of *Rodgersia podophylla*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16:4600-4602.
- Choi, S.Y., N.J. Kang and H.C. Kim. 2006. Inhibitory effects of root extracts on melanin biosynthesis in *Rodgersia podophylla* A. Gray. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 14:27-30.
- He, T.C., A.B. Sparks, C. Rago, H. Hermeking, L. Zawel, L.T. da Costa, P.J. Morin, B. Vogelstein and K.W. Kinzler. 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281:1509-1512.
- Johnson, V., E. Volikos, S.E. Halford, E.T. Eftekhar Sadat, S. Popat, I. Talbot, K. Truninger, J. Martin, J. Jass, R. Houlston, W. Atkin, I.P. Tomlinson and A.R. Silver. 2005. Exon 3 beta-catenin mutations are specifically associated with colorectal carcinomas in hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *Gut* 54:264-267.
- Jung, K.W., Y.J. Won, H.J. Kong and E.S. Lee. 2018. Community of Population-Based Regional Cancer Registries. *Cancer statistics in Korea: incidence, mortality, survival, and prevalence in 2015.* *Cancer Res. Treat.* 50:303-316.
- _____. 2019. Prediction of cancer incidence and mortality in Korea, 2019. *Cancer Res. Treat.* 51:431-437.
- Kim, H.N., G.H. Park, J.D. Kim, S.B. Park, H.J. Eo and J.B. Jeong. 2019. Effect of the extracts from the leaves and branches of *Sageretia thea* on β -catenin proteasomal degradation in human colorectal and lung cancer cells. *Korean J. Plant Res.* 32:153-159.
- Kong, Y.H., P. Lee and S.Y. Choi. 2007. Action of *Rodgersia podophylla* root extracts on biosynthesis in skin. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 15:434-436.
- Li, V.S., S.S. Ng, P.J. Boersema, T.Y. Low, W.R. Karthaus, J.P. Gerlach, S. Mohammed, A.J. Heck, M.M. Maurice, T. Mahmoudi and H. Clevers. 2012. Wnt Signaling through Inhibition of β -Catenin Degradation in an Intact Axin1 Complex. *Cell* 149(6):1245-1256.
- Liu, C., Y. Li, M. Semenov, C. Han, G.H. Baeg, Y. Tan, Z. Zhang, X. Lin and X. He. 2002. Control of β -Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism. *Cell* 108:837-847.
- Morin, P.J., A.B. Sparks, V. Korinek, N. Barker, H. Clevers, B. Vogelstein and K.W. Kinzler. 1997. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275:1787-1790.
- Neth, P., C. Ries, M. Karow, V. Egea, M. Ilmer and M. Jochum. 2007. The Wnt signal transduction pathway in stem cells and cancer cells: influence on cellular invasion. *Stem Cell Rev.* 3:18-29.
- Neth, P., M. Ciccarella, V. Egea, J. Hoelters, M. Jochum and C. Ries. 2006. Wnt signaling regulates the invasion capacity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24:1892-1903.
- Nusse, R and H. Clevers. 2017. Wnt/beta-catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities. *Cell* 169:985-999.
- Shang, S., F. Hua and Z.W. Hu. 2017. The regulation of β -catenin activity and function in cancer:therapeutic opportunities. *Oncotarget.* 8:33972-33989.
- Tetsu, O. and F. McCormick. 1999. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398:422-426.

(Received 24 June 2019 ; Revised 23 August 2019 ; Accepted 27 August 2019)