韓藥作誌(Korean J. Medicinal Crop Sci.) 30(5) : 311 – 318 (2022)
ISSN(Print) 1225-9306
ISSN(Online) 2288-0186
http://www.medicinalcrop.org
http://dx.doi.org/10.7783/KJMCS.2022.30.5.311

천마 추출물을 처리한 간암 세포에서 Bcl-2, Bax 및 AMPKα 발현과 세포 자멸사에 미치는 영향 분석

박재현[1] · 강민호[2] · 홍지우[3] · 김소희[4] · 황윤선[5] · 박제훈[6] · 김진우[7,8†]

Effects of *Gastrodia elata* Blume on Apoptotic Cell Death of Liver Cancer Cells by Expression of Bcl-2, Bax, and AMPKα

Jae Hyun Park[1], Min Ho Kang[2], Ji Woo Hong[3], So Hee Kim[4], Yoon Seon Hwang[5], Jae Hoon Park[6] and Jin Woo Kim[7,8†]

Received: 2022 May 18
1st Revised: 2022 June 13
2nd Revised: 2022 July 12
3rd Revised: 2022 September 1
Accepted: 2022 September 1

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.

ABSTRACT

Background: This study was carried out to investigate the anticancer effects of *Gastrodia elata* Blume extract (GEE) in human hepatoma-derived Hep3B cells by apoptotic cell death.
Methods and Results: To evaluate the anticancer effect, a Hep3B cell viability assay and a real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) on GEE were performed, which was obtained extracted by ultrasound-assisted extraction and then used to treat the Hep3B cells. Cell viability was inhibited to 48.2% (4.0 ㎎/㎖). To identify anticancer mechanisms using qRT-PCR, mRNA expressions of B-cell lymphoma-2, its associated Bax protein, and 5'-AMP-activated protein kinase were examined with a comparative $\triangle C_T$ method. A qualitative analysis of the bioactive compounds in GEE was coducted using liquid chromatography tandem mass spectrometry, gastrodin and phloretin were identified as the two major compounds.
Conclusions: These findings demonstrate that GEE can decrease liver cancer cell viability and control apoptosis gene expression to have anticancer effects, GEE could be employed as a natural anticancer agent with less side effects than those of traditional anticancer medications.

Key Words: *Gastrodia elata* Blume, Anticancer, Cell Viability, Gene Expression, Hep3B, Real-time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

서 언

국내 통계청에서 발표한 사망원인 자료에 의하면 2021년 한국인의 3대 사망원인은 암, 심장 질환과 뇌혈관 질환으로 이 중에 암에 의한 사망은 27.4%로 사망률이 전년 대비 1.2% 증가하여 해마다 사망률이 증가하는 질병 중 하나이다 (SK, 2021).

암은 세포신호경로 변성으로 인해 비정상적 세포의 증식이 일어나는 과정과 세포 내 세포 자멸사가 정상적으로 이루어지지 않을 때 발생하는 질병으로 보고된다. 특히 암 사망률 중 1 위를 차지하는 간암은 자각증세가 없어 조기 진단이 어려울 뿐만 아니라 사망률이 10 만 명당 22.6 명이며 5 년 평균 생존율이 35.6%로 예후가 불량한 질환으로서 예방과 항암치료에 대한 연구의 필요성이 높아지고 있다 (Stuver, 1998; Montalto *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2016).

†Corresponding author: (Phone) +82-41-530-2226 (E-mail) kimjw1028@sunmoon.ac.kr
[1]선문대학교 식품과학과 학사과정생 / Bachelor's degree student, Department of Food Science, Sunmoon University, Asan 31480, Korea.
[2]선문대학교 식품과학과 학사과정생 / Bachelor's degree student, Department of Food Science, Sunmoon University, Asan 31480, Korea.
[3]선문대학교 응용생물과학과 석사과정생 / Master's degree student, Department of Applied Biological Science, Sunmoon University, Asan 31480, Korea.
[4]선문대학교 식품과학과 학사과정생 / Bachelor's degree student, Department of Food Science, Sunmoon University, Asan 31480, Korea.
[5]선문대학교 식품과학과 학사과정생 / Bachelor's degree student, Department of Food Science, Sunmoon University, Asan 31480, Korea.
[6]선문대학교 식품과학과 학사과정생 / Bachelor's degree student, Department of Food Science, Sunmoon University, Asan 31480, Korea.
[7]선문대학교 식품과학과 교수 / Professor, Department of Food Science, Sunmoon University, Asan 31480, Korea.
[8]프렉스프로 대표이사 / CEO, FlexPro Biotechnology, Asan 31480, Korea.

항암치료의 가장 중요한 전략 중 하나인 세포 자멸사 (apoptosis)는 스트레스에 노출된 숙주세포의 역분화 및 암화를 방지하기 위해 성장인자의 발현과 동시에 노화와 사멸이 활성되어 암화가 진행된 비정상적 세포들을 제거하여 암을 방지하는 중요한 방어기전이다. 이는 암세포만을 특이적으로 사멸시키는 방법으로 세포 손상, 산화적 스트레스, 자외선, 바이러스 및 산소결핍에 의해 발생되는 내인적 세포 자멸사 (intrinsic apoptosis)와 tumor necrosis factor-α (TNFα), Fas cell surface death receptor (FAS) 및 TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) 등의 사이토카인이 유도하는 외인적 세포 자멸사 (extrinsic apoptosis)와 구별된다 (Alnemri, 1997; Jin and El-Deiry, 2005).

세포 자멸사 기작에 있어 주요 암 지표 유전자인 B-cell lymphoma-2 (Bcl-2)는 백혈구의 T-세포가 분비하는 사이토카인 면역 유전자로 세포 자멸사를 조절한다고 알려져 있다 (Zhao *et al.*, 2001). 특히 미토콘드리아의 외막과 결합 부위를 가진 Bcl-2는 세포질에서 미토콘드리아 외벽으로 이동하여 미토콘드리아 막의 투과성을 감소시켜 사이토크롬 C의 세포질 분출을 막아 DNA 분해효소인 caspase-activated DNase (CDA) inhibitor의 비활성화를 통해 세포 자멸사를 억제시킨다 (Hockenbery *et al.*, 1990; Hong *et al*., 2012).

이와 대응하는 Bcl-2 associated X Protein (Bax)는 미토콘드리아 막을 통해 Bcl-2와 결합하여 Bcl-2/Bax 복합체를 형성하며 Bcl-2를 저해시켜 길항적으로 조절하는 역할을 수행한다. 이러한 Bcl-2 계통 유전자 발현은 인체 내 세포 자멸사 억제를 통한 발암 과정에서 중요한 역할을 하여 항암 표적에 중요한 기전으로 보고된다 (Korsmeyer *et al.*, 1993; Okada *et al.*, 2001).

또한, 암의 세포 자멸사 유도 유전자인 AMP-activated protein kinase (AMPK)는 저산소증, 영양분 결핍과 열충격에 의해 세포 내 ATP가 결핍될 때 에너지 수신호자 역할을 하며 에너지 소비 경로를 억제하고 생성 경로 활성화를 유도한다 (Soung *et al.*, 2005; Borger *et al.*, 2008). 특히 AMPKα는 에너지 소비 경로 억제와 생성 경로 활성화를 조절을 하여 세포 자멸사를 유도하기 위한 유전자 지표로서 세포 자멸사 기작에서 AMPK 신호전달 경로의 중요성이 강조되고 있다 (Koh and Chung, 2007; Kim *et al*., 2019).

천마 (*Gastrodia elata* Blume)는 다년 초본 식물로 페놀 유도체인 gastrodin, gastrodigenin과 *p*-hydroxybenzyl alcohol 등의 생리활성 물질이 함유되어 있다고 알려져 있으며 항산화, 항염 및 진통 등의 생리활성이 높은 것으로 보고된다 (Zhishen *et al.*, 1999; Lee *et al*. 2021).

천마의 항암효과에 대한 Heo 등 (2006)의 연구에서는 피부암 세포에 천마 추출물을 처리하여 운동성을 측정한 결과 5 배 저해되었으며 이 과정에서 암전이의 핵심 인자인 Bcl-2 발현을 억제시켜 천마 추출물이 암전이 방지에 영향을 주는 것으로 보고된다 (Yoon and Lee, 2009; Kim *et al.*, 2021).

또한, Wang 등 (2020)의 연구에서는 신경계 악성종양 세포인 B35에 천마 추출물 투여시 세포 자멸사율이 2 배 증가하여 종양이 암으로 변이 되는 것을 방지한다고 보고되었다. 이러한 천마는 항암 소재로서의 활용 가능성에 대한 연구가 진행되어 왔으나 간암 세포에서 천마 추출물의 항암능 및 세포 자멸사를 평가하는 연구는 미비한 실정이다.

특히 현대에서는 암을 치료하기 위해 합성 항암제를 사용하거나 치료효능과 비례하여 독성 및 부작용이 정상 세포에 악영향을 미치므로 부작용이 최소화된 천연물 유래 항암제의 수요가 증가하고 있으며 이에 본 연구에서는 천마로부터 항암제 소재 개발에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다 (Ernst and Cassileth, 1998; Festuccia *et al*., 2005).

따라서 본 연구는 천마 추출물을 인간 유래 간암 세포주인 Hep3B에 처리하여 암세포 성장 저해와 간암 세포 자멸사 유전자인 Bcl-2, Bax와 AMPKα 발현에 미치는 영향을 qRT-PCR을 이용해 유전자 발현을 확인하고 천마 추출물의 주요물질을 분석하여 천연물 유래의 간암 세포 자멸사 소재로서 활용 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

천마 (*Gastrodia elata* Blume)는 무주농협 (Muju, Korea)에서 건조물을 구매해 사용하였고 추출을 위해 99.5% (v/v) 에탄올과 1차 증류수를 혼합하여 용매로 사용하였다.

천마로부터 생리활성 물질 추출을 위해 천마 1.0 g에 50% 에탄올 10 ㎖를 가하고 초음파 추출기 (SD-D250H, JAC Ultrasonic, Hwaseng, Korea)를 이용해 40.0 ㎑의 연속파로 60℃에서 30분간 추출을 진행하였다.

추출물의 고액분리를 위해 원심분리기 (LoboGene 1236R, Gyrozen, Gimpo, Korea)를 이용하여 4℃에서 5 분간 10,000 rpm으로 상등액을 분리한 후 냉동 보관하여 필요에 따라 희석하여 사용하였다.

2. 세포 배양

천마 추출물이 암세포에 미치는 영향을 평가하기 위해 인간 신장 세포 (HEK-293)와 인간 간암 세포 (Hep3B)를 한국 세포주 은행 (Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였으며 세포 배양을 위해 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin은 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구매하여 사용하였다.

세포 배양기에는 1% (v/v)의 penicillin과 10% (v/v)의 FBS

가 혼합된 DMEM을 사용하였고 온도는 37℃로 고정하였으며 5% CO_2가 공급되는 CO_2 배양기 (MCO-18AIC, Sanyo Electric Co., Ltd., Osaka, Japan)를 사용하여 배양하였다. 세포 배양 진행은 세포 배양 플라스크에 간암 세포를 5.0×10^4 cells/well로 분주한 후 24 시간 주기로 세포를 확인하고 계대배양을 진행하였다.

3. 간암 세포 성장 저해 측정

천마 추출물이 간암 세포 성장 저해에 미치는 영향을 확인하기 위해 간암 세포주를 180 ㎕씩 96 well plate에 1.0×10^4 cells/well 분주 후 CO_2 배양기에서 상기 조건으로 24 시간 배양하였다. 이후 DMEM을 제거한 뒤 추출물을 농도별로 희석하여 20 ㎕씩 plate에 분주하여 72 시간 배양 후에 MTT 시약 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 0.25 ㎎/㎖로 PBS에 용해시켜 DMEM와 혼합하여 플레이트 분주 후 4 시간 반응 한 뒤 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 100 ㎕를 분주하고 마이크로 플레이트 리더기 (AMR-100, Allsherng, Seoul, Korea)를 이용해 540 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 대조군과 천마 추출물 첨가군의 흡광도를 계산해 아래의 식에 따라 세포 생존율을 산출하였다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

A : 천마 추출물 첨가구의 흡광도 (실험군)
B : DMEM 첨가구의 흡광도 (대조군)

4. 간암 세포 자멸사 유전자 발현 분석

천마 추출물 처리한 간암 세포 자멸사 유전자의 발현량을 분석하기 위해 간암 세포를 1.0×10^6 cells/well로 96 well plate에 분주한 뒤 24 시간 배양 후 천마 추출물을 0.0 ㎎/㎖ - 0.5 ㎎/㎖의 수준으로 처리하였다.

그 후 세포를 회수하고 AccuPrep® Universal RNA Extraction Kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 total RNA를 추출한 뒤 NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)로 total RNA 양을 측정하였다. cDNA 합성은 Step One Plus™ real-time PCR system (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)에서 amfiRivert cDNA Synthesis Platinum Master Mix (GenDEPOT, Barker, TX, USA)를 이용하여 수행하였다.

합성한 cDNA 2.0 ㎕와 PowerUP™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) 10.0 ㎕를 혼합한 뒤 β-actin과 간암 세포 자멸사 유전자인 Bcl-2, Bax와 AMPKα 프라이머를 각각 1.0 ㎕씩 첨가하고 diethylpyrocarbonate (DEPC)로 최종부피가 20.0 ㎕가 되도록 조정한 후 초기 변성 95℃에서 10 분, 변성 반응 95℃에서 15 초, 그리고 결합 반응 60℃에서 1 분, 그리고 신장 반응 72℃에서 30 초로 60 회 qRT-PCR을 진행하였다.

Table 1. Primer sequences of Bax, Bcl-2, AMPKα and β-actin for evaluating liver cancer-related gene expressions using qRT-PCR.

Target	Primer	Sequence (5′→ 3′)
Bax	Forward	CTC CCC CCG AGA GGT CTT T
	Reverse	TCC CGG AGG AAG TCC AAT G
Bcl-2	Forward	CAT GTG TGT GGA GAG CGT CAA
	Reverse	GAC AGC CAG GAG AAA TCA AAC AG
AMPK α	Forward	TCT GGA GCT GTG GTG TTA TCT TG
	Reverse	GAC AGC CAG GAG AAA TCA AAC AG
β-actin	Forward	TGG CAT TGC CGA CAG GAT
	Reverse	GGG CCG GAC TCG TCA TAC T

프라이머는 최적화된 프로그램인 Primer Express 3.0.1 (Life Technologies, Framingham, MA, USA)로 설계하였고 염기서열은 Table 1에 나타내었다. 분석법은 comparative C_T method를 이용하였으며 산출된 C_T를 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 법을 통해 각 유전자에 대한 상대정량을 실시하였다 (Kenneth and Thomas, 2001).

$$\triangle C_T = [C_T\,(\text{목적유전자}) - C_T\,(\text{대조군유전자})]$$

$$2^{-\triangle\triangle \mathrm{CT}} = \frac{1^{\Delta CT} = [C_T\,(\text{목적유전자}) - C_T\,(\text{대조군유전자})]}{2}$$

목적 유전자 : Bcl-2, Bax와 AMPKα의 각 C_T와 $\triangle C_T$
대조군 유전자 : β-actin의 각 C_T와 $\triangle C_T$

5. 천마 추출물 주요물질 분석

천마 추출물에 포함된 주요물질 분석을 위해 LC-MS/MS를 이용하여 분자량 분포에 따른 정성분석을 진행하였으며 사용된 이동상인 formic acid와 acetonitrile (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)은 HPLC 등급 제품을 사용하였다.

시료 준비를 위해 천마 추출물은 10 ㎕의 샘플을 주입하고 0.22 ㎛의 공극 크기를 가진 실린지 필터 (Hyundai Micro Co., Anseong, Korea)로 여과한 후 Roc™ C18 컬럼 (3.0 ㎜ × 150 ㎜, Restek Co., Bellefonte, PA, USA)을 장착한 LC-MS/MS (Finnigan TSQ Quantum, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 주요물질 검출을 진행하였고 이동상 및 온도 등의 조건을 Table 2에 나타내었다.

질량 분석기에서는 시료에 에너지를 가하여 이온화시키는 전자분무 이온화 (electrospray ionization, ESI) 방법의 양이온 모드를 운전조건으로 설정하였으며 질량 스펙트럼 정보의 질량 대 전하 비를 50 m/z에서 800 m/z까지 설정한 전체 스캔

Table 2. LC-MS/MS operating condition and mobile phase composition for an3alysis of major compounds in GEE analysis.

Operating condition		
Specific charge	50 m/z - 800 m/z	
Column temperature	30℃	
Injection volume	10 ㎕	
Mobile phase A	1% (v/v) formic acid/distilled water	
Mobile phase B	1% (v/v) formic acid/acetonitrile	
Flow rate	0.2 ㎖/min	
Running time	20 min	
Gradient Profile		
Time	A	B
0 min	95.0%	5.0%
11 min	0.0%	100.0%
14 min	95.0%	95.0%
15 min	95.0%	95.0%
20 min	95.0%	95.0%

모드 (full scan mode)를 통해 질량 스펙트럼을 수집하였다.

6. 통계 분석

모든 실험은 3 회 반복 수행하여 결과값을 평균 ± 표준편차로 표시하였으며 GraphPad Prism Software (San Diego, CA, USA)을 사용하여 통계 처리를 실시하였다. 실험군 간 유의성 평가는 One-Way ANOVA로 실험군 간의 통계적 유의성을 $p < 0.05$ 기준으로 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 천마 추출물이 간암 세포 성장에 미치는 영향

천마 (*Gastrodia elata* Blume) 추출물의 간암 세포 성장 저해를 확인하기 위해 천마 추출물을 0.0 ㎎/㎖에서 4.0 ㎎/㎖ 까지의 농도로 처리하여 세포 성장을 비교하였을 때 신장 세포에서 처리 최대농도인 4.0 ㎎/㎖ 까지 세포 성장 저해가 없었으나 간암 세포에서는 농도 의존적으로 세포 성장이 저해되며 특히 1.0 ㎎/㎖ 이상의 농도에서 세포 성장에 유의한 저해 효과가 확인되었다 ($p < 0.05$). 또한, 천마 추출물을 4.0 ㎎/㎖의 수준으로 처리 시 대조군과 비교하여 48.2%의 수준으로 간암 세포 성장을 감소시키는 것을 확인하였다 (Fig. 1).

천마 추출물 성분분석 및 *in vitro* 생리활성에 관한 이전 연구에 따르면 천마 추출물을 1.0 ㎎/㎖의 농도 수준으로 처리한 경우 간암 세포주 (Hep3B)를 비롯한 4 종의 암 세포주에 대한 생장을 저해할 수 있음이 확인된 바 있다 (Kim *et al*., 2002). 이는 본 연구에서 적용한 농도인 4.0 ㎎/㎖ 보다 낮은

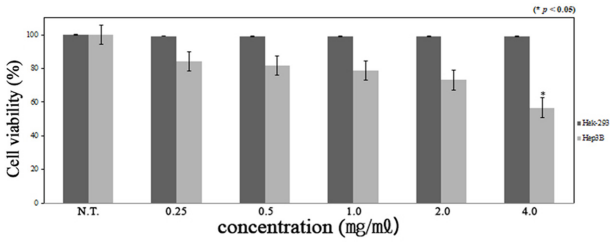

Fig. 1. Inhibitory effects of different concentrations of GEE extract on HEK-293 and Hep3B. Hep3B cells were treated with indicated concentrations of GEE in DMEM for 24 hours. Cell viability was evaluated using the MTT Assay. GEE suppresses proliferation of Hep3B cells in a dose dependent manner above 1.0 ㎎/㎖. All values are expressed as means ± SD (n = 3). Each value is a means ± SE (n = 3). *Different letters are significantly different at 5% by One-Way ANOVA ($p < 0.05$).

농도로, 본 연구에서는 50% 에탄올을 용매로 한 추출물을 사용한 반면 Kim 등 (2002)의 연구에서는 천마 분말과 증류수를 1 : 10으로 혼합한 후 90℃ - 95℃에서 8 시간 환류 추출 및 동결건조 후 사용하였기 때문에 추출 용매의 변화에 따른 차이로 생각되어진다.

천마로부터 유용물질 추출에 있어 추출 부위, 건조 방법 및 증자 여부는 천마의 주요물질인 gastrodin과 4-hydroxybenzyl alcohol 함량에 많은 영향을 미치는 것으로 보고되었다 (Choi *et al*., 2011). 또한, 천마와 같은 약용작물은 추출용매의 종류에 따라 주요물질 추출에 영향을 받는다고 알려져있으며 Kim 등 (2007)의 연구에서는 가자, 정향 등의 약용작물은 에탄올과 아세트산에틸 등 용매와 추출법 따라 추출 효율에 유의한 차이가 있고, 동일 약용작물을 다른 용매로 추출하여 항산화 활성을 측정한 결과 열수 추출보다 에탄올을 용매로 사용하였을 때의 항산화 활성이 23% 증가하였다고 보고되었다.

따라서 본 실험은 농축하지 않은 50% 에탄올 추출물을 시료로 사용하였기에 Kim 등 (2002)의 연구에서 사용된 농축한 동결건조 시료 대비 더 높은 농도인 4.0 ㎎/㎖에서 세포 저해능이 있는 것으로 생각되어진다.

2. 간암 세포 자멸사 유전자 발현 분석

천마 추출물의 성장 저해에서 유의성이 나타나지 않는 농도에서 세포 자멸사 유전자 발현을 평가하고자 0.0 ㎎/㎖ 에서 0.5 ㎎/㎖ 의 수준으로 천마 추출물을 처리한 후 qRT-PCR을 통해, Bcl-2, Bax와 AMPKα의 발현을 확인하고자 하였다.

천마 추출물을 0.5 ㎎/㎖ 처리 시 Bcl-2는 대조군 대비 △△C_T가 -1.56이 나왔으며 동시에 Bax의 △△C_T의 수치는 -17.05로 대조군에 비해 발현량이 크게 증가함을 확인하였으며 전체적인 comparative C_T는 Fig. 2에 나타내었다. 이는 Bcl-2/Bax 이형 복합체 형성에 있어서 Kang 등 (2005)의 골육종에서 세포 자멸사 관련 유전자인 survivin, Bcl-2와 Bax

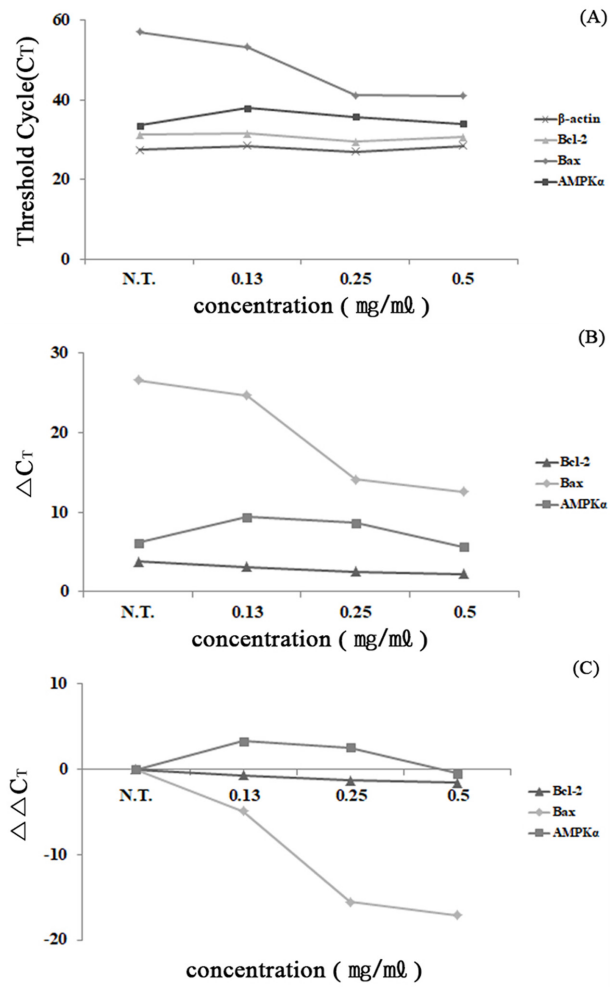

Fig. 2. The expression analysis value of each gene expression relative quantified by the comparative $\triangle C_T$ Methods. Using the $2^{-\triangle\triangle CT}$ method of Kenneth and Thomas, (2001). $\triangle C_T$ and $\triangle\triangle C_T$ were calculated for the C_T values of each of the interest of genes (Bax, Bcl-2, and AMPKα), and endogenous gene (β-actin). [1)]NT; template was used as a control group. (A) is C_T, (B) is $\triangle C_T$ and (C) is $\triangle\triangle C_T$.

발현 연구에서 Bcl-2가 증가함에 따라 CAD의 비활성화로 Bcl-2와 비례하게 Bax의 발현량도 증가하였다는 연구 결과와 일치하며 간암 세포에서 성장 저해가 일어남에 따라 Bcl-2의 발현량이 증가함과 동시에 이에 대응하여 Bax가 Bcl-2의 발현을 억제시키는 결과로 해석된다.

또한, AMPKα는 0.125 ㎎/㎖ 에서 0.250 ㎎/㎖ 의 범위에서는 유전자 발현량이 감소하였으나 0.500 ㎎/㎖ 에서는 대조군 대비 $\triangle\triangle C_T$ –0.49가 나타났으며 이는 0.500 ㎎/㎖에서 Bcl-2와 Bax의 발현량이 비례적으로 증가함에 따라 AMPK 에너지 생성 경로가 활성화되어 증가된 것으로 판단되어진다 (Fogarty and Hardie, 2010).

이러한 유전자 기작은 발현되면서 세포 자멸사의 자극 여부 전·후와 미토콘드리아 사멸이 진행되고 말기 규제 완화 단계 총 4 단계에 각 역할을 수행하며 이 단계 중 미토콘드리아 내·외부와 크리스테 (cristae) 소기관에 유전자 기작으로 인해 전자의 이동으로 세포 자멸사가 조절된다 (Scorrano and Korsmeyer, 2003). 이를 통한 포스파티딜셀린 (phosphatidylserine, PS)이 세포 자멸사 중 세포막 바깥으로 노출되며 아넥신 V (Annexin V) 단백질과 특이적으로 결합하는 기작을 이용한 유세포 분석법 (flow cytometric analysis)을 이용하여 향후 세포 자멸사를 분석 후 Bcl-2와 Bax의 사이토크롬 C 전자 방출 분석에 대한 연구가 추가적으로 필요할 것으로 생각된다 (Vermes *et al.*, 2000).

3. 천마 추출물의 주요 물질 분석

간암 세포를 이용한 qRT-PCR 실험에서 간암 세포 자멸사 유전자 발현량 증감을 확인하였고 이에 간암 세포 내 천마 추출물의 영향을 주는 주요 물질을 탐색하고자 LC-MS/MS를 이용한 천마 추출물의 정성분석을 수행하였다. 양성자 모드 (positive mode)로 m/z를 측정하였을 때 3.8 및 2.9 분에서 각각 m/z 309 및 276에서 분자이온 피크가 확인되었으며 분자량 물질 탐색에 있어 m/z 309 $[M+Na]^+$ gastrodin (m/z 286) 및 $[M+2H]^+$ m/z 276 $[M+Na]^+$ phloretin (m/z 274)이 주요 물질로 검출되었다 (Fig. 3).

천마의 주요 폴리페놀 화합물인 gastrodin은 식물의 뿌리에서 발견되는 폴리페놀 화합물인 gastrodigenin의 글루코사이드 화합물로서 뉴런 보호, 항염증과 항산화 등의 효능을 가지는 것으로 알려져 있다 (Liu *et al.*, 2020). 또한, gastrodin과 동일한 생리활성을 가지는 *p*-hydroxybenzyl alcohol와는 달리 gastrodin은 추출을 위한 가공공정에서 높은 열 안정성을 가지면서 생리효능을 유지하는 물질로 알려져 있어 천연물 소재 항암제로 활용되기 적합한 물질이다 (Lv *et al.*, 2021).

이는 gastrodin의 항암 효과 평가를 진행한 Shu 등 (2013)의 연구에서 95% 에탄올로 천마의 유효 성분인 gastrodin을 추출하고 감압 농축하여 시료로 사용하였다. 그 후 gastrodin 추출물 15.0 - 150.0 ㎎/㎏ 을 H22 간암 세포를 피하 주사하여 암화된 쥐에 투여 후 종양을 적출하여 무게를 측정하였을 때, 종양 무게가 대조군 대비 gastrodin 150.0 ㎎/㎏ 투여군에 12% 감소되었다고 보고된다.

이후 간암이 유발된 쥐에게 gastrodin 추출물을 15.0 - 150.0 ㎎/㎏ 처리한 후 간 종양을 적출하여 무게를 측정하였다. 그 결과 gastrodin 투여군에서 종양 무게가 대조군 대비 12% 감소되어 gastrodin의 항암 효과를 입증하였다.

또한, qRT-PCR 진행하여 자가 항상성 유지하여 암화를 방지하는 T 세포인 CD+4에서 Bcl-2와 Bcl-xL의 발현을 확인한 결과 대조군 대비 gastrodin 투여군에서 Bcl-2와 Bcl-xL 발현이 각각 4 배와 5 배 증가해 CD+4 T 세포의 생존도가

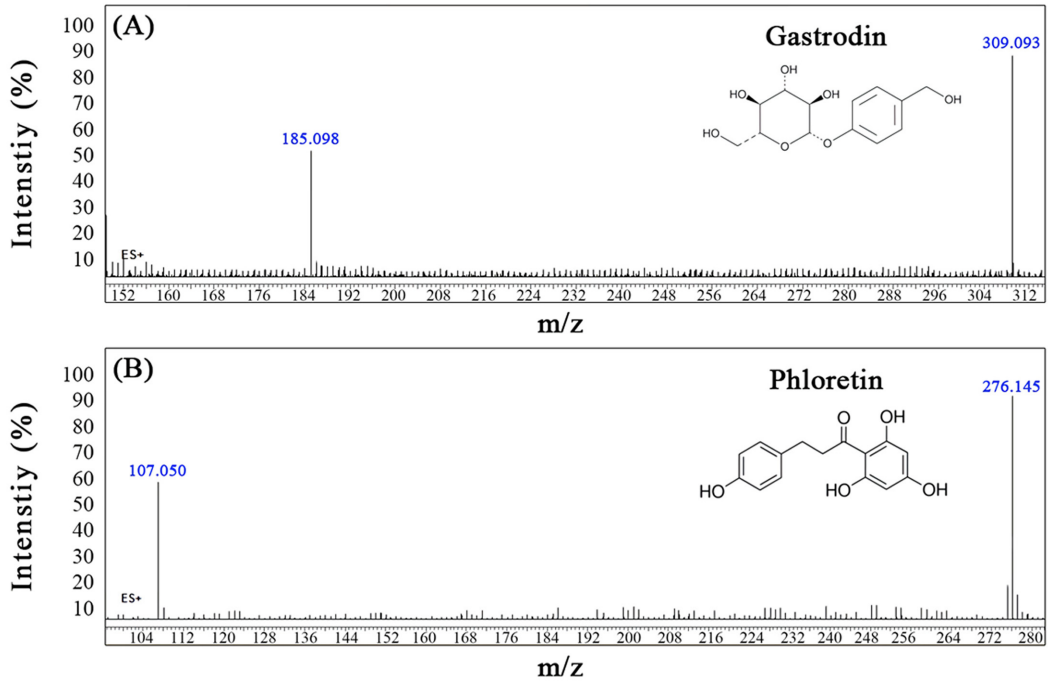

Fig. 3. Spectra of LC-MS/MS fragmentation patterns of polyphenols including gastrodin and phloretin form GEE. The following is the spectra of LC-MS/MS, which were analyzed by GEE in positive mode, (A) is gastrodin (m/z 309), and (B) is phloretin (m/z 276).

향상되었다는 연구결과가 보고되어 gastrodin의 항암 효과를 입증하였다 (Kim *et al*., 2007).

폴리페놀의 일종인 phloretin은 항염증에 높은 생리활성 효과가 있으며 (Huang *et al*., 2017), 인간 식도 편평 상피암 세포인 EC-109를 대상으로 60 ㎍/㎖에서 80 ㎍/㎖ 까지의 농도 수준으로 phloretin을 처리한 후 유세포 분석을 진행한 결과, phloretin의 농도가 높아질수록 인간 식도 편평 상피암 세포의 세포 자멸사가 농도 의존적으로 증가하며 세포 자멸사와 관련된 단백질의 발현에 있어 p53, Bax의 경우는 phloretin에 의해 단백질 발현이 증가한 반면 Bcl-2의 발현은 감소하였다는 연구 결과가 보고된 바 있다 (Duan *et al*., 2017).

또한, 급성염증과 만성염증은 세포 증식과 돌연변이를 유도하고 혈관신생을 촉진하여 세포 자멸사를 억제하는 등 암이나 악성 종양으로 인해 조절되지 않은 세포의 성장, 혈액과 림프계를 통한 다양한 기관들로 전이하나 phloretin을 처리하게 되면 암을 유도하는 염증을 방지하는 것은 물론 암의 전이를 방지할 수 있는 효과가 있다고 하였다 (Lee and Choi, 2013).

기존 연구자들의 보고 및 본 연구를 통해 천마 추출물의 주요 물질인 gastrodin 및 phloretin은 간암 세포 성장 저해와 세포 자멸사 주요조절 유전자인 발현에 영향을 미치며 특히 미토콘드리아 막과 세포내 소체막에 존재하는 Bcl-2가 막의 이온 통로를 형성하여 투과성 변화를 조절하여 Ca 이온의 항상성을 조절함에 따라 세포사멸을 억제하며 천마 추출물의 농도가 높아질수록 증가하는 Bcl-2의 발현도에 따라 대응 유전자인 Bax의 발현량이 높아지는 것으로 확인되었다. 또한, Bcl-2와 Bax의 발현량 증가에 따라 AMPK 에너지 생성 경로 활성으로 AMPKα의 발현에 영향을 미치는 것으로 사료된다 (Han *et al*., 2019).

이에 본 연구에서는 천마 추출물의 농도에 따른 Bcl-2 발현량을 확인하고자 하였으며, 그 결과 천마 추출물의 농도가 증가할수록 Bcl-2와 Bax의 발현량이 증가하는 것을 확인하였다. 또한, AMPKa의 발현량 증가를 확인함으로써 Bax의 발현량 증가가 AMPK 에너지 생성 경로를 활성화시켜 AMPKa의 발현을 증가시킨다는 Han 등 (2019) 등의 연구를 재입증하였다.

이러한 결과를 바탕으로 본 연구에서는 천마 열수 추출물의 세포 자멸사 유전자 및 항암능 평가를 통해 기존 합성 항암제의 부작용을 대체하기 위해 천연물 유래 항암제의 원료로써 사용 될 수 있는 가능성을 제시하였다.

REFERENCES

Alnemri ES. (1997). Mammalian cell death proteases: A family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. Journal of Cellular Biochemistry. 64:33-42.

Borger DR, Gavrilescu LC, Bucur MC, Ivan M and DeCaprio JA. (2008). AMP-activated protein kinase is essential for survival in chronic hypoxia. Biochemical and Biophysical Research

Communications. 370:230-234.

Choi YJ and Jung KI. (2016). Anti-diabetic, alcohol-metabolizing, and hepatoprotective activities of moringa(*Moringa oleifera* Lam.) leaf extracts. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 45:819-827.

Duan H, Wang R, Yan X, Liu H, Zhang Y, Mu D, Han J and Li X. (2017). Phloretin induces apoptosis of human esophageal cancer *via* a mitochondria-dependent pathway. Oncology Letters. 14:6763-6768.

Ernst E and Cassileth BR. (1998). The prevalence of complementary/alternative medicine in cancer: A systematic review. Cancer. 83:777-782.

Festuccia C, Angelucci A, Gravina GL, Biordi L, Millimaggi D, Muzi P, Vicentini C and Bologna M. (2005). Epidermal growth factor modulates prostate cancer cell invasiveness regulating urokinase-type plasminogen activator activity. Thrombosis and Haemostasis. 93:964-975.

Fogarty S and Hardie DG. (2010). Development of protein kinase activators: AMPK as a target in metabolic disorders and cancer. Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Proteins and Proteomics. 1804:581-591.

Han X., Shi H, Liu K, Zhong L, Wang F and You Q. (2019). Protective effect of gastrodin on myocardial ischemia-reperfusion injury and the expression of Bax and Bcl-2. Experimental and Therapeutic Medicine. 17:4389-4394.

Heo JC, Park JY, An SM, Lee JM, Yun CY, Shin HM, Kwon TK and Lee SH. (2006). Anti-oxidant and anti-tumor activities of crude extracts by *Gastrodia elata* Blume. Korean Journal of Food Preservation. 13:83-87.

Hockenbery D, Nuñez G, Milliman C, Schreiber RD and Korsmeyer SJ. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature. 348:334-336.

Hong JH, Min SH, Lee E, Son HH, Yeon JY, Park HD and Koo DB. (2012). Effect of Bcl-2 inhibitor treatment on embryo developmental competence, apoptosis and ER-stress in pigs. Reproductive and Developmental Biology. 36:167-172.

Huang WC, Fang LW and Liou CJ. (2017). Phloretin attenuates allergic airway inflammation and oxidative stress in asthmatic mice. Frontiers in Immunology. 8:134. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00134/full (cited by 2022 April 3).

Jin Z and El-Deiry WS. (2005). Overview of cell death signaling pathways. Cancer Biology and Therapy. 4:147-171.

Kang HG, Kim HS, Lee MR, Seol SM, Oh JH, Lee SH and Kang GH. (2005). Expressions of apoptotic genes(survivin, Bcl-2, Bax) and clinical relevance in osteosarcoma. Journal of the Korean Bone and Joint Tumor Society. 11:118-125.

Kim EJ, Kim GT, Kim BM, Lim EG, Ha SH, Kim SY and Kim YM. (2016). Apoptotic effect of extract from *Artemisia annua* Linné by Akt/mTOR/GSK-3β signal pathway in Hep3B human hepatoma cells. Journal of Life Science. 26:764-771.

Kim ES, Jung HW, Choi JI, Nam-Goong IS, Hong SH and Kim YI. (2007). Suppression of pathogenic autoreactive CD4+ T cells by CD137-mediated expansion of CD4+ CD25+ regulatory T cells in Graves' Disease. Journal of Korean Endocrine Society. 22:332-338.

Kim JS, Kong CS, Sim HB and Seo YW. (2021). Anti-invasive effect of *Artemisia scoparia* halophyte extract and its solvent-partitioned fractions in human fibrosarcoma cells. Journal of Life Science. 31:1100-1109.

Kim KD and Kim SJ. (2007). The study on the efficacy of herbal plant extracts by the part and solvent extraction. Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea. 33:127-135.

Kim MY, HwangBo H, Ji SY, Hong SH, Choi SH, Kim SO, Park C and Choi YH. (2019). Relationship between reactive oxygen species and adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling in apoptosis induction of human breast adenocarcinoma MDA-MB-231 cells by ethanol extract of *Citrus unshiu* peel. Journal of Life Science. 29:410-420.

Koh HJ and Chung JK. (2007). AMPK links energy status to cell structure and mitosis. Biochemical and Biophysical Research Communications. 362:789-792.

Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE and Oltvai ZN. (1993). Bcl-2/Bax: A rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. Seminars in Cancer Biology. 4:327-332.

Lee HG, Kim GN, Park DJ, Lee SY and Jin MH. (2021). Studies on antioxidant, anti-inflammation and moisturizing activities of *Gastrodia elata* flower extract. Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea. 47:219-226.

Lee MS, Oh WK, Bae EY, Ahn SC, Sohn CB, Osada H and Ahn JS. (2002). The VHR dual-specificity protein tyrosine phosphatase (DS-PTPase) inhibitor isolated from *Gastrodia elata*. Korean Journal of Food Science and Technology. 34:505-509.

Lee SH and Choi YH. (2013). Link between periodontal disease and cancer: A recent research trend. Journal of Life Science. 23:602-608.

Liu XC, Wu CZ, Hu XF, Wang TL, Jin XP, Ke SF, Wang E and Wu G. (2020). Gastrodin attenuates neuronal apoptosis and neurological deficits after experimental intracerebral hemorrhage. Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases. 29:104483. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1052305719305671 (cited by 2022 April 3).

Livak KJ and Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. Methods. 25:402-408.

Lv Y, Cao H, Chu L, Peng H, Shen X and Yang H. (2021). Effects of gastrodin on BV2 cells under oxygen-glucose deprivation and its mechanism. Gene. 766:145152. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378111920308210 (cited by 2022 April 3).

Montalto G, Cervello M, Giannitrapani L, Dantona F, Terranova A and Castagnetta LA. (2002). Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma. Annals of the New York Academy of Sciences. 963:13-20.

Okada E, Murai Y, Matsui K, Isizawa S, Cheng C, Masuda M and Takano Y. (2001). Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients. Cancer Letters. 163:109-116.

Park W, Lim DH, Paik SW, Koh KC, Choi MS, Park CK, Yoo BC, Lee JE, Kang MK, Park YJ, Nam HR, Ahn YC and Huh SJ. (2005). Local radiotherapy for patients with unresectable hepatocellular carcinoma. International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics. 61:1143-1150.

Shu G, Yang T, Wang C, Su H and Xiang M. (2013). Gastrodin

stimulates anticancer immune response and represses transplanted H22 hepatic ascitic tumor cell growth: Involvement of NF-κB signaling activation in CD4+ T cells. Toxicology and Applied Pharmacology. 269:270-279.

Soung YH, Lee JW, Kim SY, Nam SW, Park WS, Lee JY, Yoo NJ and Lee SH. (2005). Mutational analysis of proapoptotic Bcl-2 family genes in colon carcinomas. Korean Journal of Pathology. 39:168-171.

Statistics Korea(SK). (2021). Statistics on the cause of death in 2020. Statistics Korea. Daejeon, Korea. http://kostat.go.kr/portal/eng/pressReleases/1/index.board?bmode=read&aSeq=414516 (cited by 2022 April 3).

Stuver SO. (1998). Towards global control of liver cancer? Seminars in Cancer Biology. 8:299-306.

Wang ZH, Chen BH, Lin YY, Xing J, Wei ZL and Ren L. (2020). Herbal decoction of Gastrodia, Uncaria, and Curcuma confers neuroprotection against cerebral ischemia *in vitro* and *in vivo*. Journal of Integrative Neuroscience. 19:513-519.

Youn YS and Lee JS. (2009). Effect of Gastrodiae Rhizoma on apoptosis in cerebral infarction induced by middle cerebral artery occlusion in rats. Journal of Korean Medicine Rehabilitation. 19:1-13.

Zhao ZQ, Budde JM, Morris C, Wang NP, Velez DA, Muraki S, Gyuton RA and Vinten-Johansen J. (2001). Adenosine attenuates reperfusion-induced apoptotic cell death by modulating expression of Bcl-2 and Bax proteins. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 33:57-68.

Zhishen J, Mengcheng T and Jianming W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry. 64:555-559.