짜자래나무 [*Rhamnus yoshinoi*] 가지 추출물에 의한 전립선암세포의 Wnt/ β -catenin 분해 유도 활성 및 GC/MS 분석

강연경 · 어현지 · 김다솜 · 박영기 · 박광훈

Extract from the branches of *Rhamnus yoshinoi* exerts anti-cancer effects on human prostate cancer cells through Wnt/ β -catenin proteasomal degradation and identification of compounds by GC/MS

Yeongyeong Kang · Hyun Ji Eo · Da Som Kim · Youngki Park · Gwang Hun Park

Received: 30 April 2021 / Revised: 10 June 2021 / Accepted: 11 June 2021
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract We evaluated the anti-cancer activity against human prostate cancer cells and the associated molecular mechanism of extracts from the branches of *Rhamnus yoshinoi* (RYB). Treatment with RYB suppressed viability of human prostate cancer cells (PC-3) and decreased protein levels of both β -catenin and T-cell factor 4 (TCF4). This was reflected in reduced TCF4 mRNA, but not decreased β -catenin mRNA. PC-3 cells were pretreated with the proteasome inhibitor MG132 before treatment with RYB, which blocked RYB-mediated down regulation of β -catenin in PC-3 cells, thus confirming that RYB promotes the proteasomal degradation of β -catenin. RYB induced β -catenin phosphorylation, and GSK-3 β inhibition by LiCl blocked the phosphorylation and proteasomal degradation of β -catenin by RYB. These results suggest that GSK-3 β may be an important upstream kinase for RYB-mediated regulation of β -catenin. Finally, GC/MS analysis of RYB identified 18 compounds. Based on these findings, RYB shows potential for development as a therapeutic agent for prostate cancer.

Keywords Anti-cancer, β -catenin, TCF4, Prostate cancer, *Rhamnus yoshinoi*

서 언

남성의 전립선에 발생하는 악성종양인 전립선암은 남성에게 나타나는 가장 흔한 암으로 발병률이 높은 고위험군에 있어 검진 수검률이 낮고, 이미 진행된 상태에서 발견되는 경우가 많아 사망의 주요 원인 중 하나로 보고되고 있다 (Campos et al. 2018; Pyun et al. 2020; Shen 2018; Yoon 2020). 2017년 국가암등록통계에 따르면 암 환자 수는 2017년도 232,255명으로 2016년도 231,236명 대비 0.4% 증가했다. 이 중 전립선암 환자 수는 2017년도 12,797명으로 2016년도 11,944명 대비 6.7% 증가했다. 전립선암은 1999년 이후 발병률이 증가 추세를 보이고 있으며, 국내 남성암 발생률 중 간암을 제치고 4위에 올라섰다 (Korea Central Cancer Registry, National Cancer Center. 2019). 점차 서구화되는 생활습관 및 식생활 문화에 따라 전립선암 발생률이 증가하고 있어 전립선암의 예방과 치료에 대한 관심이 필요한 시점이다 (Kim et al. 2019; Yoon 2020).

Wnt/ β -catenin 신호전달경로의 주요 단백질인 β -catenin은 다양한 암의 진행과 전이에 관여하는 것으로 알려져 있다. β -catenin을 이용한 신호 전달은 암발병에 고빈도로 나타난다고 보고되어 있으며, 다양한 표적유전자의 발현을 조절한다고 알려져 있다 (Nile et al. 2017; Sim et al. 2019; Zhan et al. 2017). 비정상적인 β -catenin의 발현은 암세포에서 세포증식과 관련된 c-Myc, Cyclin D1, MMP2 그리고 MMP9 등의 발현을 증가시켜 암세포의 증식과 전이를 촉진시킨다고 알려져 있다 (He et al. 1998; Kim et al. 2019; Neth et al. 2006; Neth et al. 2007; Tetsu and McCormick 1999). 핵 내 β -catenin의 과잉 축적은 발암유전자의 발현을 유도하기 때문에 Wnt/ β -catenin

Y. Kang · H. J. Eo · D. S. Kim · Y. Park · G. H. Park (✉)
국립산림과학원 산림약용자원연구소
(Forest Medicinal Resources Research Center, National Institute of Forest Science, Yeongju 36040, Korea)
e-mail: ppkh0230@korea.kr

신호전달경로의 주요단백질인 β -catenin의 발현을 억제할 수 있는 천연항암제 개발이 요구되고 있다(Kim et al. 2019; Kim et al. 2019; Shang et al. 2017).

짜자래나무(*Rhamnus yoshinoi*)는 갈매나무과(Rhamnaceae)의 낙엽 활엽 관목이며 2016년 국립수목원에서 발간한 한국 관속식물분포도에 따르면 충청남도, 제주도 및 울릉도를 제외한 지역에 분포하는 산림약용자원으로(Oh et al. 2016), 예로부터 천식, 기침, 가래, 설사 치료 등에 사용되어 왔다. 최근 보고된 연구로는 항산화와 미백, 항주름 등의 약리효능에 대해서 알려져 있다(Kim 2018). 하지만 항암활성에 대한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 짜자래나무 추출물의 전립선암세포에 Wnt/ β -catenin 분해 유도 활성을 통한 항암 활성 및 작용기전을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용된 전립선암 세포주 PC-3은 ATCC (American Type Culture Collection, Virginia, USA)에서 분양받았고, 전립선암 세포의 배양을 위한 배지인 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F-12 1 : 1 modified medium (DMEM/F-12)는 HyClone (Logan, UT, USA)에서 구매하였다. 특이적 효소 억제제인 MG132와 LiCl, 전립선암 세포의 생육억제효능을 평가하기 위한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. Western blot 분석을 위한 항체인 β -catenin과 Phospho- β -catenin, TCF4, β -actin은 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구매하였다.

추출물 제조

본 연구에 사용된 시료인 갈매나무과(Rhamnaceae)에 속하는 짜자래나무(*Rhamnus yoshinoi*)는 2019년 10월 8일 경북 상주시에서 채취하여 국립산림과학원 산림약용자원연구소에서 보관하고 있다(표본번호: FMCrySJ-1910-1-3). 동결 건조 후, 파쇄된 짜자래나무 부위별(잎, 가지, 열매) 시료 각 20 g에 70% 에탄올 400 mL을 첨가하여 상온에서 48시간 동안 교반 추출하였다. 추출 후 filter paper (No. 2, Whatman Co., Maidstone, England)를 사용하여 여과하고, 45°C 이하의 중탕에서 감압 환류 냉각장치(N-1110S, EYELA, Tokyo, Japan)로 농축 후, 동결 건조하였다. 완성된 시료는 실험 전까지 -80°C로 냉동 보관하면서 분석을 위한 시료로 사용하였다. 짜자래나무 부위별 추출물은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해하여 실험에 사용하였고, 대조군은 DMSO를 0.1%를 초과하지 않는 범위에서 사용하였다.

세포 배양 및 세포 생육 억제 활성 측정

본 연구에서 사용된 전립선암 세포주인 PC-3은 10% fetal bovine serum (FBS) (Grand Island Biological co., NY, USA)와 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin이 포함된 DMEM/F-12 배지로 37°C에서 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 전립선암 세포인 PC-3의 증식 억제 평가는 MTT assay로 측정하였다. 전립선암 세포 PC-3을 12 well plate에서 well 당 1×10^5 cells로 24시간 배양한 후, 짜자래나무 잎, 가지, 열매 추출물을 농도별로 24시간 동안 처리하였다. 24시간 후 각 well에 MTT (1 mg/mL) 용액 200 μ L씩 첨가하여 2시간 동안 배양시킨 후, well 바닥에 형성된 formazan이 흡수되지 않게 상등액을 제거하고 DMSO를 1 mL 첨가하여 천천히 녹인 후 UV/Visible spectrophotometer (Lambda 365, PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 형태 변화 관찰

짜자래나무 가지 추출물의 처리에 따른 전립선암 세포 PC-3의 세포 형태 변화를 관찰하기 위하여 6 well plate에 1×10^5 cells로 24시간 배양한 후, 짜자래나무 가지 추출물을 농도별로 24시간 동안 처리하였다. 이후 도립현미경(Leica Microsystems DMi8, Leica, Wetzlar, Germany)으로 전립선암 세포 PC-3 세포의 형태적 변화를 관찰하였으며, Leica LAS X Core (LAS X Version 3.6)을 사용하여 촬영하였다.

SDS-PAGE 및 western blot 분석

짜자래나무 가지 추출물이 처리된 세포에서 단백질을 추출하기 위해서 세포를 차가운 1×phosphate-buffered saline (1×PBS)로 2회 세척한 후, protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)과 phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)이 포함된 radio immuno precipitation assay (RIPA) buffer (Boston Bio Products, Ashland, MA, USA)를 4°C에서 30분간 처리하여 lysis시켜 단백질을 얻었다. Bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Pierce Biotechnology Inc., Waltham, MA, USA)로 단백질 정량 후, 동일량의 단백질을 10% SDS-acrylamide에 loading하고 Trans-Blot turbo transfer system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Singapore)을 이용하여 Trans-Blot turbo transfer Pack (Bio-Rad Laboratories, Inc., hercules, CA, USA) membrane에 이동시킨 후 5% Bovine serum albumin (BSA)로 상온에서 1시간 동안 blocking하였다. 1시간 후, 1차 항체를 5% BSA에 용해시켜 4°C에서 14시간 동안 반응시킨 후 membrane을 0.05% tween-20이 포함된 tris-buffered saline (TBS-T)로 5분간 3회 세척하였다. 그 후 2차 항체는 5% BSA에 용해하여 membrane에 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 0.05% tween-20이 포함된 TBS-T로 5분간 3회 세척하였다.

간 처리하였고, TBS-T로 5분간 3회 세척 후 membrane은 ECL Prime western blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences Co., Little Chalfont, UK)를 이용하여 ChemiDoc MP System (Bio-Rad inc., Hercules, California, USA)로 단백질 확인 및 정량화하였다(Image Lab 5.2.1 software).

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA 추출은 짝자래나무 가지 추출물이 처리된 전립선암 세포 PC-3에 RNeasy Mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)를 이용하여 수행되었고, cDNA는 1 µg의 total RNA를 Verso cDNA kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 제조되었다. PCR은 PCR master mix kit (Promega Co., Madison, WI, USA)를 이용하여 수행되었고, 사용된 primer는 Table 1과 같다.

GC/MS 분석

짝자래나무 가지 추출물의 화합물 분석은 가스크로마토그래프 질량분석기 GC/MS (Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하

여 수행하였다. GC/MS 분석은 EI 소스와 자동 주입기가 장착된 Shimadzu GCMS-QP2010 ultra의 Shimadzu GC-2010 plus GC (Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하였다. GC 컬럼은 SH-Rxi-5ms (30.0 m × 0.25 mm × 0.25 µm)를 사용하였고, 오븐 온도는 60°C에서 5분간 유지한 뒤 분당 5°C씩 280°C까지 승온시켜 280°C에서 5분간 유지하였다. 짝자래나무 가지 추출물 주입 시 split ratio는 1:10으로 설정하였고, 운반기체는 분당 1 mL의 고순도 헬륨을 사용하였다. 질량분석 시 ionization energy 70 eV와 m/z 50–750으로 설정하였다.

통계분석

모든 결과는 3회 반복 측정 후 평균±표준편차로 나타내었고, 처리 간 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

짝자래나무 추출물 처리에 따른 전립선암 세포의 세포생육억제 활성과 세포 형태 변화

짝자래나무 잎, 가지, 열매의 70% 에탄올 추출물을 이용하여 전립선암 세포주인 PC-3의 세포생육억제 활성을 측정하기 위해 MTT assay를 진행하였다. 짝자래나무 잎, 가지, 열매 추출물을 0, 25, 50, 100 µg/mL 농도로 처리한 결과 짝자래나무 가지 추출물에서 전립선암 세포 PC-3의 생육을 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 1A). 따라서, 짝자래나무 가지 추출물을 시료로 선정하여 0, 25, 50, 100, 200 µg/mL 농도로

Table 1 Sequence of oligonucleotide primers used for RT-PCR

Gene name	Sequence
β-catenin	Forward: 5'-cccaatgtccagcgttt-3'
	Reverse: 5'-aatccactggtgaaccaagc-3'
TCF4	Forward: 5'-ttcaagacgacggcgaacag-3'
	Reverse: 5'-ttgctgtacgtgataagaggcg-3'
GAPDH	Forward: 5'-accagaagactgtgatgg-3'
	Reverse: 5'-ttctagacggcaggtcaggt-3'

Fig. 1 Effect of 70% ethanol extracts from *Rhamnus yoshinoi* (RY) on the cell viability of PC-3 cells. (A) PC-3 cells were treated with 0, 25, 50 and 100 µg/mL of extract from RY leaves (RYL), branches (RYB) or fruit (RYF) for 24 hours. (B) PC-3 cells were treated with 0, 25, 50, 100 and 200 µg/mL of RYB for 24 hours. Cell viability was measured using the MTT assay system and is expressed as percent cell viability. (C) Morphological changes of PC-3 cells receiving the indicated treatment, visualized using an inverted microscope (100x). Error bars represent SD

*P < 0.05 compared to control (Con.) cells

처리한 결과, 짝자래나무 가지에서 전립선암 세포 PC-3의 생육을 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 1B). 짝자래나무 가지 추출물 처리 후 도립현미경으로 전립선암 세포 PC-3의 형태적 변화를 관찰하였을 때 농도 의존적으로 세포생육을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 1C).

짝자래나무 가지 추출물의 Wnt/ β -catenin 단백질 수준 감소 및 단백질 분해 유도 활성

β -catenin은 세포막, 세포질 및 핵에서 세포 내 존재 위치에 따라 이중적 역할을 한다(Li et al. 2014; Scanlon et al. 2013). Cadherin과 결합하고 있는 β -catenin은 세포막에 존재하며, 암세포 간 부착과 성장을 억제하고, 세포질과 핵에 존재하는 β -catenin은 Wnt 신호전달의 중심 분자로 작용한다고 알려져 있다(Li et al. 2014; Schmalhofer et al. 2009). Wnt 신호전달이 없을 때, Axin/APC/GSK-3 β /CK-1으로 구성된 복합체는 β -catenin threonine-41(T41)/serine-33(S33)/serine-37(S37)의 인산화를 통해 β -catenin의 분해를 유도하지만, Wnt 신호전달은 Axin/APC/GSK-3 β /CK-1으로 구성된 복합체 활성 억제를 통해 β -catenin의 세포질 축적을 유도한다. 세포질에 축적된 β -catenin의 핵내 전이로 c-Myc과 같은 암세포의 생육과 관련된 유전자의 발현을 촉진시킨다(Tam and

Weinberg 2013). 따라서, β -catenin의 분해는 항암제 개발에서 중요한 분자 타겟으로 여겨지고 있다(Kim et al. 2019; Shang et al. 2017).

짝자래나무 가지 추출물이 전립선암 세포 PC-3의 생육억제가 암세포 성장에 관여하는 Wnt/ β -catenin과 TCF4 발현 억제와 관련이 있는지 확인한 결과, 짝자래나무 가지 추출물은 Wnt/ β -catenin과 TCF4 단백질 수준을 농도 의존적으로 감소시켰고(Fig. 2A), 200 μ g/mL 농도 처리 후 6시간째부터 Wnt/ β -catenin과 TCF4 단백질 수준을 감소시켰다(Fig. 2B). 짝자래나무 가지 추출물이 Wnt/ β -catenin과 TCF4 단백질 수준 감소가 전사조절에 기인하는 것인지 확인하기 위해 짝자래나무 가지 추출물이 처리된 전립선암 세포 PC-3에서 Wnt/ β -catenin과 TCF4 mRNA 발현을 확인하였다. 그 결과 짝자래나무 가지 추출물은 Wnt/ β -catenin 단백질 수준을 감소시키지만 mRNA 수준은 감소시키지 않음을 확인하였고, TCF4의 단백질 수준과 mRNA 수준을 감소시켰음을 확인하였다(Fig. 2C, D).

짝자래나무 가지 추출물이 β -catenin 단백질 분해를 유도하는지 평가하기 위해, 단백질 분해효소 억제제인 MG132를 전립선암 세포 PC-3에 2시간 전 처리 후 200 μ g/mL 농도의 짝자래나무 가지 추출물을 6시간 동안 처리하여 Wnt/ β -catenin 단백질을 확인하였다(Fig. 3A). 그 결과 MG132가 처

Fig. 2 Down regulation of β -catenin and TCF4 by RYB in PC-3 cells. (A) PC-3 cells were treated with RYB at the indicated concentrations for 24 hours. (B) PC-3 cells were treated with 200 μ g/mL of RYB for the indicated times. (A and B) Cell lysates were subjected to SDS-PAGE and western blot was performed using antibodies against β -catenin and TCF4. β -actin was used as the internal control. Representative blots (left) and quantification of 3 replicates (right) are provided. Values were normalized to the β -actin loading control. Error bars indicate SD. (C and D) RT-PCR analysis of β -catenin and TCF4 gene expression. Total RNA was prepared after RYB treatment at the indicated concentrations for 24 hours (C) or PC-3 cells were treated with 200 μ g/mL of RYB for the indicated times (D). GAPDH was used as the internal control. Representative images (left) and quantification of 3 replicates (right) are provided. Values were normalized to the GAPDH loading control. Error bars indicate SD

* $p < .05$ compared to the cells without RYB treatment

Fig. 2 Down regulation of β -catenin and TCF4 by RYB in PC-3 cells. (A) PC-3 cells were treated with RYB at the indicated concentrations for 24 hours. (B) PC-3 cells were treated with 200 μ g/mL of RYB for the indicated times. (A and B) Cell lysates were subjected to SDS-PAGE and western blot was performed using antibodies against β -catenin and TCF4. β -actin was used as the internal control. Representative blots (left) and quantification of 3 replicates (right) are provided. Values were normalized to the β -actin loading control. Error bars indicate SD. (C and D) RT-PCR analysis of β -catenin and TCF4 gene expression. Total RNA was prepared after RYB treatment at the indicated concentrations for 24 hours (C) or PC-3 cells were treated with 200 μ g/mL of RYB for the indicated times (D). GAPDH was used as the internal control. Representative images (left) and quantification of 3 replicates (right) are provided. Values were normalized to the GAPDH loading control. Error bars indicate SD

* $p < .05$ compared to the cells without RYB treatment (continued)

Fig. 3 Effect of RYB on β -catenin proteasomal degradation and determination of the upstream kinases involved in RYB-mediated Wnt/ β -catenin degradation in PC-3 cells. (A) PC-3 cells were pretreated with 20 μ M MG132 for 2 hours followed by 200 μ g/mL RYB for 6 hours. (B) PC-3 cells were pretreated with the GSK-3 β inhibitor LiCl (20 mM) for 2 hours followed by RYB (200 μ g/mL) for 6 hours. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE and western blot was performed using antibody against Wnt/ β -catenin. Representative blot (left) and quantification of 3 replicates (right) are provided. Values were normalized to the β -actin loading control. Error bars indicate SD

* $p < 0.05$ compared to the cells without RYB treatment

Fig. 4 Effect of RYB on β -catenin phosphorylation in PC-3 cells. (A) PC-3 cells were treated with 200 μ g/mL of RYB for the indicated times. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE and western blot was performed using antibody against phospho- β -catenin. β -actin was used as an internal control. (B) PC-3 cells were pretreated with the GSK-3 β inhibitor LiCl (20 mM) for 2 hours, and then co-treated with RYB (200 μ g/mL) for 1 hours. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE and western blot was performed using antibody against phospho- β -catenin (Thr286). β -actin was used as an internal control. (A and B) Representative blot (left) and quantification of 3 replicates (right) are provided. All values were normalized to the β -actin loading control. Error bars indicate SD * $P < 0.05$ compared to cells without RYB treatment

리된 세포에서는 짝자레나무 가지 추출물에 의해 유도되는 Wnt/ β -catenin 단백질의 감소가 억제되었다. 따라서 짝자레나무 가지 추출물은 Wnt/ β -catenin 단백질 분해를 유도할 수 있음을 나타내는 것으로 판단된다.

짝자레나무 가지 추출물의 GSK-3 β 유도 Wnt/ β -catenin 단백질 분해 Kinase 구명

짝자레나무 가지 추출물에 의해 유도되는 Wnt/ β -catenin 단백질 분해 유도와 관련된 Kinase를 구명하기 위해 전립선암 세포 PC-3에 GSK-3 β 억제제인 LiCl을 처리하였다. 억제제는 2시간 전처리 후, 짝자레나무 가지 추출물을 6시간 동안 처리하여 Wnt/ β -catenin의 단백질 발현 정도를 확인하였다. 그 결과 전립선암 세포 PC-3에서 짝자레나무 가지 추출물에 의해 유도되는 Wnt/ β -catenin 단백질 감소가 억제되었다. 따라서 짝자레나무 가지 추출물에 의한 Wnt/ β -catenin의 단백질 분해는 GSK-3 β 의존성이 있을 수 있음을 확인했다(Fig. 3B) GSK-3 β 유도 β -catenin의 인산화는 β -catenin의 분해와 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다(Li et al. 2012). GSK-3 β 에 β -catenin의 아미노말단 serine-33, serine-37, serine-45, threonine-41

이 인산화를 매개하면서 F-box-containing protein인 β -TrCP ubiquitin E3 ligase에 의해 연속적인 유비퀴틴 proteasome으로 β -catenin 단백질이 분해된다(Li et al. 2012, Nusse and Clevers 2017).

PC-3 세포에서 짝자레나무 가지 추출물이 GSK-3 β 의존적으로 β -catenin의 분해를 유도하는 것을 확인하였다. 짝자레나무 가지 추출물의 Wnt/ β -catenin 인산화와 LiCl에 의한 GSK-3 β 억제의 짝자레나무 가지 추출물 유도 Wnt/ β -catenin 인산화에 대한 영향을 평가하였다. 그 결과, 짝자레나무 가지 추출물 처리 1시간에 Wnt/ β -catenin을 인산화시켰으며(Fig. 4A) LiCl 처리에 의한 GSK-3 β 의 억제는 짝자레나무 가지 처리에 의해 야기되는 β -catenin의 인산화를 억제시켰다(Fig. 4B). 본 결과를 미루어 볼 때, 짝자레나무 가지 추출물에 의한 PC-3세포의 Wnt/ β -catenin 단백질 분해는 GSK-3 β 의존성으로 확인된다.

Gas chromatography mass spectrometer (GC/MS) 분석

GC/MS를 이용하여 짝자레나무 가지 추출물의 활성성분에 대한 정성 분석을 실시하였다. GC/MS 분석 결과(Fig. 5,

Fig. 5 Chromatogram of compounds identified in RYB by GC/MS

Table 2 The detected chromatographic data of the 18 identified compounds in RYB analyzed by GC/MS

No.	RT	Name of the compound	Molecular formula	Molecular mass
1	14.305	Hydroxydihydromaltol	C ₆ H ₈ O ₄	144.13 g/mol
2	16.825	5-Hydroxymethylfurfural	C ₆ H ₆ O ₃	126.11 g/mol
3	18.995	2-Methoxy-4-vinyl phenol	C ₉ H ₁₀ O ₂	150.18 g/mol
4	20.030	2,6-Dimethoxyphenol	C ₈ H ₁₀ O ₃	154.17 g/mol
5	22.680	2-Methoxy-5-[(E)-1-propenyl]phenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164.20 g/mol
6	34.625	Palmitic Acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.43 g/mol
7	37.375	Phytol	C ₂₀ H ₄₀ O	296.54 g/mol
8	38.000	Linoleic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.45 g/mol
9	38.085	(Z)-9-Hexadecenal	C ₁₆ H ₃₀ O	238.41 g/mol
10	38.300	Ethyl linoleate	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	308.51 g/mol
11	38.835	Ethyl stearate	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	312.54 g/mol
12	41.395	(Z)-Oleic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282.47 g/mol
13	41.865	Arachidic acid	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	312.54 g/mol
14	44.215	Beta-monopalmitin	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	330.51 g/mol
15	45.105	Docosanoic acid	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	340.59 g/mol
16	47.090	(S)-Glyceryl linoleate	C ₂₁ H ₃₈ O ₄	354.53 g/mol
17	47.215	Trilinolein	C ₅₇ H ₉₈ O ₆	879.40 g/mol
18	49.115	(E)-Squalene	C ₃₀ H ₅₀	410.73 g/mol

Table 2), 활성물질은 hydroxydihydromaltol (Yu et al. 2013), 5-Hydroxymethylfurfural (Shapla et al. 2018), 2-methoxy-4-vinyl phenol (Jeong and Jeong 2010; Jiang et al. 2013; Kim et al. 2019), 2,6-dimethoxyphenol (Virk and Issenberg 1986), 2-Methoxy-5-[(E)-1-propenyl]phenol, palmitic acid (Harada et al. 2002), phytol (Sakthivel et al. 2018), linoleic acid (Lu et al. 2010), (Z)-9-hexadecenal (Hoda et al. 2020), ethyl linoleate (Park et al. 2014), ethyl stearate, (Z)-oleic acid (Giulitti et al. 2021), arachidic acid (Das 1990), beta-monopalmitin (Jumina et al. 2018), docosanoic acid (Kojima et al. 2010), (S)-glyceryl linoleate (Stoessl et al. 1980), trilinolein (Chan and Tomlinson 2000; Chou et al. 2011; Huang et al. 2014), (E)-squalene (Gonor et al. 2006; Newmark 1997; Ohkuma et al. 1983; Rao and Achaya 1968; Rao et al. 1998; Theresa et al. 1998) 등으로 동정되었고, 이 화합물들은 항암, 항염증, 항균 및 항비만 등 생리활성 물질로 보고되어 있다.

따라서 이러한 생리활성 물질에 의해 짝자래나무 가지 추출물이 항암활성을 가지는 것으로 판단된다. 향후 계속적인 연구를 통해 활성물질 분리 및 구조 동정 연구가 필요할 것으로 사료된다.

적 요

본 연구에서는 갈매나무과에 속하는 *Rhamnus yoshinoi* (RY, 짝자래나무) 가지 부위의 70% 에탄올 추출물을 이용하여 전립선암세포의 항암 활성을 규명하고자 하였다. 짝자래나무 가지 추출물을 전립선암 세포 PC-3에 처리하여 β -catenin과 TCF4의 단백질 수준 감소를 확인하였다. 이후, β -catenin과 TCF4의 mRNA 발현을 조사한 결과 β -catenin은 감소하지 않았고, TCF4는 감소하였다. 이를 통해, β -catenin

mRNA의 발현에는 영향이 없지만, TCF4 mRNA 발현은 억제하는 것으로 나타났다. 단백질 분해효소억제제인 MG132를 처리한 전립선암 세포 PC-3에서 단백질 수준 확인을 통해 β -catenin의 단백질 분해를 유도할 수 있음을 확인하였다. 또한 전립선암 세포 PC-3에서 짝자래나무 가지 추출물의 GSK-3 β 유도 β -catenin 단백질 분해 Kinase 구명과 β -catenin 인산화에 영향을 미치는 것을 확인하였다. 이상의 연구 결과로 짝자래나무 가지 추출물은 GSK-3 β 의존성 Wnt/ β -catenin 단백질의 분해를 통해 전립선암의 생육 억제와 관련이 있는 것으로 확인된다. 또한 짝자래나무 가지 추출물에서 항암활성과 관련된 활성물질이 있는 것으로 확인되었다. 본 결과는 전립선암의 항암제 개발을 위한 소재로 짝자래나무 가지 추출물의 활용이 가능할 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 2021년도 국립산림과학원 일반연구과제 ‘갈매나무과 식물의 항염증 물질 탐색 및 약리기전 연구(과제번호: FP0400-2019-01)’ 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

References

- Campos C, Sotomayor P, Jerez D, González J, Schmidt C, Schmidt K, Banzer W, Godoy AS (2018) Exercise and prostate cancer: from basic science to clinical applications. *The Prostate* 78(9): 639–645
- Chan P, Tomlinson B (2000) Antioxidant effects of Chinese traditional medicine: focus on trilinolein isolated from the Chinese herb sanchi (*Panax pseudoginseng*). *J Clin Pharmacol* 40:457–461
- Chou PY, Huang GJ, Pan CH, Chien YC, Chen YY, Wu CH, Sheu MJ, Cheng HC (2011) Trilinolein inhibits proliferation of human non-small cell lung carcinoma A549 through the modulation of PI3K/Akt pathway. *Am J Chin Med* 39:803–815
- Das UN (1990) Gamma-linolenic acid, arachidonic acid, and eicosapentaenoic acid as potential anticancer drugs. *Nutrition* 6:429–434
- Giulitti F, Petrungaro S, Mandatori S, Tomaipitina L, Franchis V, D'Amore A, Filippini A, Gaudio E, Ziparo E, Giampietri C (2021) Antitumor effect of oleic acid in hepatocellular carcinoma cell lines via autophagy reduction. *Front Cell Dev Biol* 9(629182):1–16
- Gonor KV, Pogozheva AV, Derbeneva SA, Mal'tsev Glu, Trushina EN, Mustafina OK (2006) The influence of a diet with including amaranth oil on antioxidant and immune status in patients with ischemic heart disease and hyperlipoproteidemia. *Vopr Pitan* 75(6):30–33
- Harada H, Yamashita U, Kurihara H, Fukushi E, Kawabata J, Kamei Y (2002) Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substance in a marine red alga. *Anticancer Res* 22(5):2587–2590
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281(5382): 1509–1512
- Hoda S, Gupta L, Shankar J, Gupta AK, and Vijayaraghavan P (2020) cis-9-hexadecenal, a natural compound targeting cell wall organization, critical growth factor, and virulence of *Aspergillus fumigatus*. *ACS Omega* 5:10077–10088
- Huang SS, Deng JS, Lin JG, Lee CY, Huang GJ (2014) Anti-inflammatory effects of trilinolein from *Panax notoginseng* through the suppression of NF- κ B and MAPK expression and proinflammatory cytokine expression. *Am J Chin Med* 42(6): 1485–1506
- Jeong JB, Jeong HJ (2010) 2-Methoxy-4-vinylphenol can induce cell cycle arrest by blocking the hyper-phosphorylation of retinoblastoma protein in benzo[a]pyrene-treated NIH3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 400:752–757
- Jiang J, Cao DH, Tsukamoto T, Wang GQ, Jia ZF, Suo J, Cao XY (2013) Anticancer effects of 4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) against SGC-7901 human gastric carcinoma cells. *Oncol Lett* 5:1562–1566
- Jumina, Nurmala A, Fitria A, Pranowo D, Sholikhah EN, Kurniawan YS, Kuswandi B (2018) Monomyristin and monopalmitin derivatives: synthesis and evaluation as potential antibacterial and antifungal agents. *Molecules* 23(3141):1–10
- Kim CH, So JH, Park HG, Madusanka N, Deekshitha P, Bhattacharjee S, Choi HK (2019) Analysis of texture features and classifications for the accurate diagnosis of prostate cancer. *Journal of Korea Multimedia Society* 22(8):832–843
- Kim DH, Han SI, Go B, Oh UH, Kim CS, Jung YH, Lee J, Kim JH (2019) 2-Methoxy-4-vinylphenol attenuates migration of human pancreatic cancer cells via blockade of FAK and AKT signaling. *Anticancer Res.* 39(12):6685–6691
- Kim HN, Kim JD, Son HJ, Park GH, Eo HJ, Jeong JB (2019) Anti-Cancer activity of the leave extracts of *Rodgersia podophylla* through β -catenin proteasomal degradation in human cancer cells. *Korean J. Plant Res.* 32(5):442–447
- Kim HN, Park GH, Kim JD, Park SB, Eo HJ, Jeong JB (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
- Kim HO (2018) Antioxidant activity and anti-wrinkle effect of *Rhamnus yoshinoi* Methanol Extract. Graduate School of Keimyung University
- Kim HO, Shin KR, Jang BC, Kim YC (2019) Action mechanism of anti-wrinkle effect of *Rhamnus yoshinoi* methanol extract in human dermal fibroblast and keratinocyte cell lines. *Toxicol Res* 36(1):69–77
- Kojima M, Tachibana N, Yamahira T, Seino S, Izumisawa A, Sagi N, Arishima T, Kohno M, Takamatsu K, Hirotsuka M, Ikeda I (2010) Structured triacylglycerol containing behenic and

- oleic acids suppresses triacylglycerol absorption and prevents obesity in rats. *Lipids Health Dis* 9(77):(1-6)
- Korea Central Cancer Registry, National Cancer Center. Annual report of cancer statistics in Korea in 2017, Ministry of Health and Welfare, 2019
- Li LF, Wei ZJ, Hong H, Jiang B (2014) Abnormal β -catenin immunohistochemical expression as a prognostic factor in gastric cancer: A meta-analysis. *World J Gastroenterol* 20: 12312-12321
- Li VS, Ng SS, Boersema PJ, Low TY, Karthaus WR, Gerlach JP, Mohammed S, Heck AJ, Maurice MM, Mahmoudi T, Clevers H (2012) Wnt signaling through inhibition of β -catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell* 149(6):1245-1256
- Lu XF, He GQ, Yu HN, Ma Q, Shen SR, Das UN (2010) Colorectal cancer cell growth inhibition by linoleic acid is related to fatty acid composition changes. *J Biomed Biotechnol* 11(12):923-930
- Neth P, Ciccarella M, Egea V, Hoelters J, Jochum M, Ries C (2006) Wnt signaling regulates the invasion capacity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24:1892-1903
- Neth P, Ries C, Karow M, Egea V, Ilmer M, Jochum M (2007) The Wnt signal transduction pathway in stem cells and cancer cells: influence on cellular invasion. *Stem Cell Rev* 3:18-29
- Newmark HL (1997) Squalene, olive oil, and cancer risk: a review and hypothesis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 6:1101-1103
- Nile AH, Mukund S, Stanger K, Wang W, Hannoush RN (2017) Unsaturated fatty acyl recognition by Frizzled receptors mediates dimerization upon Wnt ligand binding. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 114:4147-4152
- Nusse R, Clevers H (2017) Wnt/beta-catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities. *Cell* 169:985-999
- Oh BY, Ko SH, Kang SH, Paik WK, Yoo KO et al. (2016) Distribution maps of vascular plants in Korea. Korea National Arboretum. Pocheon, Korea
- Ohkuma T, Otagiri K, Tanaka S, Ikekawa T (1983) Intensification of host's immunity by squalene in sarcoma 180 bearing ICR mice. *Journal of Pharmacobio-Dynamic* 6:148-151
- Park SY, Seetharaman R, Ko MJ, Kim DY, Kim TH, Yoon MK, Kwak JH, Lee SJ, Bae YS, Choi YW (2014) Ethyl linoleate from garlic attenuates lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokine production by inducing heme oxygenase-1 in RAW264.7 cells. *Int. Immunopharmacol* 19:253-261
- Pyun Jong Hyun, Kang SH, Kim JY, Shin JE, Jeong IG, Kim JW, No TI, Oh JJ, Yu JH, Chung HS, Jeon SS (2020) Survey results on the perception of prostate-specific antigen and prostate cancer screening among the general public. *Korean J Urol Oncol* 18(1):40-46
- Rao CV, Newmark HL, Reddy BS (1998) Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis* 19:287-290
- Rao MK, Achaya KT (1968) Antioxidant property of a cholesterol precursor, squalene. *J Am Oil Chem Soc* 45:296
- Sakthivel R, Malar DS, Devi KP (2018) Phytol shows anti-angiogenic activity and induces apoptosis in A549 cells by depolarizing the mitochondrial membrane potential. *Biomed. Pharmacother.* 150:742-752
- Scanlon CS, Van Tubergen EA, Inglehart RC, D'Silva NJ (2013) Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *J Dent Res* 92:114-121
- Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz TE (2009) Cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 28:151-166
- Shang S, Hua F, Hu ZW (2017) The regulation of β -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. *Oncotarget* 8:33972-33989
- Shapla UM, Solayman M, Alam N, Khalil MI, Gan SH (2018) 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health. *Chem Cent J* 12(35):1-18
- Shen JK (2018) "Prostate Cancer Pathology: Recent Updates and Controversies," *Missouri Medicine* 115(2) pp 151-155
- Sim BR, Nam YS, Lee JB (2019) Regulation of Wnt/ β -catenin signal transduction in HT-29 colon cancer cells by a Rhododendron brachycarpum fraction. *Journal of Life Science* 29(8):871-878
- Stoessl A, Fisch MH, Arditti J (1980) Monolinolein as a selective fungus inhibitor from Cymbidium, Orchidaceae. *Mycopathologia* 70(3):131-134
- Tam WL, Weinberg RA (2013) The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med* 19:1438-1449
- Tetsu O, McCormick F (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells *Nature* 398:422-426
- Theresa JS, Yang GY, Seril DN, Liao J, Kim SB (1998) Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene. *Carcinogenesis* 19(4):703-706
- Virk MS, Issenberg P (1986) Effects of phenol and 2, 6-dimethoxy-phenol (syringol) on in vivo formation of N-nitrosomorpholine in rats. *Carcinogenesis* 7(6):867-870
- Yoon JH (2020) A review of therapeutic exercise strategies for prostate cancer and benign prostate hyperplasia. *Korean Journal of Sport Science* 31(1):1-10
- Yu X, Zhao M, Liu F, Zeng S, Hu J (2013) Identification of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one as a strong antioxidant in glucose-histidine Maillard reaction products. *Food Res Int* 51:397-403
- Zhan T, Rindtorff N, Boutros M (2017) Wnt signaling in cancer. *Oncogene* 36:1461-1473