



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2022년 2월

교육학석사(영양교육)학위논문

까마귀쪽나무 열매가 유방암 세포의 유전자 발현에 미치는 영향

조선대학교 교육대학원

영양교육전공

이 수 진

까마귀쪽나무 열매가 유방암 세포의 유전자 발현에 미치는 영향

Effect of *Litsea japonica* fruit on the gene
expression of breast cancer cells

2022년 2월

조선대학교 교육대학원

영양교육전공

이 수 진

까마귀쪽나무 열매가 유방암 세포의 유전자 발현에 미치는 영향

지도교수 이 주 민

이 논문을 교육학석사(영양교육)학위 청구논문으로 제출함

2021년 10월

조선대학교 교육대학원

영양교육전공

이 수 진

이수진의 교육학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 조선대학교 교수 김복희 인

심사위원 조선대학교 교수 이재준 인

심사위원 조선대학교 교수 이주민 인

2021년 12월

조선대학교 교육대학원

< 목 차 >

ABSTRACT

제 1장 서론	1
제 2장 연구방법	3
1. 재료 및 방법	3
1.1 실험 재료 구입 및 추출	3
1.2 세포 배양	3
1.3 처리 조건 및 RNA 추출	4
1.4 NGS 분석	4
제 3장 연구결과 및 고찰	5
1. 유전자 발현 분석	5
제 4장 요약 및 결론	65
참 고 문 헌	66

LIST OF TABLES

Table 1. Number of gene expression in control and <i>Litsea japonica</i> treated group	7
Table 2. List of increased gene expression after <i>Litsea japonica</i> treatment in apoptotic process	11
Table 3. List of decreased gene expression after <i>Litsea japonica</i> treatment in apoptotic process	17
Table 4. List of increased gene expression after <i>Litsea japonica</i> treatment in cell cycle	25
Table 5. List of decreased gene expression after <i>Litsea japonica</i> treatment in cell cycle	30
Table 6. List of increased gene expression after <i>Litsea japonica</i> treatment in cell death	52
Table 7. List of decreased gene expression after <i>Litsea japonica</i> treatment in cell death	58

LIST OF FIGURES

Figure 1. Pie chart representation of the findings from Gene Ontology biological process annotation analysis with control vs. <i>Litsea japonica</i> treated group	6
Figures 2. Number of up- and downregulated genes after <i>Litsea japonica</i> treatment	8
Figure 3. Significant gene Scatter Plot in apoptotic process of <i>Litsea japonica</i> treatment	22
Figures 4. KEGG. Apoptosis signaling pathway.	23
Figure 5. Significant gene Scatter Plot in cell cycle of <i>Litsea japonica</i> treatment	49
Figures 6. KEGG. Cell cycle signaling pathway.	50
Figure 7. Significant gene Scatter Plot in cell death of <i>Litsea japonica</i> treatment	63
Figures 8. KEGG. Cell death signaling pathway.	64

ABSTRACT

Effect of *Litsea japonica* fruit on the gene expression of breast cancer cells

Lee Su Jin

Advisor : Prof. Joomin Lee PhD.

Major in Nutrition Education

Graduate School of Education Chosun University

This study used the gene analysis method of next generation sequencing (NGS) to look at large amounts of gene expression and select genes that affect cells. To confirm the actual biological meaning of data obtained through genetic analysis, *Litsea japonica* fruit the data obtained from the concentration-specific experiments were compared with the control group to investigate the cell death, cell cycle, and the increase and decrease of genes in cell history.

Gene ontology analysis, scatter plot, and clustering were performed, and at this time, the gene expressed more than twice as high or lower in expression (up significant: fold change ≥ 2) was selected as a significant gene with increased and reduced expression.

Gene ontology analysis analyzed the results with 3 items: 927 apoptosis, 1,208 apoptosis, and 1,000 apoptosis out of 25,737 genes, and identified the number and ratio of gene expressions, gene names, expression volume, and pathways for each gene chip. As a graph representing the distribution of gene expression, clustering was performed to indicate the degree of similarity of expression between each gene.

Key words : *Litsea japonica* Fruit, next generation sequencing , Genetic data analysis, Cancer cells, apoptosis, Cellular cycle, Cell death.

I. 서론

오늘날의 우리는 많은 정보와 다양한 생활양식을 접하게 되면서 건강한 삶과 생활양식을 추구하는데 더 많은 관심을 두고 있다. 이러한 상황에서 암은 건강을 추구하는 현대인들로 하여금 생을 위협하는 최악의 질병이라고 할 수 있겠다.

유방암(breast cancer)은 유방에 생기는 악성 종양으로 서구국가에서 발병률이 가장 높은 암이다. 한국을 포함한 동양인의 발생은 다소 낮은편 이지만 식생활과 수유방법 및 환경변화에 따라 한국 여성의 유방암도 매년 급증하고 있는 추세이다.

유방암은 모든 암 중에서 가장 연구가 많이 된 암 중 하나이다. 하지만 유방암의 발생기전은 아직 확실하게 밝혀진 것은 없으며 유전적 요인과 환경적 요인에 의해 발생된다고 알려지고 있다. 환경적인 요인으로 비만, 음주, 출산 및 수유 요인, 에스트로겐 등의 영향을 받는 것으로 알려지고 있다(1). 또한, reactive oxygen species(ROS)를 억제하는 항산화 체계의 불균형으로 인하여 DNA와 세포 조직의 손상으로 인하여 유방암이 발생할 수 있다고 보고되고 있다(2).

항암제를 이용한 암치료는 암세포를 포함한 정상세포에도 영향을 미치며 내성을 가지게 되는 문제점까지 야기 시키기에 이를 대체할 물질을 찾는 것이 중요한 과제로 여겨지고 있다. 현재 사용되고 있는 항암제들은 생체에 관해 심한 독성으로 정상적인 세포의 대사를 크게 억제하여 항암제의 사용에 많은 장애로 나타나고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 적은 부작용의 새로운 항암제의 개발이 중점되고 있으며 특히 천연물로부터 유용한 항암제를 개발하려는 노력이 시도되고 있다(3).

최근 천연물 자체 효능에 관한 관심이 많아지면서 천연추출물에 대한 세포 신호 분자들의 조절과 암세포의 apoptosis 유도 효과에 관한 연구가 주목을 받고 있다(4). Apoptosis는 프로그램된 세포사멸 (programmed cell death) 과정으로 일반적, 외적 또는 내적으로 작용하는 기전에 의해서 이루어지고 있다(5). 또한, 면역방어기전에 하나로서 apoptosis는 다양한 외적인 요소에 의해 손상된 세포 및 비정상적인 세포를 제거하는 기능을 가지고 있다(6). 이처럼 apoptosis는 암세포 제거의 가장 중요한 기전중 하나이며, 어떤 화학치료제나 천연물 등에 의한 apoptosis 유도가 암세포 제거 기전에 중요하다고 볼 수 있겠다.

차세대 염기서열이라 일컫는 next generation sequencing (NGS)는 유전체를 많은 조각으로 나누어 각각의 많은 양의 염기서열 정보를 조합하여 유전체를 분석, 해독하는 방법이다. 어떠한 하나의 유전체를 많은 조각으로 분해한 후 각 조각을 동시에 읽어 얻어진 데이터를 생물 정보학적인 기법으로 조합함으로써 무수히 많은 유전체를 빠르게 해독하는 것을 말한다. 또한, 저비용으로 빠르게 분석할 수 있도록 하는 컴퓨터 프로그램을 기반으로 하는 방법 중 하나이다. 이러한 NGS의 발달로 인해 생명정보학의 중요성 또한 부각되고 있다. 1세대에는 DNA 합성 과정을 이용한 Sequencing 의 기술을 사용하여 염기서열을 밝혀내는 방법을 기반으로 하였으며 현재 3세대 NGS기술로 PCR amplification의 필요 없이 DNA 분자합성을 기반으로 high sensitive fluorescence detection 시스템을 이용하여 Single Molecule Sequencing(SMS)을 하는 Helicos의 Helicose Genetic Analysisystem이 있다(7). 까마귀쪽나무(Litsea japonica (Thunb.) Jussieu)는 ‘구릅비 나무’ 등으로 불리기도 하는데 관속식물로서 녹나무과에 속하며 상록엽소 교목으로 한국과 일본에 분포하고 있다. 국내 제주도 해안에서 흔히 볼 수 있으며 주로 섬에서 자생하며 바닷가 근처 산기슭에서 자란다. 까마귀쪽나무 열매(Litsea japonica Fruit)에는 주로 여러종류의 essential oils, fatty acids, lactones, alkaloids, terpenoids 등이 함유되어 있으며(8), 주요한 생물학적 활성성분으로 hamabiwalactone A, hamabiwalatone B, akolactone B, litsealactone A 및 litsealactone B 등이 분리되고 있다(9). 이러한 분리를 통해 진통 및 항염증 효과가 나타났음이 연구된 바 있다(10).

까마귀쪽나무 열매는 식품의약품안전처로부터 2015년도에 관절건강에 관련한 건강기능식품의 원료로서 인정(인정번호 : 제2015-22호)된 바 있다. 까마귀쪽나무 열매와 잎이 암 증식억제에 미치는 영향에 대한 연구로는 인체 유래 유방암세포인 MCF-7 세포주를 이용하여 유방암세포의 증식을 억제하는 효과를 보인 연구가 실시된 바 있다(11). 그러나 이에 대한 관련 메커니즘 규명에 대한 논문은 미비한 상황이다. 따라서 이에 본 연구에서는 까마귀쪽나무 열매를 처리한 유방암 세포주를 이용하여 유전자발현분석을 통해 유의미한 유전자들을 알아보려고 하였다.

Ⅲ. 연구방법

1. 재료 및 방법

1.1 실험 재료 구입 및 추출

본 실험에 사용된 까마귀쪽나무 열매는 청명약초에서 분말의 형태로 2020년 2월에 구입하여 사용하였다. 까마귀쪽나무 열매는 -80°C 에서 냉동시킨 후 동결건조기(ED 8512, Ilshin, Yangju, Korea)를 이용하여 동결건조한 후, 분쇄기(HR1378, Philips, Karner, Slovenia)로 분쇄하였다. 각각의 시료 분말은 분석 시까지 -70°C deep freezer(MDFU52V, Sanyo, Osaka, Japan)에 보관하였다.

건조된 까마귀쪽나무 열매 100 g에 80% 에탄올 1.5 L를 첨가한 후 65°C 의 heating mantle(Mtops ms-265, Seoul, Korea)에 환류냉각관을 부착하여 3시간씩 3회 반복 추출하였다. 이후 얻어진 까마귀쪽나무 열매 추출액을 whatman filter paper(Whatman No.2)로 여과한 후 여액을 rotary vacuum evaporator(EYELA VACUUM NVC-1100, Tokyo, Japan)를 이용하여 40°C 수욕상에서 감압·농축한 후에 동결건조 하였다. 시료는 -70°C 에 보관하여 분석 시 사용하였다.

1.2 세포 배양

실험에 사용된 인체유방암세포주 MCF-7은 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로부터 분양받아 본 실험실에서 배양하여 사용하였다. MCF-7 세포는 1% penicillin/streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)을 포함한 RPMI 1640 배지(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37°C , 5% CO_2 incubator(MCO-18AIC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 배양하였다.

1.3 처리 조건 및 RNA 추출

MCF-7 세포주에 까마귀쪽나무 열매를 25 ug/mL 처리 한 후 24시간 동안 배양하였다. 이후 RNA 추출을 위해 RNeasy Mini kit (QIAGEN GmbH., Hilden, Germany)를 이용하여 유전자 발현을 분석하였다.

1.4 NGS 분석

추출한 mRNA를 이용하여 QuanSeq 3' mRNA-sequence를 분석하였다. 모든 데이터의 정규화 및 유전자 발현 분석과정은 ExDEGA(Excel based Differentially Expressed Gene Analysis) v.2.5.0 분석 프로그램을 이용하여 진행하였다. 대조군과 까마귀쪽나무 열매 추출물에 의한 유전자발현의 차이를 나타내는 여러 항목 중, 세포사멸(Apoptotic process), 세포주기(cell cycle), 세포사(cell death)를 선택하여 대조군을 기준으로 발현이 2배 이상 증가 또는 감소하고 normalized RC(log) 값이 2이상인 유전자들을 선별하여 필터링하였다. 단백질 합성 관련 pathway는 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 데이터베이스를 참조하여 분석하였다.

IV. 연구결과 및 고찰

1. 유전자 발현 분석

유전자 분석을 통해 얻어낸 데이터의 실제 생물학적 의미를 확인해보고자 까마귀 쪽나무 열매 처리에 의해 얻어진 데이터를 대조군과 비교하여 분석하였다. 그 결과 cell cycle, DNA repair, aging, apoptotic process, cell differentiation, cell death 등의 순서로 변화된 유전자 그룹이 나뉘어짐을 확인하였다 (Figure 1).

유전자 데이터 분석은 gene ontology analysis와 scatter plot을 실시하였다. 산점도(Scatter plot)는 두 개 이상의 변수의 동시분포에서 각 개체를 점으로 표시한 그림으로 대조군과 실험군의 발현 양상을 확인할 수 있으며 대조군인 X축과 실험군인 Y축으로 2보다 증가한 유전자(빨강색)와 2보다 감소한 유전자(초록색)를 그림으로 나타내었고 유의미한 유전자들을 표시하였다. 이때 대조군에 비해 발현량에서 2배 이상 높게 발현되거나 낮게 발현된 유전자를 선별하여 유의미하다고 간주하였다.

Gene ontology analysis에서는 전체 유전자 25,737개 중 유방암 세포에서 까마귀 쪽나무 열매에 의해 변화된 세포사멸(927개), 세포주기(1,208개), 세포사(1,000개) 3가지 항목으로 결과를 분석하였다(Table 1). 또한 까마귀 쪽나무 열매 추출물과 대조군에서 차이가 나는 유전자 세포사멸, 세포주기, 세포사 반응의 3가지 항목 별로 구분하여 유전자 발현 개수와 비율, gene name, 발현량, 발현경로 (pathways)를 확인하였다. 까마귀 쪽나무 열매를 처리 후 Apoptotic process (7.77%), cell cycle (15.48%), cell death(7.60%)의 유전자 발현을 보였고, 이 중에서 \log_2 Fold change ≥ 2 또는 ≤ -2 으로 표본 추출하였다.

% of Total Significant

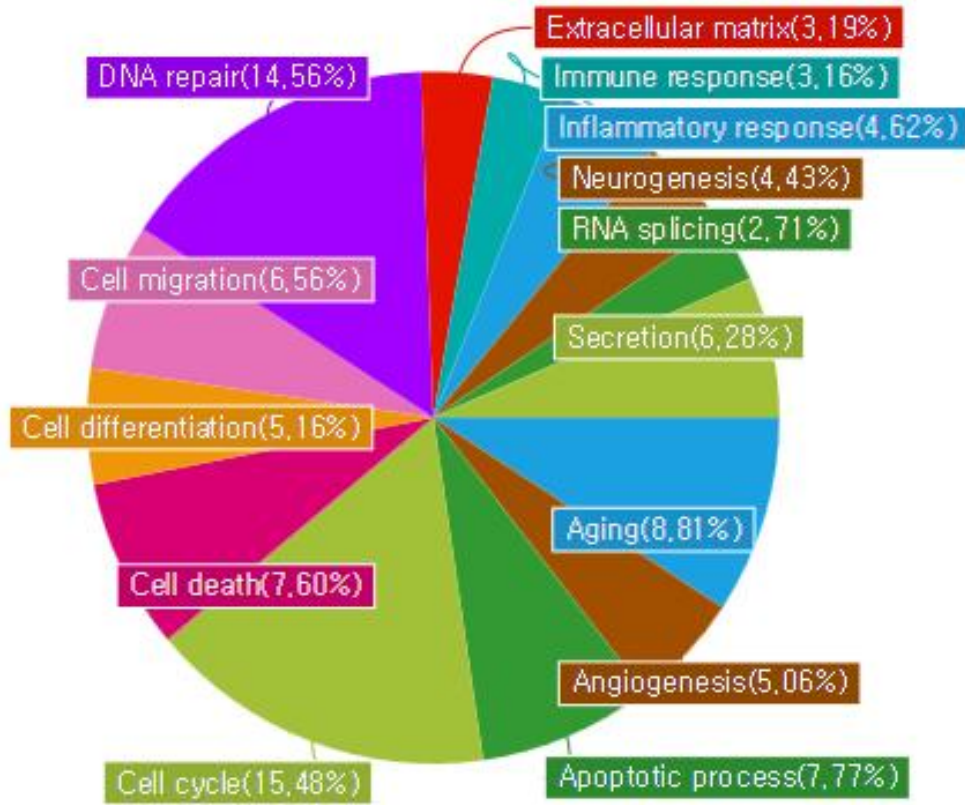
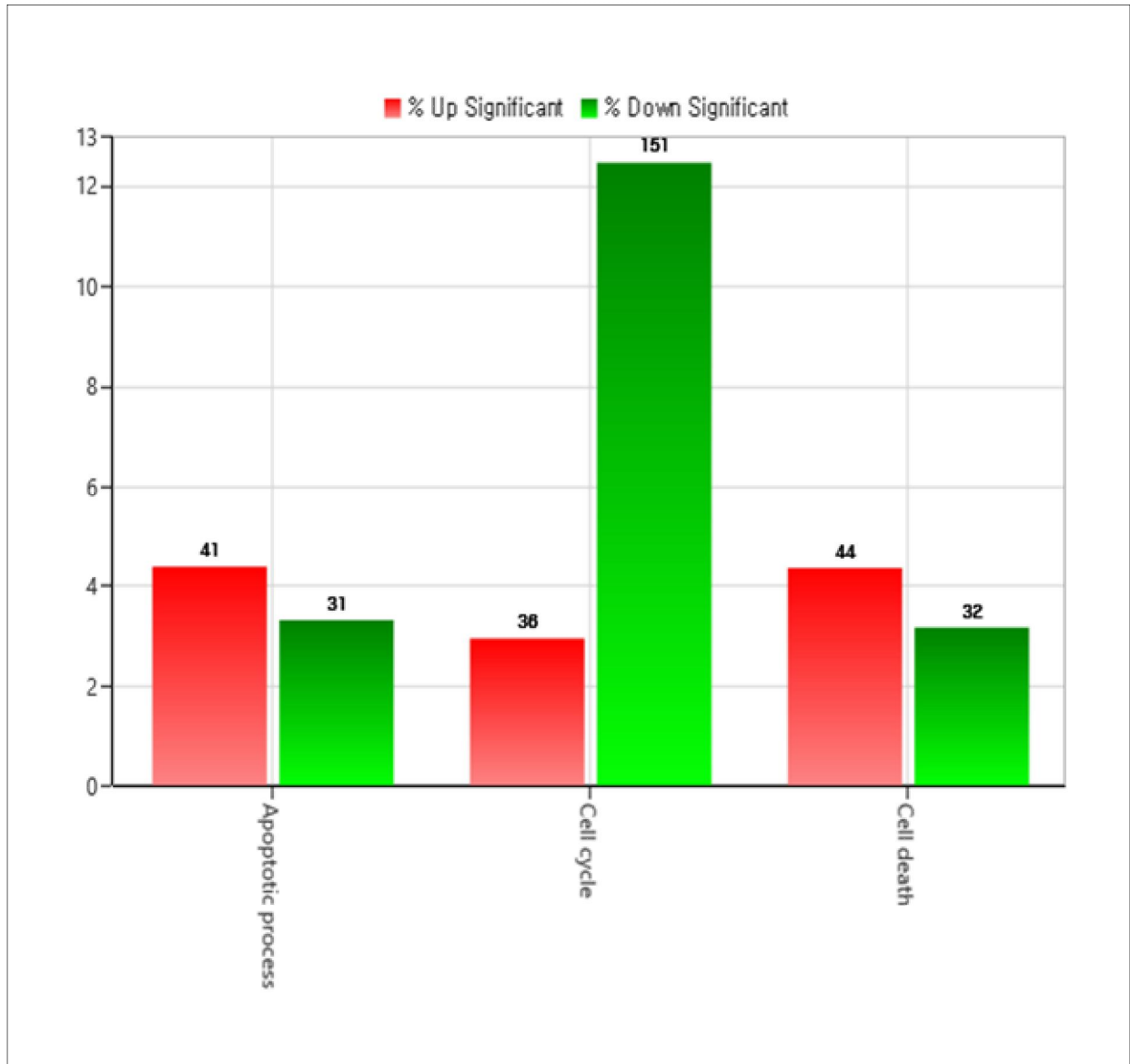


Figure 1. Pie chart representation of the findings from Gene Ontology biological process annotation analysis with control vs. *Litsea japonica* treated group

Table 1. Number of gene expression in control vs. *Litsea japonica* treated group

log2 Fold change ≥ 2 or ≤ 2

Gene category	Number	
Apoptotic process	Total count	927
	% of Total	7.77
	Significant count	72
	Significant up count	41
	Significant down count	31
Cell cycle	Total count	1208
	% of Total	15.48
	Significant count	187
	Significant up count	36
	Significant down count	151
Cell death	Total count	1000
	% of Total	7.60
	Significant count	76
	Significant up count	44
	Significant down count	32



Figures 2. Number of up- and downregulated genes after *Litsea japonica* treatment

1) 까마귀쪽나무 열매 추출물에 의해 유의미하게 발현되는 유전자

(1) 까마귀쪽나무 열매 추출물 처리가 apoptotic process에 미치는 영향

유방암세포에서 까마귀쪽나무 열매 추출물이 apoptosis와 관련하여 증가 또는 감소된 유전자 및 그 기능에 관해 살펴보았다(Table 2, 3). 또한 까마귀쪽나무 열매 처리에 의해 apoptotic process에서 유의미한 유전자를 Scatter Plot으로 분포를 확인하였다(Figure 2).

세포사멸(Apoptosis)은 유전자에 의해 일어나는 세포의 능동적인 죽음을 의미한다. 세포 내부와 외부에서의 변화로 인해 세포가 피해를 입었을 때 스스로 죽음을 택하여 생물체에 해를 끼치지 않도록 하는 기작이다. 또한 발생초기에는 조직과 형성을 조절하는데 있어 필수적인 기작으로 내부와 외부의 신호, 세포와 면역세포들에 의한 신호에 의해 유도 될 수 있다. 세포사멸에 대한 연구는 1980년대 중반부터 시작되었으며, 현재 여러 상황에서의 분자적, 유전자적으로 세포사멸 조절에 관한 연구가 많은 범위내에서 진행되고 있다(12). Apoptosis는 형태학적 발달에 중요한 역할을 하며, 세포 수축, 핵 응축, 세포 단편화를 포함한 여러 가지 특징적인 형태학적 변화를 동반한다(13). Apoptosis는 수용체매 개성 신호, 성장인자의 제거, 항암 화학제, 반응성 산소기 (reactive oxygen species, ROS), 그리고 DNA 손상 등의 다양한 인자들에 의해 유발되며 이들 각 자극은 사포사멸 과정을 활성화하는 자체의 특이 경로를 갖고 있으나 결국은 공통된 결과로 수렴하게 된다(13). Apoptosis 신호전달 경로에는 사멸 수용체(외인성) 경로와 미토콘드리아(내인성) 매개 경로의 두 가지 주요 경로가 있다(13). 외인성 경로는 tumor necrosis factor superfamily의 세포 표면 발현 사멸 수용체에 의해 시작된다. 수용체가 활성화되면 caspase-8이 활성화되고 downstream effector caspases를 직접 절단하여 apoptosis를 시작한다(14). 세포 내 스트레스에 의해 시작되는 내인성 경로는 비특이적 막투과성이 증가되고 미토콘드리아 막전위의 점진적 감소의 특징적 변화를 초래하게 된다. 미토콘드리아 경로를 활성화하게 되며 cytochrome c가 세포질로 방출되고 caspase-9 및 Apaf-1과 결합하여 apoptosome을 형성하여 caspase-3 또는 caspase-7을 활성화하여 apoptosis를 일으킬 수 있다(13). Apoptosis 신호는 세포사멸을 억제하는 단백질 그룹(Bcl-2, Bcl-xL 및 Mcl-1)과 세포사멸을 촉진하는 단백질 그룹(Bax, Bak, Bok, Bim, Bad, Bcl-xS, Bid)이 있다(15).

소포체(endoplasmic reticulum, ER) 스트레스 반응은 적절한 세포 기능을 위협하는 세포 내 항상성의 불균형을 유발하는 수많은 조건에 의해 유발된다(16). 따라서 불균형을 해소하기 위한 ER 스트레스 반응은 항상성을 회복하기 위한 적응 노력을 활성화시킨다. 하지만 이러한 대책과 심각한 불균형이 지속되면 ER 스트레스 반응은 전체 유기체의 생존을 위해 결함이 있는 세포를 제거하기 위해 pro-apoptotic 프로그램을 시작하게 된다(16). 본 연구결과, 까마귀쪽나무 열매 추출물에 의해 activating transcription factor 4 (ATF4), a basic-leucine zipper (bZIP) transcriptional factor가 증가함을 보였다. ATF4는 아미노산 기아, 저산소증, 산화, 바이러스 감염 및 소포체 스트레스와 같은 다양한 세포 스트레스에 대한 반응과 관련이 있다(17). 세포의 스트레스 반응은 ATF4의 단백질 번역을 촉진하며 CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein (CHOP)과 같은 생존 및 apoptosis 촉진 단백질의 발현을 유도한다고 알려져 있다(18). 또한 까마귀쪽나무 열매 추출물에 의해 apoptosis를 촉진하는 Bim의 유전자 발현율이 증가하였다.

p53은 tumor suppressor로 널리 알려져 있으며 apoptosis 유도에 필수적이다(19). p53은 apoptosis를 유도하는 여러 BH3 도메인 전용 단백질을 조절하는데, 이들 단백질 중 일부는 최근에 p53 의존성 apoptosis의 중요한 매개체로 밝혀졌다(19). PUMA와 Noxa는 DNA 손상 후 p53 의존적 방식으로 활성화된다(20). 유방암세포주에서 까마귀쪽나무 열매에 의해 PUMA와 Noxa의 유전자 발현이 증가함을 관찰하였으며 ATF4, CHOP, Bim의 유전자발현과 함께 apoptosis 유도에 관여함을 증명하였다.

Table 2. List of increased gene expression after *Litsea japonica* treatment in apoptotic process

log2 Fold change ≥ 2

Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
SFN	439	3.156	stratifin
ZC3H12A	596	2.264	zinc finger CCCH-type containing 12A
RRAGC	615	2.747	Ras related GTP binding C
PLK3	718	3.616	polo like kinase 3
GADD45A	915	3.011	growth arrest and DNA damage inducible alpha
SH3GLB1	1009	2.098	SH3 domain containing GRB2 like endophilin B1

Table 2. *Cont.*

log2 Fold change ≥ 2

Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
GCLM	1064	7.472	glutamate-cysteine ligase modifier subunit
S100A14	1521	2.003	S100 calcium binding protein A14
IL6R	1547	3.265	interleukin 6 receptor
MEF2D	1622	2.085	myocyte enhancer factor 2D
AIFM2	2868	2.023	apoptosis inducing factor, mitochondria associated 2
UNC5B	2882	4.125	unc-5 netrin receptor B
DDIT4	2894	7.126	DNA damage inducible transcript 4
DDIT3	5577	3.257	DNA damage inducible transcript 3

Table 2. *Cont.*

log ₂ Fold change ≥ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
PAWR	5700	2.288	pro-apoptotic WT1 regulator
BCL2L2	6779	2.292	breast cancer 2
CHAC1	7691	11.981	ChaC glutathione-specific gamma-glutamylcyclotransferase 1
NUPR1	8685	40.196	nuclear protein 1, transcriptional regulator
PMAIP1	10942	3.467	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
BBC3	12125	3.466	BCL2 binding component 3
PPP1R15A	12202	6.039	protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A
KLF11	12668	3.177	Kruppel-like factor 11

Table 2. *Cont.*

log2 Fold change ≥ 2

Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
CYP1B1	12871	2.884	cytochrome P450 family 1 subfamily B member 1
BCL2L11	13370	2.369	BCL2 like 11
GULP1	13753	2.417	GULP, engulfment adaptor PTB domain containing 1
RHBDD1	14013	2.027	rhomboïd domain containing 1
TRIB3	14186	3.640	tribbles pseudokinase 3
CEBPB	14698	2.788	CCAAT /enhancer binding protein beta
HMOX1	15457	12.386	heme oxygenase 1
ATF4	15554	2.739	activating transcription factor 4

Table 2. *Cont.*

log2 Fold change ≥ 2

Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
PIM3	15684	2.211	Pim-3 proto-oncogene, serine /threonine kinase
DAB2	18170	3.597	DAB2, clathrin adaptor protein
JMY	18392	2.451	junction mediating and regulatory protein, p53 cofactor
NR3C1	18823	2.007	nuclear receptor subfamily 3 group C member 1
SQSTM1	19102	3.023	sequestosome 1
CDKN1A	19653	2.512	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
TNFRSF21	19791	2.700	tumor necrosis factor receptor superfamily member 21
RPS6KA2	20372	2.545	ribosomal protein S6 kinase A2

Table 2. *Cont.*

log2 Fold change ≥ 2

Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
BNIP3L	22985	2.276	BCL2 /adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like
CTSL	24030	4.005	cathepsin L
BEX2	25206	2.564	brain expressed X-linked 2

Table 3. List of decreased gene expression after *Litsea japonica* treatment in apoptotic process

log2 Fold change ≤ 2

Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
E2F2	372	0.354	E2F transcription factor 2
THEM4	1455	0.461	thioesterase superfamily member 4
CDK1	2817	0.311	cyclin-dependent kinase 1
ESPL1	5433	0.232	extra spindle pole bodies like 1, separase
CIT	5972	0.447	citron rho-interacting serine /threonine kinase
BRCA2	6253	0.299	breast cancer 2

Table 3. *Cont.*

log2 Fold change ≤ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
PARP2	6706	0.488	poly(ADP-ribose) polymerase 2
G2E3	6850	0.428	G2 /M-phase specific E3 ubiquitin protein ligase
SIX1	7020	0.262	SIX homeobox 1
SIVA1	7411	0.461	SIVA1 apoptosis inducing factor
BUB1B	7662	0.347	BUB1 mitotic checkpoint serine /threonine kinase B
CTSH	8087	0.318	cathepsin H
ERN2	8651	0.334	endoplasmic reticulum to nucleus signaling 2
WWOX	9136	0.444	WW domain containing oxidoreductase

Table 3. *Cont.*

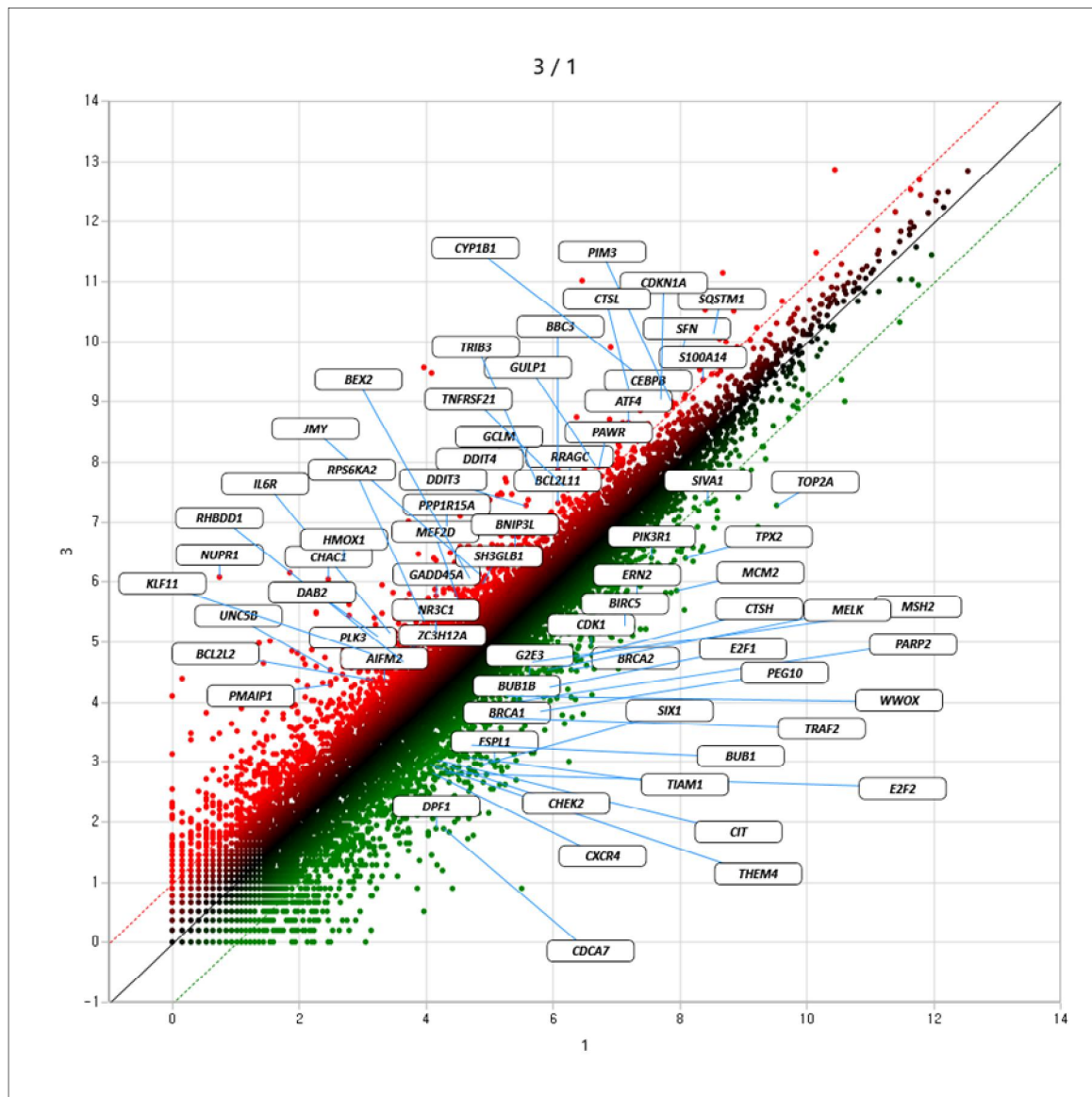
log2 Fold change ≤ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
TOP2A	9910	0.209	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa
BRCA1	10040	0.387	breast cancer 1
BIRC5	10539	0.274	baculoviral IAP repeat containing 5
DPF1	11838	0.207	double PHD fingers 1
MSH2	12939	0.498	mutS homolog 2
BUB1	13367	0.369	BUB1 mitotic checkpoint serine /threonine kinase
CXCR4	13524	0.408	C-X-C motif chemokine receptor 4
CDCA7	13676	0.191	cell division cycle associated 7

Table 3. *Cont.*

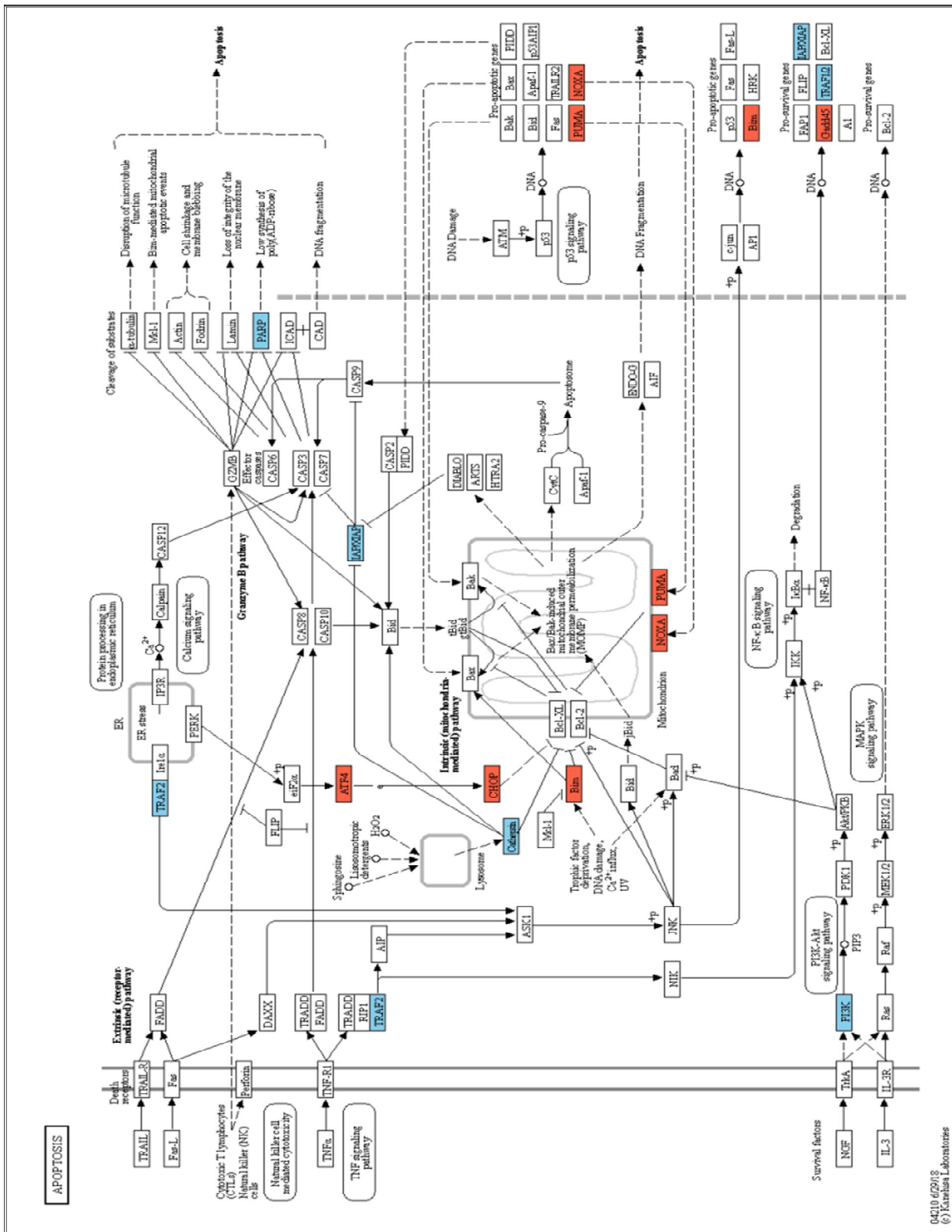
log2 Fold change ≤ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
TPX2	14437	0.308	TPX2, microtubule-associated
E2F1	14475	0.308	E2F transcription factor 1
TIAM1	14964	0.333	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1
CHEK2	15369	0.390	checkpoint kinase 2
MCM2	16552	0.233	minichromosome maintenance complex component 2
PIK3R1	18302	0.446	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1
PEG10	22212	0.258	paternally expressed 10
MELK	23863	0.388	maternal embryonic leucine zipper kinase

Table 3. *Cont.*

log2 Fold change ≤ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
TRAF2	24547	0.407	TNF receptor associated factor 2



Figures 3. Significant gene Scatter Plot in apoptotic process of *Litsea japonica* treatment



04210 d/29/13
© Keio University

Figures 4. KEGG. Apoptosis signaling pathway.

(2) 까마귀쪽나무 열매 추출물 처리가 cell cycle에 미치는 영향

까마귀쪽나무 열매 추출물의 cell cycle에서 유방암세포와 관련된 기능에 유의미하다고 보이는 유전자 중 증가 발현된 유전자를 추출하여 그 기능에 관해 살펴보았다(Table 4, 5).

세포의 분열이 일어난 후 다시 다음 세포의 분열이 일어나기까지의 일련의 과정을 세포주기(cell cycle)라고 한다. 세포주기는 G1, S, G2 및 M기로 구성되어 있으며, G1기와 G2기에 세포주기를 조절하는 checkpoint가 존재하는 것으로 알려져 있다(21). 정상적인 세포는 DNA damage, ROS, glucose deprivation과 같은 스트레스에 의하여 손상을 입게 되면 checkpoint를 통해 세포 분열을 중지하지만 이와 달리 암세포는 스스로 분열을 조절하지 못하고 비정상적인 분열을 통하여 무한정적인 증식을 한다(21). 세포주기의 진행에 있어서 중요하게 작용하는 인자로는 cyclin과 cyclin-dependent kinase(CDK)가 있으며, cyclin-CDK 복합체가 형성되어야 다음 주기가 진행된다(22). G1/S checkpoint에는 cyclin D-CDK4/6 복합체와 cyclin E-CDK2 복합체가 관여하며, G2/M checkpoint에는 cyclin A-CDK2 복합체와 cyclin B-CDK1 복합체가 관련되어 있다(22). Cyclin과 CDK는 많은 암세포주에서 과발현되고 있으며, cyclin-CDK 복합체의 저해가 세포주기 정지(cell cycle arrest)를 통한 암세포의 증식 억제에 효과적인 것으로 보고되었다(22). 본 연구 결과, 까마귀쪽나무 열매 추출물의 처리에 의해 cyclin A, cyclin B, CDK1, CDK2의 유전자 발현이 감소한 것을 나타내었다. 또한 G1/S 단계에서 MCM과 함께 DNA 복제의 시작에 중요한 CDC6 및 CDC45의 유전자 발현이 감소함을 관찰하였다. CDC6 및 CDC45는 암의 진행과도 연관이 있으며, CDC6가 적게 발현되는 경우 p21의 발현을 증가시켜 apoptosis를 촉진하고 cyclin D과 cyclin A2를 억제하여 G1기 정지를 유도함으로써 암의 형성을 억제하는 것으로 알려졌다(23). 따라서 위와 같은 결과를 통해 까마귀쪽나무 열매 추출물이 cell cycle의 여러단계에 미치는 유전자발현을 억제시켜 암의 증식을 억제하는데 기여한다고 보여진다.

Table 4. List of increased gene expression after *Litsea japonica* treatment in cell cycle process

log2 Fold change ≥ 2

Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
KLHL21	126	2.351	kelch like family member 21
TRNP1	445	2.190	TMF1-regulated nuclear protein 1
PLK3	718	3.616	polo like kinase 3
GADD45A	915	3.011	growth arrest and DNA damage inducible alpha
PHGDH	1292	3.390	phosphoglycerate dehydrogenase
TDRKH	1449	2.669	tudor and KH domain containing

Table 4. *Cont.*

log2 Fold change ≥ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
LMNA	1607	2.382	lamin A /C
AVPI1	3122	2.057	arginine vasopressin induced 1
TACC2	3323	2.717	transforming acidic coiled-coil containing protein 2
OVOL1	4260	2.710	ovo like zinc finger 1
DDIT3	5577	3.257	DNA damage inducible transcript 3
LATS2	6158	2.351	large tumor suppressor kinase 2
AJUBA	6767	2.139	ajuba LIM protein
ZFYVE26	7078	2.011	zinc finger FYVE-type containing 26

Table 4. *Cont.*

log2 Fold change ≥ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
DYNC1H1	7375	2.010	dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1
PSMC3IP	10011	2.254	PSMC3 interacting protein
CHMP1B	10739	2.121	charged multivesicular body protein 1B
SPIRE1	10748	2.213	spire type actin nucleation factor 1
KLF11	12668	3.177	Kruppel-like factor 11
BCL2L11	13370	2.369	BCL2 like 11
NABP1	13776	2.267	nucleic acid binding protein 1
TUBA4A	13977	2.338	tubulin alpha 4a

Table 4. *Cont.*

log2 Fold change ≥ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
PRNP	14266	2.204	prion protein
SIK1	15098	4.209	salt inducible kinase 1
PIM3	15684	2.211	Pim-3 proto-oncogene, serine /threonine kinase
ARL8B	15737	2.374	ADP ribosylation factor like GTPase 8B
KAT2B	15858	2.342	K(lysine) acetyltransferase 2B
CCNG2	17510	2.899	cyclin G2
NR3C1	18823	2.007	nuclear receptor subfamily 3 group C member 1
DUSP1	19004	3.533	dual specificity phosphatase 1

Table 4. *Cont.*

log2 Fold change ≥ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
TUBB2A	19161	2.268	tubulin beta 2A class IIa
CDKN1A	19653	2.512	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
PTP4A1	19868	2.409	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1
RB1CC1	23124	2.133	RB1 inducible coiled-coil 1
CDKN2B	23746	2.236	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B
BEX2	25206	2.564	brain expressed X-linked 2

Table 5. List of decreased gene expression after *Litsea japonica* treatment in cell cycle process

log2 Fold change ≤2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
E2F2	372	0.354	E2F transcription factor 2
CLSPN	577	0.157	claspin
CDCA8	603	0.266	cell division cycle associated 8
CDC20	687	0.364	cell division cycle 20
KIF2C	711	0.236	kinesin family member 2C
NASP	735	0.394	nuclear autoantigenic sperm protein

Table 5. *Cont.*

log2 Fold change ≤ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
STIL	772	0.388	SCL /TAL1 interrupting locus
PSRC1	1152	0.258	proline and serine rich coiled-coil 1
TXNIP	1329	0.466	thioredoxin interacting protein
IQGAP3	1623	0.388	IQ motif containing GTPase activating protein 3
NES	1629	0.413	nestin
NUF2	1769	0.351	NUF2, NDC80 kinetochore complex component
ASPM	1992	0.343	abnormal spindle microtubule assembly
KIF14	2006	0.296	kinesin family member 14

Table 5. *Cont.*

log2 Fold change ≤ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
NEK2	2156	0.332	NIMA related kinase 2
DTL	2159	0.128	denticleless E3 ubiquitin protein ligase homolog
CENPF	2182	0.354	centromere protein F
EXO1	2373	0.170	exonuclease 1
MASTL	2632	0.394	microtubule associated serine /threonine kinase like
ZWINT	2801	0.209	ZW10 interacting kinetochore protein
CDK1	2817	0.311	cyclin-dependent kinase 1
KIF20B	3040	0.331	kinesin family member 20B

Table 5. *Cont.*

log2 Fold change ≤ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
KIF11	3062	0.253	kinesin family member 11
CEP55	3068	0.307	centrosomal protein 55
HELLS	3081	0.171	helicase, lymphoid-specific
MKI67	3376	0.171	marker of proliferation Ki-67
RRM1	3538	0.371	ribonucleotide reductase catalytic subunit M1
DGKZ	3891	0.486	diacylglycerol kinase zeta
FEN1	4110	0.221	flap structure-specific endonuclease 1
INCENP	4117	0.292	inner centromere protein

Table 5. *Cont.*

log2 Fold change ≤ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
CDCA5	4226	0.256	cell division cycle associated 5
MRE11A	4558	0.499	MRE11 homolog A, double strand break repair nuclease
NCAPD3	4897	0.227	non-SMC condensin II complex subunit D3
FOXM1	4940	0.311	forkhead box M1
RAD51AP1	4955	0.256	RAD51 associated protein 1
NCAPD2	4978	0.389	non-SMC condensin I complex subunit D2
CDCA3	4998	0.250	cell division cycle associated 3
TUBA1B	5332	0.454	tubulin alpha 1b

Table 5. *Cont.*

log2 Fold change ≤ 2

Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
RACGAP1	5358	0.360	Rac GTPase activating protein 1
ESPL1	5433	0.232	extra spindle pole bodies like 1, separase
CDK2	5519	0.488	cyclin-dependent kinase 2
TIMELESS	5543	0.478	timeless circadian clock
CIT	5972	0.447	citron rho-interacting serine /threonine kinase
POLE	6117	0.340	polymerase (DNA) epsilon, catalytic subunit
SKA3	6160	0.328	spindle and kinetochore associated complex subunit 3
BRCA2	6253	0.299	breast cancer 2

Table 5. *Cont.*

log2 Fold change ≤ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
MIS18BP1	6920	0.340	MIS18 binding protein 1
WDHD1	6976	0.385	WD repeat and HMG-box DNA binding protein 1
DLGAP5	6980	0.252	discs large homolog associated protein 5
BUB1B	7662	0.347	BUB1 mitotic checkpoint serine /threonine kinase B
KNSTRN	7671	0.388	kinetochore-localized astrin /SPAG5 binding protein
CASC5	7678	0.280	cancer susceptibility candidate 5
RAD51	7680	0.462	RAD51 recombinase
OIP5	7696	0.445	Opa interacting protein 5

Table 5. *Cont.*

log2 Fold change ≤ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
NUSAP1	7697	0.286	nucleolar and spindle associated protein 1
CCNB2	7864	0.351	cyclin B2
TIPIN	7928	0.362	TIMELESS interacting protein
KIF23	7963	0.274	kinesin family member 23
TICRR	8190	0.262	TOPBP1 interacting checkpoint and replication regulator
BLM	8214	0.328	Bloom syndrome RecQ like helicase
PRC1	8221	0.270	protein regulator of cytokinesis 1
CCNF	8408	0.200	cyclin F

Table 5. *Cont.*

log2 Fold change ≤ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
CCP110	8592	0.374	centriolar coiled-coil protein 110kDa
PLK1	8650	0.333	polo-like kinase 1
KIF22	8721	0.473	kinesin family member 22
PARD6A	9006	0.321	par-6 family cell polarity regulator alpha
CDT1	9232	0.275	chromatin licensing and DNA replication factor 1
AURKB	9499	0.241	aurora kinase B
SPAG5	9700	0.228	sperm associated antigen 5
CDC6	9906	0.233	cell division cycle 6

Table 5. *Cont.*

log2 Fold change ≤ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
TOP2A	9910	0.209	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa
TUBG1	10013	0.491	tubulin gamma 1
BRCA1	10040	0.387	breast cancer 1
RAD51C	10280	0.472	RAD51 paralog C
SKA2	10283	0.446	spindle and kinetochore associated complex subunit 2
BRIP1	10314	0.225	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1
SRSF2	10520	0.447	serine /arginine-rich splicing factor 2
BIRC5	10539	0.274	baculoviral IAP repeat containing 5

Table 5. *Cont.*

log2 Fold change ≤ 2

Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
NDC80	10684	0.247	NDC80 kinetochore complex component
CHAF1A	11177	0.450	chromatin assembly factor 1 subunit A
UHRF1	11192	0.162	ubiquitin like with PHD and ring finger domains 1
HAUS8	11532	0.288	HAUS augmin like complex subunit 8
LIG1	12168	0.350	DNA ligase 1
CENPA	12767	0.415	centromere protein A
MSH2	12939	0.498	mutS homolog 2
NCAPH	13247	0.237	non-SMC condensin I complex subunit H

Table 5. *Cont.*

log2 Fold change ≤ 2

Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
BUB1	13367	0.369	BUB1 mitotic checkpoint serine /threonine kinase
MCM6	13521	0.428	minichromosome maintenance complex component 6
SPC25	13635	0.181	SPC25, NDC80 kinetochore complex component
HJURP	14093	0.389	Holliday junction recognition protein
PCNA	14272	0.248	proliferating cell nuclear antigen
MCM8	14284	0.438	minichromosome maintenance 8 homologous recombination repair factor
GINS1	14407	0.298	GINS complex subunit 1
TPX2	14437	0.308	TPX2, microtubule-associated

Table 5. *Cont.*

log2 Fold change ≤ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
E2F1	14475	0.308	E2F transcription factor 1
DSN1	14530	0.372	DSN1 homolog, MIS12 kinetochore complex component
RBL1	14534	0.167	retinoblastoma-like 1
FAM83D	14567	0.260	family with sequence similarity 83 member D
MYBL2	14585	0.421	MYB proto-oncogene like 2
UBE2C	14640	0.322	ubiquitin conjugating enzyme E2 C
AURKA	14731	0.376	aurora kinase A
CHAF1B	15024	0.371	chromatin assembly factor 1 subunit B

Table 5. *Cont.*

log2 Fold change ≤ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
CDC45	15224	0.182	cell division cycle 45
RANBP1	15239	0.458	RAN binding protein 1
CHEK2	15369	0.390	checkpoint kinase 2
MCM5	15458	0.249	minichromosome maintenance complex component 5
GTSE1	15666	0.195	G2 and S-phase expressed 1
FANCD2	15779	0.398	Fanconi anemia complementation group D2
SGOL1	15859	0.323	Shugoshin-like 1
KIF15	16004	0.387	kinesin family member 15

Table 5. *Cont.*

log2 Fold change ≤ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
TRIP13	18022	0.344	thyroid hormone receptor interactor 13
SKP2	18148	0.194	S-phase kinase-associated protein 2, E3 ubiquitin protein ligase
CENPK	18287	0.329	centromere protein K
CCNB1	18305	0.401	cyclin B1
KIF20A	18686	0.498	kinesin family member 20A
CDC25C	18689	0.401	cell division cycle 25C
SPDL1	18979	0.318	spindle apparatus coiled-coil protein 1
GMNN	19277	0.327	geminin, DNA replication inhibitor

Table 5. *Cont.*

log2 Fold change ≤ 2

Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
KIFC1	19597	0.198	kinesin family member C1
MCM3	19820	0.382	minichromosome maintenance complex component 3
TTK	19926	0.302	TTK protein kinase
CENPW	20135	0.415	centromere protein W
EPB41L2	20152	0.475	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 2
MYB	20193	0.174	MYB proto-oncogene, transcription factor
FBXO5	20299	0.227	F-box protein 5
ANLN	21876	0.236	anillin actin binding protein

Table 5. *Cont.*

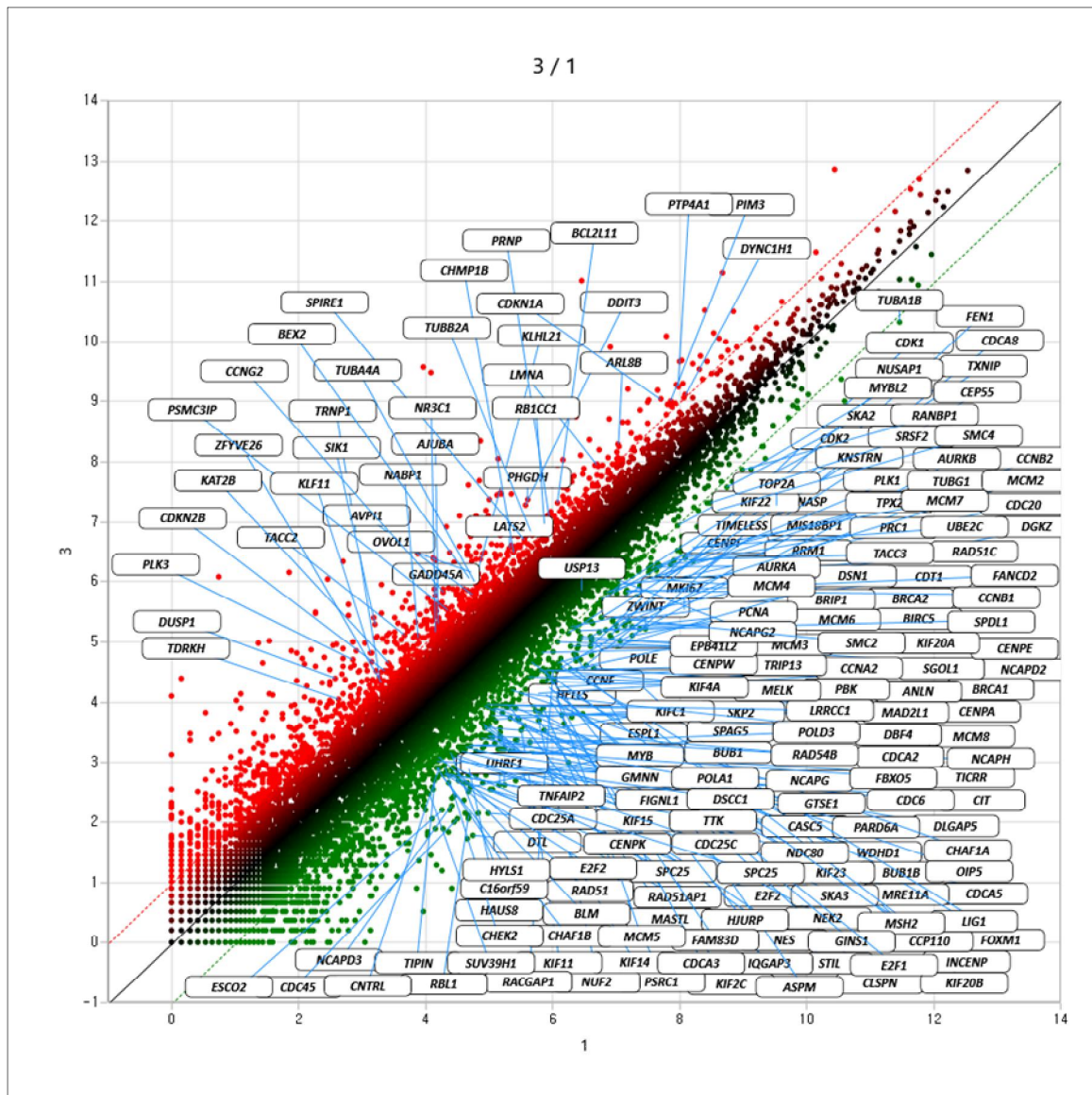
log2 Fold change ≤ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
FIGNL1	21969	0.385	fidgetin like 1
DBF4	22167	0.388	DBF4 zinc finger
MCM7	22273	0.290	minichromosome maintenance complex component 7
NCAPG2	22769	0.500	non-SMC condensin II complex subunit G2
CDCA2	22982	0.343	cell division cycle associated 2
ESCO2	22997	0.238	establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 2
PBK	22998	0.434	PDZ binding kinase
MCM4	23112	0.352	minichromosome maintenance complex component 4

Table 5. *Cont.*

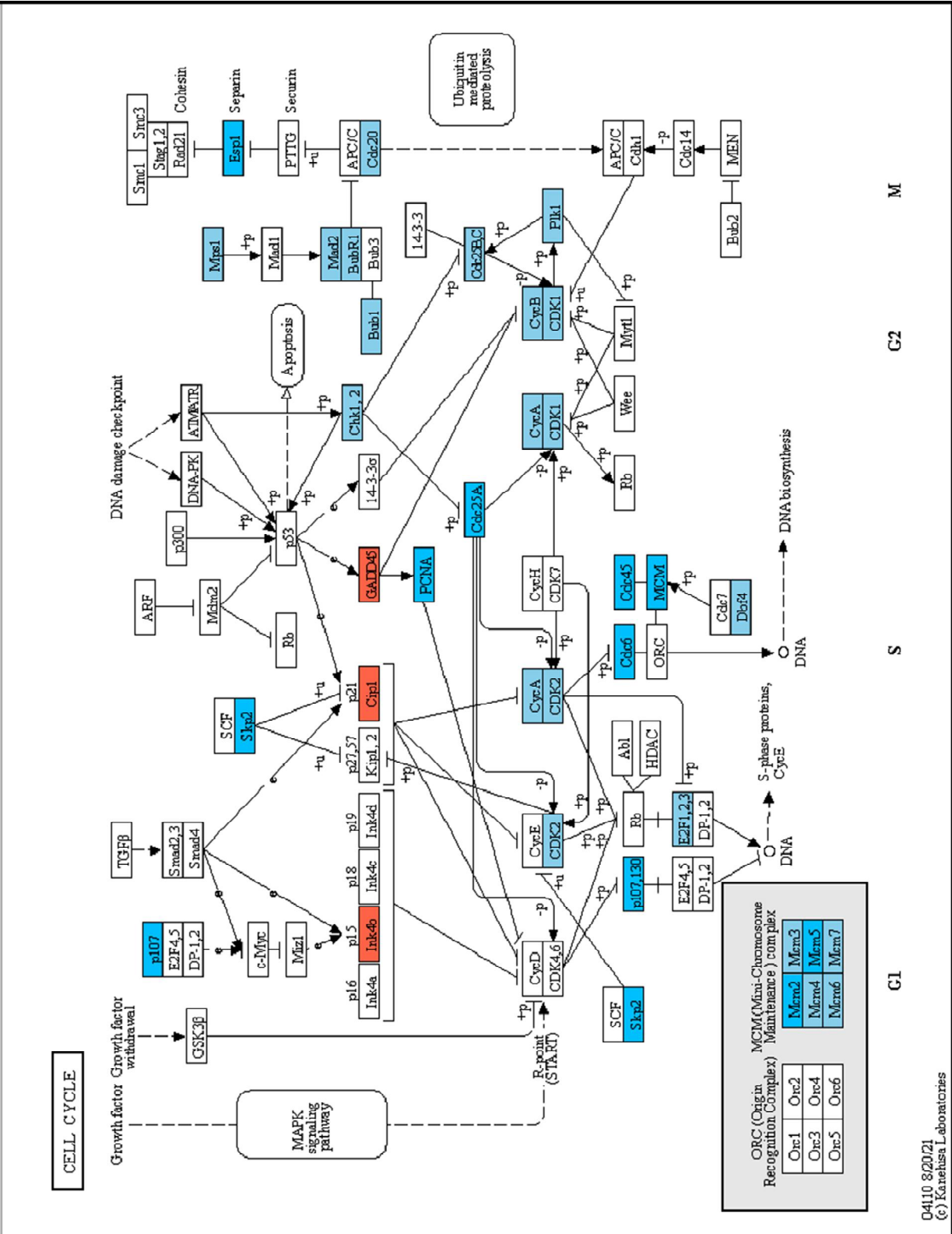
log2 Fold change ≤ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
LRRCC1	23280	0.499	leucine rich repeat and coiled-coil centrosomal protein 1
RAD54B	23328	0.392	RAD54 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)
DSCC1	23437	0.355	DNA replication and sister chromatid cohesion 1
MELK	23863	0.388	maternal embryonic leucine zipper kinase
SMC2	24170	0.335	structural maintenance of chromosomes 2
CNTRL	24281	0.406	centriolin
POLA1	24767	0.358	polymerase (DNA) alpha 1, catalytic subunit
SUV39H1	24888	0.333	suppressor of variegation 3-9 homolog 1

Table 5. *Cont.*

log2 Fold change ≤ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
KIF4A	25048	0.342	kinesin family member 4A



Figures 5. Significant gene Scatter Plot in cell cycle of *Litsea japonica* treatment.



Figures 6. KEGG. Cell cycle signaling pathway.

O4110 8/20/21
(c) Kanehisa Laboratories

(3) 까마귀쪽나무 열매 추출물 처리가 cell death에 미치는 영향

유방암세포에서 까마귀쪽나무 열매 추출물이 cell death와 관련하여 증가 또는 감소된 유전자 및 그 기능에 관해 살펴보았다(Table 6,7). 또한 까마귀쪽나무 열매 처리에 의해 cell death 과정에서 유의미한 유전자를 Scatter Plot으로 분포를 확인하였다(Figure 4).

세포의 삶과 죽음은 세포 내부에서도 결정되지만 외부로부터 전달되는 화학적 신호에 의해서 더 크게 조절된다(24). 외부로부터 전달되는 신호 중 세포사를 유발하는 기전은 크게 세 가지로 나뉘게 된다. 먼저 apoptosis는 세포가 주변 조직에 영향을 주지 않으면서 조용히 자살하는 시스템으로, 발달 과정에서 필요 없어진 조직, 노화된 조직, 손상된 조직을 제거하는 방식이다. 두 번째는 세포가 물리적, 화학적으로 매우 극한에 환경에 빠지면 세포가 터져 죽는 현상을 necrosis라 한다. 마지막 세 번째는 세포가 에너지가 없는 환경에 놓이거나, 세포 내의 기관에 이상이 발생하여 제거되어야 하는 경우 세포가 살아남기 위해 자신의 소기관을 소화시키게 되는데 그 과정에서 세포가 더 이상 생존이 불가해지면 죽게 되는 현상이다(24). Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45 (GADD45)는 세포 스트레스 반응에 중요한 역할을 하며 종양 억제인자 역할을 한다고 알려져 있다(25). GADD45에 의한 cell cycle의 조절은 p53과 함께 조절된다(25). 또한 p53 및 GADD45는 cell-cycle 정지 및 cell death에 중요한 역할을 하며, 이러한 유전자의 감소는 세포가 anti-apoptotic 및 화학저항성과 같은 특성을 갖도록 유도한다(26). 본 연구 결과, 까마귀쪽나무 열매 추출물에 의해 GADD45의 유전자발현이 증가함을 관찰하였으며 이는 유방암세포의 증식 및 cell cycle, apoptosis의 유도에 영향을 미치는 것으로 생각되어진다.

Table 6. List of increased gene expression after *Litsea japonica* treatment in cell death

log₂ Fold change ≥ 2

Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
SFN	439	3.156	stratifin
ZC3H12A	596	2.264	zinc finger CCCH-type containing 12A
RRAGC	615	2.747	Ras related GTP binding C
PLK3	718	3.616	polo like kinase 3
GADD45A	915	3.011	growth arrest and DNA damage inducible alpha
SH3GLB1	1009	2.098	SH3 domain containing GRB2 like endophilin B1

Table 6. *Cont.*

log2 Fold change ≥ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
GCLM	1064	7.472	glutamate-cysteine ligase modifier subunit
S100A14	1521	2.003	S100 calcium binding protein A14
IL6R	1547	3.265	interleukin 6 receptor
MEF2D	1622	2.085	myocyte enhancer factor 2D
OPTN	2544	3.066	optineurin
AIFM2	2868	2.023	apoptosis inducing factor, mitochondria associated 2
UNC5B	2882	4.125	unc-5 netrin receptor B
DDIT4	2894	7.126	DNA damage inducible transcript 4

Table 6. *Cont.*

log2 Fold change ≥ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
DDIT3	5577	3.257	DNA damage inducible transcript 3
PAWR	5700	2.288	pro-apoptotic WT1 regulator
BCL2L2	6779	2.292	BCL2 like 2
CHAC1	7691	11.981	ChaC glutathione-specific gamma-glutamylcyclotransferase 1
NUPR1	8685	40.196	nuclear protein 1, transcriptional regulator
PMAIP1	10942	3.467	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
BBC3	12125	3.466	BCL2 binding component 3
PPP1R15A	12202	6.039	protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A

Table 6. *Cont.*

log2 Fold change ≥ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
KLF11	12668	3.177	Kruppel-like factor 11
FOSL2	12814	2.350	FOS like 2, AP-1 transcription factor subunit
CYP1B1	12871	2.884	cytochrome P450 family 1 subfamily B member 1
BCL2L11	13370	2.369	BCL2 like 11
GULP1	13753	2.417	GULP, engulfment adaptor PTB domain containing 1
RHBDD1	14013	2.027	rhomboid domain containing 1
TRIB3	14186	3.640	tribbles pseudokinase 3
CEBPB	14698	2.788	CCAAT /enhancer binding protein beta

Table 6. *Cont.*

log ₂ Fold change ≥ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
HMOX1	15457	12.386	heme oxygenase 1
ATF4	15554	2.739	activating transcription factor 4
PIM3	15684	2.211	Pim-3 proto-oncogene, serine /threonine kinase
DAB2	18170	3.597	DAB2, clathrin adaptor protein
JMY	18392	2.451	junction mediating and regulatory protein, p53 cofactor
NR3C1	18823	2.007	nuclear receptor subfamily 3 group C member 1
SQSTM1	19102	3.023	sequestosome 1
CDKN1A	19653	2.512	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A

Table 6. *Cont.*

log₂ Fold change ≥ 2

Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
TNFRSF21	19791	2.700	tumor necrosis factor receptor superfamily member 21
RPS6KA2	20372	2.545	ribosomal protein S6 kinase A2
PNPLA8	22399	2.390	patatin like phospholipase domain containing 8
BNIP3L	22985	2.276	BCL2 /adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like
CTSL	24030	4.005	cathepsin L
BEX2	25206	2.564	brain expressed X-linked 2

Table 7. List of decreased gene expression after *Litsea japonica* treatment in cell death

log2 Fold change ≤ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
E2F2	372	0.354	E2F transcription factor 2
THEM4	1455	0.461	thioesterase superfamily member 4
CDK1	2817	0.311	cyclin-dependent kinase 1
ESPL1	5433	0.232	extra spindle pole bodies like 1, separase
CIT	5972	0.447	citron rho-interacting serine /threonine kinase
BRCA2	6253	0.299	breast cancer 2

Table 7. *Cont.*

log2 Fold change ≤ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
PARP2	6706	0.488	poly(ADP-ribose) polymerase 2
G2E3	6850	0.428	G2 /M-phase specific E3 ubiquitin protein ligase
SIX1	7020	0.262	SIX homeobox 1
ITPK1	7251	0.407	inositol-tetrakisphosphate 1-kinase
SIVA1	7411	0.461	SIVA1 apoptosis inducing factor
BUB1B	7662	0.347	BUB1 mitotic checkpoint serine /threonine kinase B
CTSH	8087	0.318	cathepsin H
ERN2	8651	0.334	endoplasmic reticulum to nucleus signaling 2

Table 7. *Cont.*

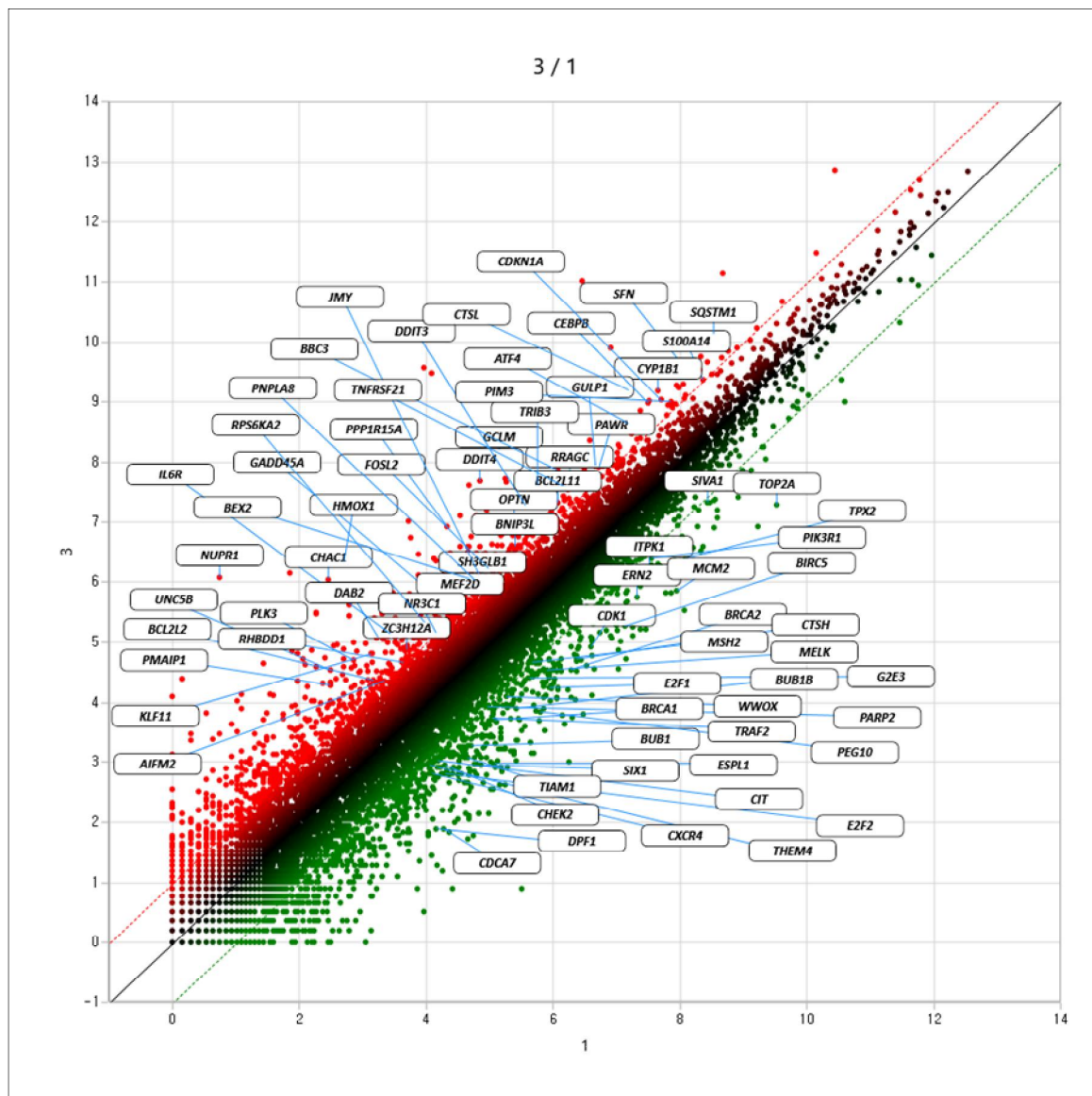
log2 Fold change ≤ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
WWOX	9136	0.444	WW domain containing oxidoreductase
TOP2A	9910	0.209	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa
BRCA1	10040	0.387	breast cancer 1
BIRC5	10539	0.274	baculoviral IAP repeat containing 5
DPF1	11838	0.207	double PHD fingers 1
MSH2	12939	0.498	mutS homolog 2
BUB1	13367	0.369	BUB1 mitotic checkpoint serine /threonine kinase
CXCR4	13524	0.408	C-X-C motif chemokine receptor 4

Table 7. *Cont.*

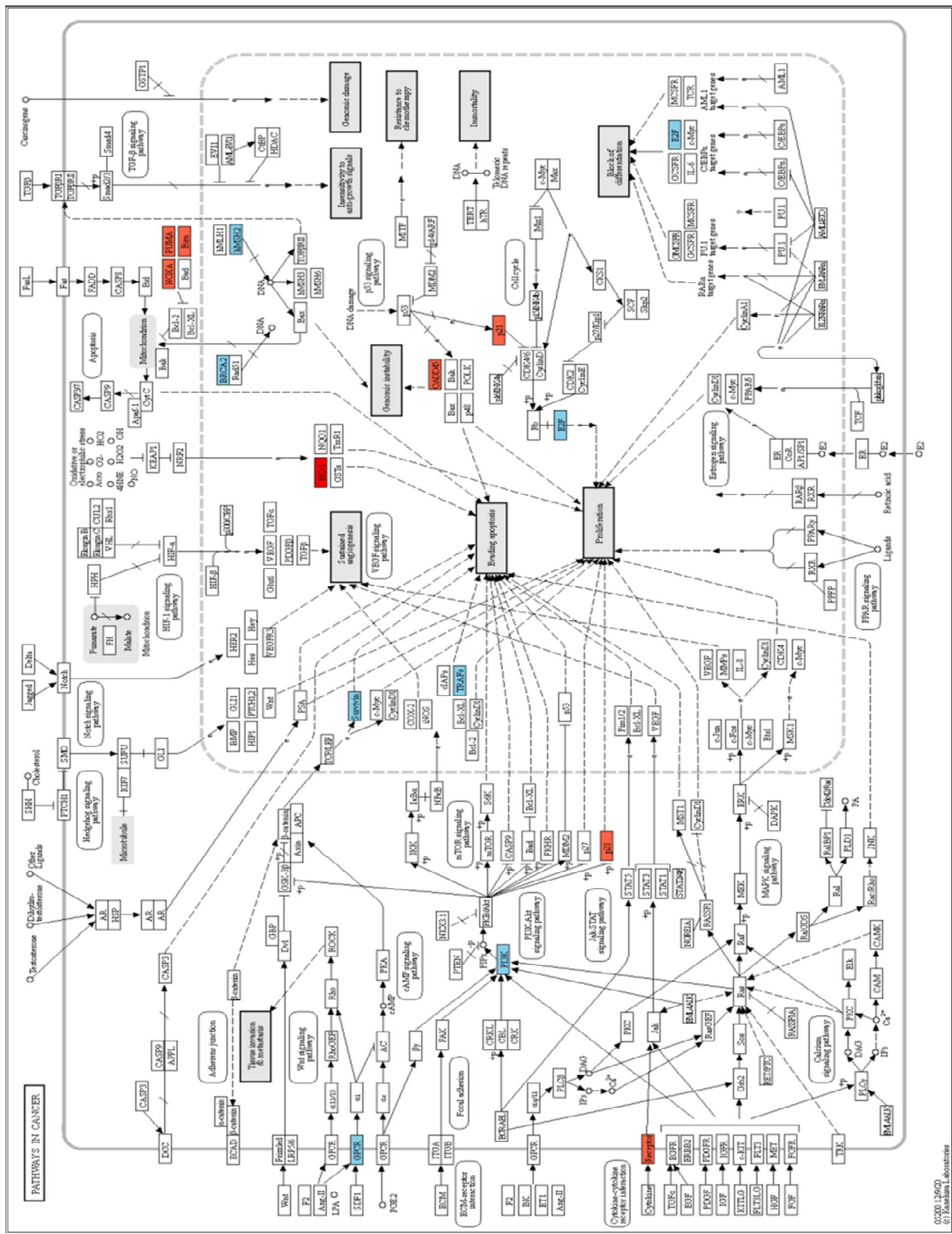
log2 Fold change ≤ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
CDCA7	13676	0.191	cell division cycle associated 7
TPX2	14437	0.308	TPX2, microtubule-associated
E2F1	14475	0.308	E2F transcription factor 1
TIAM1	14964	0.333	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1
CHEK2	15369	0.390	checkpoint kinase 2
MCM2	16552	0.233	minichromosome maintenance complex component 2
PIK3R1	18302	0.446	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1
PEG10	22212	0.258	paternally expressed 10

Table 7. *Cont.*

log2 Fold change ≤ 2			
Gene symbol	Gene ID	Fold change	Gene name
MELK	23863	0.388	maternal embryonic leucine zipper kinase
TRAF2	24547	0.407	TNF receptor associated factor 2



Figures 7. Significant gene Scatter Plot in cell death of *Litsea japonica* treatment



Figures 8. KEGG. Cell death signaling pathway.

VI. 요약 및 결론

본 연구는 지방암세포 증식 억제에 효과를 보인 까마귀쪽나무 열매 추출물을 이용하여 발현되는 유전체를 분석, 해독하는 방법인 차세대염기서열분석(next generation sequencing; NGS)의 유전자 분석법을 이용하여 다량의 유전자 발현을 관찰하고 세포에 영향을 미치는 유전자를 선별해보았다. 이러한 유전자 분석을 통해 얻은 데이터의 실제 생물학적 의미를 확인하기 위해 농도별 실험에서 얻은 데이터를 대조군과 비교하여 암세포에서의 apoptotic process(세포사멸), cell cycle(세포주기), cell death(세포사) 등을 조사하였으며 유전자 데이터 분석은 gene ontology Analysis, scatter plot, clustering을 실시하였다. 이때 대조군에 비해 발현량에서 2배 이상 높게 발현되거나 낮게 발현된(up significant: fold change \geq 2, down significant: fold change \leq 2) 유전자를 발현이 증가, 감소한 유의한 유전자로 선별하여 유의미하다고 간주하였다. Gene ontology analysis에서는 전체 유전자 25,737개 중 세포사멸(927개), 세포주기(1,208개), 세포사(1,000개) 3가지 항목으로 결과를 분석하였으며 유전자 칩 각각에 대해 세포사멸, 세포주기, 세포사 반응의 3가지 항목별로 구분하여 유전자 발현 개수와 비율, gene name, 발현량, 발현경로(pathways)를 확인하였다.

참 고 문 헌

1. www.cancer.go.kr.
2. Wanga X., Yuana S., Wanga J., Lina P., Liub G., Lua Y., Zhanga J., Wangc W., Weid Y. 2006. Anticancer activity of litchi fruit pericarp extract against human breast cancer in vitro and in vivo. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 215(2):166-178
3. kim JH, Kim JK, Kang WW, Ha YS, Sang-Won Choi and Kwang-Deog Moon. 2003. Chemical Compositions and DPPH Radical Scavenger Activity in Different Sections of Safflower. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32(5),733~738
4. Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., Peter, M.E. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 17:1675-1687, 1998.
5. Lawen, A. Apoptosis - an introduction. *Bioessays* 25:888-896, 2003.
6. Jin, Z., El-Deiry, W.S. 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 4: 139-163
7. Thompson JF, Steinmann KE. Single molecule sequencing with a HeliScope genetic analysis system. *Curr Protoc Mol Biol*. 2010 Oct;Chapter 7:Unit7.10.
8. Tanaka, H., T. Nakamura and K. Ichino. 1990. Butanolides from *Litsea japonica*. *Phytochemistry* 29:857-859.
9. Min, B.S., S.Y. Lee, J. H. Kim, O.K. Kwon, B.Y. Park, R.B. An, J.K. Lee, H.I. Moon, T.J., Kim, Y.H. Kim, H. Joung and H.K. Lee. 2003. Lactones from the leaves of the *Litsea japonica* and their anti-complement activity. *J. Nat. Prod.* 66:1388-1390.
10. Koo H.J., Yoon W.J., Sohn E.H., Ham Y.M., Jang S.A., Kwon J.E., Jeong Y.J., Kwak J.H., Sohn E.S., Park S.Y., Jang K.H., Seung N.K., Han H.S., Jung Y.H., Kang S.C. 2014. The analgesic and anti-inflammatory effects of *Litsea japonica* fruit are mediated via suppression of NF- κ B and

- JNK/p38 MAPK activation. *Int. Immunopharmacol.* 22:84-97.
11. Lee SJ, Lee JM. 2020. Comparative Study of *Litsea japonica* Fruit and Leaf Extract on the Antioxidant and Anti-proliferation Effects in Breast Cancer Cells. *Korean J Community Living Sci.* 31(3):365~373, doi.org/10.7856/kjcls.2020.31.3.365
 12. Christopher Potten and James Wilson, *Apoptosis*, pp. 9-11, 월드사이언스, 서울, 2006.
 13. Saraste, A.; Pulkki, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 2000, 45, 528-537,
 14. Fulda, S.; Debatin, K.M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006, 25, 4798-4811
 15. Knudson, C.M.; Korsmeyer, S.J. Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death. *Nat Genet* 1997, 16, 358-363,
 16. Liu X, Guo S, Liu X, Su L. Chaetocin induces endoplasmic reticulum stress response and leads to death receptor 5-dependent apoptosis in human non-small cell lung cancer cells. *Apoptosis.* 2015;20(11):1499-1507.
 17. Tanaka T, Tsujimura T, Takeda K, Sugihara A, Maekawa A, Terada N, Yoshida N, Akira S. Targeted disruption of ATF4 discloses its essential role in the formation of eye lens fibres. *Genes Cells*, 3, 801-810 (1998).
 18. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.*, 7, 880-885 (2006).
 19. Yu J, Zhang L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Jun 10;331(3):851-8.
 20. Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell.* 2001 Mar;7(3):673-82.
 21. Sherr CJ. 1996. Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-1677.
 22. Gérard C, Goldbeter A. 2014. The balance between cell cycle arrest

- and cell proliferation: control by the extracellular matrix and by contact inhibition. *Interface Focus* 4: 20130075.
23. Jiang W, Yu Y, Liu J, Zhao Q, Wang J, Zhang J, Dang X. Downregulation of Cdc6 inhibits tumorigenesis of osteosarcoma in vivo and in vitro. *Biomed Pharmacother.* 2019 Jul;115:108949.
 24. D'ARCY, Mark S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*, 2019, 43.6: 582-592.
 25. Costa-Cabral, S, Brough, R, Konde, A, et al. CDK1 is a synthetic lethal target for KRAS mutant tumours. *PLoS One.* 2016;11:e0149099.
 26. Devarajan, E, Sahin, AA, Chen, JS, et al. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene.* 2002;21:8843-8851.