

인체 대장암 세포주 SW480에서 재배 와송의 세포 사멸 유도 효과

김재용 · 정은정 · 원영선 · 이주혜 · 신동영¹ · 서권일*
순천대학교 식품영양학과, ¹순천대학교 원예학과

Cultivated *Orostachys japonicus* Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Cells

Jae-Yong Kim, Eun-Jung Jung, Yeong-Seon Won, Ju-Hye Lee, Dong-Young Shin¹, and Kwon-II Seo*

Department of Food and Nutrition, Suncheon National University
¹Department of Horticultural Science, Suncheon National University

Abstract This study was performed to elucidate the anticancer activities and the mechanism of chloroform fractions from cultivated *Orostachys japonicus* (CFCOJ) in human colon cancer cells. CFCOJ markedly decreased viable cell numbers in both a dose-dependent and time-dependent manner within SW480 cells. Cell death induced by CFCOJ increased cell populations in the sub-G1 phase, as well as the formation of apoptotic bodies, nuclear condensation, and induced DNA fragmentation. CFCOJ-induced apoptosis was associated with the activation of initiator caspase-8 and -9, as well as the effector caspase-3. CFCOJ also stimulated Bid cleavage, indicating that the apoptotic action of caspase-8-mediated Bid cleavage leads to the activation of caspase-9. CFCOJ increased the expression of the proapoptotic protein, Bax, and decreased the expression of the antiapoptotic protein, Bcl-2. These results indicate that CFCOJ exert anticancer effects on human colon cancer SW480 cells through a caspase-dependent apoptotic pathway.

Keywords: *Orostachys japonicus*, human colon cancer cell, anticancer activity, apoptosis

서 론

현대사회의 급속한 산업 및 경제 발달은 각종 스트레스, 운동 부족, 환경오염 등을 발생시켜 심장질환, 암, 당뇨, 정신질환 등 만성 또는 난치성 질환의 발병률을 증가 시켰다(1). 특히 암은 세계 사망 원인 중 1위를 차지하고 있는 질환으로 2020년에는 전 세계적으로 환자가 50% 이상 증가 될 것으로 보고되고 있다(2,3). 그 중 대장암은 매년 그 발생증가율이 평균 암 발생증가율의 두 배 이상으로 높은 발생빈도를 나타내고 있어 그 심각성이 대두되고 있다(3-5). 대장암의 치료에는 일반적으로 수술 이외에 화학요법, 방사선요법 등이 행해지고 있으나, 이는 면역기능저하, 유전자 손상 및 탈모와 같은 여러 부작용을 유발시킬 수 있다고 알려져 있어 효과적인 치료에 많은 문제점이 제시되고 있는 실정이다(6,7). 이로 인해 안전성이 높고 항암 효과가 높은 천연 자원 소재의 항암제에 관한 개발이 요구되어 현재 안전성이 높은 생리활성물질 탐색 및 이를 이용한 기능성 식품 및 의약품 개발 등에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(8).

와송(*Orostachys japonicus*)은 암송, 옥송, 작엽하초, 바위솔 등으로도 불리는 들나무과의 다년생 초본식물로 오래된 기와지붕

이나 산위의 바위에서 자란다(9). 한국, 중국, 일본 등지에 분포하며 fatty acid ester류, flavonoid류, triterpenoid류, sterol류 및 aromatic acid류 등의 다양한 생리활성 성분들을 포함하고 있어(10-13), 면역(14), 항산화(15,16), 항균(17), 항고지혈증(18) 및 항당뇨 효과(19) 등 다양한 약리적 효과를 가지고 있는 것으로 보고되고 있다. 또한 최근 연구에 따르면 와송 추출물이 인간 급성 전골수성백혈병세포주인 HL60 세포에서 p53 단백질 발현을 통해 apoptosis를 유도하며(20), HT-29 대장암 세포에서 세포주기 억제제를 통해 세포 사멸을 유도한다고 보고되고 있고(21,22), 위암, 간암, 자궁경부암 및 폐암 세포 등 다양한 암세포에서도 유사한 결과들이 보고되고 있다(23).

와송은 다양한 약리적 효과를 가지고 있음에도 불구하고 특이한 생육조건으로 환경오염 등에 취약하여 근래에는 야생에 자생하고 있는 천연 와송을 찾아보기가 쉽지 않다. 이로 인해 최근에는 와송을 일반적으로 손쉽게 구할 수 있도록 여러 농가에서 대량으로 재배 육성하는 노력을 기울이고 있다. 그러나 재배 와송이 천연 와송과 같이 뛰어난 항암 및 생리활성을 가지는지에 대한 재배 와송의 효능에 관한 연구는 아직 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 대장암세포에서 재배 와송과 천연 와송의 항암 효과를 비교하였으며 재배 와송 분획물의 암세포 성장 억제 효과 및 apoptosis 유도 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

와송의 추출 및 분획

재배 와송(*Orostachys japonicus* A. Berher)의 종자는 기와위에서 자생하는 종자를 채취하여 일주일동안 5°C 저온으로 휴면타

*Corresponding author: Kwon-II Seo, Department of Food and Nutrition, Suncheon National University, Suncheon, Jeonnam 540-742, Korea
Tel: 82-61-750-3655
Fax: 82-61-752-3657
E-mail: seoki@sunchon.ac.kr
Received November 29, 2011; revised March 29, 2012; accepted March 31, 2012

파 처리하여 파종하였다. 파종 상토는 흙과 모래 기와가루를 2:2:1의 비율로 혼합하여 40×30 cm의 플라스틱 포트에 파종하여 3년 동안 생육시킨 후 추대되어 개화한 후 종자가 맺은 다음 전초를 채취하여 음건 한 것을 본 실험에서 재배 외송으로 사용하였다(24). 천연 외송은 경상북도 포항시에서 채취된 것을 구입하여 사용하였다. 각각의 건조된 외송을 분쇄한 후 시료량의 10배(w/v)량 100% 메탄올과 혼합하여 64°C에서 3시간씩 3회 환류추출한 후 여과하였다. 여과액을 회전감압농축기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Japan)로 농축하여 메탄올 추출물을 얻었다. 재배 외송 메탄올 추출물은 극성이 가장 낮은 용매인 헥산층부터 클로로포름층, 에틸아세테이트층, 부탄올층 그리고 물층으로 분획하여 실험에 사용하였다.

세포 배양

본 실험에 사용한 인체 대장암 세포주 SW480 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, KCLB)으로부터 분양받아 100 units/mL의 Antibiotic Antimycotic(GIBCO®/Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA)과 10% FBS(GIBCO®/Invitrogen™)가 첨가된 RPMI(GIBCO®/Invitrogen™)를 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 계대 배양하여 사용하였다.

암세포 증식 억제능 측정

암세포 증식 억제능은 SRB(sulforhodamine B)법을 이용하여 측정하였다. SRB법은 생존 세포 내의 단백질 총량을 흡광도로 나타내어 세포 사멸 정도를 확인 하는 방법이다. TCA(Trichloroacetic acid)에 의해 생존 세포만 well plate에 부착되며 이 세포의 단백질 내 염기성 아미노산 잔기가 SRB와 결합하여 마지막에 처리하는 Tris buffer에 녹아 나와 흡광도를 나타낸다(25). 세포를 1×10⁵ cells/mL가 되도록 희석하여 24 well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하여 외송을 농도별로 첨가하고 24 및 48시간 동안 반응시켰다. 12% TCA(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 넣어 4°C에서 세포를 고정시키고 well을 세척한 후 0.4% SRB(Sigma-Aldrich) 용액을 첨가하여 염색하였다. 염색 종료 후 1% acetic acid(Kanto Chemical Co. Inc., Tokyo, Japan)로 세척하고 10 mM Tris buffer(Sigma-Aldrich)를 첨가하였다. 상등액을 96 well plate에 옮겨 microplate reader(Titertek Multiskan Plus, Huntsville, AL, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Sub-G1의 함량분석

암세포를 1×10⁶ cells/mL가 되도록 희석하여 6 well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하여 외송을 각 농도별로 well plate에 처리하고 24시간 동안 반응시켰다. 회수한 세포를 세척하고, 상층액을 제거한 다음 70% ethanol(Dae Jung Chemical Industry Co. Ltd., Goryeong, Korea)을 가하고 4°C에서 24시간 방치하였다. 고정된 세포를 세척하고 0.5 mg/mL RNase(Sigma-Aldrich), 1 mg/mL PI(propidium iodide, MP biochemicals Co. Ltd., USA) 및 PBS를 섞은 용액을 넣어 37°C에서 염색하였다. 염색된 세포 현탁액은 flow cytometer(EPICS XL, Beckman Coulter, Brea, CA, USA)를 이용하여 세포주기를 분석하였다.

Hoechst staining

암세포를 5×10⁵ cells/mL가 되도록 희석하여 6 well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 외송을 각 농

도별로 처리하여 24시간 동안 반응시켰다. 반응이 종료된 세포를 수거하여 200 μL hoechst 33258(bis-benzimide, 1 μg/mL, MP biochemicals Co. Ltd.)를 첨가하여 실온에서 10분간 염색시킨 후 PBS로 2회 세척하였다. 염색된 핵을 형광 현미경으로 관찰하였다.

DNA fragmentation

암세포를 1×10⁶ cells/mL가 되도록 희석하여 100 mm dish에 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 외송을 각 농도별로 처리하여 24시간 반응시켰다. 세포는 DNA lysis buffer(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, pH 8.0, 0.5% Triton X-100, 20% SDS, 10 mg/mL proteinase K)로 용해시켜 6 N NaCl을 가하고 원심분리(8000 rpm, 20 min, 4°C)하였다. 상층액 분리하여 phenol buffer(phenol-chloroform and phenol-chloroform-isoamylalcohol)로 세척하고 원심분리 후, 70% EtOH를 첨가하여 4°C에서 24시간 방치하였다. 반응 종료 후 원심분리(9000 rpm, 10 min, 4°C)하여 pellet을 회수하고 건조시킨 다음 RNase(2 mg/mL, Sigma-Aldrich)가 첨가된 TE buffer(10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 첨가하여 37°C water bath(JEIO Tech. Co. Ltd., Seoul, Korea)에서 1시간 동안 반응시켰다. 이를 EtBr(GIBCO®/Invitrogen™)이 첨가된 2% agarose gel(BioVision Inc., San Francisco, USA)을 이용하여 100V로 loading한 후 UV transilluminator imaging system(Entela Co. Ltd., Entzheim, France)로 확인하였다(26).

Caspase 활성 측정

Caspase의 활성을 Colorimetric assay kit(BioVision, Inc.)로 제조사의 방법에 따라 측정하였다. 암세포를 1×10⁶ cells/mL가 되도록 희석하고 100 mm dish에 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 외송을 각 농도별로 처리하여 24시간 반응시켰다. 반응이 종료된 세포를 회수한 후 lysis buffer를 첨가하여 각각의 caspase-3: DEVD-pNA, caspase-8: IETD-pNA, caspase-9: LEHD-pNA와 함께 37°C에서 2시간 간격으로 반응시켜 microplate reader(Titertek Multiskan Plus)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Caspase의 inhibitor 처리에 따른 활성 변화는 암세포주를 1×10⁵ cells/mL가 되도록 희석하여 24 well plate에 분주한 다음 37, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 외송을 처리하기 전에 5 μM의 caspase-family inhibitor(z-VAD-fmk, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)가 첨가된 배양액을 처리하여 CO₂ incubator에서 2시간 반응시킨 후 외송을 농도별로 처리하고 24시간 더 반응시켰다. 반응 후 세포를 수거하여 trypan blue(GIBCO®/Invitrogen™)로 염색하고 세포를 counting하였다.

Western blot analysis

암세포를 1×10⁶ cells/mL가 되도록 희석하여 100 mm dish에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 외송을 각 농도별로 처리하여 24시간 반응시켰다. 반응이 종료된 세포를 회수하여 lysis buffer를 첨가하고 얼음에서 용해시킨 후 상층액을 수거하여 BCA protein assay kit(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)로 단백질을 정량하였다. 정량한 세포 용해액과 2× sample buffer를 섞어 100°C에서 끓인 후 12% gel에서 100 V로 SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane(Whatman™, Dassel, Germany)으로 이동시킨 후 2.5% bovine serum albumin(BSA, BioShop Canada Inc., Ontario, Canada)으로 실온에서 1시간동안 blocking하고 primary antibody(anti-PARP, anti-Bid, anti-Bax, anti-Bcl 2,

Santa Cruz Biotechnology Inc.)를 가하여 4°C에서 overnight시켰다. 마지막으로 membrane을 T-TBS로 3회 세척하고 secondary antibody conjugated HRP(Santa Cruz Biotechnology Inc.)를 희석하여 실온에서 30분 동안 교반하였다. 반응이 종료된 membrane을 T-TBS로 세척하고 enhanced chemiluminescence kit(Santa Cruz Biotechnology Inc.)를 사용하여 단백질을 확인하였다.

통계처리

실험결과는 3반복에 대한 평균 및 표준편차로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군 간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's *t*-test를 실시하여 유의성 여부를 판정하였다(**p*<0.05, ***p*<0.01, and ****p*<0.001).

결과 및 고찰

외송 추출물 및 분획물의 SW480 암세포 성장 억제효과

암세포의 성장 억제효과는 SW480 암세포에 100% 메탄올로 추출한 재배 외송과 천연 외송을 각각 100, 300 및 500 µg/mL 농도로 처리하여 SRB assay를 통해 측정하였다. Fig. 1A와 같이 재배 외송과 천연 외송 추출물 모두 SW480 암세포의 성장을 농도 의존적으로 억제하였으며, 특히 500 µg/mL의 농도에서 높은 암세포 성장 억제효과를 나타내었다. 따라서 대장암 세포주인

SW480 세포에서 재배 외송은 천연 외송과 같이 높은 암세포 성장 억제 효과를 보임을 알 수 있었다. Kim 등(18)은 외송 메탄올 추출물의 이급성 독성연구에서 외송 메탄올 추출물을 500 mg/kg 및 2 g/kg의 농도로 rat에 2주간 투여하여 실험하였으나, 심장, 간, 비장, 신장, 폐 등 각 조직의 무게 및 형태학적 변화에서 독성을 나타내지 않았다고 보고하였다.

최근 연구에 따르면 외송은 클로로포름 분획물에서 friedelin, β-sitosterol 등의 terpenes와 sterols이, 에틸아세테이트 분획물에서 kaempferol, astrgalin, isoquercitrin 등의 flavonoids와 소량의 sterols이, 그리고 부탄올 분획물에서 dextrose 등의 당이 확인되었다(18). 재배 외송을 극성에 따라 분획하여 각각의 분획물 간의 세포 성장 억제효과를 확인한 결과, 물과 부탄올 분획물에서는 세포 생존율에 큰 변화를 나타내지 않았으나 헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트 분획물에서는 농도 의존적으로 세포 수가 감소하였다. 특히 500 µg/mL 농도의 클로로포름 분획물에서 생존율이 11.01%로 나타나 가장 높은 암세포 성장 억제효과를 나타내었다(Fig. 1B).

재배외송 클로로포름 분획물의 apoptosis 유도효과

외송 클로로포름 분획물의 암세포 증식 억제효과가 apoptosis에 의한 것인지 알아보기 위해 hoechst 33258 염색을 통한 핵 형태 변화, DNA 절편화 및 sub-G1의 함량 변화를 통해 확인하였

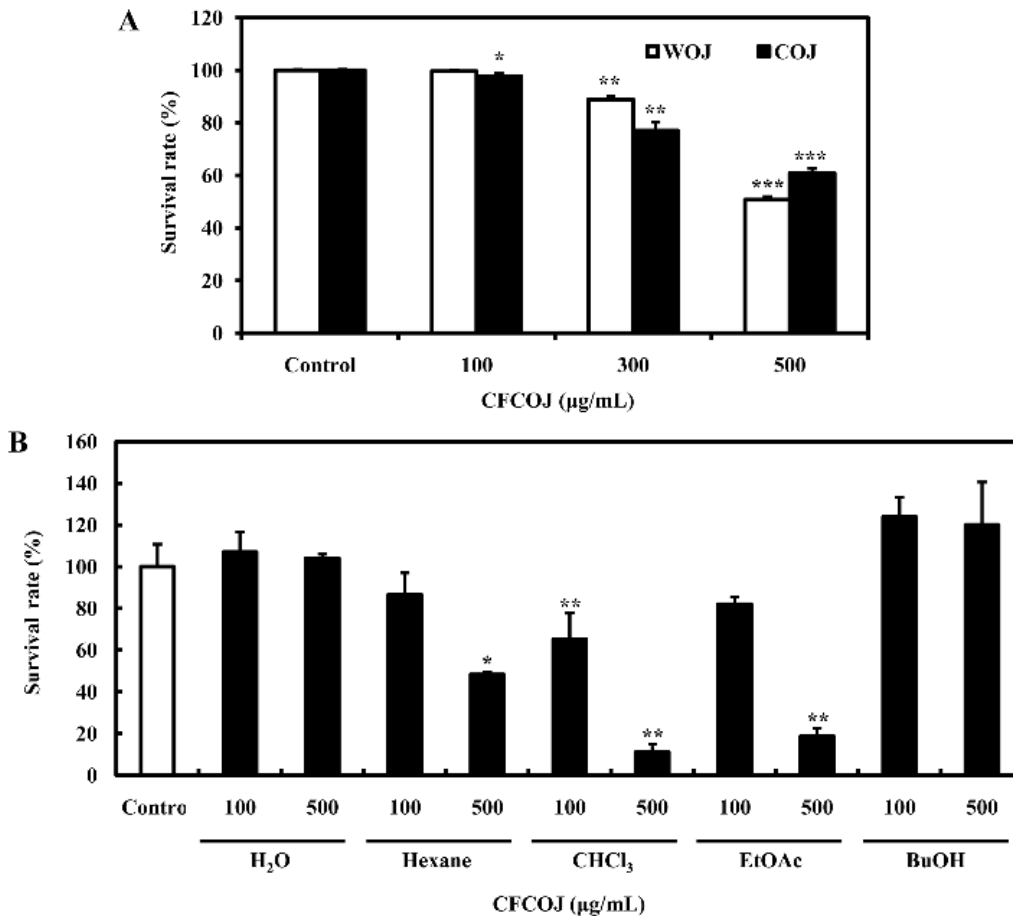


Fig. 1. Effect of *Orostachys japonicus* on the growth of SW480 colon cancer cells. (A) SW480 colon cancer cells were treated with various concentrations of cultivated *Orostachys japonicus* (COJ) and wild *Orostachys japonicus* (WOJ) for 48 h, and cell viability was determined by SRB assay. (B) SW480 colon cancer cells were treated with various concentrations of fractions from COJ for 24 h, and cell viability was determined by SRB assay. Data values were expressed as mean±SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with the control at **p*<0.05, ***p*<0.01, and ****p*<0.001 by Student's *t*-test.

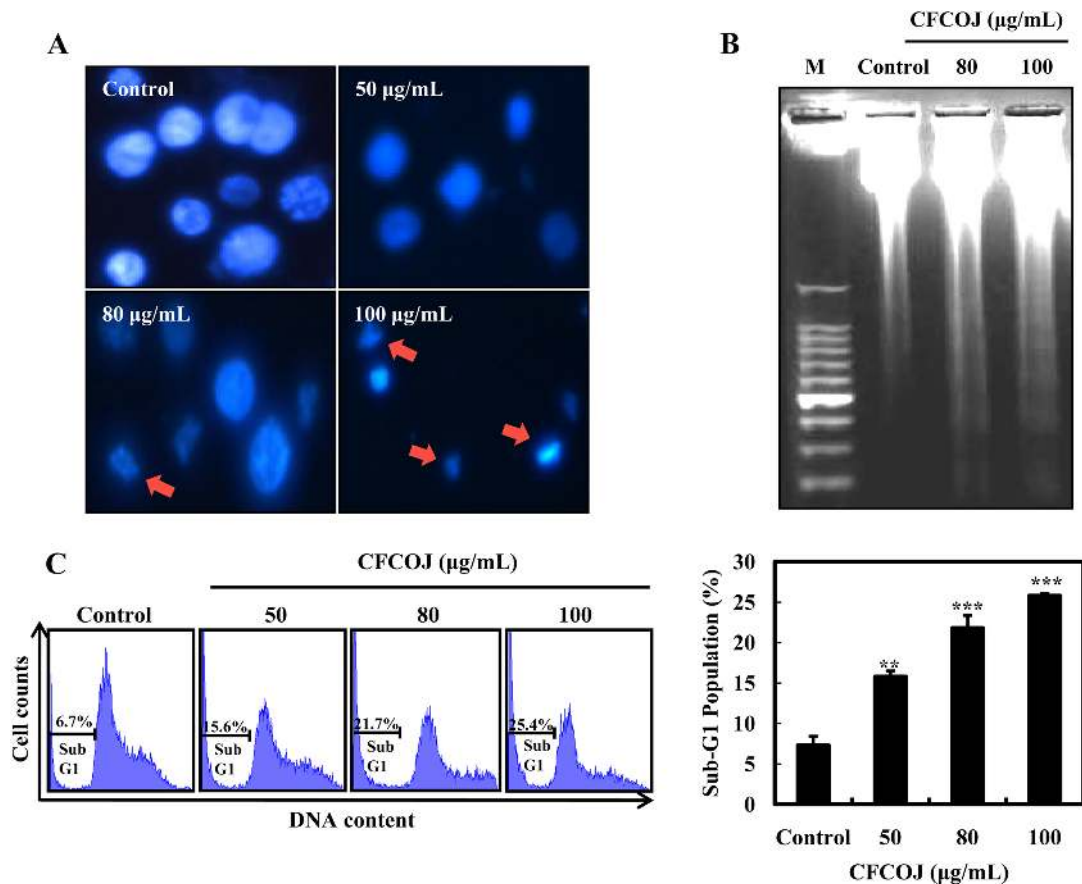


Fig. 2. Effect of CFCOJ on apoptotic induction. SW480 colon cancer cells were treated with CFCOJ for 24 h. (A) Nuclear fragmentation was assessed by fluorescent microscopy using bis-benzimide (Hoechst 33258). (B) DNA fragmentation was visualized after electrophoresis using 2% agarose gel and photographed under UV light. M refers to the 100 bp DNA marker. (C) Sub-G1 population was analyzed by flow cytometry. Significant differences were compared with the control at $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, and $***p < 0.001$ by Student's *t*-test.

다. 염색을 통한 핵 형태 변화를 관찰한 결과는 Fig. 2A와 같다. 대조군 암세포의 핵 형태는 일정한 반면, 외송 클로로포름 분획물을 80 및 100 µg/mL 농도로 처리한 군에서는 핵이 손상되어 절편 되었으며 apoptosis 특징 중 하나인 apoptotic bodies가 관찰 되었다. 또한 전기영동을 이용하여 DNA 분절을 확인한 결과 외송 클로로포름 분획물을 처리한 군에서는 DNA가 일정한 간격으로 분절된 모습을 보였다(Fig. 2B). 한편, 외송에 의해 유도된 apoptosis의 정도를 정량적으로 확인하기 위해 외송 클로로포름 분획물을 50, 80 및 100 µg/mL 농도로 처리하여 세포주기 중 sub-G1기에 속하는 세포의 함량을 flow cytometry를 이용하여 측정하였다. 외송 클로로포름 분획물의 처리는 농도 의존적으로 sub-G1의 함량을 증가시켰으며 특히 100 µg/mL 농도의 외송 클로로포름 분획물에서 sub-G1의 함량이 25.4%로 나타나 가장 높은 apoptosis 유도 효과를 보였다(Fig. 2C). 이러한 결과를 통해서 외송 클로로포름 분획물에 의한 SW480 암세포의 증식 억제효과가 apoptosis로 인하여 일어난 것임을 알 수 있었다.

재배외송 클로로포름 분획물의 caspase 활성화

세포는 내외부적 자극을 받으면 apoptosis signal을 보내서 caspase-8과 -9의 활성화를 유도하여 비활성 상태인 procaspase-3를 caspase-3로 활성화 시켜 PARP를 분절하고 최종적으로 apoptosis를 일으킨다(27). 외송 클로로포름 분획물의 SW480세포에서의 apoptosis 유도효과가 caspase와 관련이 있는지 알아보기 위해

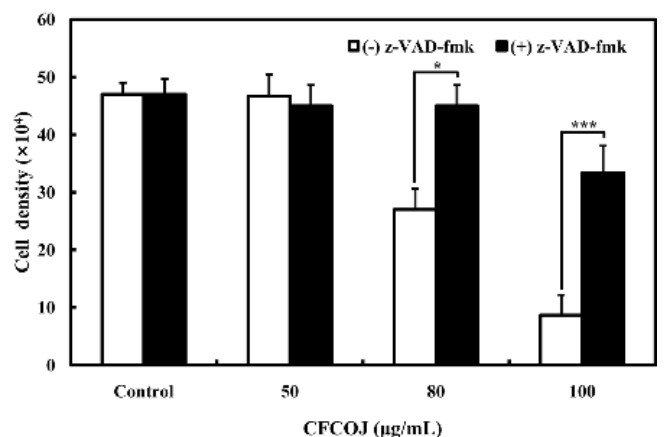


Fig. 3. Effect of a caspase inhibitor (z-VAD-fmk) on cell death induced by CFCOJ. SW480 colon cancer cells were preincubated with 5 µM of z-VAD-fmk for 2 h and then treated with various concentrations of the CFCOJ. Data values were expressed as mean±SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with the control at $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, and $***p < 0.001$ by Student's *t*-test.

caspase family inhibitor인 z-VAD-fmk를 이용하여 알아보았고, 각각의 caspase 활성을 colorimetric assay kit를 사용하여 측정하였

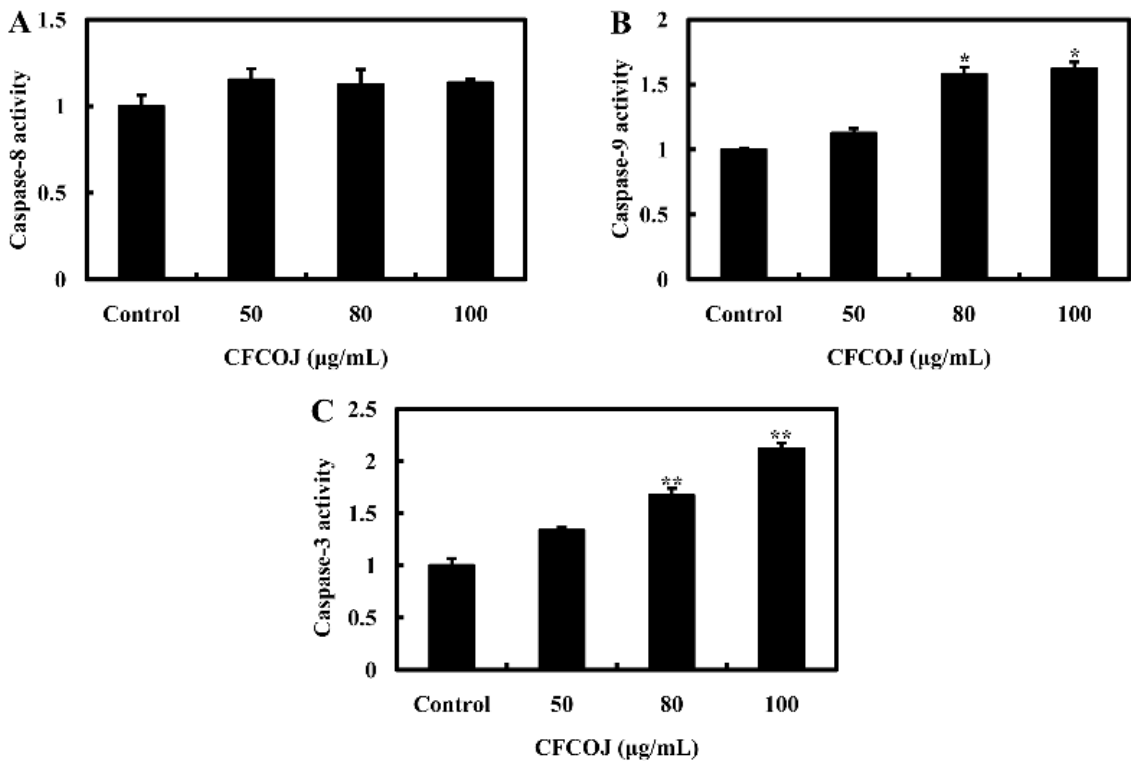


Fig. 4. Effect of CFCOJ on activation of caspase-3, -8, and -9. SW480 colon cancer cells were treated with CFCOJ for 24 h. (A) Caspase-8 was assayed with IETD-pNA enzyme substrate. (B) Caspase-9 was assayed with LEHD-pNA enzyme substrate. (C) Caspase-3 was assayed with DEVD-pNA enzyme substrate. Data values were expressed as mean±SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with the control at * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ by Student's *t*-test.

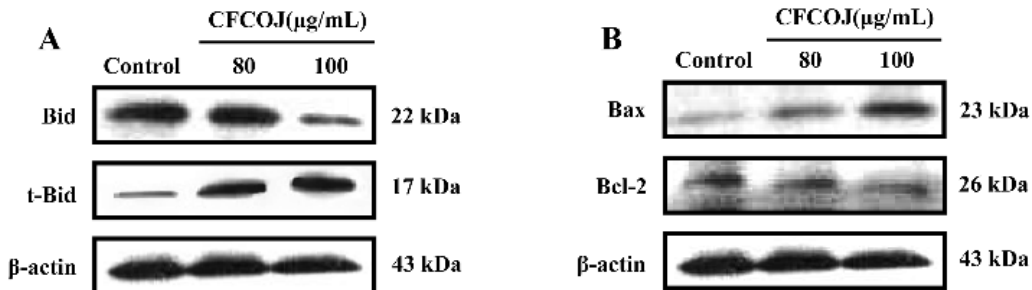


Fig. 5. Effect of CFCOJ on the expression of Bcl-2 family proteins. SW480 cells were treated with 80 and 100 µg/mL CFCOJ for 48 h. Protein lysate was subjected to 12-15% SDS-PAGE gel and immunoblotted with the corresponding antibodies. (A) Bid and tBid. (B) Bax and Bcl-2.

다. z-VAD-fmk를 처리한 군과 처리하지 않은 군을 비교한 결과, 처리하지 않은 군에서는 농도 의존적으로 암세포가 사멸하는 모습을 보였으나, 처리한 군에서는 세포 사멸 효과가 확연히 저해되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 다음으로 caspase-3, -8, 및 -9의 활성을 알아본 결과, 대조군과 비교하여 외송 처리는 caspase-3와 -9의 활성을 증가시켰으며 특히 80 및 100 µg/mL에서 높은 활성을 나타내었다. 그러나 caspase-8에서는 대조군과 비교하여 유의적인 변화를 나타내지 않았다(Fig. 4). 따라서 외송 클로로포름 분획물에 의한 인체 대장암 세포의 세포 사멸 효과가 caspase에 의존적인 apoptosis의 유도에 의해 일어난 것임을 알 수 있었다.

재배외송 클로로포름 분획물의 apoptosis 유도 관련 단백질 발현 변화

암세포에서 apoptosis 유도와 관련하여 apoptosis 촉진 단백질들

과 apoptosis 억제 단백질들이 중요한 역할을 한다. 이들은 미토콘드리아 내외부에 존재하며 여러 apoptosis signal에 의해 활성화된 인자들의 자극으로 증가 혹은 감소한다(28). Bid는 세포질에 비활성 상태로 존재하다가 caspase-8에 의해 truncated Bid(tBid)로 분절되며 미토콘드리아의 막 투과성을 높여 Bcl-2 family 단백질들의 활성화에 영향을 끼친다. Bcl-2 및 Bcl-xL 등의 단백질은 apoptosis 유도 시 발현이 감소하며 Bax 및 Bad 등의 단백질은 발현이 증가한다(29). 이러한 분자들의 발현은 미토콘드리아 막의 투과성을 높여 cytochrome c를 방출하며 이로 인해 caspase-9이 활성화되면서 caspase-3를 활성화시켜 최종적으로 PARP를 분절한다(30).

대장암세포에서 외송 클로로포름 분획물에 의한 apoptosis 유도 관련 단백질의 발현을 알아본 결과, 외송 클로로포름을 처리한 군에서 22 kDa인 full length Bid가 감소하고 17 kDa의 tBid가

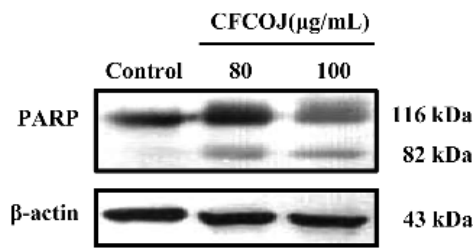


Fig. 6. Effect of CFCOJ on activation of PARP. Apoptotic PARP cleavage in SW480 cells treated with CFCOJ for 48 h, as determined by Western blot analysis.

증가하였다(Fig. 5A). 일반적으로 세포의 외부적 신호 전달이 caspase-8을 활성화 시켜 Bid 단백질을 분절시킨다고 알려져 있다. 그러나 앞선 결과에서 외송 클로로포름 분획물이 caspase-8의 활성화에 영향을 주지 않는 것으로 나타나, 외송 클로로포름 분획물에 의한 Bid 단백질의 분절에는 caspase-8 이외의 다른 외부적 경로가 작용한 것으로 보인다. Kischkel 등(31)은 caspase-10이 caspase-8과 유사한 역할을 하여 apoptosis 과정에 큰 영향을 끼친다고 보고하였고, Meng 등(32)은 HCT 116 인체 대장암 세포에서 caspase-10 경로를 통해 apoptosis가 일어남을 보고한 바 있다. 따라서 외송 클로로포름 분획물에 의한 Bid의 분절은 caspase-8의 활성 보다는 caspase-10의 활성과 관련이 있을 것으로 사료된다. 한편, 외송 클로로포름 분획물을 처리한 군에서는 apoptosis 촉진 단백질인 Bax의 발현이 농도 의존적으로 증가하였으나 apoptosis 억제 단백질인 Bcl-2의 발현은 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 5B). 내외부적 자극에 의해 손상된 암세포를 복구하여 암세포의 사멸을 방해하는 단백질인 PARP의 발현은 외송 클로로포름 분획물을 처리한 군에서는 처리하지 않은 군과 달리 농도 의존적으로 감소하였으며 116 kDa의 PARP가 82 kDa의 C-terminal fragment로 분절되었다(Fig. 6). 따라서 외송 클로로포름 분획물이 인체 대장암 세포에서 apoptosis 유도 관련 단백질들의 발현을 조절하여 세포 사멸을 일으키는 알 수 있었다.

요 약

재배 외송의 항암효과를 입증하기 위해 SW480 대장암세포에서 재배 외송 추출물의 apoptosis 유도 효과 및 그 기전에 미치는 영향에 대해 알아보았다. 재배 외송과 천연 외송 메탄올 추출물의 암세포 성장 억제능을 측정한 결과, 재배 외송은 천연 외송과 유사하게 농도 의존적으로 높은 암세포 증식억제효과를 보였으며 특히 농도 300 µg/mL의 재배 외송 메탄올 추출물에서는 천연 외송 메탄올 추출물 보다 더 높은 억제 효과를 나타내었다. 또한 재배 외송 메탄올 추출물을 분획하여 얻은 각각의 물, 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올 분획물 중 외송 클로로포름 분획물에서 암세포의 증식 억제효과가 가장 높게 나타났다. 이러한 외송 클로로포름 분획물의 apoptosis 유도 효과는 Sub-G1 기의 함량 증가와 핵의 응축 및 apoptotic bodies 생성 그리고 DNA 분절을 통해 나타났다. 한편, 외송 클로로포름 분획물의 caspase 활성화는 caspase inhibitor 처리군에서 암세포의 증식 억제 효과가 확연히 저해됨을 나타내었으며 각각의 caspase 활성화 중 caspase-3 및 -9의 활성을 증가시켰다. 또한 외송 클로로포름 분획물은 apoptosis 관련 단백질들인 Bid, Bcl-2 및 PARP의 발현을 농도 의존적으로 감소시켰으며 tBid 및 Bax 단백질의 발현을 현저하게 증가시켰다. 본 연구 결과, 재배 외송과 천연 외송은 유

사한 암세포 성장 억제 효과를 보였으며 재배 외송의 클로로포름 추출물은 caspase 의존적인 경로를 통해 apoptosis를 일으켜 세포 사멸 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 2009년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구입니다(NRF-2009-351-F00051).

문 헌

- Kim SH. Effects of the combination of *Umblicaria esculenta* extract and anticancer drugs on human cancer cells. MS Thesis, Energy Korea Polytechnic University, Shiheung, Korea (2010)
- Lanier J. Alarming increase in Alaska natives. *Int. J. Cancer.* 18: 409-412 (2006)
- Stewart BW, Kleihues P. *World Cancer Report.* IARC Press, Lyon, France. pp. 183-187 (2003)
- Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann. Oncol.* 16: 481-488 (2005)
- Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistics, 2003. *CA. Cancer J. Clin.* 53: 5-26 (2003)
- Andersen C, Adamsen L, Moeller T, Midtgaard J, Quist M, Tvetraas A, Rorth M. The effect of a multidimensional exercise programme on symptoms and side-effects in cancer patients undergoing chemotherapy-The use of semi-structured diaries. *Eur. J. Oncol. Nurs.* 10: 247-262 (2006)
- Shariati A, Haghghi S, Fayyazi S, Tabesh H, Kalboland MM. The effect of exercise on the severity of the fatigue in colorectal cancer patients who received chemotherapy in Ahwaz. *Iran J. Nurs. Midwifery Res.* 15: 145-149 (2010)
- Park KU, Kim JY, Seo KI. Antioxidative and cytotoxicity activities against human colon cancer cells exhibited by edible crude saponins from soybean cake. *Korean J. Food Preserv.* 16: 754-758 (2009)
- Lee SJ, Song EJ, Lee SY, Kim KBWR, Kim SJ, Yoon SY, Lee CJ, Ahn DH. Antioxidant activity of leaf, stem and root extracts from *Orostachys japonicus* and their heat and pH Stabilities. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38: 1571-1579 (2009)
- Choi SY, Kim JG, Sung NJ. Studies on the physicochemical characteristics and NDMA formation of *Orostachys japonicus* A. *Berger.* *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 21: 148-156 (2008)
- Park HJ, Young HS, Kim JO, Rhee SH, Choi JS. A study on the chemical constituents of *Orostachys japonicus* A. *Berger.* *Korean J. Pharmacogn.* 22: 78-84 (1991)
- Park JG, Park JC, Hur JM, Park SJ, Choi DR, Shin DY, Park KY, Cho HW, Kim MS. Phenolic compounds from *Orostachys japonicus* having anti-HIV-1 protease activity. *Nat. Prod. Sci.* 6: 117-121 (2000)
- Park HJ, Lim SC, Lee MS, Young HS. Triterpene and steroids from *Orostachys japonicus*. *Korean J. Pharmacogn.* 25: 20-24 (1994)
- Kwon J, Han KS. Effects of *Orostachys japonicus* A. *Berger* on the immune system. *Korean J. Medicinal Crop. Sci.* 12: 315-320 (2004)
- Choi SY, Chung MJ, Sung NJ. Studies on the antioxidative ability of methanol and water extracts from *Orostachys japonicus* A. *Berger* According to harvest times. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 21: 157-164 (2008)
- Lee SJ, Seo JK, Shin JH, Lee HJ, Sung NJ. Antioxidant activity of wa-song (*Orostachys japonicus* A. *Berger*) according to drying methods. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37: 605-611 (2008)
- Yoon SY, Lee SY, Kim KBWR, Song EJ, Kim SJ, Lee SJ, Lee CJ, Ahn DH. Antimicrobial activity of the solvent extract from different parts of *Orostachys japonicus*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38: 14-18 (2009)
- Kim SG, Choi JW, Park HJ, Lee SM, Jung HJ. Anti-hyperlipidemic effects of the flavonoid-rich fraction from the methanol extract of *Orostachys japonicus* in rats. *Korean J. Pharmacogn.* 40:

- 51-58 (2009)
19. Zhang GF. Anti-diabetic potential of *Orostachys japonicus* in streptozotocin induced diabetes mellitus rats. MS thesis, Gyeongsang National University, Jinju, Korea (2008)
 20. Oh CH, Bae JB, Kim NS, Jeon H, Han KS. Effect of *Orostachys japonicus* A. Berger on apoptosis induction of human leukemia HL60 Cells. Korean J. Pharmacogn. 40: 118-122 (2009)
 21. Choi SD, Nam SH. Cytotoxicities of *Orostachys japonicus* A. Berger against cancer cell lines. J. Industrial Technology Res. Inst. 12: 25-30 (2005)
 22. Ryu DS, Baek GO, Kim EY, Kim KH, Lee DS. Effects of polysaccharides derived from *Orostachys japonicus* on induction of cell cycle arrest and apoptotic cell death in human colon cancer cells. BMB Reports 43: 750-755 (2010)
 23. Kim KH, Kim EY, Kim YO, Baek GO, Kim HB, Lee DS. Studies on biological activities of the polysaccharides and oligosaccharides of *Orostachys japonicus*. Korean J. Microbiol. 40: 334-341 (2004)
 24. Shin DY, Lee YM, Kim HJ. Anatomy and artificial seed propagation in anti-cancer plant *Orostachys japonicus* A. Berher. Korean J. Crop. Sci. 39: 146-157 (1994)
 25. Papazisis KT, Geromichalos GD, Dimitriadis KA, Kortsaris AH. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. J. Immunol. Methods 208: 151-158 (1997)
 26. Wan CK, Wang C, Cheung HY, Yang MS, Fong WF. Triptolide induces Bcl-2 cleavage and mitochondria dependent apoptosis in p53-dependent HL-60 cells. Cancer Lett. 241: 1-11. (2005)
 27. Kim SY. Cytotoxicities and the mechanism by celastrol on human prostate cancer cells. MS thesis, Sunchon National University, Suncheon, Korea (2008)
 28. Dejeana LM, Martinez-Caballero S, Manon S, Kinnally KW. Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. Biochim. Biophys. Acta 1762: 191-201 (2006)
 29. Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdju-ment-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. J. Biol. Chem. 274: 1156-1163 (1999)
 30. Wang C, Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis. Annu. Rev. Genet. 43: 95-118 (2009)
 31. Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. J. Biol. Chem. 276: 46639-46646 (2001)
 32. Meng L, Sefah K, O'Donoghue MB, Zhu G, Shangguan D, Noorali A, Chen Y, Zhou L, Tan W. Silencing of PTK7 in Colon Cancer cells : Caspase-10-dependent apoptosis via mitochondrial pathway. PLoS ONE 5: e14018 (2010)