

Apoptotic Effects of Curcumin and EGCG via Akt-p53 Signaling Pathway in HCT116 Colon Cancer Cells

Song-Yi Park¹, Sol-Hwa Lee¹, Ock-Jin Park² and Young-Min Kim^{1*}¹Department of Biological Sciences, College of Life Science and Nano Technology, Hannam University, Daejeon 305-811, Korea²Department of Food and Nutrition, College of Life Science and Nano Technology, Hannam University, Daejeon 305-811, Korea

Received November 3, 2010 / Accepted December 3, 2010

p53 is tumor suppressor gene that regulates apoptosis such as caspase-dependent and p21-mediated signaling pathways. PI3K/Akt is known to be over-activated in cancer cells. Akt activates many survival-related signals such as mTOR and COX-2. Inactivation of Akt would result in non-inhibition of p53 as well as induced apoptosis. In this study, we showed that curcumin and EGCG activate p53 via inhibition of the Akt signaling pathway. Treatments using curcumin and EGCG in different concentrations for 24 hr and 48 hr inhibited proliferation of HCT116 colon cancer cells and increased apoptotic cell death. Also, our data showed that curcumin and EGCG increased the p53 expression and decreased the p-Akt. Treatment of LY294002 (Akt inhibitor) resulted in decreased cell proliferation of cancer cells, while LY294002 treated with curcumin or EGCG showed a greater decrease of cell proliferation. In addition, inhibition of Akt induced p53 activation in HCT116 colon cancer cells. These results suggest that curcumin and EGCG induce apoptosis by inhibiting Akt and increase p53 in HCT116 colon cancer cells.

Key words : Curcumin, EGCG, apoptosis, HCT116 colon cancer cells, p53, Akt

서 론

대장암은 서구 남녀 모두에서 3위의 발병률을 차지하고 있는 악성종양 중의 하나로, 외과적 수술로 약 80%의 절제술을 시행함으로써 치료할 수 있음에도 불구하고 생존율이 50% 밖에 되지 않아 수술 후 암 전이의 예방에 큰 관심이 집중되고 있다[6]. 최근에 식품에서 추출한 플라보노이드(flavonoid)와 폴리페놀(polyphenol) 같은 파이토케미컬(phytochemical)이 세포 내 신호전달 분자들을 조절 함으로써 암세포 증식 억제 및 암세포 전이를 억제한다는 연구와 함께, 이들이 조절하는 세포 내 신호경로에 관하여 많은 연구가 진행되고 있다[2]. 그 중에서 커큐민(curcumin)은 카레의 주 성분으로 강황(*Curcuma longa* L)에서 추출한 색소성분 중의 하나이다. 커큐민은 유방암을 비롯한 각종 암의 증식과 전이를 억제하고 세포 내 신호경로를 조절하여 세포의 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있으며, 최근에는 커큐민이 HT-29 대장암 세포주에서 AMPK-COX-2 신호경로를 경유하여 apoptosis를 유도함이 보고되었다[7,9,22]. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)는 녹차 잎에서 추출한 폴리페놀 중의 하나로서 항산화 효과 및 항암효과가 있음이 알려져 있다[14]. 최근 연구에서 EGCG가 여성 난소암 세포주 SKOV-3의 세포증식 억제 및 apoptosis를 유도하는 것이 발표되었으며, 신장암 세포주 NCI-H295에서

caspase-8, -9, -3, Bax, Bad, cytochrom c, GADD153 그리고 GRP78 등을 활성화 시킴으로써 세포의 apoptosis를 촉진하는 것으로 보고되었다[21].

Akt는 serine/threonine protein kinase의 일종으로 세포의 증식이나 분화, 성장에 관여하는 것으로 알려져 있으며, IGF-1에 의해서 활성화된 PI3K/Akt 신호경로는 Bad나 Caspase-9와 같은 pro-apoptotic protein의 발현을 저해하여 apoptosis를 억제하는 것으로 알려져 있다[3,12]. 또한 파이토케미컬의 일종인 셀레늄(selenium)이 Akt 신호경로의 활성을 저해함으로써 *in vitro* 실험에서 암세포의 증식을 억제하고 apoptosis를 유도하며, *in vivo* 실험에서 종양의 성장을 억제하는 것으로 보고됨에 따라 Akt 신호경로의 조절이 암세포의 비정상적인 증식을 억제할 수 있는 중요한 신호분자로 작용할 수 있음을 시사하였다[8].

p53은 종양억제유전자로 전체 악성종양의 50%가 p53의 돌연변이가 원인이 되어 발생하는 것으로 알려져 있다[1]. 정상 상태에서 세포가 DNA손상을 입었을 때, p53은 p21을 통하여 세포주기를 정지시킨다. 세포가 복구할 수 없는 손상을 입게 되면 Bax, Bcl-2, caspase와 같은 단백질들을 발현시켜 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있으므로 암의 조절에 있어서 p53의 중요성이 강조되고 있다[17]. 따라서 본 연구에서는 대장암세포 HCT116에 커큐민과 EGCG를 처리했을 때, 암세포의 증식억제와 apoptosis를 유도하는지 밝혀내고, 이러한 효과에 있어서 Akt 신호경로의 저해와 p53의 역할에 대해서 알아보고자 하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-42-629-8753, Fax : +82-42-629-8751

E-mail : kym@hnu.kr

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용된 커큐민은 Sigma (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)에서 구입하여 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 뒤 100 mM stock으로 만들어 -20°C에 보관하여 사용하였다. EGCG (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)는 멸균된 증류수에 녹인 뒤 10 mM stock으로 만들어 -20°C에 보관하여 사용하였다.

세포 배양

본 실험에 사용된 HCT116 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양 받았으며, 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)과 1% antibiotics (100 mg/l streptomycin, 100 U/ml penicillin)가 포함된 RPMI1640 배지(WelGENE Inc., Seoul, Korea)를 사용하여 5% CO₂, 37°C 조건 하에서 배양하였다. 매 48시간마다 Trypsin-EDTA (WelGENE Inc., Seoul, Korea)를 이용하여 세포를 부유상태로 만든 다음 세포를 1×10⁵개/ml로 분주하여 계대하였다.

MTT assay에 의한 암세포의 생존율 측정

세포배양용 12 well plate에 HCT116 세포를 1×10⁴ 개/ml로 분주하고 24시간 동안 배양시킨 후 커큐민과 EGCG를 각각 처리하였다. Akt의 저해제인 LY294002와 병행 처리시에는 LY294002를 30분 먼저 처리하였으며 커큐민 처리군은 24시간, EGCG 처리군은 48시간 후 0.5 mg/ml의 농도로 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 처리하여 1시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 그런 다음, MTT시약이 들어있는 배지를 제거한 후에 DMSO를 150 µl 넣어 well에 생성된 formazan을 모두 녹인 후, 96 well plate에 100 µl씩 옮겨서 microplate reader (BIO-RAD Laboratories, Inc. USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Hoechst 33342 염색을 이용한 apoptosis 측정

Cover glass가 놓여진 12 well culture plate에 HCT116 세포를 1×10⁴ 개/ml로 분주하고 배양한 후 커큐민과 EGCG를 각각 처리 하였다. 그 다음에 Hoechst 33342 시약을 10 µM의 농도로 30분 동안 처리한 후에 3.5% formaldehyde로 15분간 고정시키고 phosphate buffered saline (PBS)으로 두 번 세척하여 slide glass에 50% glycerol을 이용해 부착시키고 형광현미경(Olympus Optical, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

Western blotting

세포배양용 6 well plate에 HCT116 세포를 1×10⁵개/ml로

분주하여 24시간 동안 배양한 다음 커큐민과 EGCG를 각각 처리하였다. LY294002와 병행 처리시에는 LY294002를 30분 먼저 처리하였으며, 모든 물질을 최종 처리한 후 6시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하고 나서 RIPA lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.4), 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF]를 이용하여 단백질을 분리하였다. 추출한 단백질을 정량한 후 8% acrylamide gel을 이용하여 전기영동을 실시한 후 nitrocellulose membrane에 transfer 하였다. 그런 다음 2% Bovine serum albumin (BSA)를 이용해 blocking 한 후, 1차 항체를 4°C에서 밤새 반응시키고 2차 항체를 결합시킨 후 실험결과를 측정하였다.

통계처리

통계 프로그램인 SPSS 17.0을 사용하였고 실험설계에 대한 분산분석은 ANOVA를 실시하여 검정하였다. 각 자료는 3번 이상의 반복된 실험을 통하여 얻어진 결과로 검정하였고 $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

커큐민과 EGCG가 HCT116 세포의 증식과 사멸에 미치는 영향

커큐민과 EGCG가 HCT116 세포의 증식과 사멸에 미치는 영향을 탐색하기 위해 커큐민과 EGCG를 농도별로 처리하여 MTT assay를 통해 암세포의 생존율을 측정하였다. 그 결과, 커큐민을 10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM로 24시간 처리하였을 때, 커큐민의 농도가 높아짐에 따라 HCT116 세포의 증식이 더욱 억제되는 것을 확인하였고(Fig. 1A) 커큐민 40 µM을 6, 12, 24시간 처리하였을 때 시간이 지남에 따라 HCT116 세포의 증식이 더욱 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 1C). EGCG를 10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM로 48시간 처리한 결과, 역시 농도 의존적으로 암세포의 증식이 억제되는 것을 확인하였고(Fig. 1B) EGCG 40 µM을 24, 48시간 처리하였을 때 48시간에서 유의하게 세포의 증식이 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 1D). 이러한 실험결과를 통해 커큐민과 EGCG가 HCT116 세포의 증식억제에 효과적으로 작용하는 것을 확인하였다.

커큐민과 EGCG에 의한 apoptosis 유도

MTT assay와 동일한 조건으로 커큐민을 10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM로 24시간 처리하고, EGCG를 10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM로 48시간 처리하고, 또한 LY294002를 10 µM, 20 µM로 24시간 처리하여 Hoechst 33342 염색을 통해 apoptosis에서 나타나는 염색체 응축 현상을 확인하였다. 그 결과 커큐민과 EGCG의 농도가 높아짐에 따라 농도 의존적으로 염색체 응축 현상인 apoptotic body가 더 많이 발생된 것을 확인하였다(Fig. 2A, B). 또한 LY294002의 농도에 따라 apoptotic

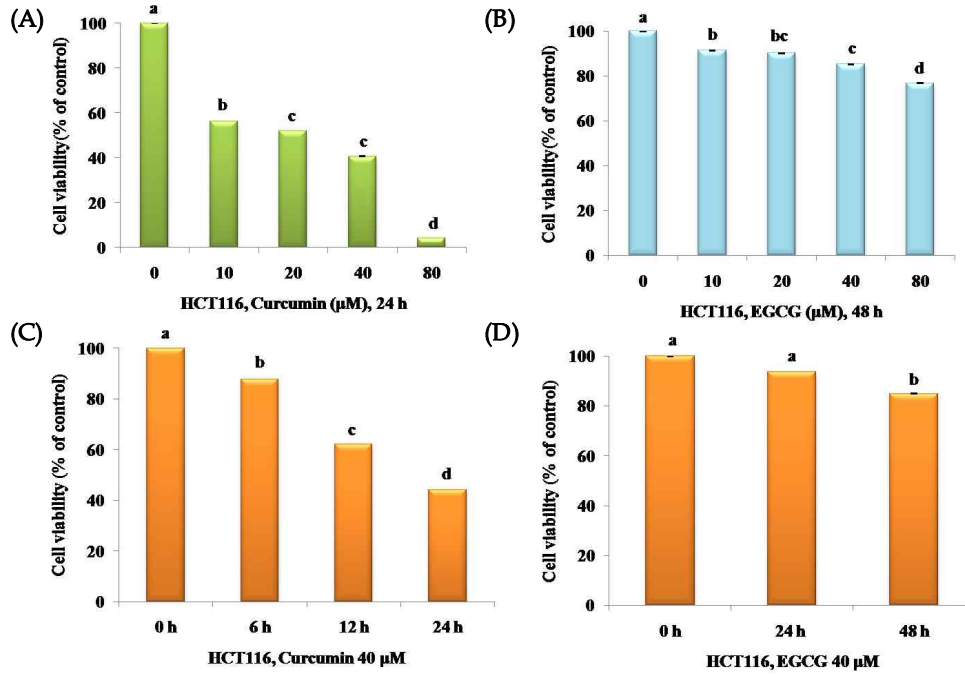


Fig. 1. Anti-proliferatory effects of curcumin and EGCG in HCT116 colon cancer cells. Cell viability was measured by MTT assay. Treatment of curcumin and EGCG inhibits cell proliferation and induces apoptosis. Cells were treated with curcumin 10-80 μM (A). Cells were treated with EGCG 10-80 μM (B). Cells were treated with curcumin 40 μM for 6-24 hr (C). Cells were treated with EGCG 40 μM for 24-48 hr (D). a, b, c, d; $p < 0.05$ (each experiment's $n=3$)

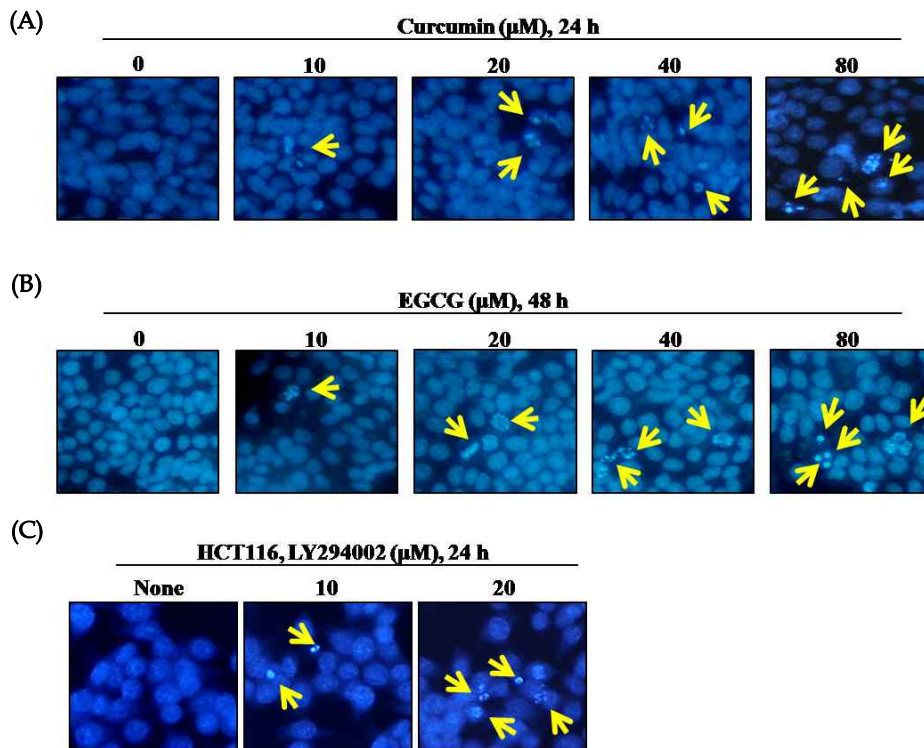


Fig. 2. Cells were treated to different concentration for 24 hr and 48 hr. Cells were treated with curcumin 10-80 μM for 24 hr (A), EGCG 10-80 μM for 48 hr (B) and LY294002 10-20 μM for 24 hr. Apoptotic bodies were measured by Hoechst 33342 staining. The arrows indicate cleaved nuclei in the HCT116 colon cancer cells, and chromatin condensation were measured by Hoechst 33342 staining.

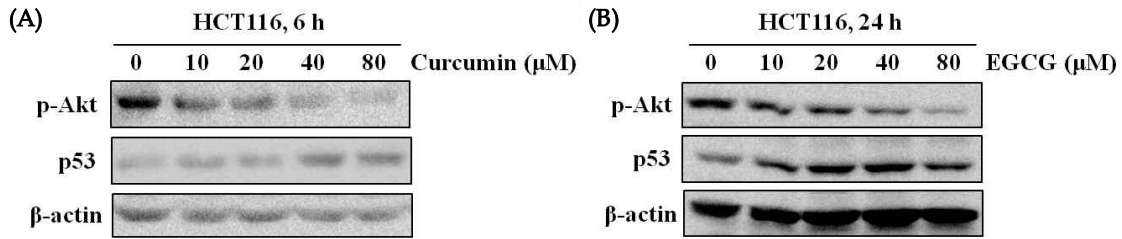


Fig. 3. Curcumin and EGCG effect on p-Akt and p53 in HCT116 colon cancer cells. Cells were treated with Curcumin 10-80 μM for 6 hr (A), EGCG 10 - 80 μM for 24 hr (B). Protein levels of the p-Akt and p53 were determined by Western blotting.

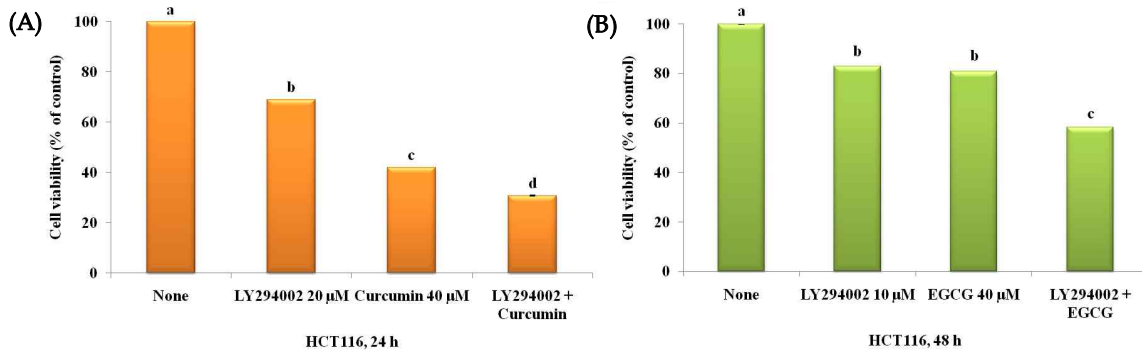


Fig. 4. Co-treatment of LY294002 and curcumin or LY294002 and EGCG inhibits cell proliferation. Cells were pre-treated with LY294002 20 μM for 30 min and co-treated with curcumin 40 μM for 24 hr (A). Cells were pre-treated with LY294002 10 μM for 30 min and co-treated with EGCG 40 μM for 48 hr (B). Cell viability was measured by MTT assay. a, b, c, d; $p < 0.05$ (each experiment's $n=3$).

body가 더 많이 발생된 것을 확인하였다(Fig. 2C)

커큐민과 EGCG에 의한 p53과 p-Akt의 신호경로

커큐민과 EGCG를 농도별로 처리했을 때 p53과 p-Akt 신호 경로를 알아보기 위해 Western blotting을 실시하였다. Fig. 3A에 나타난 바와 같이 커큐민을 10 μM, 20 μM, 40 μM, 80 μM로 처리했을 때, 농도 의존적으로 p53의 발현이 증가하는 반면, Akt의 활성 형태인 p-Akt는 감소하는 것을 확인하였다. 또한, Fig. 3B에서와 같이 EGCG를 동일한 농도인 10 μM, 20 μM, 40 μM, 80 μM로 처리했을 때, 마찬가지로 p53의 발현이 증가했으나, p-Akt의 발현은 감소하는 것을 확인하였다.

Akt 저해제가 HCT116 세포의 증식에 미치는 영향

Akt의 저해제인 LY294002를 처리했을 때, 커큐민과 EGCG가 HCT116 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 실시하였다. Fig. 4A에 나타난 바와 같이, LY294002 20 μM, 커큐민 40 μM을 각각 24시간 동안, 그리고 동일한 농도로 병행 처리했을 때의 암세포 증식을 확인하였다. LY294002를 단독 처리했을 때에는 약 69%의 생존율을 보였고, 커큐민을 단독 처리했을 때에는 약 42%의 생존율을 보였다. 또한 LY294002와 curcumin을 병행처리 했을 때에는

약 30%의 생존율을 보였다. 또한 Fig. 4B에서와 같이 LY294002 10 μM, EGCG 40 μM을 48시간 동안 각각 그리고 병행처리 하였다. 암세포의 증식을 확인한 결과, LY294002를 단독 처리했을 때에는 약 83%의 생존율을 보였고, EGCG를 단독 처리했을 때에는 약 80%의 생존율을 보였으며, 커큐민과 EGCG를 병행처리 했을 때에는 약 58%의 생존율을 보였다. 이러한 실험결과를 통해 Akt를 저해했을 때 커큐민과 EGCG에 의한 암세포의 증식억제효과가 더욱 강하게 나타난 것을 확인하였다.

Akt 저해제에 의한 p53, p-Akt의 신호경로 조절

LY294002와 커큐민 또는 EGCG를 각각, 그리고 병행처리 했을 때 Akt의 저해에 따른 p53 단백질의 발현 양상을 알아보기 위해 Western blotting을 실시하였다. 그 결과, Fig. 5A에서 나타난 바와 같이 커큐민과 LY294002를 단독으로 각각 처리 했을 때 p53의 발현이 증가했으며, 커큐민과 LY294002를 병행 처리 했을 때에는 p53의 발현이 더욱 증가하였다. 또한 EGCG와 LY294002를 단독으로 각각 처리했을 때와 EGCG와 LY294002를 병행 처리했을 때 p53의 발현이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 5C). 이런 결과는 Fig. 5B, 5D에서 보이는 바와 같이, 통계적으로 유의한 것임을 확인하였다.

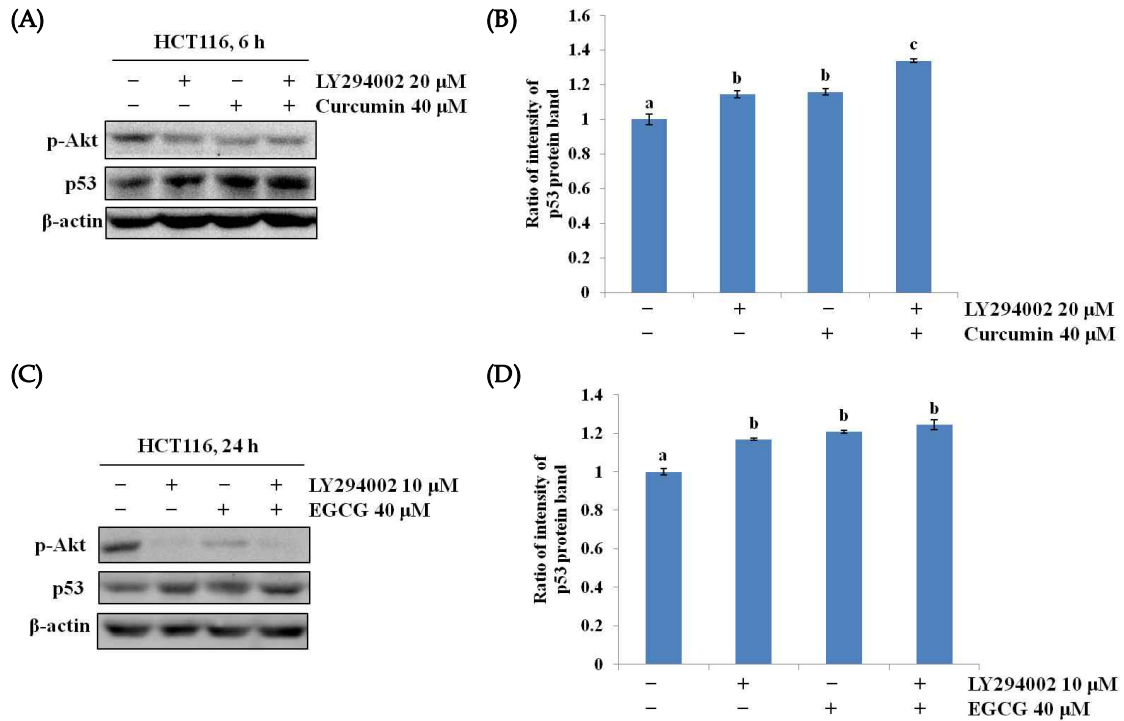


Fig. 5. Co-treatment of LY294002 and curcumin or LY294002 and EGCG regulate p53 and p-Akt in HCT116 colon cancer cells. Cells were pre-treated with LY294002 20 μ M for 30 min and co-treated with curcumin 40 μ M for 6 hr (A). Cells were pre-treated with LY294002 10 μ M for 30 min and co-treated with EGCG 40 μ M for 24 hr (C). Intensity of p53 bands are represented by graph (B, D). a, b, c; $p < 0.05$ (each experiment's n=3)

고찰

암은 종양억제유전자의 돌연변이와 세포성장에 관여하는 세포 내 신호경로의 과활성화에 의해 비정상적인 세포가 증식하는 것이다. 항암제를 이용한 암 치료에서 암세포가 대부분의 항암제에 내성을 갖기 때문에, 치료 이후에 재발되는 2차성 암 치료에 있어서는 항암제가 크게 효과를 나타내지 못하는 문제가 생긴다[24]. 그래서 최근에는 식품에서 추출한 물질인 파이토케미컬을 이용하여 암세포의 전이를 억제하고, 암세포에서 apoptosis를 유도하려는 연구에 관심이 집중되고 있다 [15]. 카레의 성분인 커큐민은 강황에서 추출한 색소성분으로 *in vitro*, *in vivo* 실험에서 종양의 성장을 억제하고 암세포의 apoptosis를 촉진함이 보고되었다[10]. 녹차에서 추출한 폴리페놀류는 항암 및 항염증 효과가 있으며, 그 중에서 EGCG가 가장 높은 항암효과를 보이는 것으로 알려져 있다[18].

종양 억제유전자인 p53은 여러 암종에서 암세포의 증식 조절과 apoptosis에 관여하며, 암세포의 apoptosis를 촉진하게 하는 downstream의 전사인자들을 활성화 시키는 역할을 한다[16]. PI3K/Akt 신호경로는 세포의 증식이나 분화에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 여러 암종에서 Akt가 과활성화 되는 것으로 밝혀져 있다[24]. 본 연구에서는 HCT116 세포에 커큐민과 EGCG를 처리했을 때 암세포의 증식억제와 apoptosis

유도 효과를 알아보고, 이러한 효과에 따른 Akt와 p53 신호분자의 발현을 알아보고자 하였다. 이를 위하여 먼저 HCT116 세포에 커큐민과 EGCG를 농도별로 처리하여 암세포의 생존율 및 apoptosis 효과를 관찰하였다. Fig. 1A에서 보이는 바와 같이 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비하여 커큐민을 농도별로 처리했을 때, 커큐민의 농도가 높아감에 따라 암세포의 생존율이 감소하는 것을 확인하였으며, Fig. 2에서 나타난 바와 같이 이러한 암세포의 생존율 감소가 apoptosis에 의한 것임을 확인할 수 있었다. 또한 EGCG를 커큐민과 동일한 농도로 처리했을 때에도 암세포의 생존율이 감소하였으며, 이와 같은 EGCG 처리에 의한 암세포의 생존율 감소가 apoptosis에 의한 것임을 확인할 수 있었다. 선행연구들에서 커큐민을 처리하였을 때 많은 암종에서 apoptosis가 일어남이 보고되었다. HCT116 대장암 세포에 커큐민을 24시간 처리하였을 때 pro-caspase의 발현은 저해되었고 PARP의 cleavage가 일어남이 보고되었다[19]. 또한 MCF-7 유방암 세포에서도 커큐민을 처리하였을 때 early apoptotic cell을 인지하는 Annexin V의 발현이 증가하는 것으로 나타났다[2]. 뿐만 아니라 EGCG를 처리하였을 때 역시 여러 암종에서 apoptosis가 일어남이 보고되었다. HCT116 대장암 세포에 EGCG를 24시간 처리한 후 TUNEL assay를 실시하였을 때 apoptotic cell death가 일어남이 보고되었으며 HT-29 대장암 세포에서도 EGCG를 처리하

였을 때 Hoechst33342 염색을 통하여 apoptotic body가 형성됨이 보고되었다[5,13]. 따라서 앞선 선행연구 및 본 실험에서 수행한 연구결과를 통하여 커큐민과 EGCG가 apoptosis 유도 효과가 있음을 확인할 수 있다.

커큐민과 EGCG를 농도별로 처리했을 때 나타나는 apoptosis 효과가 p53의 발현을 증가시키는지 알아보기, 세포 증식에 관여하는 인자인 Akt의 활성을 저해할 수 있는지를 알아보았다. 선행연구들에서 MCF-7 유방암 세포에서 커큐민을 처리하였을 때 p53의 핵내 이동이 증가하여 세포의 apoptosis를 유도함이 보고되었다[2]. 최근 연구에서 p53과 AMPK가 세포질 내에서 결합하여 핵 내로 들어가 세포증식에 관여하는 신호분자들의 발현을 저해하고 세포의 apoptosis를 유도함이 보고되었다[11]. 그리고 HT-29 대장암 세포에서 커큐민을 농도별로 6시간 처리하였을 때 p53의 조절인자로 알려진 AMP-activated protein kinase (AMPK)의 활성이 증가하여 COX-2의 발현을 저해함이 보고되었다[7]. 이에 따라 본 연구에서도 역시 HCT116 대장암 세포에 커큐민을 6시간 처리하였을 때 p53의 활성과 p-Akt의 활성저해를 알아보았다. 그 결과, 커큐민을 농도별로 6시간 처리했을 때 Akt가 활성화된 형태인 p-Akt의 발현이 농도가 높아짐에 따라 더욱 강하게 저해되었고, p53의 활성은 증가하는 것을 확인하였다. 또한 선행연구에서 낮은 농도의 H₂O₂가 HT-29 대장암 세포의 세포 성장을 촉진하는 것으로 보고되었으며, EGCG 100 µM을 시간별로(3-24 시간) 처리하였을 때 시간에 따라 p53의 발현이 증가하고 COX-2의 발현은 감소하는 것으로 나타났다[13]. 이에 따라 본 연구에서는 HCT116 대장암세포에 EGCG를 24시간 처리하였을 때 p53의 활성과 p-Akt의 활성저해를 알아보았다. 그 결과 EGCG를 농도별로 24시간 처리했을 때 p-Akt의 발현은 감소하였으며 같은 농도에서 p53의 발현은 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 선행연구들의 결과와 본 연구를 비교해 보았을 때, 커큐민과 EGCG를 처리하였을 때 일어나는 p53의 발현증가가 HCT116 대장암 세포의 세포증식에 관여하는 신호경로를 저해하고 apoptosis를 유도하는 것으로 보인다.

한편 Akt 저해제인 LY294002를 처리했을 때 HCT116 세포 증식을 확인해 보기 위해 LY294002와 커큐민 또는 EGCG를 각각 그리고 커큐민과 EGCG를 병행 처리하여 세포 생존율을 측정해 보았다. 그 결과, Akt의 저해제인 LY294002를 처리했을 때에는 아무것도 처리하지 않은 것에 비하여 암세포의 생존율이 감소하였으며 커큐민 또는 EGCG를 병행 처리했을 때 암세포의 생존율이 더욱 더 감소하는 것을 확인하였다. 동일한 조건에서 Akt의 활성저해가 p53의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 Western blotting으로 측정해 본 결과, LY294002를 처리하여 Akt를 저해했을 때에 p53의 발현이 증가하였으며, 커큐민과 LY294002 또는 EGCG와 LY294002를 병행처리했을 때에는 p53의 발현이 더욱 강하게 증가함을 확인하였다. 현재까지의 선행연구에서 LY294002를 위암세포

주 SGC7901에 처리했을 때 p53과 PUMA의 발현이 증가한다는 것이 보고되었다[23]. 또한 활성화된 Akt는 Mdm2를 인산화시킴으로써 Mdm2가 핵 내로 이동하여 p53의 발현을 저해하여 p53이 조절하는 apoptosis를 억제시키고, 암세포의 증식을 촉진한다[4]. 이러한 선행연구와 비교해 보았을 때 커큐민과 EGCG에 의한 Akt의 활성 저해는 p53의 발현을 촉진하여 apoptosis를 유도하는 신호분자를 활성화 시킴으로써 apoptosis를 일으키는 것으로 보인다.

결론적으로, 본 연구를 통하여 커큐민과 EGCG가 HCT116 세포의 증식억제와 apoptosis를 유도하는 것이 밝혀졌으며, 이는 Akt 신호경로를 저해하여 p53의 활성을 증가시킴으로써 일어나는 것으로 보인다. 또한 커큐민과 EGCG에 의한 Akt 신호경로, p53 신호분자의 apoptosis 조절이 어떠한 신호분자들을 통하여 일어나는지는 향후 진행될 연구과제로 여겨진다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 한남대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 연구되었음.

References

1. Amaral, J. D., J. M. Xavier, C. J. Steer, and C. M. Rodrigues. 2010. The role of p53 in apoptosis. *Discov. Med* **9**, 145-152.
2. Banerjee, M., P. Singh, and D. Panda. 2010. Curcumin suppresses the dynamic instability of microtubules, activates the mitotic checkpoint and induces apoptosis in MCF-7 cells. *FEBS J.* **277**, 3437-3448.
3. Carnero, A. 2010. The PKB/AKT pathway in cancer. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 34-44.
4. Gottlieb, T. M., J. F. Leal, R. Seger, Y. Taya, and M. Oren. 2002. Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene* **21**, 1299-1303.
5. Inaba, H., Y. Nagaoka, Y. Kushima, A. Kumagai, Y. Matsumoto, M. Sakaguchi, K. Baba, and S. Uesato. 2008. Comparative examination of anti-proliferative activities of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epigallocatechin against HCT116 colorectal carcinoma cells. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 79-84.
6. Jemal, A., R. Siegel, J. Xu, and E. Ward. 2010. Cancer statistics, 2010. *CA. Cancer J. Clin.* **60**, 277-300.
7. Lee, Y. K., S. Y. Park, Y. M. Kim, and O. J. Park. 2009. Regulatory effect of the AMPK-COX-2 signaling pathway in curcumin-induced apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1171**, 489-494.
8. Lee, Y. K., S. Y. Park, Y. M. Kim, D. C. Kim, W. S. Lee, Y. J. Surh, and O. J. Park. 2010. Suppression of mTOR via Akt-dependent and -independent mechanisms in selenium-treated colon cancer cells: involvement of AMPK α 1. *Carcinogenesis* **31**, 1092-1099.
9. Lee, Y. K., W. S. Lee, J. T. Hwang, D. Y. Kwon, Y. J. Surh,

- and O. J. Park. 2009. Curcumin exerts antidifferentiation effect through AMPK α -PPAR- γ in 3T3-L1 adipocytes and antiproliferatory effect through AMPK α -COX-2 in cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 305-310.
10. Milacic, V., S. Banerjee, K. R. Landis-Piwowar, F. H. Sarkar, A. P. Majumdar, and Q. P. Dou. 2008. Curcumin inhibits the proteasome activity in human colon cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* **68**, 7283-7292.
 11. Okoshi, R., T. Ozaki, H. Yamamoto, K. Ando, N. Koida, S. Ono, T. Koda, T. Kamijo, A. Nakagawara, and H. Kizaki. 2008. Activation of AMP-activated protein kinase induces p53-dependent apoptotic cell death in response to energetic stress. *J. Biol. Chem.* **283**, 3979-3987.
 12. Osaki, M., M. Oshimura, and H. Ito. 2004. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* **9**, 667-676.
 13. Park, I. J., Y. K. Lee, J. T. Hwang, D. Y. Kwon, J. Ha, and O. J. Park. 2009. Green tea catechin controls apoptosis in colon cancer cells by attenuation of H₂O₂-stimulated COX-2 expression via the AMPK signaling pathway at low-dose H₂O₂. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1171**, 538-544.
 14. Rao, S. D., and K. Pagidas. 2010. Epigallocatechin-3-gallate, a natural polyphenol, inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human ovarian cancer cells. *Anticancer Res.* **30**, 2519-2523.
 15. Sarkar, F. H. and Y. Li. 2004. Cell signaling pathways altered by natural chemopreventive agents. *Mutat. Res.* **555**, 53-64.
 16. Seitz, S. J., E. S. Schleithoff, A. Koch, A. Schuster, A. Teufel, F. Staib, W. Stremmel, G. Melino, P. H. Krammer, T. Schilling, and M. Müller. 2010. Chemotherapy-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves the p53 family and is mediated via the extrinsic and the intrinsic pathway. *Int. J. Cancer* **126**, 2049-2066.
 17. Sheu, M. J., P. Y. Chou, C. S. Huang, I. C. Tsai, Y. C. Chien, S. Y. Lin, H. Y. Tsai, H. C. Cheng, and C. H. Wu. 2010. Pipoxolan inhibits proliferation of HL-60 human leukaemia cancer cells by arresting the cell cycle at the G₀/G₁ phase. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **37**, 605-612.
 18. Tachibana, H. 2009. Molecular basis for cancer chemoprevention by green tea polyphenol EGCG. *Forum Nutr.* **61**, 156-169.
 19. Watson, J. L., R. Hill, P. W. Lee, C. A. Giacomantonio, and D. W. Hoskin. 2008. Curcumin induces apoptosis in HCT-116 human colon cancer cells in a p21-independent manner. *Exp. Mol. Pathol.* **84**, 230-233.
 20. Wu, A. H., R. G. Ziegler, P. L. Horn-Ross, A. M. Nomura, D. W. West, L. N. Kolonel, J. F. Rosenthal, R. N. Hoover, and M. C. Pike. 1996. Tofu and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **5**, 901-906.
 21. Wu, P. P., S. C. Kuo, W. W. Huang, J. S. Yang, K. C. Lai, H. J. Chen, K. L. Lin, Y. J. Chiu, L. J. Huang, and J. G. Chung. 2009. (-)-Epigallocatechin gallate induced apoptosis in human adrenal cancer NCI-H295 cells through caspase-dependent and caspase-independent pathway. *Anticancer Res.* **29**, 1435-1442.
 22. Wu, S. H., L. W. Hang, J. S. Yang, H. Y. Chen, H. Y. Lin, J. H. Chiang, C. C. Lu, J. L. Yang, T. Y. Lai, Y. C. Ko, and J. G. Chung. 2010. Curcumin induces apoptosis in human non-small cell lung cancer NCI-H460 cells through ER stress and caspase cascade- and mitochondria-dependent pathways. *Anticancer Res.* **30**, 2125-2133.
 23. Xing, C. G., B. S. Zhu, H. H. Liu, F. Lin, H. H. Yao, Z. Q. Liang, and Z. H. Qin. 2008. LY294002 induces p53-dependent apoptosis of SGC7901 gastric cancer cells. *Acta Pharmacol. Sin.* **29**, 489-498.
 24. Yoeli-Lerner, M., G. K. Yiu, I. Rabinovitz, P. Erhardt, S. Jauliac, and A. Toker. 2005. Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Mol. Cell* **20**, 539-550.

초록 : HCT116 대장암 세포에서 Akt-p53 신호경로를 통한 커큐민과 EGCG의 apoptosis 효과

박송이¹ · 이솔화¹ · 박옥진² · 김영민^{1*}

(¹한남대학교 생명나노과학대학 생명과학과, ²한남대학교 생명나노과학대학 식품영양학과)

식품에서 추출한 파이토케미컬은 여러 암종에서 암세포의 증식억제와 apoptosis를 유도한다. 최근에 이러한 파이토케미컬의 세포 내 신호전달 기작에 관한 관심이 높아지고 있으며, 본 연구에서는 파이토케미컬의 일종인 커큐민과 EGCG를 HCT116 대장암세포에 처리함으로써 암세포의 증식억제와 apoptosis 유도 효과를 알아보고, 암세포의 증식에 관여하는 Akt의 활성화와 중앙 억제유전자인 p53의 신호경로를 규명하고자 하였다. 그 결과, 커큐민과 EGCG를 처리했을 때 HCT116 세포의 증식이 억제되었고, 암세포에서 apoptosis 효과가 나타남을 확인하였다. 동일한 조건에서 Western blotting을 실시했을 때 Akt의 활성화는 감소하였으며 p53의 발현은 증가하였다. 또한 Akt의 저해제인 LY294002를 처리했을 때 암세포의 증식이 더욱 강하게 억제되었으며, p53의 발현은 더욱 강하게 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 HCT116 세포에서 커큐민과 EGCG 처리에 의한 암세포의 증식 억제 및 apoptosis는 p53의 발현이 증가함에 따라 유도되며, 이러한 p53의 발현 증가는 Akt 신호경로를 저해함으로써 일어난다는 것을 확인하였다.