

천년초 선인장 줄기 에탄올 추출물의 HT-29 대장암 세포증식 저해효과

박수영¹ · 김영아² · 이선영¹

¹충남대학교 생활과학대학 식품영양학과
²충남대학교 산학협력선도대학육성사업단

Antiproliferative Effect of *Opuntia humifusa* Ethanol Extract on Human Carcinoma HT-29 Cells

Soo Young Park¹, Young A Kim², and Sun Yung Ly¹

¹Department of Food and Nutrition and ²Leaders in Industry University Cooperation, Chungnam National University

ABSTRACT Colon cancer is the third highest cause of death in Korea. Known dietary causes of colon cancer include a diet rich in fat and red meat as well as inadequate intake of dietary fiber, fruits, and vegetables. Therefore, recent research has focused on the anticancer effects of natural products. *Opuntia humifusa* is a type of prickly pear that is known to contain biologically active compounds that can be used in the treatment of diabetes mellitus, arteriosclerosis, and hyperglycemia. The aim of this study was to determine whether or not *O. humifusa* extract affects proliferation, cell death, and DNA fragmentation in human carcinoma HT-29 cells. *O. humifusa* is rich in carbohydrates, minerals (Mg, K, and Ca), and total phenolics. HT-29 cells were treated with extracts of *O. humifusa* at concentrations of 0, 0.25, 0.5, 1, and 2 mg/mL for 24 or 48 hours. *O. humifusa* extracts inhibited HT-29 cell growth in a dose-dependent manner. Hoechst 33342/PI double staining and Comet assay were performed to observe changes in nuclei of cancer cells undergoing cell death. The results of both tests showed that *O. humifusa* extract induced cell shrinkage, DNA fragmentation, and chromatin condensation dose-dependently in HT-29 cells. The results of this study suggest that *O. humifusa* extract inhibits the growth of HT-29 via induction of DNA fragmentation and chromatin condensation.

Key words: *Opuntia humifusa*, HT-29 cell, antiproliferative effect

서 론

대장암은 세계적으로 암의 사망원인 중 3위를 차지하고 있고 특히 미국, 유럽 등지에서 발병률이 더 높는데 이는 육류 위주의 식단을 즐기는 서구사회의 식습관에 의한 것으로 알려져 있다(1). 최근 우리나라의 사망원인 통계를 보면 대장암은 폐암, 간암, 위암 다음으로 사망률이 높은 암으로 나타나며 그 발병률 또한 2002년 5.1%에서 2011년 7.7%로 꾸준히 증가하는 추세에 있다(2). 대장암은 유전요인보다는 식이요인과 밀접한 관계를 가지고 있는 것으로 알려져 있는데 식사 시 식이섬유를 적게 섭취하고 고지방 육류를 많이 섭취하면 대변의 양이 적고 내용물이 대장을 통과하는 시간이 증가한다(3). 또한 담즙산과 스테롤의 분비가 증가하여 흡수되지 않은 담즙산은 혐기성 박테리아에 의해 대사되어 발암물질로 변화한다(4). 이렇게 대장암과 식이요인 간의

상관성이 높은 특성을 고려하여 식품 중 항암효과를 보이는 천연물질을 섭취함으로써 암을 예방하고 관리하고자 하는 욕구는 지속적으로 증대되어 왔으며 최근 한국에서도 관련 연구가 활발히 진행되고 있다.

손바닥 선인장은 건생식물로서 주로 건조기후 또는 반 건조기후에서 잘 자라나 뛰어난 환경적응력으로 인하여 미국, 지중해, 아프리카, 중동, 호주, 인도, 한국 등의 다양한 기후에서도(5) 생육하고 있다. 국내에는 내륙지방에서 재배되고 있는 천년초(*Opuntia humifusa*; *O. humifusa*)와 제주도의 백년초(*Opuntia ficus-indica* var. *saboten*)가 식용으로 이용되고 있다. 이 중 천년초는 작은 솜털 가시를 가지며 -20°C의 겨울에도 노지에서 생장하는 강인한 생존력을 가지고 있다(6). 또한 천년초에는 플라보노이드 계열의 isorhamnetin, kaempferol, quercetin, taxifolin 등이 존재하며(7) 특히 천년초에서 분리한 taxifolin이 α -tocopherol보다 항산화능이 더 우수하다고 보고되었다(8). 최근 연구에 따르면 천년초의 MCF-7 유방암 세포증식 억제효과(9), 간 손상 예방효과(10), 3T3-L1 세포에서 지질축적 감소(11), 기타 항암, 항산화(12) 등이 보고되고 있으나 아직 천년초의

Received 12 August 2014; Accepted 15 September 2014

Corresponding author: Sun Yung Ly, Department of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
E-mail: sunly@cnu.ac.kr, Phone: +82-42-821-6838

대장암 세포 활성 억제에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 천연초의 일반성분을 분석하고 에탄올이나 메탄올, 열수 추출물 중 유효한 효능을 보이는 추출물에 대하여 인체 유래 대장암 세포인 HT-29 cell에 미치는 영향을 평가하고 천연초의 대장암 관련 기능성 식품의 개발에 대한 기초적 연구 자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

시험 재료

본 연구에 사용된 시험 재료는 전남 무안군의 한 농가로부터 구입한 8년생 천연초 선인장 줄기로서 물로 수세하고 가시를 제거한 뒤 동결 건조와 분쇄를 거쳐 성분분석 및 추출 대상 시료로 사용하였다. 시료의 알코올 추출은 시료량의 10배의 70% 에탄올이나 메탄올을 가하여 상온에서 24시간 동안 교반하면서 3회 반복 추출하였다. 열수 추출물은 100°C에서 3시간 동안 3회 반복하여 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman No. 2, Advantec, Tokyo, Japan)를 사용하여 여과한 뒤 40°C rotary vacuum evaporator(Eyela, Tokyo, JAPAN)에서 감압농축 하였다. 추출한 분말은 -20°C 냉동고에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

시료의 일반성분 분석

적외선 수분측정기(US/Retriever 50, Shinhan Scientific, Seoul, Korea)를 이용하여 천연초 선인장 줄기 동결건조 분말 시료의 수분 함량을 측정하였으며 600°C의 회화로에서 건식 회화법으로 조회분을 측정하였다. 조단백 분석은 micro-Kjeldahl법으로 측정하였으며 조지방 함량은 Soxhlet법을 이용하여 측정하였다. 탄수화물 함량을 나타내는 가용성 무질소물(nitrogen-free extracts, NFE) 함량은 공식, $100 - (\text{수분} + \text{조회분} + \text{조단백} + \text{조지방} + \text{조섬유})$ 에 의하여 산출하였다. 무기질 분석은 시료를 microwave digestion system에서 습식 회화하여 Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer(ICP-AES, Optima 3300DV, Perkin-Elmer Instruments, Santa Clara, CA, USA)로 측정하였다. 시료의 총당 함량은 phenol-H₂SO₄법으로 측정하였다. 총 페놀 함량은 증류수로 80배 희석한 메탄올 추출 시료에 2 N Folin-Denis 용액 100 µL를 넣고 혼합한 후 3분간 방치하고 20% Na₂CO₃ 300 µL 가한 뒤 암실에서 2시간 동안 반응시켜 765 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포배양 및 세포증식

인체 유래 대장암 HT-29 세포(human colon adenocarcinoma)와 murine preadipocyte인 3T3-L1 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포는 10% fetal bovine serum(FBS; HyClone Inc., Logan, UT, USA), 10%

bovine calf serum(BCS; Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA)과 1% penicillin-streptomycin(PS; Gibco Laboratories)을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco Laboratories) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 세포는 75 cm² cell culture flask(SPL Life Science, Pocheon, Korea)에서 배양하였으며 세포 밀도가 70~80% 정도 되는 시점에 phosphate buffered saline solution(PBS; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)으로 세척하고 trypsin ethylene-diamine-tetraacetic acid(EDTA; Sigma Chemical Co.)를 처리하여 세포를 부유시킨 뒤 새로운 flask에 계대배양을 하면서 실험에 사용하였다. 천연초 선인장 줄기 추출물은 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 배양액에 처리하였으며 HT-29 세포의 증식에 미치는 영향을 평가하기 위하여 water soluble tetrazolium(WST)을 이용한 cell viable assay kit(Daeil Lab Service, Seoul, Korea)를 사용하여 세포 생존율을 측정하였다.

Hoechst 33342 & PI 염색

천연초 선인장 줄기 추출물의 처리에 따른 HT-29 세포의 핵을 관찰하기 위해 Hoechst 33342 & PI(propidium iodide; Sigma Chemical Co.) double staining을 실시하였다. HT-29 세포를 24 well plate에 1.5×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 배양한 후 천연초 선인장 줄기 추출물 시료를 0, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/mL의 농도로 48시간 동안 처리하였다. 이후 PBS에 녹인 Hoechst 33342(Sigma Chemical Co.)로 암실에서 25분 동안 염색하고 다시 PBS에 녹인 PI로 5분 동안 추가 염색하였다. 배양액 내 각 염료의 최종 농도는 2 µg/mL이었다. 염색이 끝난 후 바로 200배율의 현광 현미경(Olympus, Tokyo, Japan) 하에서 관찰하였다.

Comet assay에 의한 세포 DNA 손상

Comet assay를 위하여 농도별로 처리한 세포를 75 µL의 0.7% low melting agarose gel(LM; Sigma Chemical Co.)과 섞은 후, 0.5% normal melting agarose(NMA; Sigma Chemical Co.)가 미리 코팅된 슬라이드 위에 현탁액이 굳고 루 분산되게 한 다음 cover glass로 덮어 4°C 냉장고에 보관하였다. Gel이 굳으면 cover glass로 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 한 겹 더 덮었다. 미리 준비해 둔 차가운 alkali-lysis buffer(pH 10.0)에 1% Triton X-100(Sigma Chemical Co.)을 사용 직전에 섞은 후 여기에 슬라이드를 담가 저온 암실에서 1시간 동안 침지시켜 DNA의 double strand를 풀어주었다. Lysis가 끝난 후 슬라이드를 electrophoresis tank에 배열하고 4°C의 차가운 전기영동 buffer를 채워 40분 동안 unwinding 시켜 DNA의 alkali-labile sites가 드러나게 한 후 25 V/300 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4 M tris buffer에 5분씩 담가 세척하는 과정을 3회 반복하여 슬라이드

드를 건조시켰다. Ethidium bromide(Sigma Chemical Co.)로 슬라이드 위의 핵을 형광 염색하여 cover glass로 덮은 뒤 형광현미경 상에서 관찰하였다. 세포핵의 image는 software Komet 5.5 image analyzing system(Kinetic Imaging, Liverpool, UK)을 이용하여 분석하였다. 세포 내 DNA 분절은 핵으로부터 이동해서 꼬리 부분으로 떨어져 나간 꼬리 부분의 DNA%(tail DNA), tail length(TL) 그리고 tail 내 DNA%와 tail length(TL)로부터 산출된 tail moment(TM)를 측정하여 나타내었다.

통계처리

실험 결과는 SPSS/Windows 20.0(Chicago, IL, USA)을 이용하여 통계처리 하였고, 평균값과 표준편차를 구하였다. 군 간의 평균값의 차이를 검증하기 위하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 한 후, Duncan's multiple range test로 변인 간의 차이를 검증하였다. 모든 통계적인 유의성은 $\alpha=0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

수율 및 일반성분

각 추출물의 수율은 에탄올 추출 시 18.8%, 메탄올 추출 시 13.0%, 열수 추출 시 55.0%로 열수 추출물의 수율이 월등히 높았으며 열수 추출물의 수율은 Lee 등(13)의 연구 결과와 유사한 경향이었으나 에탄올 추출물의 수율(30.24%)은 다소 낮았다. 천년초 선인장 줄기의 동결 분말의 일반성분을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 수분 함량은 4.621%, 조회분 함량은 7.278%, 조단백과 조지방은 각각 2.358%와 1.354%였다. 특히 조섬유(6.183%), 가용성 무질소물(78.205%), 총당(24.250%)의 함량이 높아 탄수화물을 많이 포함하고 있는 것을 알 수 있다. 천년초의 성분 분석치는 연구팀에 따라 다르게 보고되고 있는데, 충남 아산에서 재배한 천년초 줄기의 성분을 분석한 연구(14)에서는 조회분 17.20%, 조단백 12.75%, 조지방 3.53%, 조섬유 8.04%, 가용성 무질소물 58.24%로 본 연구보다 가용성 무질소물을 제외한 모든 성분의 함량이 높았으며, 전남 여수에서 재배한 천년초 줄기의 성분을 분석한 다른 연구(15)에서는 수분 5.82%, 조회분 12.40%, 조단백 5.43%, 조지방 1.69%, 조섬유 4.05%, 가

용성 무질소물 71.95%로 조회분 함량을 제외한 성분에서 가장 비슷한 구성비를 보였다. 손바닥 선인장 속은 성장할수록 조단백질, 조섬유, 조회분의 함량이 감소하고 산성도, 카로틴, 총 탄수화물이 증가하는 것으로 보고된 점으로 보아(16), 각 연구에서의 성분 차이는 천년초 처리 및 분석 방법의 차이 외에 천년초의 생육 기간, 재배 지역에 따른 일조량, 토양의 구성비, 기후, 재배 방법, 재배 연도, 수확 시기 등에 따른 차이로 판단된다.

무기질 함량

유도결합플라즈마 분광광도계로 천년초 선인장 줄기 분말에 대한 무기질 함량을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 무기질 함량은 마그네슘이 955.711 mg/g으로 가장 함량이 높았고 이어 칼륨 631.360 mg/g, 칼슘 337.812 mg/g 순이었다. 천년초 선인장 줄기 분말의 무기질을 분석한 Jung 등(15)과 Yoon 등(14)의 연구에서 마그네슘 함량은 각각 620.07 mg/g, 1,110.86 mg/g으로 보고되어 함량의 차이는 있지만 마그네슘과 칼슘 등의 양이온이 풍부하고 K 대비 Na의 비율(10.97:1)이나 Ca 대비 P의 비율(5.40:1)이 매우 낮아 건강에 도움이 될 수 있는 무기물 조성을 보이고 있었다.

총 폴리페놀 함량

페놀성 화합물은 식물체가 자외선에 의한 산화나 자동산화로부터 자신을 보호하기 위하여 생성한 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조와 분자량을 가지며 플라보노이드와 탄닌이 주성분이다. 이들은 phenolic hydroxyl(OH)을 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 쉽게 결합하는 성질을 가지며 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다(17). 총 폴리페놀 함량은 Table 3에 나타내었다. 폴리페놀 함량은 메탄올 추출물에서 2.330%, 에탄올 추출물에서 2.259%이었으며 열수 추출물에서는 거의 검출되지 않았다. Han 등(18)은 천년초 줄기의 총 폴리페놀 함량으로 2.93%라고 보고하여 본 연구 결과와 유사한 결과를 보여주었다. 또한 천년초의 총 폴리페놀 함량은 백년초 추출물의 함량(0.18%)에 비하여 10배 이상 높은 것으로 보고되고 있으며(19) 이로 인한 항산화 기능이 많은 연구에서 검증되고 있다(8,11,20).

Table 1. Proximate composition of lyophilized *Opuntia humifusa* stem

Components	% (w/w) (dry basis)
Moisture	4.621±0.816 ¹⁾
Crude ash	7.278±0.226
Crude protein	2.358±0.229
Crude fat	1.354±0.043
Crude fiber	6.183±0.105
Total sugar	24.250±0.617
Nitrogen-free extracts	78.205±0.565

¹⁾Means±SD (n=3).

Table 2. Mineral contents of lyophilized *Opuntia humifusa* stem

Mineral	Concentrations (mg/g) (dry basis)
Mg	955.711
K	631.360
Ca	337.812
P	62.592
Na	57.545
Zn	8.775
Mn	6.510
Fe	4.199
Cu	0.0569

Table 3. Total polyphenol contents of lyophilized *Opuntia humifusa* stem

Extracts ¹⁾	Concentrations (% w/w)
OM	2.330±0.272 ²⁾
OE	2.259±0.078
OW	—

¹⁾OM: *O. humifusa* methanol extract, OE: *O. humifusa* ethanol extract, OW: *O. humifusa* water extract.

²⁾Means±SD (n=3).

세포 생존율 측정

세포 생존율을 측정한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. HT-29 세포에 각 추출물을 0.25~2.0 mg/mL의 농도로 처리한 결과 에탄올 추출물은 48시간 처리 후에 세포 생존율이 유의하게 낮아졌으며 농도 의존적인 결과를 보여주었다. 메탄올 추출물은 24시간 배양 후부터 세포 생존율이 낮아지기 시작하였으나 48시간 후에 처리 농도에 따른 차이가 보이기 시작하였으며 농도 의존적인 효과는 에탄올 추출물에서 더욱 확실하게 나타났다. 반면 열수 추출물은 2 mg/mL의 농도에서만 유의한 차이를 보였으며 그 효과도 상당히 미미하였다. 따라서 천연초 줄기의 건조 분말 시료는 70% 알코올 추출에서만 인체 유래 대장암 세포인 HT-29 세포의 성장을 저해시키는 것으로 보이며 암세포의 증식 억제효과는 에탄올 추출물이 메탄올 추출물에 비해 농도 의존적으로 더 확실하게 나타나는 것으로 판정되었다. 선행연구를 통하여 손바닥 선인장의 폴리페놀 성분으로는 isorhamnetin, quercetin, kaempferol, taxifenol 등이 알려져 있으며(7), 그중 하

나인 isorhamnetin은 인체 대장암 세포주인 HCT-116에서 세포사멸과 세포괴사를 유도하고 세포주기 중 G2/M기의 checkpoints에 작용하여 세포증식을 억제하는 것으로 보고되었다(21). 그 외에도 손바닥 선인장류인 *Opuntia robusta* Gavia나 *Opuntia violaceae* Moradillo가 Caco-2 cell이나 PC-3 prostate cancer cell의 세포성장을 억제하였다는 연구(22)가 있어 손바닥 선인장들에 대한 연구가 좀 더 진행된다면 다양한 암세포에 작용하는 항암 효능으로 인하여 nutraceuticals로서의 가치를 창출할 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구 결과로 얻어진 천연초 줄기 분말 추출물의 대장암 세포증식 억제능은 세균(*Streptomyces peucetius*)에서 분리된 항생제로서, 각종 암 치료에 보편적으로 사용되어 온 항암제, doxorubicin의 효능에 비하여 약 200~250배 활성이 낮았다. Doxorubicin은 역전사 효소 및 RNA 중합효소 작용 억제뿐 아니라 세포 DNA에 결합하는 유전자 독성의 특성을 갖고 있어 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있다(23). 선행 연구에 의하면 HT-29 세포에 doxorubicin 1 µg/mL를 48시간 동안 처리하였을 때의 세포 생존율이 본 연구에서 천연초 70% 에탄올 추출물을 250 µg/mL를 처리하였을 시와 비슷하게 나타났다(24). 그러나 천연식품인 오미자 열수 추출물을 1 mg/mL의 농도로 HT-29 세포에 처리하였을 때 세포 사멸률이 10%에 불과하였으며, 2 mg/mL의 농도에서 70%, 4 mg/mL에서 88%였던 연구 결과(25)에 비교하면 천연초 추출물이 오미자 추출물에 비해 약 3배 이상의 활성을 보이므로 식품으로서는 우수한 자원으로 볼 수

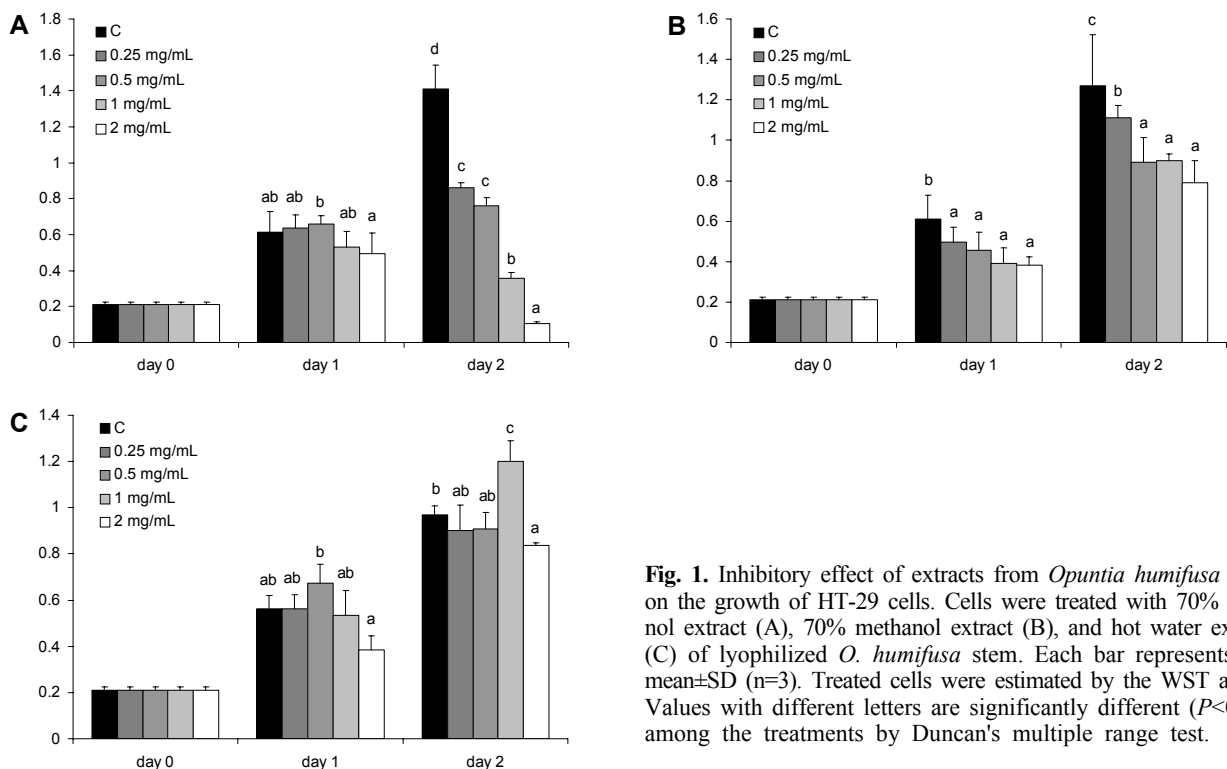


Fig. 1. Inhibitory effect of extracts from *Opuntia humifusa* stem on the growth of HT-29 cells. Cells were treated with 70% ethanol extract (A), 70% methanol extract (B), and hot water extract (C) of lyophilized *O. humifusa* stem. Each bar represents the mean±SD (n=3). Treated cells were estimated by the WST assay. Values with different letters are significantly different ($P<0.05$) among the treatments by Duncan's multiple range test.

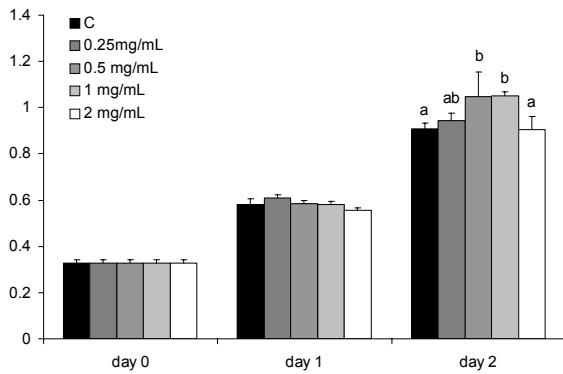


Fig. 2. Inhibitory effect of extracts from *Opuntia humifusa* stem on the growth of murine preadipocyte 3T3-L1 cell line. Cells were treated with 70% ethanol extract of lyophilized *O. humifusa* stem. Each bar represents the mean±SD (n=3). Treated cells were estimated by the WST assay. Values with different letters above each bar are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

있다. 이와 같은 결과를 얻었기에 항암기전과 관련한 이후의 실험은 에탄올 추출물을 중심으로 진행하였다.

독성평가

천년초 70% 에탄올 추출물이 HT-29 세포의 성장을 저해하는 효과가 독성에 의한 것인지를 판단하기 위해 정상 세포주인 지방세포(3T3-L1)에 천년초 에탄올 추출물을 처리하여 WST를 이용한 세포 생존율을 측정된 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

천년초 70% 에탄올 추출물을 3T3-L1 세포에 0, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/mL의 농도로 처리하였을 때 흡광도 값은 day 1, 2 모두 대조군에 비하여 시료 처리군에서 유의하게 낮아지지 않았다. 따라서 천년초 70% 에탄올 추출물은 0.25~2 mg/mL의 농도에서 세포 독성을 유발하지 않는 것으로 판단

하여 이 농도 범위에서 다음 실험을 진행하였다. 선행 연구에 의하면 천년초 선인장 줄기의 ethyl acetate 추출물이나 물 분획물은 1,000 µg/mL의 농도에서 human fibroblast BJ 세포의 증식을 저해하지 않았고 오히려 ethyl acetate 추출물은 세포증식을 유도하였다고 하였다(26).

Hoechst 33342 & PI 염색

암세포증식 억제 효능 평가 시험에서 시료를 48시간 처치한 군에서는 유의하게 세포증식이 감소하는 효과를 나타내었으므로 이 시점에서 천년초 추출물의 처리가 인체 유래 대장암 세포인 HT-29의 핵에 미치는 영향을 알아보고, 세포 사멸의 형태를 확인하기 위해 Hoechst 33342 & PI 염색을 실시하였다. Hoechst 계열의 염색약은 DNA에 특이적으로 결합하여 350 nm의 자외선 파장으로부터 자극을 받으면 푸른색의 형광 빛을 분출하며 이중 에틸기가 하나 더 부착되어 있어 세포 투과성이 좋은 Hoechst 33342를 본 연구에서 사용하였다. 반면 propidium iodide는 생세포의 표면을 통과할 수 없고 죽은 세포의 세포막을 통과하여 핵을 염색하므로 Hoechst dye는 살아있는 세포의 핵의 형상을 관찰, PI는 죽은 세포의 비율을 판단할 수 있다.

HT-29 세포의 핵을 염색하여 관찰한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 파란색으로 표시된 부분이 Hoechst 33342로 염색된 생세포의 핵으로서 용매대조군은 핵 고유의 둥근 형태를 유지하는 반면 천년초 시료를 처치한 군은 농도가 증가할수록 핵이 손상되었으며 세포질 분리, chromatin 응축 등이 나타나는 apoptotic body가 관찰되었다. 이러한 apoptotic body는 농도 의존적으로 증가하였으며, 최고 처리 농도인 2 mg/mL에서는 그 이하의 농도에서 거의 보이지 않았던 PI 염색 세포가 발견되어 세포의 죽음을 확인할 수 있었다. 따라서 천년초 추출물은 농도 의존적으로 HT-29 세포의 죽음을 유도하는 것으로 사료된다.

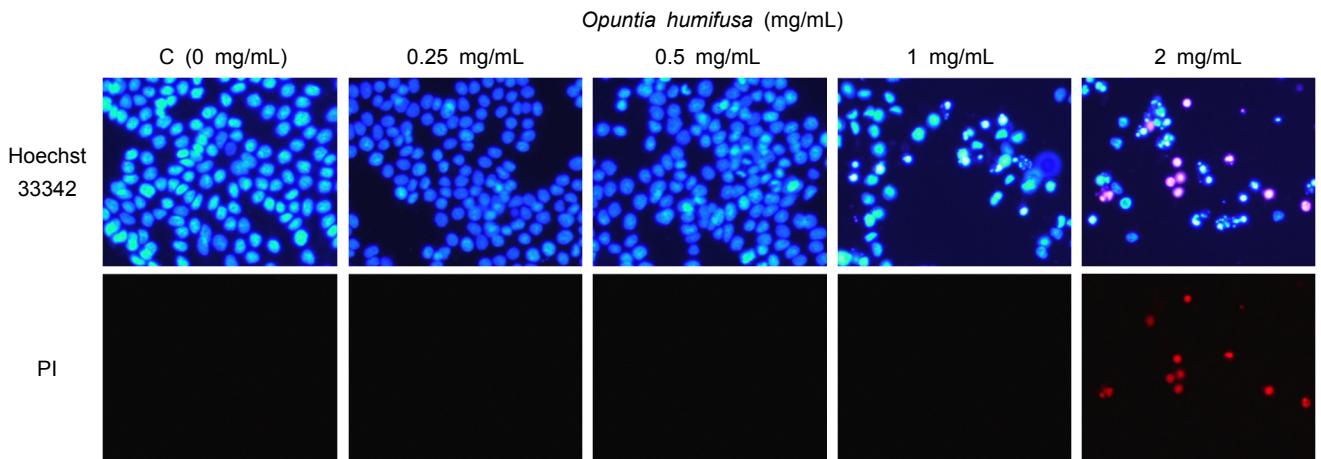


Fig. 3. Photomicrographs of HT-29 human colon adenocarcinoma cells treated with *Opuntia humifusa* and stained with Hoechst 33342 & PI. HT-29 cells were treated with 70% ethanol extract of *O. humifusa* at 0, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/mL and incubated for 48 hours. Cellular DNA was stained with Hoechst 33342 (2 µg/mL) at 37°C for 25 min and then with PI (2 µg/mL) for 5 min. After successive incubation, the cells were examined by a fluorescence microscope at ×200 magnification.

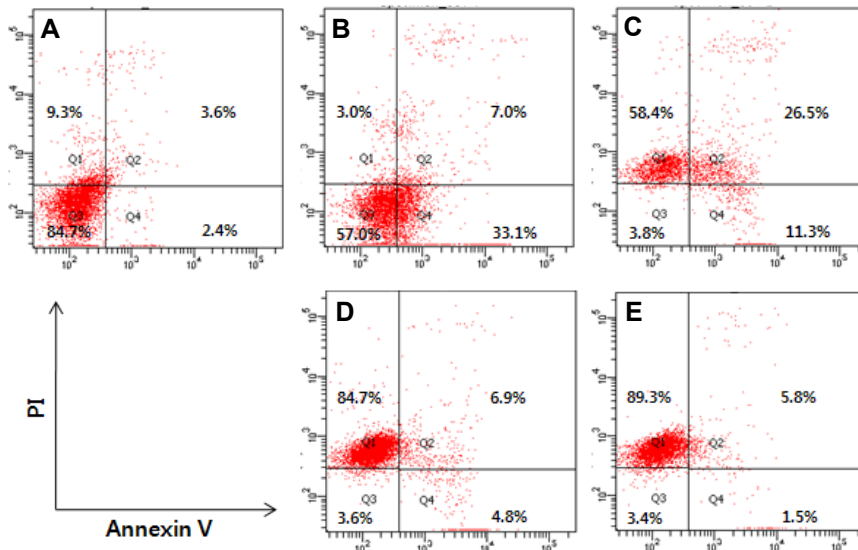


Fig. 4. FACS analysis of HT-29 cells treated with *Opuntia humifusa* extract. Cells were incubated with *O. humifusa* extract at concentration of 0 (A), 0.25 (B), 0.5 (C), 1 (D), 2 (E) mg/mL for 48 hours and then stained with Annexin V & PI. Apoptotic cell death (right window) and nonapoptotic cell death (left window) were measured by FACS-based quantification.

Annexin V & PI double staining

앞의 결과에서 HT-29 세포에 천년초 추출물을 처리하였을 때 세포증식 억제, apoptotic body가 보였으므로, 천년초의 효능이 apoptosis에 의해 기인한 것인지 확인하기 위해 Annexin V & PI double staining을 실시하였다. Apoptosis가 유도되면 세포 내부에 존재하던 phosphatidylserine이 세포 외부로 노출되고 여기에 Annexin V가 결합하고 세포의 죽음이 급진적으로 진행될수록 PI만 염색되는 원리를 이용하여 apoptosis와 necrosis의 유발 정도를 측정하게 된다.

천년초 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. Annexin V & PI double staining은 천년초가 HT-29 세포의 성장억제에 미치는 영향에 대하여 정확하게 알아보고자 48시간 배양하여 결과를 도출하였다. 시료 처리 후 48시간 배양한 결과는 대조군에 비하여 0.25 mg/mL 처리한 군에서 early apoptosis가 유의하게 증가하였고 (33.1% vs 2.4%), 0.5 mg/mL 처리한 군에서는 early apoptosis 11.3%, late apoptosis 26.5%로 증가하여 대조군에 비하여 저농도 시료 처리군에서는 전반적으로 apoptosis의 비율이 증가하였으나 고농도(1~2 mg/mL)로 처리한 군에서는 dead cell이 84.7%, 89.3% 나타나 세포가 세포사멸과정을 거쳐 세포괴사로 진행된 것으로 추측되었다.

DNA fragmentation

인체 유래 대장암 세포 HT-29에서 천년초 70% 에탄올 추출물이 DNA 손상을 이끌어 내어 세포의 손상이나 증식 억제를 유도했는지를 확인하기 위해 천년초를 처리한 결과를 Table 4에 나타내었다. 본 실험 결과 tail-DNA, tail-moment, tail length은 용매 대조군에 비해 추출물을 1과 2 mg/mL로 처리한 군에서 유의하게 증가하였다. 특히 2 mg/mL로 처리한 군은 tail-DNA, tail length, tail-moment가 3.24배, 2.58배, 5.75배 높았다. 이 결과는 앞서 Hoechst

Table 4. Levels of DNA damage expressed as tail-DNA, tail length and tail moment in HT-29 cells treated with *Opuntia humifusa* extract

Group	Tail-DNA (%)	Tail length (μm)	Tail moment
C	8.972 \pm 2.857 ^{a1)2)}	37.443 \pm 14.169 ^a	5.394 \pm 3.164 ^a
0.25	15.560 \pm 0.628 ^{ab}	66.500 \pm 8.962 ^{abc}	15.818 \pm 4.787 ^{ab}
0.5	14.132 \pm 5.624 ^{ab}	55.626 \pm 17.318 ^{ab}	10.878 \pm 6.554 ^{ab}
1	23.263 \pm 8.755 ^{bc}	80.395 \pm 28.673 ^{bc}	23.756 \pm 13.163 ^{bc}
2	29.202 \pm 2.872 ^c	96.756 \pm 3.878 ^c	31.020 \pm 1.831 ^c

¹⁾Mean \pm SD (n=3).

²⁾Mean with different letters in a column are significantly different among groups by Duncan's multiple range test at $\alpha=0.05$.

33342 & PI 염색을 나타난 형태학적인 변화에 있어 농도의존적으로 apoptic body가 증가하였던 것과 연관성이 있으며, 천년초 추출물이 HT-29 세포에 있어 세포사를 일으킬 수 있는 DNA 분절 현상을 이끌면서 암세포의 성장이나 증식을 억제하는 효과와 연관된다고 할 수 있다.

천년초 줄기 분말의 추출물이 인체 유래 대장암 세포주에서 항암 효능을 보이는지 평가한 결과 열수 추출물은 거의 효과가 없었으나 알코올 추출물이 세포증식을 억제하였으며, 특히 70% 에탄올 추출물의 효과가 농도 의존적으로 나타났다. 천년초 줄기의 에탄올 추출물은 HT29 대장암 세포의 사멸을 유도하였고 DNA fragmentation의 결과와 함께 대장암 예방 소재로 활용 가능할 것으로 사료되었다. 그러나 천년초가 대장암 세포에 미치는 영향에 대한 기전을 파악하기 위해 apoptosis나 세포주기에 대한 영향 등 심도 있는 연구가 좀 더 진행되어야 할 것이며, 나아가 동물실험과 인체시험을 통해 천년초의 항암 효능이 안전성과 함께 입증되어야 활용 가치가 높아질 것이다.

요 약

천년초 에탄올 추출물이 인체 대장암 세포 HT-29의 세포사

멸에 미치는 영향과 기능성 식품 소재로서의 가능성을 시사하고자 본 연구를 수행하였다. 연구 내용은 천년초의 일반성분 분석과 천년초 에탄올 추출물의 처리 농도에 따른 인체 대장암 세포의 증식과 세포사멸 현상을 비교 관찰하고 항암 효과의 가능성을 확인하고자 하였다. 천년초 분말의 일반성분 분석을 진행한 결과 탄수화물의 함량과 마그네슘 등의 양이온의 함량이 높았고 Na/K의 비율과 P:Ca의 비율이 매우 낮았다. 천년초 70% 에탄올, 메탄올, 열수 추출물을 0.25, 0.5, 1, 2 mg/mL의 농도로 HT-29 세포에 48시간 처리하고 WST를 이용한 세포 생존율을 측정한 결과는 모든 군에서 세포증식이 억제되었으며($P < 0.05$), 특히 에탄올 추출물이 농도 의존적으로 유의한 효능을 보였다. Hoechst 33342 & PI로 이중으로 핵을 염색해서 세포사를 관찰한 결과 시료 농도가 증가할수록 apoptotic body가 증가하였으며, 특히 1 mg/mL의 농도 이상에서 급격히 증가하여 2 mg/mL에서는 세포사를 관찰할 수 있었다. Annexin V & PI double staining을 통하여 저농도(0.25~0.5 mg/mL) 시료 처리군에서는 전반적으로 apoptosis의 비율이 증가하였고 고농도(1~2 mg/mL)로 처리한 군에서는 dead cell이 84.7%, 89.3% 나타나 세포가 세포 사멸과정을 거쳐 세포괴사로 진행된 것으로 추측되었다. 또한 comet assay를 통해 용매 대조군에 비해 1~2 mg/mL 농도에서 유의하게 DNA가 분절되었음을 확인하였다($P < 0.05$). 따라서 천년초 에탄올 추출물은 인체 유래 대장암 세포 HT-29의 세포증식을 억제하고 항산화 효과가 있는 것으로 나타나 천년초의 항암 가능성을 보여 주었으나, 확실한 효과와 기전을 파악하기 위하여 심도 있는 연구가 필요로 된다.

감사의 글

이 연구는 충남대학교 학술연구비에 의해 지원되었음

REFERENCES

- Chan DS, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, Norat T. 2011. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PLoS ONE* 6: e20456.
- Statistics Korea. 2012. *Annual report on the cause of death statistics in 2011*. Statistics Korea, Deajeon, Korea.
- Kushi LH, Byers T, Doyle C, Bandera EV, McCullough M, McTiernan A, Gansler T, Andrews KS, Thun MJ. 2006. American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA Cancer J Clin* 56: 254-281.
- Bernstein H, Bernstein C, Payne CM, Dvorakova K, Garewal H. 2005. Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers. *Mutat Res* 589: 47-65.
- Feugang JM, Konarski P, Zou D, Stintzing FC, Zou C. 2006. Nutritional and medicinal use of cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. *Front Biosci* 1: 2574-2589.
- Lee KS, Kim MG, Lee KY. 2004. Antimicrobial effect of the extracts of cactus *Chounnyuncho* (*Opuntia humifusa*) against food borne pathogens. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1268-1272.
- Kim H, Park SH. 2009. Metabolic profiling and discrimination of two cacti cultivated in Korea using HPLC-ESI-MS and multivariate statistical analysis. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 52: 346-352.
- Lee KS, Lee KY. 2010. Biological activity of phenol compound from a cactus Cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*) in Korea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1132-1136.
- Yoon JA, Hahm SW, Park J, Son YS. 2009. Total polyphenol and flavonoid of fruit extract of *Opuntia humifusa* and its inhibitory effect on the growth of MCF-7 human breast cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1679-1684.
- Park MK, Lee YJ, Kang ES. 2005. Hepatoprotective effect of Cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*) extract in rats treated carbon tetrachloride. *Korean J Food Sci Technol* 37: 822-826.
- Yoon BR, Lee YJ, Kim SG, Jang JY, Lee HK, Rhee SK, Hong HD, Choi HS, Lee BY, Lee OH. 2012. Antioxidant effect of hot water and ethanol extracts from Cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*) on reactive oxygen species (ROS) production in 3T3-L1 adipocytes. *Korean J Food Preserv* 19: 443-450.
- Jung BM, Shin MO, Kim HR. 2012. The effects of antimicrobial, antioxidant, and anticancer properties of *Opuntia humifusa* stems. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 20-25.
- Lee JN, Kim HE, Kim TS. 2014. Anti-diabetic and anti-oxidative effects of *Opuntia humifusa* cladodes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 661-667.
- Yoon JA, Hahm SW, Son YS. 2009. Nutrients contents in different parts of pickly pear (*Opuntia humifusa*) and possible anti-breast cancer effect. *Korean J Food & Nutr* 22: 485-491.
- Jung BM, Han KA, Shin TS. 2011. Food components of different parts of Cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*) harvested from Yeosu, Jeonnam in Korea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1271-1278.
- Rodriguez-Felix A, Cantwell M. 1988. Developmental changes in composition and quality of prickly pear cactus cladodes (nopalitos). *Plant Foods Hum Nutr* 38: 83-93.
- Yu MH, Lee S, Im HG, Kim HJ, Lee I. 2004. Antioxidant activities of *Prunus salicina* Lindl. cv. Soldam (plum) at different growth stages. *Korean J Food Preserv* 11: 358-363.
- Han IH, Lee KA, Byoun KE. 2007. The antioxidant activity of Korean cactus (*Opuntia humifusa*) and the quality characteristics of cookies with cactus powder added. *Korean J Food Cookery Sci* 23: 443-451.
- Lee YC, Hwang KH, Han DH, Kim SD. 1997. Compositions of *Opuntia ficus-indica*. *Korean J Food Sci Technol* 29: 847-859.
- Lee KS, Oh CS, Lee KY. 2005. Antioxidative effect of the fractions extracted from a cactus *Cheonnyuncho* (*Opuntia humifusa*). *Korean J Food Sci Technol* 37: 474-478.
- Jaramillo S, Lopez S, Varela LM, Rodriguez-Arcos R, Jimenez A, Abia R, Guillen R, Muriana FJ. 2010. The flavonol isorhamnetin exhibits cytotoxic effects on human colon cancer cells. *J Agric Food Chem* 58: 10869-10875.
- Chavez-Santoscoy RA, Gutierrez-Urbe JA, Serna-Saldívar SO. 2009. Phenolic composition, antioxidant capacity and *in vitro* cancer cell cytotoxicity of nice prickly pear (*Opuntia* spp.) juices. *Plant Foods Hum Nutr* 64: 146-152.
- Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. 2012. Doxorubicin: an

- update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol* 65: 157-170.
24. Park WC, Lee JK, Pak RK. 2003. Role of p53 and p38 MAPK on Doxorubicin and Lovastatin-induced apoptosis in colon cancer cells. *J Korean Surg Soc* 65: 267-278.
 25. Ryu MJ, Chung HS. 2012. Antiproliferative activity of Omija (*Schizandra chinensis* Baillon) extracts on colon cancer cell line (HT-29). Abstract No P-98 presented at Spring Meeting of the Korean Society of Applied Pharmacology. Chungju, Korea.
 26. Hahm SW, Park J, Son YS. 2010. *Opuntia humifusa* partitioned extracts inhibit the growth of U87MG human glioblastoma cells. *Plant Foods Hum Nutr* 65: 247-252.