

Antiproliferative and Apoptotic Effects of *Sasa quelpaertensis* Nakai in Human Cancer Cells

Ji Hye Kim¹ and Min Young Kim^{1,2*}

¹Toxicology Laboratory, Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Science, SARI, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

²Research Institute for Subtropical Agriculture and Biotechnology, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Received April 28, 2014 / Revised June 23, 2014 / Accepted July 15, 2014

Plants are an invaluable source of potential new anti-cancer drugs. *Sasa quelpaertensis* Nakai (Korean name, Jeju-Joritdae) is one of these plants with medical value, which is a bamboo grass widely distributed in Mt. Halla on Jeju Island, Korea. Here, we investigated the apoptotic effects of *S. quelpaertensis* leaf extracts in six human cancer cell lines (A549, MCF-7, HepG-2, HeLa, HCT116 and A375). MTT assay signified the antiproliferative nature of *S. quelpaertensis* extracts against all tested cancer cells: *S. quelpaertensis* displayed slight cytotoxicity against A549, MCF-7 and HepG-2 cells, whereas it was exclusively cytotoxic to HeLa, HCT116 and A375 cells. Apoptotic cells were evaluated using PI staining of DNA fragmentation by flow cytometry (sub-G1 peak). PI staining indicated increasing accumulation of HeLa, HCT116 and A375 cells at sub-G1 phase. Further events like generation of nitric oxide (NO^{*}) were accompanied in the *S. quelpaertensis* Nakai-induced apoptosis. Augmented NO^{*} generation resulted in the DNA fragmentation of HeLa, HCT116 and A375 cells by treatment with *S. quelpaertensis* leaf extracts. These results suggest that *S. quelpaertensis* may be a potential natural resource for treating cancer cell. To identify the exact mechanisms of molecular mechanism of *S. quelpaertensis* induced apoptosis awaits further investigation.

Key words : Apoptosis, human cancer cells, nitric oxide, *Sasa quelpaertensis* Nakai

서 론

Apoptosis는 체계적인 신호전달 과정을 통해 일어나는 능동적인 세포사멸로 여러 가지 형태학적, 생화학적 변화를 동반하게 되는데, 조직 손상 및 감염에 의한 apoptosis의 실패는 암을 비롯한 각종 질환의 원인이 되는 것으로 밝혀져 있다. 최근 연구 결과에 따르면 몇몇 chemopreventive 및 chemotherapeutic agent가 암세포의 파괴된 apoptosis 기전을 수복하거나 분화를 유도하는 것으로 알려져 이를 응용한 새로운 암 치료제 연구개발이 활기를 띠고 있다[17, 26].

Nitric oxide (NO^{*})는 3가지 nitric oxide synthase (NOS): neuronal NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS), endothelial NOS (eNOS)로 부터 합성되는 물질로 생체 내에서 항상성을 조절하고 신경계와 면역계의 주요매개인자로 작용한다. 뿐만 아니라 NO^{*}는 그 발생량에 apoptosis를 항진시키거나 저해하는데[3, 25], superoxide dismutase (SOD), catalase (CTA), glutathione peroxidase (GPx) 등과 같은 체내 항산화계에 의

해 reactive nitrogen species (RNS)가 소거되지 않을 때 NO^{*}의 과다 축적으로 야기되는 nitrosative stress는 mitochondria의 기능 상실, 핵의 응축, DNA 단편화 등을 초래하며 암세포의 세포 사멸을 유도하는 역할을 한다[9, 10].

암세포의 apoptosis 유발은 복잡한 과정이기 때문에, 세포주기의 교란과 저해를 통한 암화과정 및 종양진행의 억제는 새로운 항암제 발굴에 있어 매우 중요한 의의를 갖는다. 세포주기의 전환은 cyclin과 cyclin dependent kinase (CDK)의 상호작용에 의해 조절되며, 이러한 cyclin과 CDK의 발현 장애는 비정상적인 세포의 증식과 암의 변성을 유발한다. Cyclin/CDK 복합체는 세포주기의 각 기에서의 활성이 순간적으로 증폭되며, DNA 합성이 개시되는 G0/G1기에서는 cyclin D, E와 CDK2, 4, 6가, DNA가 합성되는 S기에서는 Cyclin A와 CDK2, Cyclin B1은 CDK2와 복합체를 형성하며 G2/M기의 주요조절자로 작용하고 이들의 지속적인 순환에 의해 세포 증식이 이루어진다. 일반적으로 암세포는 정상세포보다 활발하게 세포주기가 진행되며, 세포분열이 이행되기 앞서 세포주기의 정체로 발생하는 mitotic arrest는 새로운 세포주기의 진입을 저지하여 암세포의 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있다. 아울러 유방암, 식도암, 대장암, 폐암 세포 등에서 cyclin/CDK 복합체의 과발현 및 cyclin/CDK 복합체의 활성을 억제하는 p16, p21, p27 등의 변이가 관찰되고 이를 차단함으로써 궁극적으로 암세포의 선택적 폐사를 유도할 수 있다는 실험적 증거가 보고되어[5, 16, 29], 암을 제어할 수 있는 유용

*Corresponding author

Tel : +82-64-754-3349, Fax : +82-64-756-3351

E-mail : jeffkim@jejunu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

한 단계로써 연구의 필요성이 강조되고 있다.

제주조릿대는 한라산 일대에 군락을 이루어 분포하고 있으며 기후변화 등의 요인으로 자생지역이 급격히 확산되고 있는 추세로 한라산 식생의 생물다양성을 교란하는 위협적인 존재로 부각되고 있다. 제주조릿대를 인위적으로 제거하는 것은 현실적인 어려움이 있어, 이를 효과적으로 자원화하고 높은 부가가치를 창출하기 위해 식품, 의약품, 향장품 등으로의 산업화가 대안으로 제시되고 있지만 현재까지의 연구개발은 미흡한 실정이다. 지금까지 이루어진 연구 결과로는 조릿대의 혈당강하능, 항균 활성 등에 국한되어 있지만 항산화 기능을 하는 것으로 알려진 유효성분이 다량 함유되어 있다는 사실과 대식세포의 종양억제작용을 증강시키는 등 일부 항암 효과가 제시되면서 제주조릿대의 항암 소재로서의 개발 가능성을 시사하는 중요한 요인이 되고 있다[12, 27].

이 밖에도 항암제의 정상 세포에 대한 독성 및 유해성 여부가 여전히 논란이 되고 있어 안정성과 관능상 문제가 적은 천연 자원을 소재로 한 항암제 및 항암보조제의 연구개발이 각광받고 있으며, 이에 본 연구에서도 제주조릿대의 항암 제제로서의 가능성을 검증하여 지역산업 발전을 도모하고 효율적인 자원화 방안을 마련하고자 한다.

재료 및 방법

시료준비

본 연구에 사용된 제주조릿대는 증류수로 세척하여 24시간 동안 동결건조 후 분쇄하였다. 건조된 제주조릿대에 1 g/10 ml의 농도가 되도록 70% ethanol을 첨가하여 25°C, 150 rpm으로 6시간 동안 3회 반복하여 유효성분을 추출하였다. 추출액을 1500 rpm에서 15분간 원심분리 시키고 0.45 µm의 여과 필터로 걸러내어 부유성분을 제거하였으며, 감압 농축을 통해 얻어낸 고형성분을 다시 동결 건조시켜 보관하였다. 실험 시에는 dimethyl sulfoxide (Amresco, Solon, Ohio, USA)를 이용하여 200 mg/ml의 농도로 stock solution을 만든 다음 적정 농도로 배지에 희석하여 사용하였다.

실험재료

세포 배양에 사용된 Ham's F-12와 Dulbecco's modified eagle medium는 Lonza (Walkersville, MD, US), McCoy's 5A medium는 Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA), minimum essential medium eagle는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 각각 구입하였으며, 세포생존율 측정에 이용된 cell proliferation kit I은 Roche (Indianapolis, IN, USA)에서 구입하였다. 또한 세포주기 분석을 위해 필요한 RNase는 Amresco (Solon, Ohio, USA)에서, propidium iodide와 DNA 분절 검사에 이용된 genalute™ mammalian genomic DNA miniprep kit 및 ethidium bromide, nitrite 생성량 측정을 위한 griess

reagent는 Sigma에서 구입하여 사용하였다.

세포배양

본 실험에 사용된 A549 (인간폐암세포)는 Ham's F-12, HCT116 (인간대장암세포)는 McCoy's 5A medium, HepG-2 (인간간암세포)는 minimum essential medium eagle, MCF-7 (인간유방암세포), Hela (인간자궁경부암세포) 및 A375 (인간 흑색종세포)는 Dulbecco's modified eagle medium 배지에 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin과 L-glutamine을 첨가하여 37°C 습윤한 CO₂ incubator (5% CO₂/95% air)에서 배양하였다. 세포가 배양용기의 80% 정도 증식하였을 때 적정수의 세포를 유지하기 위하여 phosphate-buffered saline (PBS)으로 세척한 후 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 계대 배양하였고 배양액은 3-4일마다 교환하였다.

세포생존율 측정

제주조릿대의 세포독성은 cell proliferation kit I을 이용하여 측정하였는데, 96 well plate에 5×10⁴ cells/well이 되도록 세포를 분주하고 제주조릿대를 0-200 µg/ml의 농도로 24-72 시간 동안 처리하여 550 nm에서의 흡광도를 packard EL340 microplate reader (Bio-Tek instruments, Winooski, VT, US)로 측정하였다.

Cell cycle 분석

Cell cycle 분석은 Li 등[24]의 방법에 따라 분석하였다. 시험 세포주(2×10⁶ cells/well)에 제주조릿대를 48시간 동안 처리하여 회수한 뒤 70% ethanol로 고정하였다. 고정된 세포는 1% FBS가 포함된 PBS로 2-3회 세척하였으며, 500 µg/ml의 propidium iodide로 염색하여 10 µg/µl의 RNase가 포함된 PBS (1% FBS)에 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 BD FACS caliber™ flow cytometer (BD biosciences, San Jose, CA, US)를 이용하여 세포주기를 분석하였다.

DNA 분절 검사

준비된 세포를 수집하여 genalute™ mammalian genomic DNA miniprep kit로 DNA를 분리하여 1.8% agarose gel에서 60-120분(50 V) 동안 전기영동한 뒤 ethidium bromide로 염색하고 UV transilluminator 하에서 DNA 단편화 현상을 관찰하였다.

Nitrite 생성량 측정

Nitrite 생성량은 Green 등[8]의 방법에 따라, 위와 동일한 조건의 배양용기에서 100 µl 씩의 배지를 취하여 동량의 griess reagent를 첨가하고 이를 10분간 실온에서 반응시켜 oxidation product인 NO₂⁻ 생성 정도를 540 nm 파장에서 측정하였

으며, 이때 NO₂⁻ 농도에 대한 표준곡선은 NaNO₂를 사용하여 작성하였다.

통계 처리

본 실험의 결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였으며, 통계처리는 student's t-test에 의해 p<0.05인 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

제주조릿대의 항암 활성

제주조릿대의 항암 활성을 알아보기 위하여 다양한 인간암 세포종(A549: 인간폐암세포, MCF-7: 인간유방암세포, HepG-2: 인간간암세포, Hela: 인간자궁경부암세포, HCT116: 인간대장암세포, A375: 인간흑색종세포)을 대상으로 증식억제 효과를 탐색하였다. 제주조릿대를 농도별(0-200 µg/ml)로 처리하였을 때 시간이 경과함에 따라 암세포주의 생존율이 비례적으로 감소함을 보였으며, 72시간 배양한 결과 A375세포의 성장을 50% 억제하는 농도(IC₅₀) 값이 35.36 µg/ml, Hela와 HCT116 세포의 IC₅₀이 각각 40.32와 36.93 µg/ml로 우수한 세포독성 효과를 보인 반면, MCF-7 (139.51 µg/ml), A549 (102.398

µg/ml), HepG-2 (177.31 µg/ml) 세포는 미비한 활성을 나타내었다(Fig. 1).

이러한 현상은 급성 림프구성 백혈병세포 Jurkat, Molt-4와 혈구암세포 HL60에 대나무 추출물을 처리하였을 때 농도가 증가함에 따라 암 세포의 생존율을 감소시키고[2, 23], 유방암 세포 MCF-7/ADR에 조릿대 추출물을 첨가하였을 때 (-)-syringaresinol, tricetin과 같은 성분이 세포독성을 유발한다는 결과와 유사한 것으로 보인다[15]. 그러나 조릿대 추출물이 간암 세포 HepG-2의 성장을 저해한다는 보고와는 판이하게 나타났는데[28], 이는 조릿대와 제주조릿대 간의 활성성분차에 기인한 것으로 추측된다.

제주조릿대의 apoptosis 유발

여러 암종에 대한 제주조릿대의 증식 억제 작용에 apoptosis가 수반되는지 파악하기 위하여 우수한 항암 활성을 보인 A375, Hela, HCT116 세포를 대상으로 sub-G1 발생빈도와 DNA 분절 형성 유무를 조사하였다. 제주조릿대 추출물이 나타내는 세포사멸 작용을 0-200 µg/ml의 농도까지 검색하였을 때, sub-G1의 발생빈도가 농도의존적으로 증가하였고, 최고농도(200 µg/ml)에서 A375 세포(30.9%)가 Hela (24.2%)와 HCT116 (22.8%) 세포에 비해 높게 나타났다(Fig. 2). 또한 이와

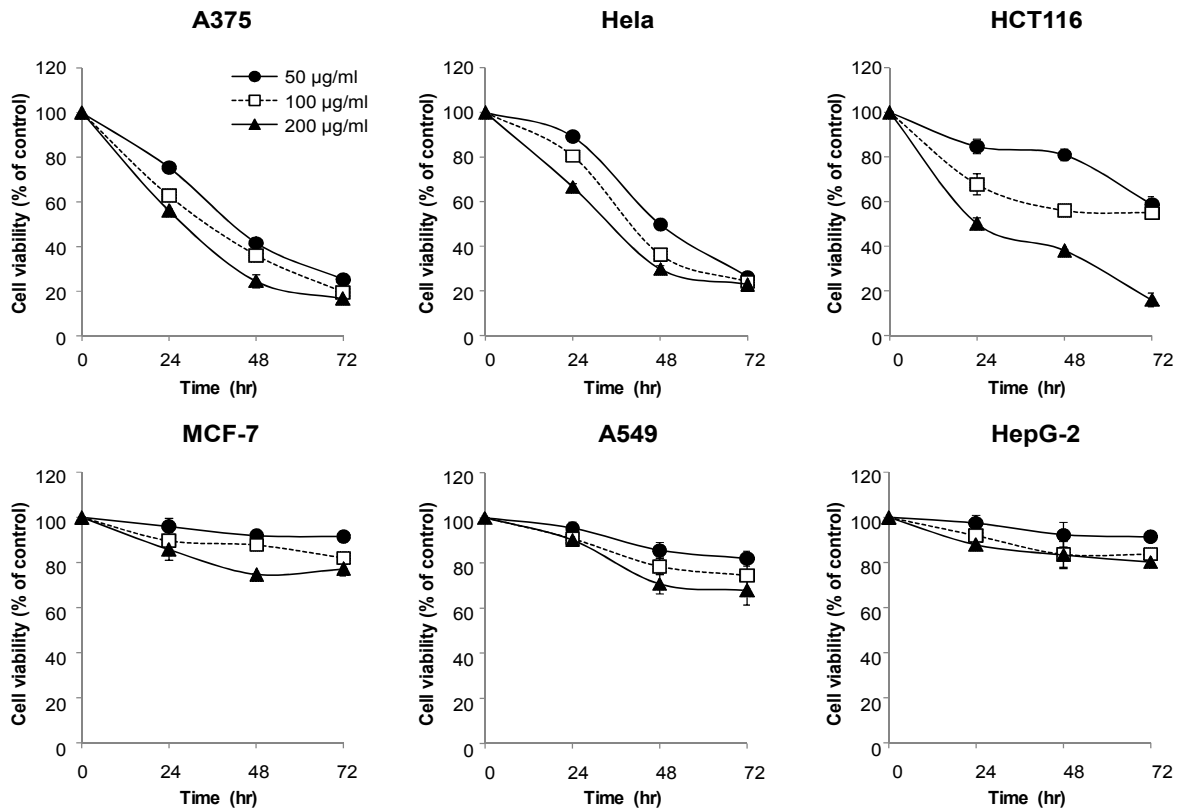


Fig. 1. Growth inhibition of various human cancer cells after treatment with *Sasa quelpaertensis* Nakai. The cells were treated with indicated concentration (0-200 µg/ml) of *Sasa quelpaertensis* Nakai for 24-72 hr and cell proliferation was determined by the MTT assay. Each point is the mean ± SD of three experiments.

같은 경향으로 DNA 분절 현상이 농도의존적으로 뚜렷하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

여타 선행 연구 결과에 의하면 대나무 잎 추출물이 caspase-3를 활성화시킴으로써 백혈병세포 CMK-7과 대장암세포 Colo320 DM의 성장을 저해하고[22], 죽여는 reactive oxygen species (ROS)에 의한 NF- κ B 경로를 차단하여 섬유육종 HT1080 세포의 apoptosis를 유도하는 것으로 보고된 바 있다 [18]. 이 외에도 제주조릿대의 *p*-coumaric acid가 tyrosinase의 활성을 현저히 감소시켜 흑색종 세포의 악성화를 억제한다는 연구결과가 발표되어[1] 본 연구에서도 제주조릿대에 함유되

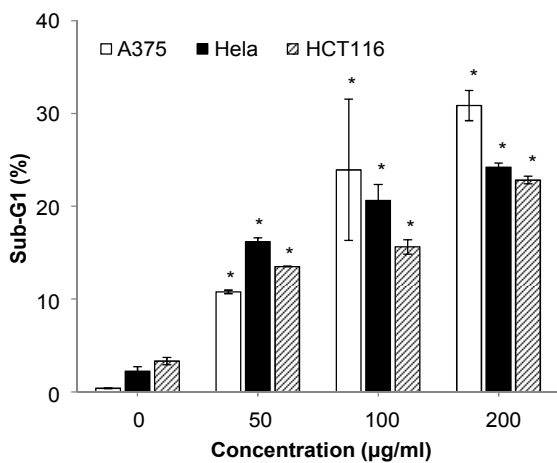


Fig. 2. Dose effect of *Sasa quelpaertensis* Nakai induced apoptosis in A375, HeLa and HCT116 cells. Cells were treated with indicated concentration (0-200 µg/ml) of *Sasa quelpaertensis* Nakai for 48 hr, stained with PI, and analyzed for cell cycle using flow cytometry. Results are expressed as mean \pm SD from three separated experiments. * p <0.05 compared with control.

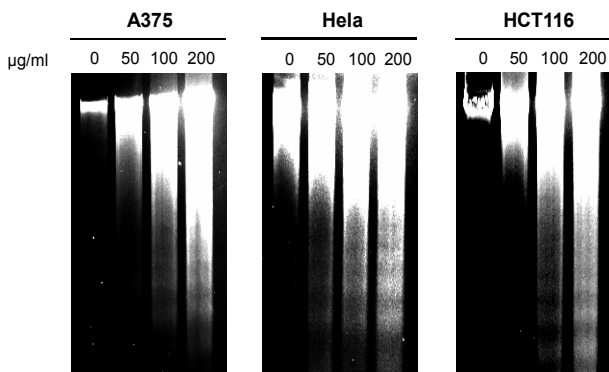


Fig. 3. Internucleosomal DNA fragmentation induced in A375, HeLa and HCT116 cells *Sasa quelpaertensis* Nakai. Cells were exposed with *S. quelpaertensis* at different concentration (0-200 µg/ml) for 48 hr. To analyze the DNA fragmentation, the genomic DNAs were extracted, electrophoresed in a 1.8% agarose gel and then visualized by ethidium bromide staining.

어 있는 다양한 활성물질이 여러 암종의 apoptosis를 유발하였을 것으로 예상된다.

제주조릿대의 NO[•] 생성

NO[•]는 cell cycle arrest 및 apoptosis 유발 과정에 핵심적인 역할을 하며, 과도한 NO[•]의 축적은 세포내 산화적 스트레스 증가에 따른 DNA 손상을 야기할 뿐만 아니라 미토콘드리아의 기능을 파괴함으로써 intrinsic pathway에 의한 apoptosis를 항진시키는 작용을 한다[31, 33]. Jangananathan 등[14]에 따르면 제주조릿대에 함유되어 있는 *p*-coumaric acid 성분에 의해 발생된 NO[•]와 ROS가 대장암 HCT-15와 HT-29 세포의 성장을 저해하고, Park 등[21]은 조릿대 추출물에 의한 백혈병 세포 HL60와 L1210의 사멸작용에 NO[•]와 ROS가 연관되어 있음을 발표하였다.

본 연구에서는 Table 1에 나타난 바와 같이 A375, HeLa, HCT116 세포에 제주조릿대 처리시 nitrite 생성량이 농도의존적으로 증가하는 것으로 나타났는데(200 µg/ml에서 1.8-3.2배 증가), 이는 제주조릿대 등에 존재하는 기능성 성분이 NO[•]를 증가시켜 암세포의 성장을 저해한다는 보고[11]와 부합된다. 하지만 다양한 식물 소재에 의해 NO[•]가 억제되어 대장암, 유방암, 폐암 등이 사멸한다는[19, 32] 상반된 결과들도 나오고 있어 제주조릿대에 의해 유도된 apoptosis와 NO[•]의 상관관계 기전규명 등 더 많은 연구들이 필요한 것으로 사료된다.

제주조릿대의 세포주기 교란

다음으로 제주조릿대의 항종양효과가 세포주기 기능 제어에 의한 현상인지 확인하기 위해 선정된 3가지 암종(A375, HeLa, HCT116)의 세포주기를 검토한 결과 암종마다 각기 상이하게 조절되는 것을 관찰할 수 있었다(Table 2). 좀 더 자세히 살펴보자면 A375세포는 세포주기 중 G0/G1기가 점차 증가되는 전형적인 G0/G1 arrest를 나타냈는데 이는 Interleukin-1 (IL-1)에 의해 발생된 G0/G1기의 지연이 흑색종 세포의 증식을 저해한다는 기존 연구와 함께, 세포주기 교란과 관련되어 보고된 많은 천연물 추출물의 G0/G1기 지체에 따른 암세포 사멸사 유도과 유사한 결과이다. 특히 차가버섯 추출물은 신경교모세포종 U-87 MG에서 cyclin/CDK의 결합을 방해

Table 1. Does effect of *Sasa quelpaertensis* on nitrite production in A375, HeLa and HCT116 cells

µg/ml	Nitrite (µM/10 ⁶ cells)		
	A375	HeLa	HCT116
0	2.94±0.118	2.09±0.019	2.92±0.079
50	5.35±0.0595*	2.63±0.086	4.27±0.371
100	6.96±0.319*	3.61±0.024*	4.74±0.174
200	9.47±0.1597*	5.37±0.039*	5.26±0.244*

The results are shown as the mean \pm SD. * p <0.05 compared with control.

Table 2. *Sasa quelpaertensis* induced cell cycle arrest in A375, HeLa and HCT116 cells

	μg/ml	% of cells		
		G0/G1	S	G2/M
A375	0	60.5±0.200	7.02±0.379	32.5±0.18
	50	69.98±0.402	7.4±0.18*	22.6±0.58
	100	63.5±4.15	9.2±2.26*	27.3±1.89*
	200	71.6±0.07	7.7±0.66*	20.7±0.59
Hela	0	58.9±2.48	15.6±1.53	25.5±0.94
	50	46.3±0.66	26.3±1.35	27.4±0.69*
	100	50.8±2.58*	23.9±0.76	25.3±1.82*
	200	51.2±1.000*	22.3±0.61	26.5±1.61*
HCT116	0	79.98±0.087	10.8±0.18	9.2±0.27
	50	71.4±0.42	15.7±0.68	12.9±0.26
	100	52.5±3.695	14.5±0.702	32.9±2.99
	200	47.6±2.38	15.7±0.33	36.7±2.72

The results are shown as the mean ± SD. * $p < 0.05$ compared with control.

하여 세포주기의 이행을 효과적으로 정지시키고 동시에 위암 세포 SNU-484와 자궁경부암 HeLa S3 등에서도 효능이 있음이 제시되었고[4, 13, 30], 유자, 탕자 및 천년초 선인장 추출물은 유방암 세포 MCF-7의 G0/G1기를 지체시킴으로써 세포생존율을 저하하는 등 폭 넓은 연구가 이루어지고 있다[7, 20]. 하지만 HeLa는 예상과 달리 S기의 미약한 증가 외에 뚜렷한 경향성을 보이지 않아 단정할 순 없으나 세포주기 조절과 무관한 것으로 추정되며, HCT116의 경우 G2/M기의 차단에 따른 mitotic arrest에 의해 분열이 중단됨을 알 수 있었다. 이러한 작용은 flavonoid 성분이 HCT116 세포에서 ROS에 의해 유도된 MAPK14 pathway를 항진시켜 mitotic arrest에 따른 사멸을 유도한다는 연구 결과를 뒷받침함과 동시에 flavonoid에 의한 HCT116의 G2/M기 억제 작용이 약 15% 전후였던 반면 제주 조릿대는 약 25%로 더 뛰어난 효력을 지님을 예측할 수 있다[6].

본 연구 결과는 대다수의 선행 연구 결과가 G1 arrest에 한정되어 있다는 점에서 볼 때 중요한 기초자료가 될 것으로 사료되며, 세포주기의 교란이 암세포의 자연사멸을 유도하는 과정에 있어 매우 유용한 요소임을 고려하여 볼 때 이후 HCT116 및 A375 세포주에 대해 더욱 심도있는 연구가 요구되어진다.

결론

현재까지 제시된 암의 치료법으로는 방사선요법, 화학요법 및 외과적 절제술이 있으며, 이중 항암제를 이용한 화학요법은 현대의학의 발전에도 불구하고 암세포에 대한 낮은 특이성으로 여러 부작용을 유발하는 한계를 지니고 있다. 그러므로 최근에는 기존 항암제보다 암세포에 대한 선택성이 높아 효율적이고 안전성이 높은 천연물 유래의 소재 개발이 새로운 항암치료제 발굴의 표적이 되고 있어 본 연구에서도 이러한 연구개발의 일환으로 여러 암종을 대상으로 제주조릿대의 항암

제제로써의 가치를 검증하였다. 기존 보고에 따르면 다양한 약리작용을 하는 phytochemical이 제주조릿대에 다량 포함되어 있다는 점에서 미루어보아 암의 예방과 치료에 유효할 것으로 추정될 뿐 아니라, 이와 같은 의약품으로의 자원화가 궁극적으로 제주지역의 한라산 식생 파괴 방지 대책이 될 수 있을 것으로 기대된다.

상기의 결과를 종합하여 보면 제주조릿대의 여러 암종에 대한 독성이 apoptosis 와 밀접한 연관성이 있으며, 일부 암종에서 제주조릿대 처리시 NO[•] 발생이 동반되는 것으로 미루어 보아 제주조릿대에 의한 apoptosis 유발 기전에 NO[•] pathway가 관여하고 있다는 사실을 암시한다. 또한 추가적인 자료를 확보하기 위하여 세포주기 분석을 진행한 결과 일부 암세포주에서 G0/G1, G2/M기 교란 현상이 관찰되었으며 이는 제주조릿대가 비정상적인 세포주기 이행에 따라 초래되는 암세포의 과잉 생장을 방지함으로써 항종양 효과 가진다는 것을 의미하는 결과로, NO[•] pathway 이외에 cell cycle 조절을 통한 자연사멸 기전을 동반함을 잠정적으로 시사하는 것이다. 이에 대한 구체적인 분자생물학적 기전 분석이 이루어지지 않은 상태에서 단정할 수 없으나 이상의 결과를 토대로 볼 때 제주조릿대의 항암 제제로써의 개발 가능성이 입증되었으며, 추가적인 기전 규명을 통해 더욱 경제적인 암세포 자연사멸 유도 전략을 수립하는데 기여할 수 있을 것으로 예상된다. 또한 향후 암 치료제로서 제주조릿대를 활용하기 위해서는 이에 따른 동물실험 및 임상실험을 수행해야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업입니다(No. 2011-0006617).

References

- An, S. M., Lee, S. I., Choi, S. W., Moon, S. W. and Boo, Y. C. 2008. *p*-Coumaric acid, a constituent of *Sasa quel-paertensis* Nakai, inhibits cellular melanogenesis stimulated by α -melanocyte stimulating hormone. *Br J Dermatol* **159**, 292-299.
- Ando, H., Ohba, H., Sakaki, T., Takamine, K., Kamino, Y., Moriwaki, S., Bakalova, R., Uemura, Y. and Hatate, Y. 2004. Hot-compressed-water decomposed products from bamboo manifest a selective cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia cells. *Toxicol In Vitro* **18**, 765-771.
- Brune, B., Knethen, A. V. and Sandau, K. B. 1999. Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis. *Cell Death Differ* **6**, 969-975.
- Burczyk, J., Gawron, A., Slotwinska, M., Smietana, B. and Terminska, K. 1996. Antimitotic activity of aqueous extracts of *Inonotus obliquus*. *Boll Chim Farm* **135**, 306-309.
- Champeme, M. H., Bieche, L., Lizard, S. and Lidereau, R. 1995. 11q13 amplification in local recurrence of human primary breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **12**, 128-133.
- Chen, Y. J., Chen, H. P., Cheng, Y. J., Lin, Y. H., Liu, K. W., Chen, Y. J., Hou, M. F., Wu, Y. C., Lee, Y. C. and Yuan, S. S. 2013. The synthetic flavonoid WYC02-9 inhibits colorectal cancer cell growth through ROS-mediated activation of MAPK14 pathway. *Life Sci* **92**, 1081-1092.
- Eymin, B., Claverie, P., Salon, C., Leduc, C., Col, E., Brambilla, E., Khochbin, S. and Gazzeri, S. 2006. p14ARF activates a Tip60-dependent and p53-independent ATM/ATR/CHK pathway in response to genotoxic stress. *Mol Cell Biol* **26**, 4339-4350.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* **126**, 131-138.
- Hirst, D. G. and Robson, T. 2007. Nitrosative stress in cancer therapy. *Front Biosci* **12**, 3406-3418.
- Hirst, D. G. and Robson, T. 2010. Nitrosative stress as a mediator of apoptosis: Implications for cancer therapy. *Curr Pharm Des* **16**, 45-55.
- Hsieh, B. S., Huang, L. W., Su, S. J., Cheng, H. L., Hu, Y. C., Hung, T. C. and Chang, K. L. 2011. Combined arginine and ascorbic acid treatment induces apoptosis in the hepatoma cell line HA22T/VGH and changes in redox status involving the pentose phosphate pathway and reactive oxygen and nitrogen species. *J Nutr Biochem* **22**, 234-241.
- Hwang, J. H., Choi, S. Y., Ko, H. C., Jang, M. G., Jin, Y. J., Kang, S. I., Park, J. G., Chung, W. S. and Kim, S. J. 2007. Anti-inflammatory effect of the hot water extract from *Sasa quel-paertensis* leaves. *Food Sci Biotechnol* **16**, 728-733.
- Hwang, Y. J., Noh, G. W. and Kim, S. H. 2003. Effect of extracts on proliferation and caspase-3 activity in human gastro-intestinal cancer cell lines. *Korean J Nutr* **36**, 18-23.
- Jaganathan, S. K., Supriyanto, E. and Mandal, M. 2013. Events associated with apoptotic effect of *p*-coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells. *World J Gastroenterol* **19**, 7726-7734.
- Jeong, Y. H., Chung, S. Y., Han, A. R., Sung, M. K., Jang, D. S., Lee, J., Kwon, Y. J., Lee, H. J. and Seo, E. K. 2007. *p*-Glycoprotein inhibitory activity of two phenolic compounds, (-)-syringaresinol and tricetin from *Sasa borealis*. *Chem Biodivers* **4**, 12-16.
- Kawamoto, H., Koizumi, H. and Uchikoshi, T. 1997. Expression of the G2-M checkpoint regulators cyclin B1 and cdc2 in nonmalignant and malignant human breast lesions: immunocytochemical and quantitative image analyses. *Am J Pathol* **150**, 15-23.
- Khan, N., Adhami, V. M. and Mukhtar, H. 2008. Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of cancer. *Biochem pharmacol* **76**, 1333-1339.
- Kim, A. Y., Im, M. J., Yim, N. H., Jung, Y. P. and Ma, J. Y. 2013. Aqueous extract of bambusae caulis in taeniam inhibits PMA-induced tumor cell invasion and pulmonary metastasis: suppression of NF- κ B activation through ROS signaling. *PLoS One* **8**, e78061.
- Kim, J., Jho, K. H., Choi, Y. H. and Nam, S. Y. 2013. Chemopreventive effect of cactus (*Opuntia humifusa*) extracts: radical scavenging activity, pro-apoptosis, and anti-inflammatory effect in human colon (SW480) and breast cancer (MCF-7) cells. *Food Funct* **4**, 681-688.
- Kim, J. E., Park, J. H., Kang, B. W., Seo, M. J., Choi, Y. H., Lim, H. S., Seo, K. L., Kim, J. I., Joo, W. H., Lee, B. K. and Jeong, Y. K. 2008. Anticancer activity of ethanol extract from peel of *Citrus junos* and *Poncirus trifoliata* on MCF-7 breast cancer cells. *J Life Sci* **18**, 1435-1441.
- Kim, J. H. and Park, S. W. 2003. Cytotoxicity of *Sasamorpha purpurascens* extract against HL60 cells and L1210 cells with alterations of ROS scavenging enzymes activities. *J Nat Sci* **11**, 1-21.
- Kim, K. K., Kawano, Y. and Yamazaki, Y. 2003. A novel porphyrin photosensitizer from bamboo leaves that induces apoptosis in cancer cell lines. *Anticancer Res* **23**, 2355-2361.
- Kim, S. H., Kim, T. S., Lee, H. J. and Yoo, J. C. 2007. Enhancement of 1,25-dihydroxyvitamin D₃- and all-trans retinoic acid-induced differentiation of human leukemia HL-60 cells by *Phyllostachys nigra* var. *henonis*. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **29**, 119-129.
- Li, Q. U., Pang, B., Kiziltepe, T., Trudel, L. J., Engelward, B. P., Dedon, P. C. and Wogan, G. N. 2006. Threshold effects of nitric oxide-induced toxicity and cellular responses in wild-type and p53-null human lymphoblastoid cells. *Chem Res Toxicol* **19**, 399-406.
- Liu, L. and Stamler, J. S., 1999. NO: an inhibitor of cell death. *Cell Death Differ* **6**, 937-942.
- Meiler, J. and Schuler, M. 2006. Therapeutic targeting of apoptotic pathways in cancer. *Curr Drug Targets* **7**, 1361-1369.
- Park, Y. O. and Lim, H. S. 2009. Antioxidant activities of bamboo (*Sasa borealis*) leaf extract according to extraction solvent. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **38**, 1640-1648.
- Park, H. S., Lim, J. H., Kim, H. J., Choi, H. J. and Lee, I. S. 2007. Antioxidant flavone glycosides from the leaves of

- Sasa borealis*. *Arch Pharm Res* **30**, 161-166.
29. Sherr, C. J. and Roberts, J. M. 1996. Cancer cell cycles. *Science* **274**, 1672-1677.
30. Shin, J. A., Park, J. H., Kim, S. H. and Song, K. Y. 2013. Inhibition effect of cell proliferation and apoptosis by *Inonotus obliquus* in human glioblastoma U-87 MG cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **42**, 1022-1028.
31. Wang, J., Yu, Y., Hashimoto, F., Sakata, Y., Fujii, M. and Hou, D. X. 2004. Baicalein induces apoptosis through ROS-mediated mitochondrial dysfunction pathway in HL-60 cells. *Int J Mol Med* **14**, 627-632.
32. Xiao, H., Yang, C. S., Li, S., Jin, H., Ho, C. T. and Patel, T. 2009. Monodemethylated polymethoxyflavones from sweet orange (*Citrus sinensis*) peel inhibit growth of human lung cancer cells by apoptosis. *Mol Nutr Food Res* **53**, 398-406.
33. Yang, J., Xiao, Y. L., He, X. R., Qiu, G. F. and Hu, X. M. 2010. Aesculetin-induced apoptosis through a ROS-mediated mitochondrial dysfunction pathway in human cervical cancer cells. *J Asian Nat Prod Res* **12**, 185-193.

초록 : 제주조릿대의 인간 암세포 증식 저해와 자연사멸 효과

김지혜¹ · 김민영^{1,2*}

(¹제주대학교 생명공학부 독성학 실험실, ²제주대학교 아열대농업생명과학연구소)

본 연구에서는 제주도 한라산에 광범위하게 자생하는 제주조릿대의 항암 제제로써의 이용 가능성을 평가하기 위하여 6개 암세포(A549, MCF-7, HepG-2, Hela, HCT116, A375)를 대상으로 세포주기 교란 작용 및 자연사멸 효과를 탐색하였다. MTT 분석 결과 제주조릿대가 다양한 암세포의 증식을 효과적으로 저해하였으며, sub-G1기의 증가와 DNA 분절로 인한 자연사멸 증가에 산화질소가 연관성이 있었다. 이와 별개로 제주조릿대는 세포주기의 장애를 야기하여 암세포의 성장을 억제하는 것으로 나타나 상기의 결과들로 예측하여 볼 때 제주조릿대를 항암 활성을 지닌 소재로 활용 가능할 것이며, 향후 정확한 자연사멸기전 규명을 위한 연구가 진행되어야 할 것이다.