

Anti-proliferative Activities of Solvent Fractions of Lees Extracts in Human Colorectal HCT116 Cells

Hyung-Taek Kang¹, Seung Hoon Lee¹, Soon Young Kim¹, Mi-Sun Kim², Woo-Chang Shin³, Ho-Yong Sohn² and Jong-Sik Kim^{1*}

¹Department of Biological Sciences, Andong National University, Andong 760-749, Korea

²Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 760-749, Korea

³Research Institute, Kooksoondang Brewery Co., Ltd, Seongnam 460-120, Korea

Received June 4, 2014 / Revised September 22, 2014 / Accepted September 23, 2014

In the present study, we prepared eighty-five different kinds of lees extracts and their solvent fractions and investigated their anti-proliferative activities against human colorectal cancer HCT116 cells. HCT116 cells were treated with eighty-five solvent fractions of lees extracts and then cell viability was measured using MTS assay. Among the treated solvent fractions, three solvent fractions (KSD-E1-3, KSD-E2-3, and KSD-E4-3) were selected based on cell viability assay. In addition, we performed an oligo DNA microarray analysis to analyze the gene expression changes by treatment of KSD-E1-3 in HCT116 cells. Among the up-regulated genes, we selected 4 genes (*NAG-1*, *ATF3*, *p21*, and *DDIT3*) and performed RT-PCR using gene-specific primers. Among the treated solvent fractions, KSD-E1-3 dramatically induced the expressions of the four selected genes. In addition, we investigated whether the up-regulations of those genes were dependent on the transcription factor *p53*'s presence using *p53* null HCT116 cells. The results indicate that the up-regulations of *NAG-1*, *ATF3*, and *DDIT3* are not dependent on the *p53* presence, whereas *p21* is dependent on the *p53* presence. These findings may help to understand the molecular mechanisms of the anti-proliferative activity mediated by rice wine lees in human colorectal cancer cells.

Key words : Anti-proliferation, HCT116 cells, lees, oligo DNA microarray, *p53*

서론

막걸리는 찹쌀 등의 전분을 원료로 하고 있고, 발효제를 섞어 발효시킨 탁주를 혼탁하게 제성한 한국 고유의 전통주이다 [10]. 막걸리는 다른 주류에서는 볼 수 없는 당화와 발효라는 두 가지 이화학적, 미생물학적 변화를 혼합적으로 가지고 있다 [14, 15]. 막걸리를 제조할 때 술을 걸러내는 과정에서 생성되는 찌꺼기를 “주박” 혹은 “술지게미”라고 하며, 주박은 단백질과 전분질이 주성분이며 [6], 알코올, 당류, 효모, 유기산, 무기질 등을 함유하고 있다 [20]. 주박에 대한 생리활성 연구는 면역촉진물질 활성 [4], 항산화 및 항균활성 등으로 보고되었다 [12]. 또한 누룩은 술을 빚을 때 사용하는 발효제로서 효소를 지닌 곰팡이를 곡류에 번식시킨 것이다 [11]. 누룩은 밀, 호밀, 조곡, 현미를 기본 원료로 제조되는데 이는 지방마다 다른 생산원료를 사용하기 때문이며 [2], 같은 원료라도 제조시 온도,

습도 등의 환경요인에 따라 차이가 나는 것으로 알려져 있다 [25]. 더욱이 누룩은 생전분을 원료로 하기 때문에 미발효당과 올리고당, 식이성 섬유질이 풍부하게 함유되어 있어 웰빙(well being) 술의 양조가 가능하다 [24].

암은 비정상적인 세포가 통제되지 못하고 과도하게 증식을 통해 확산되는 질병이다 [16]. 국내의 경우 보건복지부 중앙등록본부의 암 등록 통계에 의하면 2011년도 기준 암 발생 현황이 갑상선암(17.8%), 위암(14.9%)에 이어 대장암이 세 번째(12.8%)이며, 암으로 인한 사망율은 위암(19.6%), 대장암(15.2%), 폐암(14.2%), 간암(11.5%) 순으로 보고되고 있다 [22]. 특히 대장암은 세계에서 두 번째로 발병률이 높고 [3], 우리나라에서도 상당히 발병률이 높다.

대장암의 유발 요인은 현대화로 인한 서구형 식생활 변화에 따른 과다한 동물성 지방 섭취 및 섬유질, 칼슘 부족 등의 환경 요인 [9]과 염증질환 및 대장 용종 등의 유전적 요인이다 [1]. 그러나 치료제로 사용되는 대부분의 항암제는 암세포의 apoptosis [8]는 물론, 정상 세포도 사멸을 유발한다. 그렇기 때문에 최근에는 식물로부터 추출한 천연재료를 활용한 면역 향상과 암세포의 사멸을 유도하는 항암제에 대한 연구 [17, 19]가 진행 중이며, 이와 더불어 가족력이 있는 환자에게는 대장암 조기 발견을 위한 검사를 권장하고 있는 실정이다 [7].

본 연구는 8종의 주박과 3종의 누룩을 유기용매로 분획한

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5798, Fax : +82-54-820-7705

E-mail : jsk@anu.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.

총 85종에 의한 대장암 세포주의 성장 억제 활성 및 항 성장 기전을 연구하고자 하였다. 즉, 인간 대장암 HCT116 세포주에서 주박 추출물이 세포생존율에 미치는 영향을 확인하고, oligo DNA microarray 실험을 수행하여 주박 추출물 처리에 의해 차별적으로 발현되는 유전자를 선별하였다. 그 중 4개의 유전자를 선별하여 전사조절인자 p53의 의존성에 대해서 연구하였다. 이러한 연구 결과는 주박 추출물 및 분획물에 의한 대장암 세포의 성장 억제활성과 그 기전을 이해하는데 도움을 줄 것으로 기대된다.

재료 및 방법

주박 및 누룩 추출물 제조

본 연구에서 사용된 8종의 주박과 3종의 누룩은 (주)국순당에서 제공받아 사용하였으며, 총 11종의 시료에서 총 85종의 분획물을 2회에 나누어 제조하였다. 제조방법은 다음의 절차에 따라 진행하였다. 주박의 열수 추출물은 시료 1 kg에 물 1 l를 가하여 100℃에서 30분 동안 추출하였으며, 여과한 후 (Whatman No. 2), 70℃에서 감압 농축하여 분말로 제조하였다. 에탄올 추출물은 시료 1.5 kg에 95% 에탄올 6 l를 가하여 상온에서 3일간 2회 추출하였고, 여과한 후 60℃에서 감압 농축하여 분말로 제조하였다. 또한 누룩의 에탄올 추출물은 시료 200 g에 95% 에탄올 1 l를 가하여 상온에서 7일 동안 2회 추출하였고, 여과한 후 60℃에서 감압 농축하여 분말로 제조하였다. 각각 추출된 추출물 4 g을 물에 현탁하여 n-hexane, ethylacetate, butanol을 이용하여 순차적으로 분획하고 물 잔류물을 회수하여 총 85종의 추출물 및 분획물을 제조하였다. 추출물과 분획물은 Dimethyl sulfoxide (DMSO, sigma, USA)에 녹여 -20℃에서 저장하여 사용하였다. 총 분획물 85종 중 cell viability assay 결과에서 선별된 분획물 KSD-E1-3, KSD-E2-3, 그리고 KSD-E4-3에 대한 자세한 정보는 Table 1에 나타내었다.

세포배양 및 재료

대장암 세포주 HCT116는 American Type Culture Collection (ATCC, Frederick, MD, USA)에서 구입하였고, p53 null HCT116 (HCT116 p53-/-) 세포주는 Johns Hopkins 의과대학의 Bert Vogelstein 박사로부터 분양 받았다. 두 종류의 세포주 배양은 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco, USA), 1% pen-

icillin 및 streptomycin (WelGene, Korea)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, USA)을 사용하였다. 세포의 생육정도를 관찰하면서 계대배양을 실시하여 적정수의 세포를 유지하였다.

세포 성장을 측정(MTS assay)

대장암 세포주 HCT116에 주박 추출물 및 분획물을 처리하여 세포 생존율에 미치는 영향을 연구하기 위해 cell viability assay를 수행하였다. 우선 96 well plate에 1×10³ cells/well의 세포를 접종한 후, 24시간 후에 FBS를 첨가하지 않은 serum free medium으로 배지를 교환한 뒤 DMSO에 녹인 주박 추출물 및 분획물을 1 mg/ml로 처리하였다. 주박 분획물의 대조 물질로는 용매인 DMSO를 처리하였다. 24시간 경과 후, cell viability assay를 수행하기 위해 MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)용액(Promega, USA)을 각 well당 20 µl씩 첨가하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 NanoQuant Plate™ (Tecan Trading AG, Switzerland)를 사용하여 580 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험 결과 수치는 4개의 독립적인 well에서 수행한 값을 Microsoft EXCEL program을 이용하여 분석한 후 mean ± SD 값과 그래프로 나타내었다.

Total RNA 추출

Total RNA 추출은 주박 및 추출물을 처리한 대장암 세포주로부터 RNeasy mini kit (Qiagen, USA)를 이용하여 제조사의 메뉴얼에 따라 수행하였다. 최종적으로 정제된 total RNA는 NanoQuant Plate™를 이용하여 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량한 후, oligo DNA Microarray 실험과 RT-PCR에 사용되었다.

Oligo DNA Microarray 실험

Oligo DNA microarray 실험과 데이터 분석은 지노믹트리사(Genomictree, Inc, Korea)에 위탁하여 수행하였다. 사용한 microarray는 Agilent사의 Agilent Human GE 4 X 44K (V2) arrays (Agilent Technologies, Palo Alto, USA)를 사용하였다

Reverse transcription-PCR

수확한 세포주로부터 추출한 total RNA 2 µg을 주형으로 PrimeScript™ RT-PCR Kit (TaKaRa, Japan)를 이용하여 제조사의 메뉴얼에 따라 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 하여 유전자 특이적인 oligonucleotide primer (Table 2)를 이용하여 PCR (Polymerase Chain Reaction) 과정을 수행하였다. PCR 반응은 94℃에서 5분 denaturation시키고, 94℃에서 30초, 58℃에서 30초, 72℃에서 30초의 cycle을 총 30번 반복한 뒤, 마지막으로 72℃에서 10분간 반응시켰다. 최종적인 PCR product는 1.5% agarose gel에서 전기영동 하고 ethi-

Table 1. List of three different kinds of lees extracts and their solvent fractions

NO.	Alcohol beverages	Extracts	Fractions
KSD-E1-3	M-Ju	80 % Ethanol ex.	Ethylacetate fr.
KSD-E2-3	W-Ju	80 % Ethanol ex.	Ethylacetate fr.
KSD-E4-3	B-Ju	80 % Ethanol ex.	Ethylacetate fr.

Table 2. Sequences of oligo-nucleotide primers used for RT-PCR

Gene Name	GenBank Acc. No.	Sequence
<i>GAPDH</i>	NM_002046	F: 5' -CTGACCTGCCGTCTAGAAAA-3' R: 5' -GAGCTTGACAAAGTGGTCGT-3'
<i>NAG-1</i>	NM_004864	F: 5' -CTCTCAGATGCTCCTGGTGT-3' R: 5' -GAATCTTCCCAGCTCTGGTT-3'
<i>ATF3</i>	NM_001040619	F: 5' -TGGTGTITGAGGATTTTGTCT-3' R: 5' -ATTTCTTTCTCGTCGCTCT-3'
<i>DDIT3</i>	NM_004083	F: 5' -CATTCCTTTCTCCTTCGGG-3' R: 5' -TGCTGGTCTGGTCTCCTCT-3'
<i>p21</i>	NM_078467	F: 5' -CGATGGAACCTCGACTTTGT-3' R: 5' -GTCCACATGGTCTTCTCTG-3'
<i>p53</i>	NM_022767	F: 5' -CTCACCATCATCACACTGGA-3' R: 5' -GAGAGGAGCTGGTGTGTGTTG-3'

dium bromide (EtBr, Bioneer, Korea)로 염색하여 Gel Image Analysis System (CoreBio, Korea)을 이용하여 사진 촬영하였다.

통계 분석

모든 실험은 최소한 3회 이상 실험을 실시하였다. $p < 0.05$ 값에서 유의성을 조사하기 위하여 Student's t-test로 평균값을 분석하였다.

결과 및 고찰

85종의 주박 추출물 및 분획물이 세포생존율에 미치는 영향

주박 추출물 및 분획물이 대장암 세포주 HCT116의 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 40종의 1차 추출물 및 분획물을 1 mg/ml의 농도로 처리한 다음 cell viability assay를 수행하였다. 주박 추출물 및 분획물의 대조물질로는 DMSO를 이용하였다. 그 결과 대부분의 추출물 및 분획물에 의해 cell

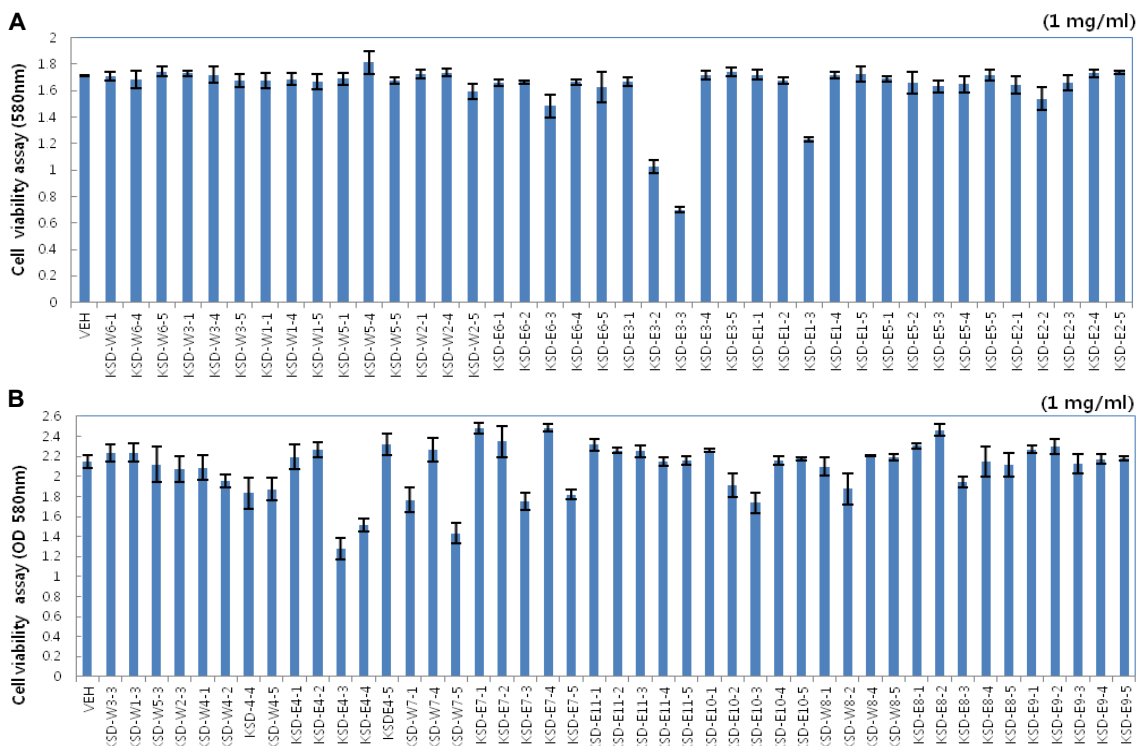


Fig. 1. Effects of eighty-five kinds of lees extracts and their solvent fractions on HCT116 cell viabilities. HCT116 cells were plated at 1×10^3 cells/well in a 96-well plate and treated with eighty-five kinds of solvent fractions of lees extracts (1 mg/ml (A) and 1 mg/ml (B)) for 24 hr. After treatment, cell viability was measured using MTS proliferation assay kit. Bars are mean values \pm SE from 4 independent experiments.

viability 생성이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 KSD-E3-2, KSD-E3-3, 그리고 KSD-E1-3 등의 시료에 의해 생존율이 크게 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1A).

2차 주박 추출물 및 분획물 45종에 의한 세포생존율을 측정하기 위해 1 mg/ml의 농도로 처리한 뒤 동일한 조건으로 cell viability assay를 수행하였다. 그 결과 KSD-E4-3, KSD-E4-4 그리고 KSD-W7-5 등의 분획물에서 세포생존율의 큰 감소를 확인할 수 있었다(Fig. 1B). 본 연구에서는 총 85종의 주박 추출물 및 분획물에 의한 cell viability assay에 결과와 마우스 대식 세포인 RAW264.7 세포주에 대한 세포 사멸결과(data not shown)를 종합하여 최종적으로 3종의 분획물(KSD-E1-3, KSD-E2-3, KSD-E4-3)을 선정하여 추후 실험을 진행하였다 (Table 1).

선별된 3종의 시료의 농도별 처리에 따른 세포생존율 측정

선별된 3종의 주박 추출물 및 분획물(KSD-E1-3, KSD-E2-3, KSD-E4-3)의 농도에 따른 처리가 HCT116 세포 생존율에 미치는 영향을 연구하였다. 연구방법은 HCT116 세포주에 선별된 주박 추출물 및 분획물 3종을 0.25, 0.5, 1 mg/ml의 농도로 24시간 처리한 후, cell viability를 측정하였다. 그 결과 3종의 시료에 의해 농도 의존적으로 cell viability가 감소함을 확인할 수 있었으나, 이 중 KSD-E1-3에 의한 세포 생존율 감소가 가장 크게 일어남을 확인하였다(Fig. 2). KSD-E1-3에 의한 유전체 수준에서의 발현을 확인하기 위하여 oligo DNA microarray 실험을 진행하였다.

실험을 진행하였다.

Oligo DNA microarray를 이용한 유전체 수준에서의 유전자 발현 분석

선별된 3종의 시료 중에서 가장 높은 항성장 활성을 보여준 KSD-E1-3 분획물을 1 mg/ml 농도로 HCT116 세포주에 처리한 후, oligo DNA microarray analysis를 수행하였다. DNA microarray 실험 결과, 2배 이상 발현이 증가되는 유전자 중 항암 유전자 4개(Non-steroid Anti-inflammatory drug-activated gene-1 [*NAG-1*], Activating Transcription Factor 3 [*ATF3*], DNA-damage-inducible Transcript 3 [*DDIT3*], Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A [*CDKN1A*, *p21*])를 선별하였다(Table 2). 세포 생존율 실험 결과에 따라 선별된 3종의 분획물을 1 mg/ml의 농도로 처리한 후, 4가지의 유전자 발현을 확인하였다. 그 결과, *p21* 유전자의 경우 KSD-E1-3에 의해서만 발현이 증가된 반면, *DDIT3*, *ATF3* 그리고 *NAG-1* 유전자는 처리한 모든 분획물에 의해 발현이 유도되었다(Fig. 3). 또한, 처리한 분획물 중 KSD-E1-3에 의해 모든 항암 유전자의 발현이 가장 높게 증가됨을 확인하였다.

NAG-1 유전자는 TGF-β (Transforming Growth Factor-β) superfamily의 한 종류로써, pro-apoptotic 및 anti-tumorigenic의 기능을 가지는 것으로 알려져 있으며, 최근 파이토키미칼과 같은 천연물에 의해 다양한 기작을 통하여 *NAG-1* 유전자의 발현이 조절된다는 총설이 보고된 바 있다[23]. *ATF3*

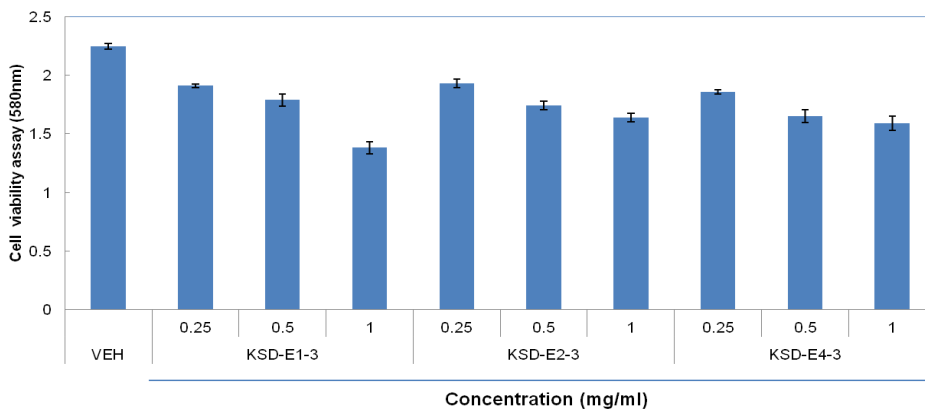


Fig. 2. Effects of three kinds of solvent fractions on human HCT116 cell viabilities. HCT116 cells were plated at 1×10^3 cells/well in a 96-well plate and treated with three kinds of solvent fractions (KSD-E1-3, KSD-E2-3 and KSD-E4-3) of different concentrations (0.25, 0.5, and 1 mg/ml) for 24 hr. After treatment, cell viability was measured using MTS proliferation assay. Bars are mean values \pm SE from 4 independent experiments.

Table 3. Selected up-regulated genes by KSD-E1-3 treatment in HCT116 cells

No.	Gene Name	GenBank Acc. No.	Sequence Description	Fold change
1	<i>DDIT3</i>	NM_004083	DNA-damage-inducible transcript 3	12.98
2	<i>p21</i>	NM_078467	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A	4.43
3	<i>NAG-1</i>	NM_004864	NSAID-activated gene-1	3.94
4	<i>ATF3</i>	NM_001040619	Activating transcription factor3	5.43

유전자는 전사조절인자로서 ATF/cAMP responsive element binding protein (CREB) family에 속하며, 천연물에 의해 발현이 증가되며 세포사멸과 관련이 있는 것으로 보고 되었다[5, 21]. *DDIT3* 유전자는 endoplasmic reticulum stress에 의해 활성화되며 세포사멸과 관련이 있는 것으로 알려져 있다[18]. *p21WAF1/CIP1* 유전자는 대표적인 cyclin-dependent kinase inhibitor 중 하나로서, 세포주기 진행을 억제하는 역할을 수행한다.

KSD-E1-3에 의해 발현이 유도된 유전자의 p53 의존성 검증

암 억제 유전자인 *p53*은 DNA 손상으로 인해 발생할 수

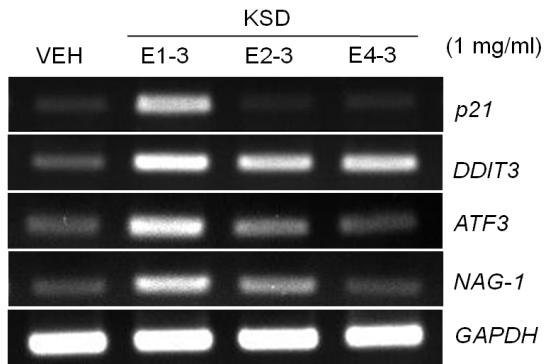


Fig. 3. Up-regulation of *NAG-1*, *ATF3*, *DDIT3* and *p21* gene by three kinds of solvent fractions. HCT116 cells were treated with three kinds of solvent fractions of lees extracts (KSD-E1-3, KSD-E2-3 and KSD-E4-3) for 24 hr. And then, total RNAs were extracted from treated cells and used for RT-PCR with *NAG-1*, *ATF3*, *DDIT3* and *p21* gene specific primers.

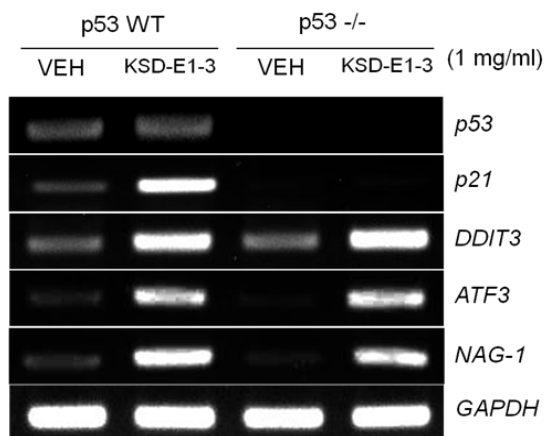


Fig. 4. Effect of p53 on gene expression by KSD-E1-3. HCT116 cells or *p53* null HCT116 were treated with 1 mg/ml KSD-E1-3 for 24 hr and then RT-PCR was performed using *p53*, *p21*, *ATF3*, *DDIT3* and *NAG-1* gene specific primers.

있는 치명적인 영향으로부터 세포를 보호하는 역할 이외에 세포주기의 정지, 노화, apoptosis 등 다양한 역할을 수행하는 전사조절인자이다. 또한, 천연물의 처리에 의해 발현이 증가되며, 암세포 사멸과 직접적 관련성이 있는 것으로 알려져 있다[13]. 본 연구에서는 oligo DNA microarray 실험에 의해 선별된 4개의 유전자 발현이 전사조절인자 *p53*에 의존적인지 확인하고자 *p53* 유전자가 null인 HCT116 세포주를 이용하였다. *p53* wild type HCT116 세포주는 *p53*의 발현이 되는 것을 확인하였고, KSD-E1-3의 처리 유무에 관계없이 *p53* null 세포주에서는 *p53*이 발현되지 않았다. 선별된 4개의 유전자 중 *NAG-1*, *ATF3*, *DDIT3* 유전자는 *p53* 발현 유무에 관계없이 KSD-E1-3에 의해 발현이 증가됨을 확인하였다. 반면, *p21* 유전자의 경우 *p53*에 의해서만 KSD-E1-3에 의해 발현이 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 4).

연구결과를 종합하면 주박 추출물 및 분획물이 여러 항암 유전자 발현을 다양한 경로를 통하여 증가시킴으로써 암세포에 대한 항성장 활성을 나타냄을 증명하였다. 그러나 선별된 KSD-E1-3 분획물의 작용기전을 이해하고, 항성장 활성의 핵심물질을 찾기 위해서는 추가 분획물을 제조하고, 추가적인 기전연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 농림수산식품부 고부가가치식품기술개발사업(과제번호 112073-3)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Sung, B. K. and Aggarwal, B. B. 2008. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res* **25**, 2097-2116.
2. Bae, S. M. 2012. *Traditionalism manufacturing technology*, pp. 107-111, Bae Brewery Res, Seoul, Korea.
3. Bernard, W. S. and Christopher, P. W. 2014. *World Cancer Report 2014*, IARC (International Agency for Research on Cancer), Lyon, France.
4. Cho, C. W., Han, C. J., Rhee, Y. K., Lee, Y. C., Shin, K. S. and Hong, H. D. 2014. Immuno stimulatory effects of polysaccharides isolated from *makgeolli* (Traditional Korean rice wine). *Molecules* **19**, 5266-5277.
5. Cho, K. N., Sukhthankar, M., Lee, S. H., Yoon, J. H. and Baek, S. J. 2007. Green tea catechin (-)-epicatechin gallate induces tumour suppressor protein ATF3 via EGR-1 activation. *Eur J Cancer* **43**, 2404-2412.
6. Cho, S. Y., Park, J. W. and Rhee, C. 1998. Edible films from protein concentration of rice wine meal. *Korean J Food Sci Technol* **30**, 1097-1106.
7. Fletcher, R., Lobb, R. and Bauser, M. 2007. Screening pa-

- tients with a family history of colorectal cancer. *J Gen Intern Med* **22**, 508-513.
8. Gary, A. P., Alanna, L. K., Mary, K., Gerhard, S., Nancy, S., Paul, H. G., Klaus, B., Randall, W. B., David, S. A., Rifat, P. and Dennis, J. A. 1995. Antineoplastic drugs sulinac sulfide and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis. *Cancer Res* **55**, 3110-3116.
 9. Jagveer, S., Rachid, H. and Bandaru, S. R. 1997. Dietary Fat and Colon Cancer : Modulatiog effect of types and amount of dietary fat on *ras-p21* function during promotion and progression stages of colon cancer. *Cancer Res* **57**, 253-258.
 10. Jang, J. H. 1989. History of Korean traditional rice wine. *Korean J Dietary Culture* **4**, 271-274.
 11. Kim, M. J. 2002. The study about traditional *Nuruk*. *J Natural Sci* **9**, 291-310.
 12. Kim, T. Y., Jeon, T. W., Yeo, S. H., Kim, S. B., Kim, J. S. and Kwak, J. S. 2010. Antimicrobial, Antioxidant and SOD-like activity effect of *Jubak* extracts. *Korean J Food Nutr* **23**, 299-305.
 13. Lai, C. Y., Tsai, A. C., Chen, M. C., Chang, L. H., Sun, H. L., Chang, Y. L., Chen, C. C., Teng, C. M. and Pan, S. L. 2012. Aciculatin induces *p53*-dependent apoptosis via MDM2 depletion in human cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One* **7**, e42192.
 14. Lee, C. H. 1993. History of Korean liquor. *Bioindustry News* **6**, 4058-4061.
 15. Lee, S. S., Kim, K. S., Eom, A. H., Sung, C. K. and Hong, I. P. 2002. Production of Korean traditional rice-wines made from culture of the single fungi isolates under laboratory conditions. *Korean J Mycol* **30**, 61-65.
 16. Lewis, J. K. and Addison, W. 2005. *Principles of cancer biology*, pp. 11-30, Benjamin Cummings, San Francisco, USA.
 17. Lukasz, D. and Ewa, M. P. 2014. Lifestyle modifications and colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* **10**, 45-54.
 18. Sano, R. and Reed, J. C. 2013. *ER stress-induced cell death mechanisms*. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 3460-3470.
 19. Shimizu, M., Deguchi, A., Hara, Y., Moriwaki, H. and Weinstein, I. B. 2005. EGCG inhibits activation of the insulin-like growth factor-1 receptor in human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **334**, 947-953.
 20. Shon, S. H., Kim, Y. H. and Bae, S. M. 1990. *Takju* brewing of uncooked rice starch using *Rhizopus koji*. *Korean J Microbiol Biotechnol* **18**, 506-510.
 21. Whitlock, N. C., Bahn, J. H., Lee, S. H., Eling, T. E. and Baek, S. J. 2011. Resveratrol-induced apoptosis is mediated by early growth response-1, Krüppel-like factor 4, and activating transcription factor 3. *Cancer Prev Res (Phila)* **4**, 116-127.
 22. Won, W. J. 2013. *Annual report of cancer statistics in Korea in 2011*, pp. 19-39, Ministry of health & welfare, Seoul, Korea.
 23. Yang, M. H., Kim, J., Khan, I. A., Walker, L. A. and Khan, S. I. 2014. Nonsteroidal anti-inflammatory drug activated gene-1 (*NAG-1*) modulators from natural products as anti-cancer agents. *Life Sci* **100**, 75-84.
 24. Yu, D. S. and Yu, H. Y. 2011. *Traditional Korean Fermenter, Nuruk of Original Form and Excellency*, pp. 17-27, World Science, Seoul, Korea.
 25. Yu, T. S., Kim, H. S., Hong, J., Ha, H. P., Kim, T. Y. and Yoon, I. W. 1996. Bibliographical study on microorganism of *Nuruk* (Until 1945). *J Korean Soc Food Nutr* **25**, 170-179.

초록 : 대장암 세포주에서 주박 추출물의 유기용매 분획물의 항성장 활성

강형택¹ · 이승훈¹ · 김순영¹ · 김미선² · 신우창³ · 손호용² · 김종식^{1*}

(¹국립안동대학교 생명과학과, ²국립안동대학교 식품영양학과, ³㈜국순당 연구소)

본 연구는 한국 고유의 전통주인 막걸리 제조시 생성되는 주박 추출물과 유기용매 분획물을 총 85종 분리하여, 이들의 대장암 세포주에 대한 항성장 활성과 활성기전을 연구하였다. 이들 중 세포생존율 연구결과에 따라 3가지 종류의 분획물(KSD-E1-3, KSD-E2-3, KSD-E4-3)을 선별하였다. 이 중 가장 활성이 높은 KSD-E1-3 분획물에 의한 유전체 수준에서의 유전자 발현변화를 확인하기 위하여 oligo DNA microarray 실험을 수행하였다. 그 결과, 2배 이상 발현이 증가된 유전자들 가운데 항암 유전자인 *NAG-1*, *ATF3*, *DDIT3* 그리고 *p21*을 선별하여 추가 실험을 진행하였다. 세포생존율 결과에 따라 선별된 3가지 종류의 분획물(KSD-E1-3, KSD-E2-3 그리고 KSD-E4-3)에 의한 4가지 종류의 유전자의 발현을 확인한 결과, KSD-E1-3에 의하여 모든 유전자의 발현이 높게 증가되었다. KSD-E1-3에 의한 유전자의 발현이 전사조절인자 *p53*에 의존적인지 확인하고자 *p53* null HCT116 세포주를 이용하여 RT-PCR한 결과, *NAG-1*, *ATF3*, 그리고 *DDIT3* 유전자 *p53*에 비의존적이었으며, 반면 *p21* 유전자는 *p53*에 의해서만 발현이 증가되는 것을 확인하였다. 이러한 연구 결과는 주박 추출물이 다양한 기작에 의해 항암 유전자의 발현을 유도함으로써 암 세포에 대한 항성장 활성을 보여주고 있음을 나타낸다.