

## Apoptotic Effect of *Sasa quelpaertensis* Nakai in Human Colon Cancer HT-29 Cells

Ji Hee Byun<sup>1</sup> and Min Young Kim<sup>1,2\*</sup>

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

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

Received June 14, 2014 / Revised July 27, 2014 / Accepted July 28, 2014

*Sasa quelpaertensis* Nakai (Korean name, Jeju-Joritdae) is one of the most abundant plants on Mt. Halla, Jeju Island, and it has long been used in traditional medicines. Recent studies have reported it as possessing various beneficial functions, including anti-inflammatory, anti-diabetic, anti-hypertension, anti-gastritis, anti-oxidant, and anti-cancer effects. However, the molecular mechanisms of its anti-cancer activity have not been clearly elucidated. In this study, we investigated the anti-cancer effects and mechanism of *S. quelpaertensis* on human colon cancer HT-29 cells. Cell growth inhibition by *S. quelpaertensis* was determined by MTT assay. Apoptosis was performed by DNA fragmentation, flow cytometry with propidium iodide staining (PI), and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) to confirm the anti-apoptotic factors, such as inhibitor of apoptosis (IAP) family members. NO<sup>•</sup> production was determined by Griess assay. *S. quelpaertensis* treatment resulted in the time- and dose-dependent inhibition of the cell viability of HT-29 cells by inducing apoptosis, as evidenced by the accumulation of the sub-G1 cell population stained by PI, as well as the ladder-like DNA fragmentation in a dose-dependent manner. *S. quelpaertensis*-inducing apoptosis was accompanied by the induction of S cell cycle arrests, increasing NO<sup>•</sup> concentrations, and the down-regulation of IAPs, including X-chromosome-linked IAP (XIAP), cellular IAP-1 (cIAP-1), cIAP-2, and survivin. Taken together, these findings have important implications for future clinical developments of *S. quelpaertensis* in colon cancer treatment.

**Key words** : Apoptosis, HT-29 cells, IAP family, nitric oxide, *Sasa quelpaertensis* Nakai

### 서론

한라산에만 자생하는 ‘벼과 대나무아과’의 제주조릿대 (*Sasa quelpaertensis* Nakai)는 생장이 빠르고 번식력이 강해 다른 식물을 고사시키고 광범위한 면적에 대규모로 자생하고 있는 식물로서 종 다양성 감소 등 생태계 파괴와 환경문제를 유발하고 있지만, p-coumaric acid, alkene glycoside, polysaccharide, tricin, flavonoid, polyphenol 등의 다양한 물질들이 함유되어 예로부터 당뇨병, 고혈압, 위염, 만성간염, 암에 효능이 있다고 알려져 왔다[1, 12, 13, 15, 26, 38]. 최근 연구에서도 제주조릿대 잎의 열수 추출물이 AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway를 활성화시켜 고칼로리식단으로 인한 비만을 제어하는 물론 멜라닌 합성을 억제하여 미백효과를 가진다는 결과가 보고되는 등의 다양한 연구가 이루어지

고 있다[1, 15, 39].

암은 우리나라에서 가장 높은 사망 원인으로 알려져 있으며 특히 대장암인 경우 전 세계적으로 발병률이 높은 암 중 하나로서 유전적인 요인뿐만 아니라 식습관에 의한 환경적인 요인에도 발병되는 경우가 많은데 국내에서도 서구화된 식습관으로 인해 발병률이 증가하고 있다[21, 29, 37]. 대장암 치료에는 암 절제를 위한 외과적 수술, 방사선 치료, 화학요법 등이 사용되고 있으나 대장암에 대한 생존율은 약 50% 밖에 되지 않고, 항암제인 경우 암세포에 대한 선택성이 낮아 정상 세포에서도 사멸을 유도함으로써 심각한 부작용이 문제가 되고 있다[22, 31]. 따라서 최근에는 항암 치료에 대한 부작용을 최소화할 수 있는 천연생리활성물질을 사용하여 세포 내의 신호전달 물질의 조절과 암세포의 사멸 유도에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다[21, 22, 31].

산화질소(nitric oxide, NO<sup>•</sup>)는 체내에서 다양한 기능을 하며 산화질소 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)가 L-arginine을 산화시켜 생성한 물질로 발생된 NO<sup>•</sup>의 농도나 노출 시간 혹은 NO<sup>•</sup>가 생성될 시 사용한 NOS의 종류 등에 따라 세포에 작용하는 역할이 달라져, 암 세포의 발생이나 사멸 유도와 같은 작용들을 유발 하기도 한다[5, 19, 25]. NOS 중에서 inducible NOS (iNOS)로 인해 NO<sup>•</sup>를 과다 생성하게 될 경우 염증을 유발하거나 염증을 악화시켜 폐, 대장, 구강 등에 종양

#### \*Corresponding author

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

E-mail : jeffmkim@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.

이 발생되기도 하지만 대체로 낮은 농도의 NO<sup>·</sup>인 경우에는 혈관수축이완, 혈소판 응집 억제 및 신경전달과 같은 항상성 조절에 주로 관여함으로써 세포를 보호하여 세포사멸을 억제시키고, 고농도의 NO<sup>·</sup>인 경우엔 superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)과 결합하여 세포독성이 강한 물질을 만들어 종양에 대한 세포사멸을 유도한다고 알려져 있으며, 이외에도 세포주기의 억제나 암 억제 인자인 p53발현의 증가, anti-apoptotic factors의 조절 등에 관여함으로써 apoptosis를 유도하기 때문에 최근 항암 치료의 표적이 되고 있다[6, 19, 23, 33].

Inhibitor of apoptosis (IAP) family는 apoptosis를 억제하는 인자 중 하나로서, apoptosis를 유도하는 caspase와 결합함으로써 그 활성을 억제시키고 세포사멸을 방해한다. IAP family의 구성원으로는 survivin, X-chromosome linked IAP (XIAP), cellular IAP-1 (cIAP-1) 및 cIAP-2 등이 존재하고 있으며, nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B), mitogen-activated protein kinase (MAPK), TNF receptor associated factor (TRAF) 등의 신호 전달에 의해 IAP family의 발현을 조절한다[3, 7]. IAP 인자 중 survivin는 caspase-3과-7의 활성을 억제하고 암세포에선 과발현되어 폐암, 대장암, 유방암 등에서 쉽게 확인할 수 있고 세포분열에 관여함으로써 주로 세포주기의 G2/M기에서 발현된다고 알려져 있다[8, 29]. caspase-3, -7 및 -9와 높은 결합력을 가진 XIAP는 대장암을 포함한 많은 암세포에서 높은 발현율을 보이고[3, 32], 또한 주로 핵 안에 존재하는cIAP-1과 cIAP-2는 TRAF과 NF- $\kappa$ B 등이 pro-survival 활성으로 발현이 유도되어 caspase-3과 -7과 결합하여 apoptosis를 억제하는 것으로 알려져 있다[10]. 그러므로 최근에는 IAP family 발현의 억제를 통해 apoptosis를 유도시켜 암을 제어하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다[8, 11, 29].

제주조릿대는 다양한 생리활성을 가져 의약품 소재, 기능성 식품 원료 등 고효율 자원화 가능성이 높은 것으로 알려져 있으나, 대장암에 대한 항암효과 및 분자생물학적 기전에 대한 구체적인 연구는 미흡한 실정이다[12, 13, 15, 17, 39]. 따라서 본 연구에서는 제주조릿대에 의한 인간대장암HT-29 세포 증식 억제 및 apoptosis유발 여부를 확인하고, 유발된 apoptosis가 NO<sup>·</sup> 발생과 IAP family의 발현 변화에 어떤 연관성을 가지고 있는지 조사함으로써 제주조릿대의 자원화 방안과 부작용이 적고 우수한 천연 항암 소재로서 개발 가능성을 검토하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시료 준비

본 실험에 사용하는 제주조릿대는 2012년 한라산에서 채집하여 60°C에서 24시간 동안 건조시킨 후 잘게 분쇄하였다. 분쇄한 제주조릿대를 각각 95°C의 물과 80°C의 70% 에탄올에

서 6시간 동안 3회 반복 추출하여 여과 및 농축 후 동결 건조하여 -20°C에 보관하였다. 실험 시에는 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해시켜 적정 농도로 배지에 희석하여 사용하였다.

### 세포 배양

본 실험에 사용한 인간 대장암 HT-29 세포는 Massachusetts Institute of Technology (MIT)의 G. N. Wogan 박사님 (Cambridge, MA, USA)으로부터 분양 받았으며, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) 및 100 units/ml penicillin-streptomycin 및 L-glutamine을 첨가한 McCoy's 5A 배지를 사용하여 37°C 습윤한 CO<sub>2</sub> incubator (5% CO<sub>2</sub>, 95% air)에서 배양하였다. 세포가 배양용기의 80%정도 증식 시 적정수의 세포를 유지하기 위해 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 세포를 세척한 후 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 재배양하였다.

### MTT assay에 의한 세포 독성 측정

96 well plate에 HT-29 세포를 5×10<sup>4</sup> cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후 제주조릿대 추출물을 농도별·시간별로 처리하였다. 처리가 끝난 각 well 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, 5 mg/ml) 용액을 첨가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시켰고 100  $\mu$ l의 solubilization solution을 처리하여 생성된formazan을 모두 녹인 후 microplate reader (Spectra MR, Dynex, VA, USA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다[4].

### Flow cytometry를 이용한 세포주기 측정

제주조릿대 추출물을 72시간 동안 농도별로 처리한HT-29 세포를 모아 PBS로 충분히 세척한 후 70% 에탄올로 4°C에서 24시간 동안 고정시켰다. 고정된 세포는 1,000 rpm에 10분 동안 원심 분리하여 모은 다음, PBS (1% FBS)로 세척하고 propidium iodide (PI, 500  $\mu$ g/ml)와 10  $\mu$ g/ml의 RNase (Amresco)가 포함된 PBS (1% FBS)에 넣어 37°C에서 30분간 반응시켰다. 그 후 BD FACS caliber™ flow cytometry (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용하여 세포주기를 분석하였다[4].

### DNA fragmentation 분석

세포에 제주조릿대 추출물을 농도별로 처리하여 72시간 동안 배양한 후 세포를 수집하고 genalute™ mammalian genomic DNA miniprep kit (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용해 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA를 1.8% agarose gel에서 80-90분(50 V)동안 전기영동을 한 다음 ethidium bromide (EtBr)로 염색하고 UV transilluminator 하에서 DNA fragmentation 현상을 관찰하였다.

**NO<sup>·</sup> 발생량 측정**

HT-29 세포로부터 발생된 NO<sup>·</sup>의 농도는 세포 배양액에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>를 인지하는 Griess reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 분석하였다. 이를 위하여 HT-29 세포에 제주조릿대 추출물을 농도별로 72시간 동안 처리한 후 100 µl씩의 배양액을 취하여 동량의 Griess reagent를 첨가한 뒤 이를 10분간 실온에서 반응시켰다. 그 다음 microplate reader를 통해 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며, NO<sup>·</sup>의 발생 농도는 NaNO<sub>2</sub> 표준용액을 사용하여 구한 검량선에 의해 정량하였다[4].

**Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의한 mRNA 발현의 분석**

제주조릿대 추출물을 72시간 동안 농도별로 처리한 HT-29 세포를 수집하고 TRI reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리한 RNA 1 µg과 각각의 primer 및 one-step RT-PCR kit (Enzynomics, Daejeon, Korea)를 혼합한 후 유전자증폭기(Genepro, Bioer Tech, Hangzhou, China)를 이용하여 증폭시켰다. PCR에 사용된 primer는 kim 등[15]의 논문에서 사용한 β-actin, survivin, XIAP와 함께 cIAP-1(sense : 5' -AAGTTCCTACCCCTGTC-CAATG-3', antisense : 5' -CAAGTAGATGAGGGTAACTGGC-3') 및 cIAP-2 (sense : 5' - CCTGTGGTTAAATCTG-CCTTG -3', antisense : 5' - CAATTCGGCACCATAACTCTG-3')의 nucleotides를 합성하여 사용하였다. 그리고 각 PCR산물의 양적 차이를 확인하기 위해 1× TBE buffer로 ethidium bromide (EtBr)이 함유된 1.5% agarose gel을 만들어 80-90분 동안 50 V로 전기영동 시킨 후 UV trans-illuminator를 통해 발현 차이를 확인하였다.

**통계처리**

모든 실험결과는 평균값±표준편차로 나타냈으며 통계분석은SPSS 18.0 (PASW Statistics 18; IMB Co., Armonk, NY, USA)을 이용하여 Student's *t*-test에 의해 *p*<0.05인 경우 유의한 것으로 판정하였다.

**결과 및 고찰**

**제주조릿대에 의한 HT-29 세포의 증식 억제 효과**

제주조릿대가 HT-29 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 통해 생존율을 측정하였다. 우선 더 효과적인 추출법을 선별하기 위해 서로 다른 용매를 사용한 제주조릿대를 비교한 결과, 본 실험실에서 Kim 등[17]이 진행한 선행 연구를 통해 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 total phenolics과 total flavonoids의 함량이 더 많고 뛰어난 항암·항산화 작용을 가짐으로써 인간 대장암 세포의 증식을 더 효과적으로 억제시켰다는 것을 알 수 있었으며(Fig. 1A), 본 연구에서는 에탄올 추출물을 사용하였다. 제주조릿대의 처리시간 및 농도에 따라 HT-29 세포의 생존율이 유의적으로 감소하여 50, 100, 200 µg/ml의 농도로 72시간 동안 처리하였을 때 63.8%, 54.9%, 30.4%의 생존율을 보였다(Fig. 1B). 뛰어난 항산화 활성을 가진 제주조릿대는[17] caspase-3과 -9의 활성을 증가시키고 PARP의 발현을 저해하여 혈구암 HL-60세포의 증식을 억제한다는 연구 보고가 있으며[13], 또한 같은 조릿대 속에 속하는 문수조릿대(*Sasa borealis*), 금대조릿대(*Sasa senanensis*) 및 섬조릿대(*Sasa kurilensis*)에 존재하는 polysaccharide, lignin, flavonoids등에 의해 뛰어난 항산화 작용을 가질 뿐만 아니라 암을 제어한다는 연구 결과가 있었다[9, 30, 34, 36]. 따라서 본 연구에서도 제주조릿대에 함유되어 있는 다양한 생리활성물질 및 항산화 활성이 대장암 HT-29 세

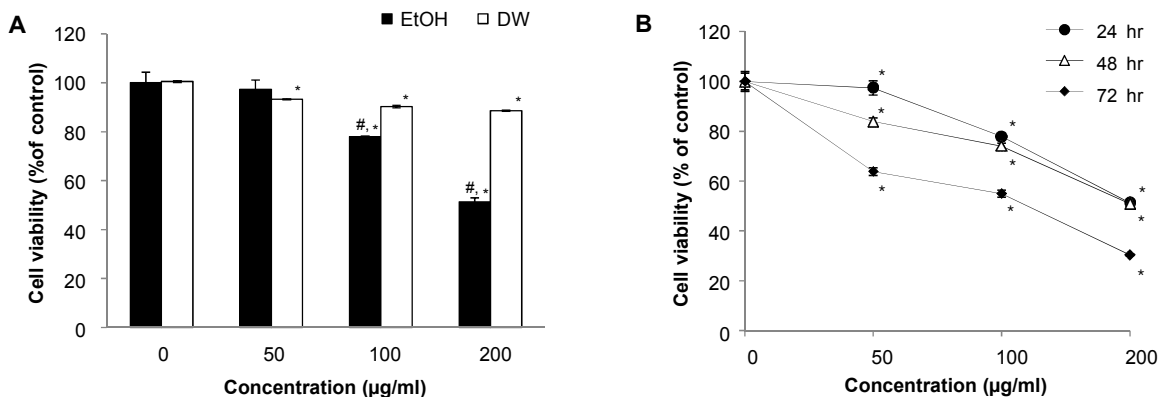


Fig. 1. Inhibition of cell viability by *Sasa queipaertensis* Nakai bamboo leaves in HT-29 cells. Cell viability was determined by MTT assay after treatment with 0, 50, 100 and 200 µg/ml of water extract or ethanol extract for 24 hr in human colon cancer cells [15] (A), MTT assay after treatment with same ethanol extract concentrations for 24, 48 and 72 hr in HT-29 cells (B). Each point is the mean ± SD of three experiments. \**p*<0.05 compared to vehicle (DMSO) control and #*p*<0.05 compared to water extract by Student's *t*-test.

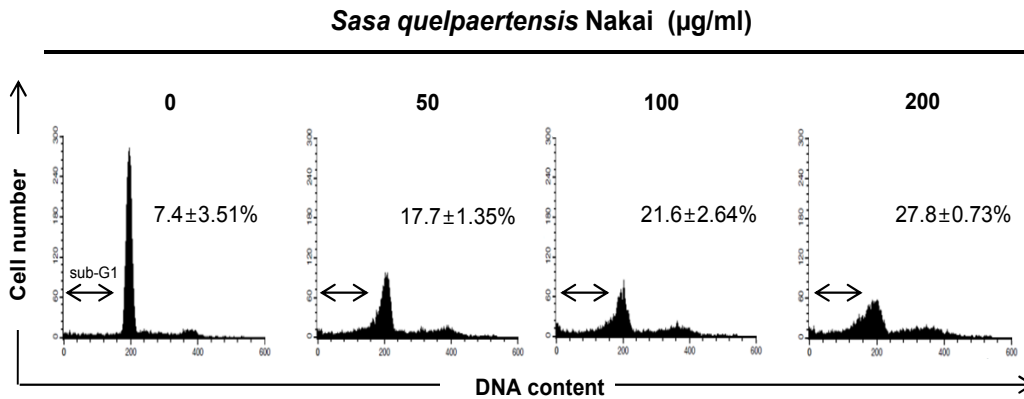


Fig. 2. Effects of *Sasa quelpaertensis* Nakai bamboo leaves on cell cycle distribution HT-29 cells. Cells were treated with 0, 50, 100 and 200 µg/ml of *Sasa quelpaertensis* for 72 hr, stained with PI, and analyzed for sub-G1 and cell cycle using flow cytometry. Representative flow cytometry patterns are shown. Apoptotic nuclei were identified as a sub-ploid DNA peak and distinguished from cell debris on the basis of forward light scatter and PI fluorescence.

Table 1. *Sasa quelpaertensis* Nakai bamboo leaves on cell cycle distribution HT-29 cells

<i>Sasa quelpaertensis</i> Nakai (µg/ml)	% of cell		
	G0/G1	S	G2/M
0	79.1±3.51	7.1±0.12	5.4±0.11
50	57.7±0.06*	9.5±0.06*	15.5±1.25*
100	52.5±3.36*	10.1±0.14*	16.4±0.71*
200	45.3±1.72*	12.3±1.08*	15.24±0.07*

포에 영향을 미쳐 세포 증식을 억제한 것으로 생각된다.

**제주조릿대에 의한 apoptosis 유발**

세포주기는 세포의 분열 및 증식을 하기 위한 일련의 과정으로 세포에 문제가 생길 시 각 단계의 checkpoint에서 cyclin dependent kinase (CDKs)의 활성을 조절하여 세포 내 손상된 DNA를 복구하거나 apoptosis를 유도한다. 하지만 암세포인 경우 세포주기가 제대로 진행되지 않아 계속 증식만 하게 된다고 알려져 있어, 최근 세포주기를 조절함으로써 암세포 사멸을 유도시키는 연구가 진행되고 있다[14, 35]. 따라서 제주조릿대에 의한 세포 증식 억제 효과가 apoptosis와 연관이 있는지 확인하기 위하여 HT-29 세포에 72시간 동안 농도별로 처리한 후 flow cytometry를 통해 세포주기를 분석하였다. 그 결과 G0/G1기는 대조군일 때 79.1%였던 세포빈도가 농도 의존적으로 감소하여 최고 농도인 200 µg/ml에선 약 45.3%를 보였지만(Table 1), 상대적으로 S기와 apoptosis를 나타내는 sub-G1기인 경우 7.1%와 7.4%에서 200 µg/ml의 제주조릿대를 처리하였을 때 12.3%와 27.8%로 세포빈도가 증가한 것을 확인할 수 있었다(Table 1, Fig. 2). 이는 제주조릿대에 의한 apoptosis 유발이 HT-29 세포의 S arrest 현상을 동반했음을 시사하였으며, 이러한 결과는 천연물을 처리함으로써 S arrest현상이 유도되어 인체 전립선 암세포와 대장암 세포의 증

식을 억제했다는 연구 결과[28, 41]와 Li 등[24]에서 천연물의 polysaccharide에 의해 S arrest현상과 함께 간암 HepG2 세포의 apoptosis를 유도했다는 보고와도 부합된다.

Apoptosis의 또 다른 증거가 되는 DNA fragmentation은 세포사멸이 유도되었을 때 endonuclease에 의해 DNA가 180-200 bp의 길이로 분해되어 발생하는 것으로 알려져 있다 [20, 27]. 따라서 상기와 동일한 조건하에 처리된 HT-29 세포의 DNA를 추출한 후 전기영동을 하여 DNA laddering현상을 관찰하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 제주조릿대의 처리 농

***Sasa quelpaertensis* Nakai (µg/ml)**

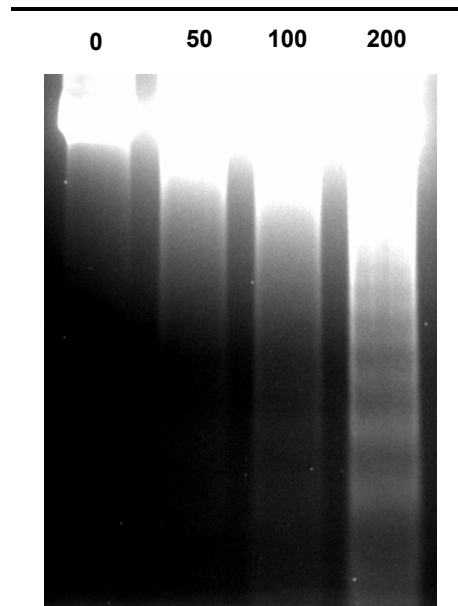


Fig. 3. Apoptosis was determined by internucleosomal DNA fragmentation. HT-29 cells were treated with 0, 50, 100 and 200 µg/ml of *Sasa quelpaertensis* for 72 hr and DNA was extracted, eletrophoresed in a 1.8% agarose gel.

도가 증가함에 따라 DNA laddering 현상이 증가하여 apoptosis가 유도되었음을 알 수 있었다. 즉, 제주조릿대에 의한 세포 증식 억제 효과는 apoptosis와 밀접한 연관성이 있음을 확인하였고 유발된 apoptosis는 HT-29 세포의 S arrest 현상을 동반하였음을 알 수 있었다.

**NO<sup>·</sup> 발생에 미치는 제주조릿대의 영향**

NO<sup>·</sup>는 특정 조건에 따라 암 발생과 제어에 중요한 역할을 하는 인자로 알려져 있으며, 일반적으로 세포 내에 발생하는 고농도의 NO<sup>·</sup>를 조절함으로써 종양에 대한 세포독성 및 세포사멸에 관련된 인자들을 조절하여 apoptosis를 유도했다는 보고가 있다[5, 23, 25, 40]. 이에 본 실험에서는 제주조릿대 추출물 처리에 의한 HT-29 세포의 apoptosis 유발이 NO<sup>·</sup> 발생에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 배지 내 발생된 NO<sup>·</sup>를 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 그 결과 Fig. 4에서 나타난 바와 같이 대조군에선 8.0 pmoles/10<sup>8</sup> cells의 NO<sup>·</sup>가 발생했지만 처리 농도가 증가함에 따라 NO<sup>·</sup> 발생량이 유의적으로 증가하여 최고 농도인 200 µg/ml의 추출물을 처리하였을 때 31.3 pmoles/10<sup>8</sup> cells로 약 4배 가량 더 많이 발생하였음을 알 수 있었다. 이에 제주조릿대에 의해 발생된 고농도의 NO<sup>·</sup>는 HT-29 세포에 대해 세포독성을 가진다고 생각되며 apoptosis 유발에 연관성이 있음을 알 수 있었다.

**IAP family mRNA 발현에 미치는 제주조릿대의 영향**

IAP family 인자들은 apoptosis 유발에 중요한 역할을 하는 caspase와 직·간접적인 결합함으로써 caspase의 활성을 억제하여 apoptosis 유발을 억제하는 것으로 알려져 있다[3, 7]. 이에 IAP family의 구성원인 survivin, XIAP, cIAP-1 및 cIAP-2가 제주조릿대에 의한 apoptosis에 어떠한 영향을 미

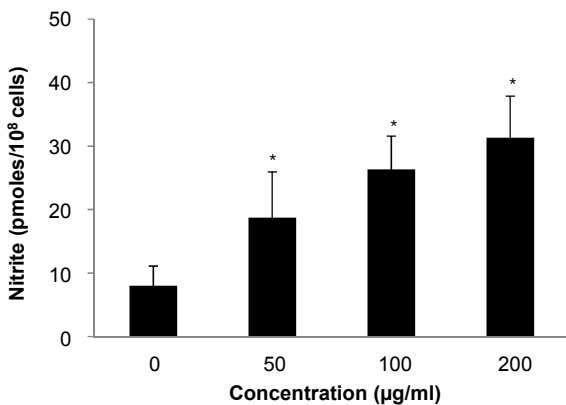


Fig. 4. Effects of *Sasa quepaertensis Nakai* bamboo leaves on cellular nitrite level in HT-29 cells. Cells were treated with 0, 50, 100 and 200 µg/ml of *Sasa quepaertensis Nakai* bamboo leaves for 72 hr. Each point is the mean ± SD of three experiments. \**p*<0.05 compared to vehicle (DMSO) control by Student's *t*-test.

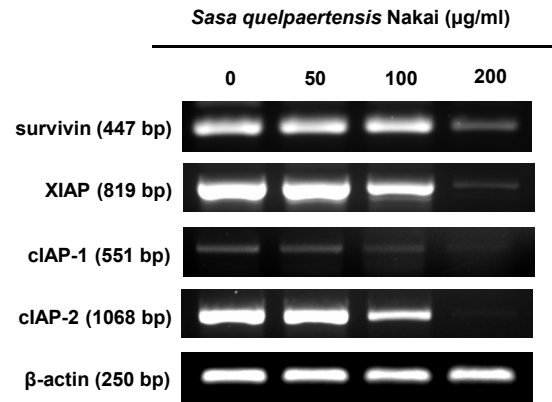


Fig. 5. Expression levels of survivin, XIAP, cIAP-1 and cIAP-2 mRNAs in HT-29 cells treated with 0, 50, 100 and 200 µg/ml of *Sasa quepaertensis Nakai* for 72 hr. Semi-quantitative PCR was performed using primer specific to survivin, XIAP, cIAP-1 and cIAP-2 or a actin control on 1 µg total RNA prepared.

치는지 mRNA 수준에서 확인하였다. 그 결과 Fig. 5에 나타난 바와 같이 농도별로 72시간 동안 처리하였을 때, 암세포에서 흔히 발견할 수 있는 survivin과 XIAP의 발현[29]뿐만 아니라 cIAP-1 및 cIAP-2의 발현도 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. Hsu 등[11]과 Park 등[28]은 survivin의 발현을 조절함으로써 대장암 세포의 사멸을 유도했다는 보고가 있으며, 이외에도 XIAP, cIAP-1, cIAP-2 등의 IAP family를 조절함으로써 암세포의 사멸을 유도한다는 연구 결과가 있었다[2, 10, 32]. 따라서 caspase의 활성을 억제하는 IAP family 발현이 전사수준에서 모두 농도 의존적으로 억제되어 제주조릿대에 의한 apoptosis 유도에 중요한 역할을 한 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합해 보면 제주조릿대에 의한 인간 대장암 HT-29 세포의 증식 억제가 apoptosis 유도에 의한 것임을 알 수 있었고 flow cytometry 분석을 통해 세포주기의 S기와 apoptosis가 유도된 sub-G1기의 세포빈도가 증가하는 것을 확인함으로써 S arrest 현상에 의해 HT-29 세포의 사멸이 유도되었음을 알 수 있었다. 또한 이러한 apoptosis는 NO<sup>·</sup>의 생성과 IAP family 발현의 억제가 동반되었음을 확인할 수 있어, 이를 입증하기 위해서는 더 구체적인 연구가 지속될 필요가 있을 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 quelpaertensis* Nakai, inhibits cellular melanogenesis stimulated by alpha-melanocyte stimulating hormone. *Br J Dermatol* **159**, 292-299.
- Asselin, E., Mills, G. B. and Tsang, B. K. 2014. XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res* **61**, 1862-1868
- Beug, S. T., Cheung, H. H., LaCasse, E. C. and Korneluk, R. G. 2012. Modulation of immune signalling by inhibitors of apoptosis. *Trends Immunol* **33**, 535-545.
- Byun, J. H. and Kim, M. Y. 2012. Inhibition of endogenous nitric oxide promotes p53-dependent apoptosis induced by cisplatin in human colon cancer cells. *Life Sci J* **9**, 2341-2346.
- Choi, B. M., Pae, H. O., Jang, S. I., Kim, Y. M. and Chung, H. T. 2002. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *J Biochem Mol Biol* **35**, 116-126.
- Choi, Y. H. 2012. Induction of apoptosis and inhibition of NO production by piceatannol in human lung cancer A549 cells. *J Life Sci* **22**, 815-822.
- Deveraux, Q. L. and Reed, J. C. 1999. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev* **13**, 239-252.
- Guha, M., Plescia, J., Leav, I., Li, J., Languino, L. R. and Altieri, D. C. 2009. Endogenous tumor suppression mediated by PTEN involves survivin gene silencing. *Cancer Res* **69**, 4954-4958.
- Hasegawa, T., Tanaka, A., Hosoda, A., Takano, F. and Ohta, T. 2008. Antioxidant C-glycosyl flavones from the leaves of *Sasa kurilensis* var. *gigantea*. *Phytochemistry* **69**, 1419-1424.
- Hirano, F., Haneda, M. and Makino, I. 2006. Chenodeoxycholic acid and taurochenodeoxycholic acid induce anti-apoptotic cIAP-1 expression in human hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol* **21**, 1807-1813.
- Hus, Y. F., Sheu, J. R., Lin, C. H., Yang, D. S., Hsiap, G., Ou, G., Chiu, P. T., Huang, Y. H., Kuo, W. H. and Hsu, M. J. 2012. Trichostatin A and sirtinol suppressed survivin expression through AMPK and p38MAPK in HT-29 colon cancer cells. *Biochim Biophys Acta* **1820**, 104-115.
- 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 quelpaertensis* leaves. *Food Sci Biotechnol* **16**, 728-733.
- Jang, M. G., Park, S. Y., Lee, S. R., Choi, S. Y., Hwang, J. H., Ko, H. C., Park, J. G., Chung, W. S. and Kim, S. J. 2008. *Sasa quelpaertensis* leaf extracts induce apoptosis in human leukemia HL-60 cells. *Food Sci Biotechnol* **17**, 188-190.
- Jin, S. J., Yun, S. G., Oh, Y. N., Lee, J. Y., Park, H. J., Jin, K. S., Kwon, H. J. and Kim, B. W. 2013. Induction of G2/M arrest and apoptosis by the methanol extract of *Typha orientalis* in human colon adenocarcinoma HT29 cells. *Korean J Microbiol Biotechnol* **41**, 425-432.
- Kang, S. I., Shin, H. S., Kim, H. M., Hong, Y. S., Yoon, S. A., Kang, S. W., Kim, J. H., Ko, H. C. and Kim, S. J. 2012. Anti-obesity properties of a *Sasa quelpaertensis* extract in high-fat diet-induced obese mice. *Biosci Biotechnol Biochem* **76**, 755-761.
- Kim, J. H. and Kim, M. Y. 2014. Immature citrus fruit extracts enhance the apoptosis inducing potential of cisplatin in human malignant melanoma A375 cells via regulation of nitric oxide and inhibitor of apoptosis family (IAP). *J Life Sci* **24**, 454-460.
- Kim, J. Y., Kim, J. H., Byun, J. H., Kim, J. H., Lee, Y. J., Im, S. J., Lee, D. S., Moon, S. H. and Kim, M. Y. 2013. Antioxidant and anticancer activities of water and ethanol extracts obtained from *Sasa quelpaertensis* Nakai. *Life Sci J* **10**, 1250-1254.
- Kim, K. H., Roh, S. G., Park, H. and Choi, W. C. 2009. Inhibition of apoptosis by nitric oxide in MCF-7 cells. *J Life Sci* **19**, 157-162.
- Kim, P. K., Zamora, R., Petrosko, P. and Billiar, T. R. 2001. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *Int Immunopharmacol* **1**, 1421-1441.
- Kim, S. Y., Lee, Y. J., Park, E. H., Yi, H. K., Jo, D. S., Kim, J. S. and Hwang, P. H. 2008. Capsaicin induced apoptosis and the enhanced anticancer effect of anticancer drugs in cancer cells. *Korean J Pediatr* **51**, 307-314.
- Labianca, R., Beretta, G. D., Kildani, B., Milesi, L., Merlin, F., Mosconi, S., Pessi, M. A., Prochilo, T., Quadri, A., Gatta, G., Braud, F. and Wils, J. 2010. Colon cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **72**, 106-133.
- Lee, J. H., Jung, S. J. and Park, Y. K. 2007. Effects of *Euphorbiae lathyridis* semen on cell apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *Korean J Herbol* **22**, 65-72.
- Li, C. and Wogan, G. N. 2005. Nitric oxide as a modulator of apoptosis. *Cancer Lett* **226**, 1-15.
- Li, Y. G., Ji, D. F., Zhong, S., Liu, P. G., Lv, Z. Q., Zhu, J. X., Chen, J. E. and Chen, H. P. 2013. Polysaccharids from *Phellinus linteus* induces S-phase arrest in HepG2 cells by decreasing calreticulin expression and activating the P27Kip1-cyclin A/D1/E-CDK2 pathway. *J Ethnopharmacol* **150**, 187-195.
- Liu, Q., Chan, S. T. and Mahendran, R. 2003. Nitric oxide induces cyclooxygenase expression and inhibits cell growth in colon cancer cell lines. *Carcinogenesis* **24**, 637-642.
- Moon, J. Y., Yang, E. J., Kim, S. S., Kang, J. Y., Kim, G. O., Lee, N. H. and Hyun, C. G. 2011. *Sasa quelpaertensis* phenylpropanoid derivative suppresses lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 expressions in RAW 264.7 cells. *Yakugaku Zasshi* **131**, 961-967.
- Okada, H. and Mak, T. W. 2004. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* **4**, 592-603.
- Park, C., Lee, W. H., Choi, B. T., Kim, K. C., Lee, Y. T. and Choi, Y. H. 2003. Induction of S phase arrest of the cell cycle by Oak smoke flavoring (Holyessing) in human prostate carcinoma cells. *Korean J Ori Physiol Pathol* **17**, 1309-1314
- Park, D. G. 2009. The Changes of expression of survivin by butyrate in HCT116 colon cancer cells. *J Korean Surg Soc* **77**, 297-305.

30. Park, H. S., Lim, J. H., Kim, H. J., Chio, H. J. and Lee, I. S. 2007. Antioxidant flavone glycosides from the leaves of *Sasa borealis*. *Arch Pharm Res* **30**, 161-166.
31. Park, S. Y., Lee, S. H., Park, O. J. and Kim, Y. M. 2011. Apoptotic effects of curcumin and EGCG via Akt-p53 signaling pathway in HCT116 colon cancer cells. *J Life Sci* **21**, 89-95.
32. Qiao, L., Li, G. H. Y., Dai, Y., Wang, J., Li, Z., Zou, B., Gu, Q., Ma, J., Pang, R., Lan, H. Y. and Wong, B. C. Y. 2009. Gene expression profile in colon cancer cells with respect to XIAP expression status. *Int J Colorectal Dis* **24**, 245-260.
33. Rao, C. V. 2004. Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. *Mutat Res* **555**, 107-119.
34. Ren, M. and Reilly, R. T. 2004. *Sasa* health exerts a protective effect on Her2/ Neun mammary tumorigenesis. *Anticancer Res* **24**, 2879-2884.
35. Rezaei, P. F., Fouladdel, S., Hassani, S., Yousefbeyk, F., Ghaffari, S. M., Amin, G. and Azizi, E. 2012. Induction of apoptosis and cell cycle arrest by pericarp polyphenol-rich extract of *Banah* in human colon carcinoma HT29 cells. *Food Chem Toxicol* **50**, 1054-1059.
36. Seki, T., Kida, K. and Maeda, H. 2010. Immuno stimulation mediated anti-tumor activity of bamboo (*Sasa senanensis*) leaf extracts obtained under vigorous condition. *Evid Based Complement Alternat Med* **7**, 447-457.
37. Siegel, R., Ma, J., Zou, Z. and Jemal, A. 2014. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **64**, 9-29.
38. Sultana, N. and Lee, N. H. 2010. A new alkene glycoside from the leaves of *Sasa quelpaertensis* Nakai. *Bull Korean Chem Soc* **31**, 1088-1090.
39. Yoon, H. S., Kim, J. K. and Kim, S. J. 2007. Inhibitory effect on the melanin synthesis in B16/F10 mouse melanoma cells by *Sasa quelpaertensis* leaf extract. *J Life Sci* **17**, 873-875.
40. Xu, W., Liu, L. Z., Loizidou, M., Ahmed, M. and Charles, I. G. 2002. The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res* **12**, 311-320.
41. Zhong, S., Ji, D. F., Li, Y. G., Lin, T. B., Lv, Z. Q. and Chen, H. P. 2013. Activation of P27Kip1-cyclin D1/E-CDK2 pathway by polysaccharide from *Phyllinus linteus* leads to S-phase arrest in HT-29 cells. *Chem Biol Interact* **206**, 222-229.

### 초록 : 인간 대장암 HT-29 세포에서 제주조릿대의 세포사멸 효과

변지희<sup>1</sup> · 김민영<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>제주대학교 생명공학부 독성학 실험실, <sup>2</sup>제주대학교 아열대농업생명과학연구소)

제주조릿대(*Sasa quelpaertensis* Nakai)는 한라산에 넓게 분포되어 자생하는 식물로 최근 연구에서 항염증, 항당뇨, 항산화, 항암 효능을 가지는 것으로 알려져 있으나 대장암에서의 항암 효능 및 그에 따른 mechanism에 대해서는 명확히 밝혀지지 않았다. 본 연구에서는 인간 대장암 HT-29 세포를 대상으로 제주조릿대에 의한 항암작용과 기전에 대해 조사하였다. 제주조릿대에 의한 HT-29 세포의 증식 억제가 apoptosis 유도과 연관성이 있음을 DNA fragmentation와 flow cytometry 분석에 의한 sub-G1기의 세포빈도의 증가로 확인하였다. 제주조릿대에 의한 apoptosis 유발은 HT-29 세포의 S arrest 현상을 동반하였을 뿐만 아니라 발생한 산화질소의 증가와 anti-apoptotic factor인 IAP family (survivin, XIAP, cIAP-1, cIAP-2) 발현이 감소함으로써 촉진되었음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들은 제주조릿대가 대장암에 대한 치료제로서의 사용 가능성을 확인할 수 있었지만 이를 입증하기 위해서는 더 자세한 항암기전에 관한 연구가 진행되어야 한다고 사료된다.