

## Sorghum Extract Enhances Caspase-dependent Apoptosis in Primary Prostate Cancer Cells and Immune Activity in Macrophages

Hyun-Dong Cho<sup>1</sup>, Jeong-Ho Kim<sup>2</sup>, Seong-Min Hong<sup>3</sup>, Ju-Hye Lee<sup>4</sup>, Du-Hyun Kim<sup>5</sup> and Kwon-Il Seo<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

<sup>2</sup>Department of Food and Nutrition, Suncheon National University, Suncheon 57922, Korea

<sup>3</sup>Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 49315, Korea

<sup>4</sup>Functional Food and Nutrition Division, Department of Agro-Food Resource, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Wanju 565-871, Korea

<sup>5</sup>Department of Life Resources Industry, Dong-A University, Busan 49315, Korea

Received November 8, 2016 / Revised November 30, 2016 / Accepted December 6, 2016

*Sorghum bicolor* L. is one of the important minor cereals in Asia, Africa, and the central United States, and it is considered a rich source of polyphenols, flavonoids, and dietary fiber. However, there is a lack of data on the anti-cancer activity of *Sorghum* in prostate cancer cells and immune activity in macrophages. This study aims to investigate the potential effects of an ethanol extract of *S. bicolor* L. (SE) on inducing apoptosis in RC-58T/h/SA#4 cells and immunomodulatory activity in RAW 264.7 cells. SE significantly inhibited the viability of RC-58T/h/SA#4 primary prostate cancer cells in a dose-dependent manner. The morphology of RC-58T/h/SA#4 cells treated with SE was shrunken and involved the formation of an apoptotic body and nuclear condensation. In addition, SE markedly activated caspase-8, -9, and -3; increased the protein levels of Bax, p53, cleaved PARP, and cytosolic cytochrome *c*; and decreased Bcl-2 protein expression. Furthermore, the inhibition of caspases in RC-58T/h/SA#4 cells with z-VAD-fmk attenuated SE-induced cell growth inhibition. The production of nitric oxide (NO) was also elevated by SE treatment, as revealed by immune response parameters. These results suggest that SE inhibits growth and induces apoptosis in primary human prostate cancer cells in a caspase-dependent manner, and it modulates the immune functions in macrophages. Therefore, *Sorghum bicolor* L. may be used as a functional food to prevent prostate cancer and enhance immune activity.

**Key words** : Apoptosis, immune activity, RC-58T/h/SA#4, *Sorghum* ethanol extract

### 서 론

최근 서구화된 식생활, 인구의 노령화 및 환경적 스트레스 등으로 암의 발생 및 치료에 관심이 집중되고 있으며 당뇨, 고혈압 등과 같은 만성질환들의 사망률은 현저히 감소하는 반면 암에 의한 사망률은 점진적으로 증가하고 있는 실정이다 [9]. 특히 나이, 가족력, 식습관 등에 의해 주로 발병된다고 알려져 있는 전립선암은 2015년 미국 전체 암환자에 대하여 발병률 및 암 관련 사망률 2위를 나타내고 있다 [21]. 이러한 전립선암의 치료방법으로는 호르몬 치료, 방사선 요법, 화학적 치료 등이 이용되고 있으나, 치료효과는 제한적이기에 암의 예방을 위한 관리에 중점을 두는 추세이다 [2]. 전립선 암을 예방

하기 위하여 다양한 기반연구들이 진행되고 있지만 대부분의 연구에서 LNCaP 및 PC-3와 같은 상피나 척추로 전이된 형태의 전립선 암세포만을 이용해 왔을 뿐, 전이되기 이전의 형태인 primary 전립선암세포를 사용한 연구는 미흡한 실정이다.

국내에서도 국민소득의 증대, 생활 패턴 및 식생활의 서구화로 암과 같은 성인질환 발병률이 증가하고 있으며, 이러한 질병들의 예방에 직접적으로 연관된 면역증진효능을 갖는 기능성 식품에 대한 요구가 증대되고 있다 [12]. 많은 역학조사 결과 식물로부터 얻어진 천연물의 섭취가 항암 및 면역조절에 효능이 뛰어난 것으로 보고되었으며 [7, 18], 합성화학물과는 대조적으로 천연물 유래 물질은 정상세포에도 독성을 거의 나타내지 않아 부작용에 대한 문제점을 최소화 하면서 효과적으로 암을 예방할 수 있는 기능성 소재로 평가된다. 따라서 다양한 식물자원에 함유되어 있는 생리활성 성분과 천연자원을 이용하여 암 예방 효능에 대한 지속적인 연구를 통해 국민의 건강증진에 도움을 줄 수 있는 천연물 소재의 개발을 촉진할 필요가 있다.

수수(*Sorghum bicolor* L. Moench)는 외떡잎식물 벼목 화본과의 한해살이 초본으로 아시아, 아프리카 및 중미 지역뿐만

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7565, Fax : +82-51-200-6536

E-mail : kseo@dau.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.

아니라 국내에서도 재배되는 잡곡으로 예로부터 쌀과 함께 많이 섭취되고 있는 식량자원이다[20, 23]. 수수에는 식이섬유, polyphenol 화합물 및 flavonoid류의 유효성분이 다량 함유되어 있다고 보고되었으며[11], 항돌연변이 활성[6], 항산화 활성[13], 콜레스테롤 흡수억제[10], 항균[19] 및 난소암 억제효능[4] 등이 있다고 알려져 있다. 하지만 수수의 항암활성에 관련된 연구는 아직 미흡한 실정이며 특히 전이되기 이전의 primary 전립선암에 대한 보고는 거의 없다.

이에 본 연구에서는 수수 에탄올 추출물의 처리가 전이되기 이전의 형태인 primary 전립선 암세포의 사멸 및 면역활성 증진에 미치는 영향을 확인하였으며 이를 기능성 소재로의 이용가능성을 제시하기 위한 기초자료로 활용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 수수 추출물의 제조

실험에 사용한 수수는 황금조 품종으로 2015년 농촌진흥청 국립식량과학원에서 분양 받아 4°C에 냉장보관 후 건조 및 분쇄과정을 거쳐 분말을 획득하였다. 수수 에탄올추출물(SE)의 제조는 수수분말에 10배(w/v) 용량의 EtOH과 혼합하고 실내에서 24시간씩 3회 추출하여 여과한 후 농축하여 실험에 사용하였다. 추출물 건조시료는 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma chemical Co., St Louis, MO) 이용하여 100 mg/ml의 농도로 녹여 stock solution을 각각 만든 다음 적정 농도로 배지에 희석하여 사용하였다.

### 세포 배양

본 실험에 사용한 primary 인체 전립선 암세포인 RC-58T/h/SA#4는 Center for Prostate Disease Research (Department of Surgery, Uniformed Services University of Health Sciences, Bethesda, MD, USA)로 부터 분양 받아 100 unit/ml의 Antibiotic Antimycotic (GIBCO®/Invitrogen™, Gran Island, NY, USA)와 10% FBS (Fetal Bovine Serum, GIBCO®/Invitrogen™)가 첨가된 DMEM (GIBCO®/Invitrogen™)을 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)에서 계대 배양하여 사용하였다.

### 암세포 증식 억제능 측정

암세포 증식 억제능은 생존 세포 내의 단백질 총량을 흡광도로 나타내어 세포 사멸 정도를 확인하는 방법인 sulforhodamine B (SRB, Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)법을 이용하여 측정하였다. Trichloroacetic acid (TCA, Sigma-Aldrich Co.)에 의해 생존 세포만 well plate에 부착되며 이 세포의 단백질 내 염기성 아미노산 잔기가 SRB와 결합하여 마지막에 처리하는 Tris buffer에 녹아 나와 흡광도를 나타낸다[17]. 암세포 증식 억제능은 세포를 2×10<sup>4</sup> cells/ml가 되도록

희석하여 48 well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하여 시료를 첨가하고 24시간 동안 반응시켰다. 반응 종료 후 12% TCA를 넣어 4°C에서 세포를 고정시키고 well을 세척한 후 0.4% SRB 용액을 첨가하여 염색하였다. 염색 종료 후 1% acetic acid (Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan)로 세척하고 10 mM Tris buffer (Sigma-Aldrich Co.)를 첨가 하여 SRB를 녹였다. 상등액을 96 well plate에 옮겨 microplate reader (Titertek Multiscan Plus, Labsystems, Espoo, Finland)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 암세포 형태의 관찰

암세포를 1×10<sup>5</sup> cells/ml가 되도록 희석하여 6 well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하여 시료를 well plate에 처리하고 24시간 동안 반응 시켰다. 이후 세포의 형태학적 변화는 200배율의 광학현미경(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)으로 관찰하고 사진을 촬영하였다.

### Hoechst staining

암세포를 5×10<sup>5</sup> cells/ml가 되도록 희석하여 6 well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후, 시료를 처리하여 48시간 동안 반응시켰다. 반응이 종료된 세포를 수거하여 200 µl hoechst 33258 (bis-benzimide, 1 µg/ml, Sigma-Aldrich Co.)을 첨가하여 실온에서 10분 간 염색시킨 후 PBS로 2회 세척하였다. 염색된 핵을 형광현미경으로 관찰하였다.

### Western blot을 이용한 단백질 측정

Monolayer로 배양한 세포를 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 single cell로 만든 후 배양액으로 최종농도가 1×10<sup>5</sup> cells/ml가 되도록 희석하여 10 cm dish에 첨가한 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간이 지난 후 각 dish의 배양액을 제거한 후 AEG를 다양한 농도로 준비한 시료가 포함된 배양액을 dish에 첨가하고 48시간 더 반응시켰다. 반응이 종료된 dish에서 회수한 세포를 PBS로 3회 세척 후 500 µl lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM NaF, 30 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1 mM PMSF, 2 µg/ml aprotinin)를 첨가하여 얼음에서 용해하였다. 세포 용해액과 2×sample buffer를 동량으로 섞어 65°C에서 5분간 끓인 후 8%와 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitro-cellulose membrane으로 transfer한 후 blocking buffer (2.5%, 5% BSA)로 상온에서 1시간 반응시키고, primary antibody를 희석하여 4°C에서 하루 동안 반응시켰다. T-TBS로 1시간 이상 세척하고 secondary anti-rabbit IgG conjugated HRP를 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 반응 종료 후 membrane을 T-TBS로 1시간 이상 세척하

고 enhanced chemiluminescence kit (ECL kit)를 사용하여 필름에 노출시켜 단백질을 확인하였다.

**Nitric oxide 생성량 측정**

RAW 264.7 마우스 대식세포를  $2 \times 10^4$  cells/ml가 되도록 희석하여 96 well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하여 1 µg/ml의 LPS와 농도 별 수수추출물 (1, 2.5, 5, 10 및 25 µg/ml)을 첨가한 후 24시간 동안 반응시켰다. 배양 상등액을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 NO 함량을 측정하였다. 배양 상등액 100 µl에 동량의 Griess (Sigma Aldrich CO.) 시약을 첨가하고 암실에서 10분간 반응시킨 후 micro plate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 농도는 sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>, Sigma Aldrich Co.)를 사용하여 얻은 표준직선을 기준으로 정량하였다.

**통계처리**

실험결과는 3 반복에 대한 평균 및 표준편차로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's t-test를 실시하여 유의성 여부를 판정하였다(\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

**결과 및 고찰**

**SE의 처리가 RC-58T/h/SA#4 세포의 성장억제에 미치는 영향**

RC-58T/hTER은 primary 전립선 종양에서 유래한 인체 전립선 암세포 cell line으로 전립선암 특유의 유전자를 대부분 발현한다고 알려져 있으며[15], 본 연구에서는 보다 정확한 전립선 암 억제효능을 연구하기 위하여 기존의 전이된 형태의 전립선 암세포주가 아닌 primary 전립선 암세포인 RC-58T/h/SA#4 세포를 사용하였다. SE 처리가 전이되기 이전의 primary 전립선 암세포의 증식억제에 미치는 영향을 정량적으로 측정하기 위하여 RC-58T/h/SA#4 세포에 SE를 10, 100, 250, 500 및 1,000 µg/ml 농도로 처리하여 24시간 동안 반응시킨 후 SRB assay를 이용하여 확인하였다(Fig. 1A). SE의 처리는 농도의존적으로 primary 전립선암세포의 증식을 억제하였으며, 대조군과 비교하여 250 µg/ml의 농도부터 약 60%의 세포 생존율을 나타내어 유의적인 RC-58T/h/SA#4 세포증식 억제효능을 보였다. 또한 각 농도의 SE를 처리한 후 위상 차 현미경으로 관찰한 결과 RC-58T/h/SA#4 세포가 부착된 형태를 잃고 culture plate로부터 분리되어 부유하였으며 세포수도 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1B). 이러한 결과를 통해 SE는 primary 인체 전립선 암세포에서 증식억제 효능을 가지는 것으로 판단된다.

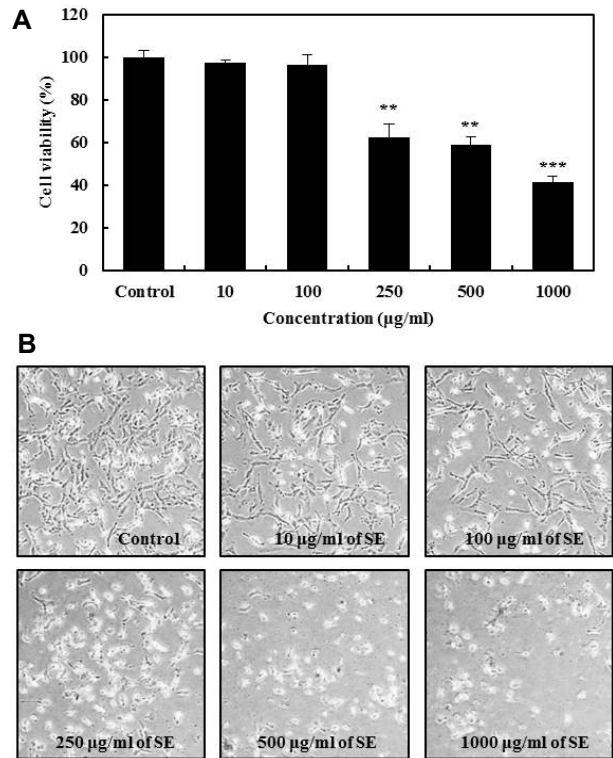


Fig. 1. Cell growth inhibitory effects in RC-58T cells treated with Sorghum ethanol extract (SE). (A) Cell viability was measured by SRB assay. Significant differences were compared with the control at \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  using Student's t-test. (B) After 24 hr incubation with SE, cell morphology was visualized by inverted microscopy ( $\times 200$ ).

**SE의 처리가 RC-58T/h/SA#4 세포 핵의 형태변화에 미치는 영향**

Apoptosis는 정상적인 또는 병리학적인 요인에 노출된 후 죽음에 이르게 되는 현상을 말하며 DNA의 절단에 의한 염색질 및 핵의 응축, 세포막 수포화 현상, DNA 단편화 등이 수반된다고 알려져 있다[5, 24]. SE에 의한 primary 전립선 암세포 증식억제효과가 apoptosis에 의한 것인지 알아보기 위해 hoechst 33258 염색을 통한 핵 형태의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다. 대조군 암세포의 핵 형태는 비교적 일정한 반면 SE를 처리한 군에서는 핵이 손상되어 응축이 일어나는 것을 관찰할 수 있었으며, apoptosis의 특징 중 하나인 apoptotic body가 확인되었다. 특히 250 µg/ml 이상의 농도에서 세포 수축 및 apoptotic body의 증가현상이 확연히 나타났다. 따라서 SE의 처리에 따른 primary 전립선 암세포 성장억제효과는 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있는 것으로 판단된다.

**SE의 처리가 RC-58T/h/SA#4 세포의 apoptosis 관련 단백질 발현에 미치는 영향**

세포가 내·외부적으로 자극을 받게 되면 다양한 death

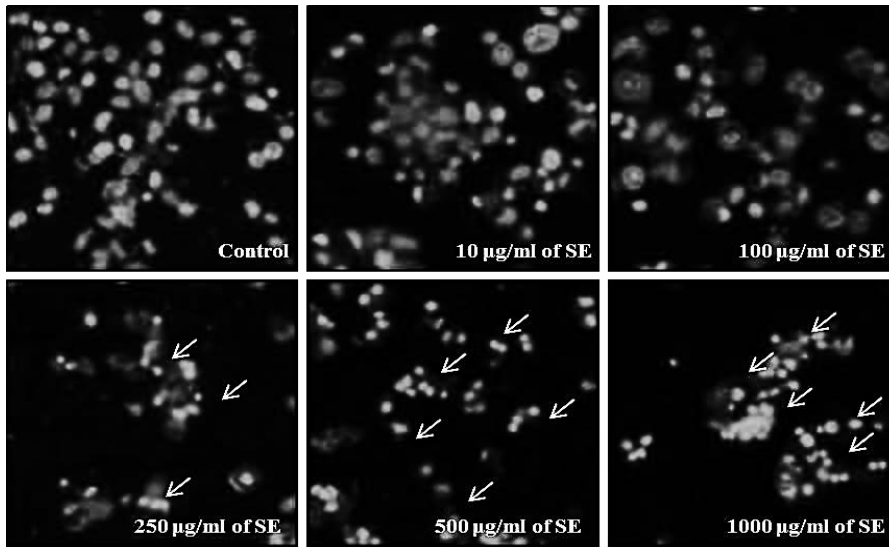


Fig. 2. Induction of apoptotic cell death in RC-58T/h/SA#4 cells by SE. Cells were treated with or without SE for 24 hr. Nuclear fragmentation was observed by fluorescent microscopy using Hoechst 33258 ( $\times 200$ ).

signal들이 활성화되고 관련 단백질들의 발현과 억제에 의해 apoptosis가 유도되는데, 이 중 Bax/Bcl-2 family 단백질들은 mitochondria 투과성을 증가시키는 중요한 역할을 담당한다. Mitochondria 막전위가 변화되어 투과성이 증가되면 cytochrome *c* 등과 같은 단백질이 mitochondria 내부에서 세포질로 방출되며 이는 종양억제인자인 p53 및 caspase 등과 같은 endonuclease의 활성을 증가시키는 결과를 초래한다[8]. Caspase 단백질의 활성화에 의해 DNA 손상을 복구하는 poly-ADP ribose polymerase (PARP) 단백질이 분절되고 결과적으로 암세포의 자가 사멸이 유도된다[22].

SE에 의한 primary 전립선 암세포의 apoptosis 유도가 관련 단백질 발현변화와 관련이 있는지 Western blot을 통해 확인한 결과는 Fig. 3, Fig. 4와 같다. RC-58T/h/SA#4 세포에 SE를 농도 별로 처리하였을 때 pro-apoptotic 단백질인 Bax 및 암

억제 단백질로 알려진 p53 단백질의 발현은 농도의존적으로 증가하는 반면 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2의 발현은 감소되는 것으로 나타났다. 또한 apoptosis 유도에서 중요한 조절인자로 작용하는 cytochrome *c*, caspase-3, -8 및 -9 단백질도 SE의 처리에 따라 활성이 증가하였으며, 116 kDa의 PARP 단백질도 82 kDa의 분절된 형태로 변화되는 것을 확인할 수 있었다.

Lee 등[16]은 Bax/Bcl-2 family의 발현변화에 의해 mitochondria 투과성이 증대되면 cytochrome *c*가 세포질로 방출되고 이로 인해 caspase 단백질이 활성화 되어 caspase 의존형 apoptosis를 유도한다고 보고하였다. 본 연구에서 SE의 처리에 의한 primary 전립선 암세포의 apoptosis 유도 및 세포증식

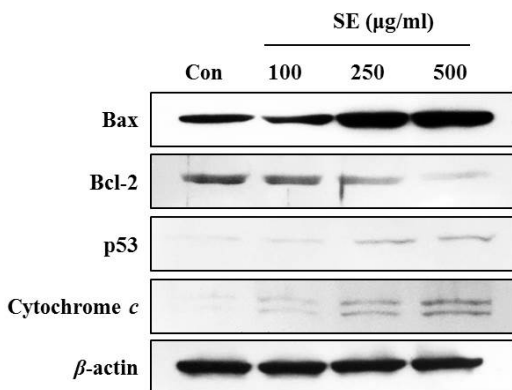


Fig. 3. Expression of proteins related with mitochondrial pathway in RC-58T/h/SA#4 cells by SE. Expressions of Bax, Bcl-2, p53, and cytochrome *c* in cells treated with SE for 24 hr, as detected by Western blotting.

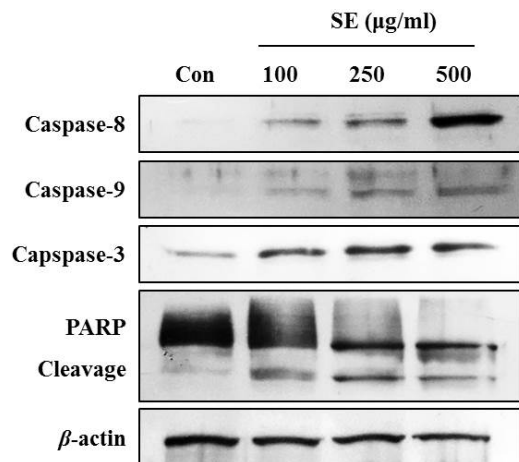


Fig. 4. Expression of proteins related with caspase pathway in RC-58T/h/SA#4 cells by SE. Expressions of caspase-8, -9, -3, PARP and cleaved PARP in cells treated with SE for 24 hr, as detected by Western blotting.

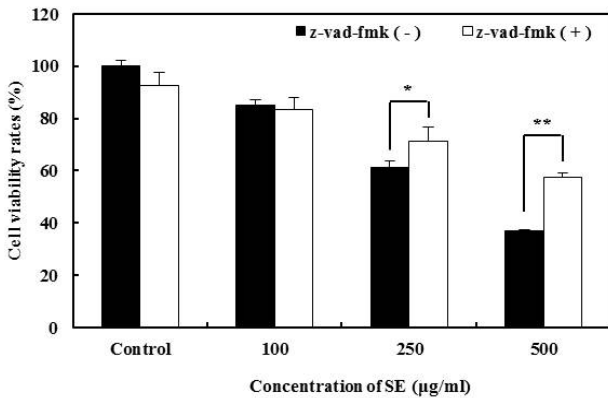


Fig. 5. Induction of caspase-dependent cell death in RC-58T/h/SA#4 cells by SE. Cells were pretreated with 10 µM z-VAD-fmk for 2 hr prior to SE treatment for 24 hr. Significant differences were compared with the control at \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  using Student's *t*-test.

억제효과가 caspase 활성화와 관련이 있는지 재확인하기 위하여 caspase inhibitor인 z-VAD-fmk를 처리하여 세포생존율을 SRB assay로 알아보았다(Fig. 5). 그 결과 caspase inhibitor인 z-VAD-fmk를 전처리하여 인위적으로 caspase 활성을 억제한 군에서 250 및 500 µg/ml의 SE를 단독으로 처리한 군과 비교하여 유의적으로 높은 세포생존율을 나타내었으며, 이는 SE에 의한 세포사멸이 caspase 의존형 apoptosis와 관련이 있다는 것을 보여준다. Darwin 등[3]에 따르면 수수 폴리페놀이 대장암 세포주에서 caspase 단백질을 활성화시켜 apoptosis를 유도한다고 보고한 바 있으며, 본 연구에서도 primary 전립선 암세포에 SE를 처리했을 때 mitochondrial pathway를 통해 caspase 의존형 apoptosis를 유도한다는 것을 알 수 있었다.

### SE의 처리가 RAW 264.7 대식세포의 면역활성에 미치는 영향

암을 비롯한 다양한 질병으로부터 인체 방어를 위해 가장

중요한 전략 중 하나로 면역조절을 들 수 있다. 수많은 면역세포 중 인체 조직에 광범위하게 분포하고 있는 대식세포는 선천면역계를 담당하는 면역세포로 이물질, 노폐물 및 생체 내 불필요한 세포 등을 포식하여 제거하는 기능을 갖는다[1, 14]. SE의 면역활성 유도능에 관해 알아보기 위하여 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 LPS와 SE를 농도별로 처리하고 대식세포 활성화에 중요한 역할을 수행하는 NO 생성량을 측정된 결과는 Fig. 6과 같다. RAW 264.7 대식세포에 대한 SE의 세포독성을 알아보기 위해 여러 농도의 SE (10, 25, 50, 100, 250 및 500 µg/ml)를 24시간 동안 처리하여 확인하였다. 10-250 µg/ml의 SE를 처리하였을 때 RAW 264.7 세포의 생존율에 유의적인 변화가 나타나지 않았으나, 500 µg/ml 이상의 농도에서부터 유의적인 세포사멸을 관찰할 수 있었다(Fig. 6A). 본 결과를 바탕으로 대식세포 면역 조절능 평가를 위한 SE 최대 처리농도를 100 µg/ml로 설정하였다. 양성 대조군으로 LPS를 단독 처리 하였을 때 대조군과 비교하여 NO 생성량이 유의적으로 증가하였으며, LPS와 10, 25, 50 및 100 µg/ml의 SE를 병용 처리한 군에서는 양성 대조군과 비교하여 유의적인 NO 생성량의 증가를 나타내었다(Fig. 6B). 대식세포가 항원을 인식하여 면역세포에 항원을 제공함과 동시에 염증물질인 NO를 생성하게 되는데, 이는 대식세포 활성화 지표 중 하나로 다양한 천연물에 의한 NO증가는 인체질환의 예방과 치료에 우수한 효능을 가지는 것으로 인식된다. 특히 적정량의 NO는 인체 내 암세포 증식을 조절한다고 알려져 있다[14]. 따라서 SE에 의한 NO 분비능 증가는 수수의 섭취가 면역기능 활성화에 효능을 가질 수 있는 한 예로서 사용될 수 있을 것으로 판단되며, 동시에 암을 예방할 수 있는 우수한 기능성 소재로도 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 아젠다 사업(과제번호: PJ011238)의

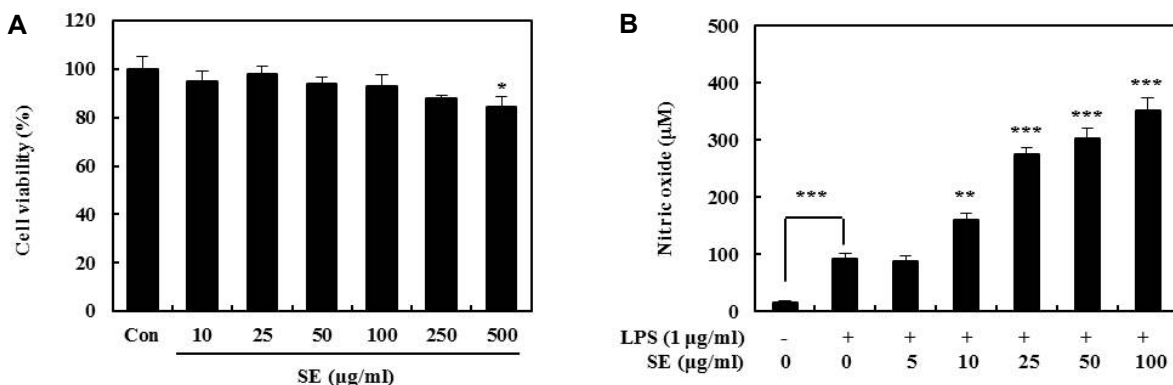


Fig. 6. Macrophage stimulating activity in RAW 264.7 cells by SE. (A) Cell viability was measured by SRB assay. (B) Nitric oxide (NO) production was measured in culture media by Griess reagent. Significant differences were compared with the control at \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  using Student's *t*-test.

지원에 의해 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

## References

- Byun, E. B., Jang, B. S., Sung, N. Y. and Byun, E. H. 2016. Immunomodulatory activity of crude polysaccharide separated from *Cudrania tricuspidata* leaf. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **45**, 1099-1106.
- Chung, M. K. 2004. Review of the treatment outcome in the adenocarcinoma of the prostate. *J. Kor. Med. Assoc.* **47**, 432-440.
- Darvin, P., Joung, Y. H., Nipin, S. P., Kang, D. Y., Byun, H. J., Hwang, D. Y., Cho, K. H., Park, K. D., Lee, H. K. and Yang, Y. M. 2015. Sorghum polyphenol suppresses the growth as well as metastasis of colon cancer xenografts through co-targeting jak2/STAT3 and PI3K/Akt/mTOR pathways. *J. Funct. Foods* **15**, 193-206.
- Dia, V. P., Pangloli, P., Jones, L., McClure, A. and Patel, A. 2016. Phytochemical concentrations and biological activities of *Sorghum bicolor* alcoholic extracts. *Food Funct.* **7**, 3410-3420.
- Fulda, S. and Debatin, K. M. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**, 4798-4811.
- Grimmer, H. R., Parbhoo, V. and Mcgrath, R. M. 1992. Antimutagenicity of polyphenol-rich fractions from *Sorghum bicolor* grain. *J. Sci. Food Agr.* **59**, 251-256.
- Ha, J. H., Jeong, H. S., Jeong, M. H., Kim, S. S., Jin, L., Nam, J. H., Hwang, B., Ma, C. J. and Lee, H. Y. 2009. Comparison of anticancer activities of ultrasonification extracts of callus and roots from *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **41**, 552-559.
- Kim, G. H., Lee, M. H., Han, M. H., Park, C., Hong, S. H. and Choi, Y. H. 2013. Induction of apoptosis by citri pericarpium methanol extract through reactive oxygen species generation in U937 human leukemia cells. *J. Life Sci.* **23**, 1057-1063.
- Kim, J. H. and Kim, M. Y. 2015. Anticancer effect of citrus fruit prepared by gamma irradiation of Budsticks. *J. Life Sci.* **25**, 1051-1058.
- Kim, J. Y., Noh, S. K., Woo, K. S. and Seo, M. C. 2016. Sorghum extract lowers lymphatic absorption of trans fat and cholesterol in rats. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* **45**, 783-788.
- Kim, K. O., Kim, H. S. and Ryu, H. S. 2006. Effect of *Sorghum bicolor* L. Moench (sorghum, su-su) water extracts on mouse immune cell activation. *J. Kor. Diet Assoc.* **12**, 82-88.
- Kim, Y. E., Kwon, E. K., Han, D. S., Kim, I. H. and Ku, K. H. 2008. Antioxidant activity, fibrinolysis and angiotensin converting enzyme inhibitory activity of pine mushroom juice (*Tricholoma matsutake* Sing.). *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 535-541.
- Kwak, C. S., Lim, S. J., Kim, S. A., Park, S. C. and Lee, M. S. 2004. Antioxidative and antimutagenic effects of Korean buckwheat, *Sorghum*, *Millet* and job's tears. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 921-929.
- Kwon, D. H., Kang, H. J., Choi, Y. H., Chung, K. T., Lee, J. H., Kang, K. H., Hyun, S. K., Kim, B. W. and Hwang, H. J. 2016. Immunomodulatory activity of water extract of *Ulmus macrocarpa* in Macrophages. *J. Life Sci.* **26**, 50-58.
- Lee, J. H., Oh, E. K., Cho, H. D., Kim, J. Y., Lee, M. K. and Seo, K. I. 2013. Crude saponins from *Platycodon grandiflorum* induce apoptotic cell death in RC-58T/h/SA#4 prostate cancer cells through the activation of caspase cascades and apoptosis-inducing factor. *Oncol. Rep.* **29**, 1421-1428.
- Lee, J. W. and Kim, Y. H. 2011. Activation of pro-apoptotic multidomain Bcl-2 family member Bak and mitochondria-dependent caspase cascade are involved in p-coumaric acid-induced apoptosis in human jurkat T cells. *J. Life Sci.* **21**, 1678-1688.
- Lee, S. M., Choi, H. K. and Yu, G. H. 2003. Effect of bisphenol A, nonylphenol, pentachlorophenol on the proliferation of MCF-7 and PC-3 cells. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 424-428.
- Park, H. Y., Lim, C. W., Kim, Y. K., Yoon, H. D. and Lee, K. J. 2006. Immunostimulating and anticancer activities of hot water extract from capsosiphon fulvescens. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **49**, 343-348.
- Sa, Y. J., Kim, J. S., Kim, M. O., Jeong, H. J., Yu, C. Y., Park, D. S. and Kim, M. J. 2010. Comparative study of electron donating ability, reducing power, antimicrobial activity and inhibition of  $\alpha$ -glucosidase by *Sorghum bicolor* extracts. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **42**, 598-604.
- Seo, M. C., Ko, J. Y., Song, S. B., Lee, J. S., Kang, J. R., Kwak, D. Y., Oh, B. G., Yoon, Y. N., Nam, M. H., Jeong, H. S. and Woo, K. S. 2011. Antioxidant compounds and activities of foxtail millet, proso millet and sorghum with different pulverizing methods. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **40**, 790-797.
- Siegel, R., Miller, K. and Jemal, A. 2015. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J. Clin.* **65**, 5-29
- Wen, X., Lin, Z. Q., Liu, B. and Wei, Y. Q. 2012. Caspase-mediated programmed cell death pathways as potential therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* **45**, 217-224.
- Woo, K. S., Lee, J. S., Kang, J. R., Ko, J. Y., Song, S. B., Oh, B. G., Seo, M. C., Kwak, D. Y. and Nam, M. H. 2011. Effects of cultivated area on antioxidant compounds and antioxidant activities of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **40**, 1512-1517.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. and Currie, A. R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251-306.

## 초록 : 수수 추출물에 의한 primary 전립선 암세포의 caspase 의존성 apoptosis 유도 및 대식세포 면역활성 증가

조현동<sup>1</sup> · 김정호<sup>2</sup> · 홍성민<sup>3</sup> · 이주혜<sup>4</sup> · 이용석<sup>3</sup> · 김두현<sup>5</sup> · 서권일<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>경북대학교 식품공학과, <sup>2</sup>순천대학교 식품영양학과, <sup>3</sup>동아대학교 생명공학과, <sup>4</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 기능성식품과, <sup>5</sup>동아대학교 생명자원산업학과)

본 연구에서는 수수 에탄올 추출물(ethanol extract of *Sorghum bicolor* L., SE)을 이용하여 RC-58T/h/SA#4 primary 인체 전립선 암세포에 대한 apoptosis 유도효과 및 RAW 264.7 마우스 대식세포에 대한 면역활성 증진효능에 대해 알아보고자 하였다. SE의 처리는 RC-58T/h/SA#4 세포의 증식을 억제하였으며 세포수축을 통한 형태학적 변화를 유발하였다. 또한 apoptosis 관련 지표현상인 apoptotic body 및 핵의 형태변화를 관찰할 수 있었다. RC-58T/h/SA#4 세포에 SE를 처리하였을 때 caspase-8, -9, -3 단백질 활성을 증가시켰으며 pro-apoptotic 단백질인 Bax, p53, 분절된 PARP 및 세포질의 cytochrome c 단백질은 증가시킨 반면, anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2 단백질은 감소시켰다. 이는 z-VAD-fmk로 caspase 활성을 억제시켰을 때 SE에 의한 세포증식 억제효과가 감소되었으며 이를 통해 SE에 의한 세포증식 억제효과는 caspase 의존적임을 확인할 수 있었다. 면역반응에서 nitric oxide (NO)의 증가는 면역활성 지표로 여겨지며, 본 연구에서 SE를 처리하였을 때 RAW 264.7 세포에서 NO 생성능이 증가하는 것으로 나타났다. 본 연구의 결과들은 SE가 primary 전립선 암세포에서 caspase 의존형 apoptosis를 유도하며 대식세포의 면역활성을 증가시킨다는 것을 나타낸다. 따라서 수수를 전립선 암 예방 및 면역활성을 증진효능이 있는 기능성 식품 소재로 활용할 수 있을 것으로 생각된다.