

야관문의 에탄올 추출물에 의한 대장암세포의 성장억제 및 세포사멸유도

- 연구노트 -

조 천¹ · 김예언² · 한인화¹ · 윤정미²

¹광주여자대학교 식품영양학과

²전남대학교 식품영양과학부

Inhibition of Cell Proliferation and Induction of Apoptosis by Ethanolic Extract of *Lespedeza cuneata* G. Don in Human Colorectal Cancer HT-29 cells

Qian Zhao¹, Yeah-Un Kim², In-Hwa Han¹, and Jung-Mi Yun²

¹Department of Food and Nutrition, Kwangju Women's University

²Division of Food and Nutrition, Chonnam National University

ABSTRACT *Lespedeza cuneata* G. Don is an edible perennial herb used in traditional Korean medicine. We investigated the anti-proliferative properties and mechanism of *L. cuneata* extract. The ethanolic extract of *L. cuneata* dose- and time-dependently inhibited human colorectal cancer cell proliferation. A 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay was used to test the effect of the extract on proliferation of HT-29 colorectal cancer cells. The extract inhibited HT-29 cell proliferation with an IC₅₀ value of 554.26±8.81 µg/mL. *L. cuneata* extract suppressed production of pro-inflammatory cytokines interleukin-6 and tumor necrosis factor-α. Apoptosis was evaluated by analysis of DNA fragmentation, poly(ADP-ribose) polymerase cleavage, caspase-3 activity, and protein expression of pro-apoptotic (Bax) and anti-apoptotic (Bcl-2). Our results demonstrated that the extract induced DNA fragmentation and characteristic morphological changes associated with apoptosis in HT-29 colorectal cancer cells. The extract also time- and dose-dependently up-regulated expression of the Bax and down-regulated expression of the Bcl-2. Furthermore, the extract dose- and time-dependently enhanced caspase-3 activity. Our findings provide evidence that *L. cuneata* extract may mediate its anti-proliferative effect via modulation of apoptosis.

Key words: *Lespedeza cuneata* G. Don, HT-29 colorectal cancer cells, apoptosis, antitumor activity, anti-inflammation

서 론

한국 통계청에서 발표한 2014년 사망원인통계 자료에 의하면 3대 사망원인은 암, 심장질환, 뇌혈관질환으로 총사망자의 47.7%를 차지하고, 그중 암은 28.6% 가장 높은 사망률을 나타내고 있다(1). 암은 인체의 면역기전 손상으로 인한 정상적인 세포가 무한정 증식, 돌연변이화를 발생하게 되는데 이는 최근 서구적인 생활양식으로의 변화, 심한 스트레스, 불규칙한 생활습관 등으로 기인한다(2). 대장은 소화 및 흡수되고 남은 음식물이 머무르는 곳으로 많은 종류의 세균이 번식하고 있고, 특히 S상 결장과 직장이 암이 생기기 가장 쉬운 부위이다. 한국에서 대장암의 발생률은 최근 현저히 증가하고 있으며, 대장암의 발생률이 위암, 폐암, 간암에 이어 4위를 차지하고 있을 정도로 매우 중요한 암질환이다(3). 최근 독성과 부작용이 적으면서 효과적으로 암세포를 제어할 수 있는 새로운 치료약제의 개발이 무엇보다도 시급

한 현실에서 항암 효과를 함유하는 천연물질을 이용하여 암을 예방하고 관리하고자 하는 욕구는 지속해서 증대되고 있다. 그에 따라 20세기에 들어와서는 천연물을 이용한 질병 치료의 연구가 체계적으로 이루어지고 있으며 천연 의약품들이 개발 중이다. 지금까지 식물 중 함유된 생리활성 물질들이 한 20,000개 이상이 밝혀져 오고 있다(4).

세포사멸(apoptosis)은 병리적인 상태뿐만 아니라 정상적인 상태의 조직에서도 확인되는 과정으로 세포사멸은 세포괴사(necrosis)와 함께 세포죽음(cell death)의 한 종류이지만 일시적인 세포손상으로 발생하는 세포괴사와는 구별된다. 세포사멸이 일어나는 세포는 탈수에 의한 세포 수축, 세포 내 칼슘이온 농도 증가, DNA 분절, 염색질 응축, phosphatidylserine이 세포막 밖으로 노출되는 등 다양한 생리적 현상이 동반되며 최종적으로 apoptotic body 형성과 함께 식세포 작용을 거치는 일련의 과정을 의미한다(5). 세포사멸 과정에서 실행경로의 활성화 과정에 관여하는 caspase는 세포사멸 시 활성화되는 중요한 단백질 분해효소이므로 효소의 활성도를 측정하여 세포사멸 정도를 파악할 수도 있다. 따라서 암세포의 비정상적인 세포사멸 기전을 적절하게 회복하는 것은 암 예방 및 암 치료의 표적이 될

Received 3 March 2016; Accepted 28 April 2016

Corresponding author: Jung-Mi Yun, Division of Food and Nutrition, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea
E-mail: sosung75@jnu.ac.kr, Phone: +82-62-530-1332

수 있으며, 최근 다양한 종양세포에서 세포사멸을 유도하는 항암제에 관한 연구들이 많이 보고되고 있다(6-8). 최근 다양한 연구에서 보고되듯이 암세포의 세포사멸을 유도하는 식품성분들은 항암제로 개발할 수 있는 좋은 소재가 될 수 있고(6), 한국에서도 녹색식물이나 과일, 한약 추출물 등에 독성이 적으면서 강력한 항암 효과를 나타내는 성분이 포함되어 있다는 보고와 국내를 비롯하여 전 세계적으로 천연물을 이용한 신약개발에 관한 투자나 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다(9). 최근 연구에 의하면 생약제로 사용된 녹차, 목단피, 강황, 오미자 추출물 등의 항산화, 항균, 항염증, 항암 등의 효과가 있다고 알려졌다(10,11). *Lespedeza*(싸리)속 식물인 야관문(*Lespedeza cuneata* G. Don)은 콩과(Leguminosae)에 속하는 여러해살이식물로 한국, 일본, 중국 등지에 널리 분포하며, 한국에서는 '비수리'라고 하고 삼엽초, 야계초 등의 여러 가지 이름으로 불린다(12). 널리 흔한 식물이지만 예로부터 민간에서는 음위증이나 유정, 기침, 천식 등의 치료에 효능이 있는 약제로 사용되었고, 야관문의 생리활성 물질로는 pinitol, tannin, β -sitosterol, avicularin, juglanin, trifolin, quercetin, kaempferol, vitexin, orientin 등을 함유한 것으로 알려져 있으며(13), 최근에는 야관문 추출물의 항산화 효과(14), 혈당강하 효과(15,16), 세포보호 효과(16), 인슐린 분비 촉진 효과(16), 미백 효과(17), 자외선 노출에 의한 피부 광노화 개선 효과(18) 및 창상 치유 효과(19) 등과 관련하여 다양한 선행연구들이 보고된 바 있다. 그러나 야관문의 대장암에 관한 항암 효과와 apoptosis 유도 기전에 관한 연구는 전무한 실정으로 본 연구는 HT-29 인간 대장암세포에 야관문 에탄올 추출물을 처리함으로써 발생하는 apoptosis 유발 및 그에 관련된 기전을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 *Lespedeza cuneata* G. Don(야관문)은 식품의약품안전처 식품원재료 데이터베이스에서 식용으로 가능함을 확인한 약초로서 2013년 5월 광주광역시 광산구 월곡동 월곡시장(Gwangju, Korea) 구입하였다. HT-29는 인간 대장암 유래의 세포주로 한국세포주은행(Seoul, Korea)으로부터 분양을 받아서 사용하였다. 세포배양에 사용된 RPMI 1640 배지 및 0.25% trypsin-EDTA, fetal bovine serum(FBS), penicillin은 Gibco(Brooklyn, NY, USA)에서 구입하였다. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 Biosesang(Seongnam, Korea)에서 구입하였다. 1차 antibody 중 nuclear factor-kappa B(NF- κ B), poly(ADP-ribose) polymerase(PARP), caspase-3, Bax, Bcl-2는 Cell Signaling(Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. Interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), SIRT1, β -actin,

GAPDH는 Santa Cruz Biotechnology(Dallas, Texas, USA)에서 구입하였으며, 2차 antibody로 사용된 anti-mouse IgG-HRP, anti-goat IgG-HRP, anti-rabbit IgG-HRP도 Santa Cruz Biotechnology에서 구입하였다. 대부분의 chemical은 Biosesang에서 구입하였다.

추출물의 제조

본 연구에 사용된 야관문은 분말 건조 시료 g당 8배의 99.9% 에탄올을 가하여 환류냉각 50°C에서 2시간 교반하여 추출의 과정을 3번 거치고 여과하여 얻었으며 얻어진 추출액을 회전진공농축기(rotary vacuum evaporator, BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Switzerland)로 감압농축, 건조하여 고형물의 함량을 산출하였다. 야관문 에탄올 추출물 수율(%)은 [추출 분말의 무게(g)/ 처음 사용한 시료(g)] $\times 100$ 으로 계산하여 3.56%의 수율을 보였다. 사용 때까지 -20°C에서 보관하여 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 사용하였다.

세포배양

본 실험에서 사용한 HT-29 세포배양을 위해 사용한 RPMI 1640 배지에 10% FBS를 첨가하고 미생물의 오염이나 증식을 억제하기 위해 100 units/mL의 penicillin을 첨가한 다음 95%의 습도가 유지되는 37°C, 5% CO₂ incubator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA)에서 배양하였다. 세포가 80% 정도 dish를 덮으면 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 계대 배양하여 사용하고 passage 수치가 10이 넘어가면 폐기하였다.

세포사멸능 측정

야관문 에탄올 추출물의 HT-29 세포 증식억제 실험을 측정하기 위해 MTT assay를 실시하였다. HT-29 세포는 96 well plate에 1×10^5 cells/well의 양으로 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 그 후 배지를 제거한 다음 각 시료를 RPMI 1640 배지로 희석하여 대조군에는 시료 대신 PBS를 100 μ L씩 첨가하고 다른 각 well당 시료를 100 μ L씩 첨가한 후 다시 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 MTT(1 mg/mL) 용액을 각각 200 μ L씩 첨가하여 4시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 배양 후 formazan 형성을 현미경으로 관찰하고 바닥에 형성된 formazan 결정이 흐트러지지 않도록 주의하면서 모든 well의 배지를 제거하고 각 well에 DMSO 200 μ L씩 첨가한 후 ELISA reader를 이용하여 흡광도 570 nm에서 측정하였다. 이 흡광도는 MTT가 세포에 의해 환원된 양을 나타내며, 따라서 이 값은 각 well에 살아있는 세포수와 비례한다. 추출물을 처리하지 않은 세포를 대조군으로 0% 하였을 때의 상대적인 세포사멸능으로 나타내었다.

Immunoblot assay

HT-29 세포를 1×10^5 cells/dish의 밀도로 100 mm dish에 분주하여 24시간 안정화되도록 배양하였다. FBS free media로 교체해준 후 일정 농도의 야관문 에탄올 추출물을 처리하여 48시간 배양한 다음 cell pellet을 만들었다. Total cell lysate를 만들기 위해 세포를 ice-cold PBS로 헹구고, RIPA buffer[150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA(pH 8.0)]와 protease & phosphatase inhibitor cocktail, EDTA-free(Biosesang)를 첨가하여 교반하였다. 침전물은 10,000 rpm, 4°C, 10분간 원심분리 하여 제거한 후 상층액을 취해 whole cell lysate로 사용하였다. Nuclear lysate는 NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagent(Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 추출하였다.

Lysate의 단백질 농도는 BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL, USA)을 사용하여 정량하였다. Cell lysate를 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 분리한 후 nitrocellulose membrane(Invitrogen, CA, USA)에 이동시켰다. Membrane은 5% skim milk blocking buffer(20 mM Tris·Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween)에서 2시간 동안 blocking하고 1차 antibody(1:1,000~5,000 희석)를 상온에서 2시간 동안 교반하였다. 그 후 2차 antibody IgG-HRP를 첨가하여 2시간 동안 교반한 다음 ChemiDoc(BIO-RAD Laboratories, CA, USA)을 이용하여 각 단백질의 양을 탐색하였다. 단백질들의 band 강도는 ECL solution(Biosesang)을 사용하여 측정하였다. 분자량은 Broad-range pre-stained protein Marker(Elpisbio, Daejeon, Korea)와 비교·분석하였다.

DNA 분절 현상 측정

HT-29 세포에 야관문 추출물로 처리한 후 세포를 수거하여 원심분리 한 다음 상층액을 제거하였다. 상층액이 제거된 세포에 100 μ L PBS와 100 μ L 2 \times lysis buffer를 처리하여 ice bucket에서 30분간 반응시킨 다음 4°C, 14,000 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 상층액만을 취해 새로운 1.5 mL tube로 옮긴 다음 1.5 μ L의 RNase를 넣고 혼합한 후 37°C에서 45분 동안 반응시킨 다음 phenol : chloroform = 1:1을 400 μ L씩 첨가하고 14,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 80 μ L의 상층액을 추출하여 아주 차가운 1 mL의 100% 에탄올과 100 μ L의 10 M ammonium acetate를 넣고 -80°C에서 30분 이상 보관하였다. 그 후 4°C, 14,000 rpm에서 15분간 원심분리 한 후 상층액을 버리고 500 μ L의 70% 에탄올을 넣어 다시 4°C, 14,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상층액을 버리고 건조하여 DNA sample을 만들었다. 2 g의 agarose와 1 \times TAE 용액을 혼합하여 가열시키고 2% agarose gel을 만들었다. 이렇게 만들어진 DNA

sample을 gel에 loading 하고 전기영동시킨 후 ethidium bromide(EtBr)로 염색하여 UV 하에서 사진 촬영하여 DNA 분절 여부를 확인하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 적어도 3번 이상 반복실험 하였으며, 그 결과를 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 각 실험 결과의 통계적 유의성 검토는 시료가 포함되지 않은 대조군과 비교하여 Student's *t*-test에 의하여 판정하였으며 *P* 값이 0.05 미만일 때 유의성이 있다고 판단하였다.

결과 및 고찰

야관문 에탄올 추출물 처리에 의한 HT-29 암세포 성장억제에 관한 효과

최근 Park 등(20)에 의하면 행해진 인간 폐암 세포주(A549), 인간 자궁경부암 세포주(HeLa), 인간 간암 세포주(Hep3B) 및 마우스 복수암 세포주(sarcoma180)에서 야관문 에탄올 추출물이 암세포 증식을 억제하였음을 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 대장암에서의 야관문 에탄올 추출물의 효과를 확인하고자 하였다. 야관문 에탄올 추출물이 HT-29 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 야관문 에탄올 추출물을 0, 100, 250, 500, 1,000 μ g/mL 농도로 처리하고 48시간 동안 배양하여 MTT assay를 조사한 결과 Fig. 1A와 같이 암세포 성장억제율은 각각 27.93%, 38.43%, 48.93%, 59.43%로 나타났다. 대조군에서는 모든 세포에서 진한 보라색의 formazan이 형성되었으나, 야관문 추출물을 처리한 군에서는 시료 농도가 증가함에 따라 모든 세포에서 보라색이 감소하였고, 시료 농도 의존적으로 세포 사멸이 증가함을 확인할 수 있었다. HT-29 세포에서 야관문 에탄올 추출물의 세포 성장억제율 50% 저해하는 농도 IC₅₀ 값은 554.26 ± 8.81 μ g/mL로 확인하였다. 따라서 본 연구의 효능평가에서는 IC₅₀의 농도를 기준으로 4개의 농도를 사용하였다.

야관문 에탄올 추출물 처리에 의한 DNA 분절 유도에 관한 효과

HT-29 세포 증식억제의 기전을 연구하기 위해서 apoptosis가 일어날 때 나타나는 DNA 분절을 확인하였다. 야관문 에탄올 추출물에 의하여 HT-29 세포의 DNA 단편화를 관찰한 결과는 Fig. 1B와 같이 나타났다. 야관문 에탄올 추출물을 처리하지 않은 경우에는 DNA 분절이 관찰되지 않았지만 야관문 에탄올 추출물을 처리한 경우는 추출물 농도(0, 200, 400, 600 μ g/mL)가 증가함에 따라 DNA 분절 현상이 증가하여 apoptosis를 유도함을 확인하였다.

HT-29 세포의 caspase의 활성과 PARP의 발현에 야관문 에탄올 추출물 처리가 미치는 영향

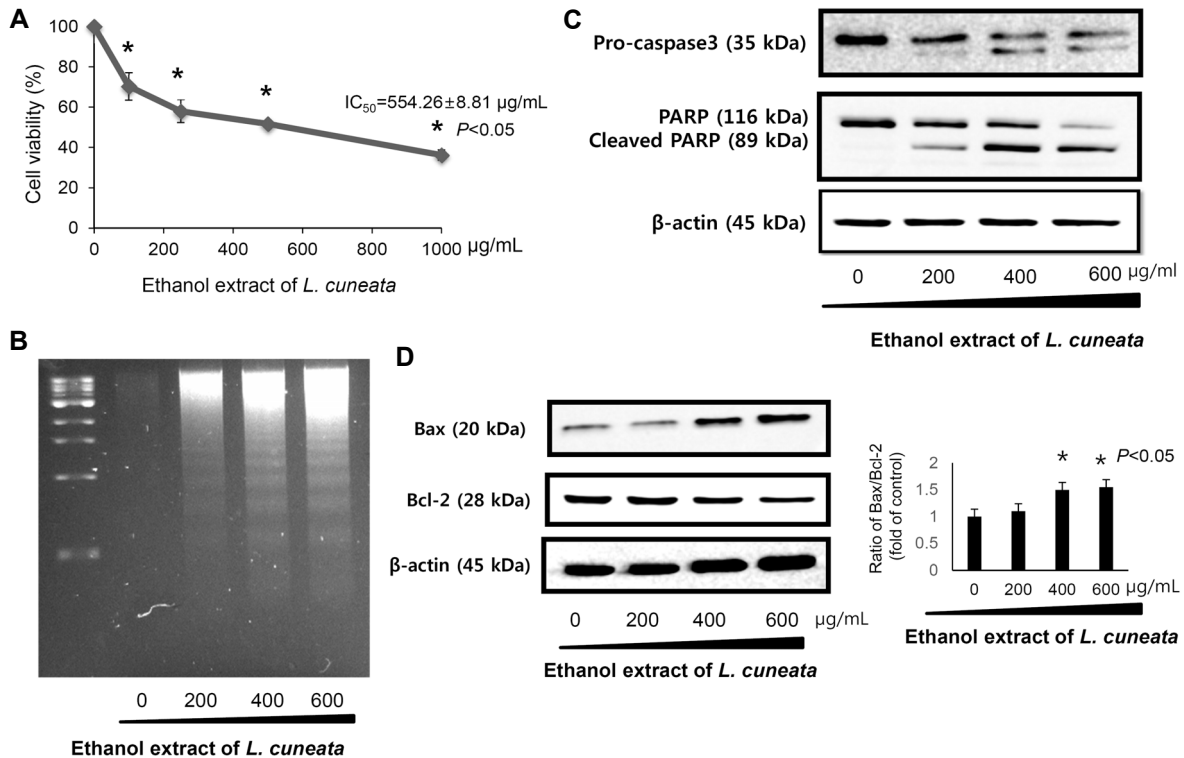


Fig. 1. Effect of *Lespedeza cuneata* extract on cell growth and apoptotic mechanism in HT-29 cells. (A) Effect of *L. cuneata* extract on the viability of HT-29 colorectal cancer cells. Cells were treated with various concentrations of *L. cuneata* extract for 48 h. Cells viability was measured by MTT assay. Mean±SD of three independent experiments. The significance was determined by a Student's *t*-test (* $P<0.05$). (B) Effect of *L. cuneata* ethanol extract on DNA fragmentation in HT-29 cells. HT-29 cells were treated with 0, 200, 400, 600 µg/mL *L. cuneata* ethanol extract for 48 h. DNA was extracted and analyzed by 2% agarose gel electrophoresis as described in Materials and Methods. (C) Effect of *L. cuneata* ethanol extract on PARP cleavage and caspase-3 activation in HT-29 cells. HT-29 cells were treated with 0, 200, 400, 600 µg/mL *L. cuneata* ethanol extract for 48 h, collected and then lysed. Lysates from the cells were subjected to immunoblot assay for pro-caspase 3, PARP and β-actin as estimated by immunoblot assay. (D) Effect of *L. cuneata* ethanol extract treatment to HT-29 cells on the expression of Bcl-2 family proteins and Bax/Bcl-2 ratio. Lysates from the cells were subjected to immunoblot assay for Bax, Bcl-2, and β-actin. Mean±SD of three independent experiments. The significance was determined by a Student's *t*-test (* $P<0.05$).

Apoptosis 경로는 extrinsic pathway와 intrinsic pathway로 나눌 수 있는데 extrinsic pathway 경우는 initiator caspase인 caspase-8이 활성화되고 이렇게 활성화된 caspase-8이 effector caspase-3을 직접 활성화해 apoptosis가 유도되는 과정이며, intrinsic pathway 경우는 미토콘드리아 의존적인 apoptosis 과정으로서 약물, 방사선 및 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS) 등과 같은 여러 가지 자극 때문에 미토콘드리아 외막에 존재하는 Bcl-2 family의 발현에 영향을 주게 되면 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential, MMP)의 변화가 유발되어 cytochrome c가 세포질로 방출이 되는 기전이다. 이렇게 방출된 cytochrome c는 apoptotic protease activating factor-1(Apaf-1) 및 pro-caspase 9와 결합하여 apoptosome을 형성하여 caspase 9와 3을 활성화해서 apoptosis를 유발한다(21-25). 암세포에서는 세포분열이 비정상적으로 왕성하여 apoptosis가 일어나지 않으며 이에 따라 PARP의 분절이 일어나지 않는다. 이러한 암세포에 항암효능이 있는 물질을 처리함으로써 비로소 PARP 분절을 확인할 수

있다. 야관문 에탄올 추출물 처리에 의한 caspase 활성화과 PARP의 분절을 확인하기 위하여 HT-29 세포에서 추출물을 0, 200, 400, 600 µg/mL 농도로 처리하고 48시간 배양한 후 immunoblot assay를 이용하여 확인한 결과, 야관문 추출물을 0, 200, 400, 600 µg/mL 농도로 처리하였을 때 pro-caspase 3의 발현이 처리농도에 의존적으로 감소하였음을 확인할 수 있었으며, 89 kDa의 PARP의 cleavage가 관찰되는 것을 알 수 있었다(Fig. 1C). 따라서 야관문 추출물에 의해 pro-caspases 3의 발현 감소와 PARP cleavage를 관찰함에 따라 HT-29 세포의 apoptosis가 유도됨을 확인할 수 있었다. Kim 등(26)에 의한 연구에 따르면 지모 에탄올 추출물의 처리농도에 따라서 농도 의존적으로 HT-29 세포의 pro-caspase 3 발현을 감소시키고 PARP의 분절을 유도함을 보고하였다. 또한, Lee 등(27)의 연구에서도 HT-29 세포에서 속수자 추출물이 pro-caspase 3을 농도 의존적으로 감소시키고 PARP 분절을 유도함을 확인하였다. 본 연구에서 사용된 야관문 에탄올 추출물도 위의 식물 추출물의 연구들과 유사한 결과 추세를 보여주었다.

HT-29 세포의 Bcl-2와 Bax의 발현에 야관문 에탄올 추출물 처리가 미치는 영향

Bcl-2 family에 속하는 Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Bax, Bad, Bak, Bid, Bcl-xs 등은 apoptosis의 경로를 조절하는 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(27). Apoptosis 유발 조절인자로 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2는 apoptosis의 유도를 억제하는 기능을 가지며, pro-apoptotic 단백질인 Bax는 apoptosis의 유도 촉진과 관계가 있다(22). 본 실험에서는 apoptosis의 intrinsic pathway의 Bcl-2와 Bax 단백질들의 변화를 확인하였다. 야관문 에탄올 추출물 처리에 의한 Bcl-2 및 Bax의 발현 정도를 확인하기 위하여 HT-29 세포에서 추출물을 0, 200, 400, 600 µg/mL 농도로 처리하고 48시간 배양한 후에 immunoblot assay를 이용하여 결과를 확인하였다(Fig. 1D). 야관문 추출물을 농도별로 처리하였을 때 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2 단백질 발현은 감소하였으며 pro-apoptotic 단백질 Bax의 발현 수준은 증가하는 것으로 확인하였다. 이러한 결과는 기타 추출물 연구(28,29)의 HT-29 세포에서 Bcl-2 및 Bax의 발현 양상과 비슷한 결과를 보이는 것으로 확인하였다.

염증성 사이토카인과 특정 유전자 발현에 야관문 에탄올 추출물 처리가 미치는 영향

사이토카인은 대식세포와 단핵구를 포함하는 다양한 세포에서 생성되며, 감염에 대한 반응으로 합성되어 방출된다. 전염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-6 등은 급성기 반응에서 중요한 역할을 하며 다량 생산될 경우 염증반응에 관련된 제반 증상을 발현시킨다(30). 전염증성 사이토카인은 면역계를 자극하는 염증유발인자로 종양의 침습에도 관련이 있다고 알려져 있다(31). 야관문 에탄올 추출물 처리에 의한 염증 관련 유전자 발현의 영향을 확인하기 위하여 HT-29 세포에서 추출물을 0, 200, 400, 600 µg/mL 농도로 처리하고 48시간 배양한 후에 immunoblot assay를 이용하여 확인하였다. Fig. 2A에 제시한 바와 같이 IL-6와 TNF-α는 야관문 에탄올 추출물 처리에 따라서 농도 의존적으로 감소

하는 것을 확인할 수 있었고, 염증성 사이토카인의 전사인자인 NF-κB의 발현이 HT-29 세포 핵 내에서 추출물의 농도에 의존적으로 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). NF-κB는 면역과 염증반응을 조절하는 전사조절인자로서 세포 증식이나 변형과 관련되는 세포신호를 전달하여 TNF-α와 같은 pro-inflammatory cytokine 등과 같은 다양한 자극 때문에 활성화되어 세포의 immortalization, proliferation, apoptosis 및 inflammation 등에 관여하는 유전자의 발현을 조절하고 NF-κB의 과도한 활성화는 암을 포함한 다양한 질병 유발과 연관되어 있다(32,33).

야관문 에탄올 추출물 처리가 HT-29 세포의 SIRT1 발현에 미치는 영향

인간에 존재하는 sirtuin 단백질 중 하나인 SIRT1은 핵에 존재하는 단백질로 히스톤과 비히스톤 단백질을 탈아세틸화하여 항염증 등 작용을 한다고 알려져 있는데, 최근 항암제 등 치료제의 타겟으로 연구가 활발히 진행되고 있다(34). 야관문 에탄올 추출물 처리에 의한 SIRT1의 활성을 확인하기 위하여 HT-29 세포에 추출물을 0, 200, 400, 600 µg/mL 농도로 처리하고 48시간 배양한 후에 immunoblot assay를 이용하여 결과를 확인하였다. Fig. 3에 제시한 바와 같이 야관문 에탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 SIRT1 단백질 발현이 증가하였다. 이러한 비슷한 경향성은 여러 추출물 연구에서 찾아볼 수 있는데 최근 *Brunfelsia grandiflora* 추출물이 인간 폐암 섬유아세포(IMR 90)에서 독성이 없는 경우는 SIRT1 발현이 증가하는 것으로 보고하였고(35), Kim 등(36)에 의한 연구에 따르면 metformin과 한약재 추출물들을 함께 처리한 군에서 처리하지 않은 군들에 비해 SIRT1과 p-AMPK의 발현이 증가한 것을 알려져 있다.

지금까지 야관문에 관한 연구로는 종자의 열수 및 에탄올 추출물의 항산화 활성, 미네랄, 아미노산, 비타민 분석만이 보고되고 있으며, 일 추출물에는 C-glycosylflavone 화합물인 isoerictin, isovitexin 등과 quercetin, kaempferol,

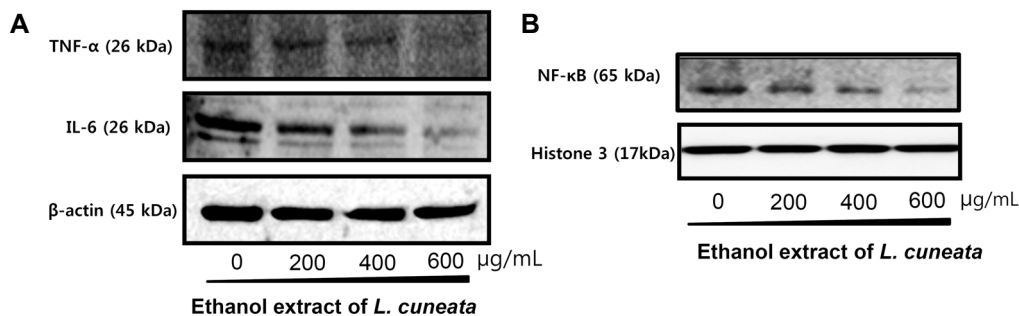


Fig. 2. Effect of *L. cuneata* ethanol extraction the expression anti-tumor-related proteins HT-29 cells. (A) Effect of *L. cuneata* ethanol extract on inflammatory related genes TNF-α and IL-6 in HT-29 cells. HT-29 cells were treated with 0, 200, 400, 600 µg/mL *L. cuneata* ethanol extract for 48 h, collected and then lysed. Lysates from the cells were subjected to immunoblot assay for TNF-α, IL-6, and β-actin as estimated by immunoblot assay. (B) Effect of *L. cuneata* ethanol extract of activation of NF-κB in HT-29 cells. HT-29 cells were treated with 0, 200, 400, 600 µg/mL *L. cuneata* ethanol extract for 48 h, collected and then lysed. Lysates from the cells were subjected to immunoblot assay for NF-κB and Histone 3.

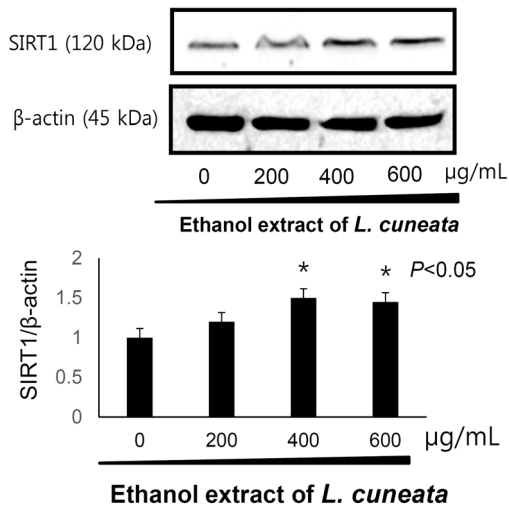


Fig. 3. Effect of *L. cuneata* ethanol extract on SIRT1 activation in HT-29 cells. HT-29 cells were treated with 0, 200, 400, 600 µg/mL *L. cuneata* ethanol extract for 48 h, collected and then lysed. Lysates from the cells were subjected to immunoblot assay for SIRT1 and β-actin. Specific band intensities were measured using a densitometer and SIRT1 induction was calculated as SIRT1/β-actin ratio. Mean±SD of three independent experiments. The significance was determined by a Student's *t*-test ($P<0.05$).

vitexin, avicularin 등이 보고되고 있다(37). 최근의 야관문 연구로는 야관문 추출물의 항산화 효과(14), 혈당강하 효과(15,16), 세포보호 효과(16), 인슐린 분비 촉진 효과(16), 미백 효과(17), 자외선 노출에 의한 피부 광노화 개선 효과(18) 및 창상 치유 효과(19) 등 다양한 선행연구들이 있다. 그러나 야관문의 대장암에 관한 항암 효과와 apoptosis 유도 기전에 관한 연구는 전무한 실정므로 본 연구는 HT-29 인간 대장암세포에 야관문 에탄올 추출물을 처리함으로써 발생하는 apoptosis 유발 및 그에 관련된 기전을 확인하고자 하였다. 본 연구에서 도출된 연구 결과들을 종합해보면 야관문 에탄올 추출물이 HT-29 세포의 증식을 억제하고 이의 기전은 apoptosis로 확인되어 야관문은 식품학적 활용으로써 대장암의 예방이나 치료에 이용 가능한 소재라는 것을 확인할 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 야관문 에탄올 추출물의 인체 대장암세포 성장억제 효능 및 그 기전을 연구하였다. 야관문 에탄올 추출물을 0, 200, 400, 600 µg/mL 농도로 48시간 처리하여 암세포 증식억제 효과를 측정된 결과 농도 의존적으로 감소하는 것으로 확인하였다. HT-29 세포에 대한 야관문 추출물의 IC₅₀ 값은 554.26±8.81 µg/mL로 확인되었다. 또한 야관문 에탄올 추출물을 처리한 HT-29 세포에 대한 세포 성장억제 기전을 확인한 결과 pro-caspase 3의 발현이 감소함에 따라 PARP의 분절 및 DNA 분절을 확인하고 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2를 감소시켰으며 pro-apoptotic 단백

질인 Bax의 수준을 증가시키는 것으로 확인하였다. 염증 관련 유전자 TNF-α, IL-6 그리고 그의 전사인자인 NF-κB는 야관문 에탄올 추출물 처리농도에 의존적으로 감소하는 것으로 확인하였고 유전자 SIRT1의 발현량도 증가하는 것으로 확인하였다. 그 결과 야관문 에탄올 추출물 처리에 따라서 HT-29의 세포 성장억제가 확인되어 apoptosis를 유도하는 것으로 확인되었고, 이러한 연구 결과는 야관문이 기능성 소재로서 기초적 데이터베이스로 활용될 수 있을 것으로 생각되며 앞으로 더욱더 야관문의 질병에 대한 효능 및 기전 연구가 지속하여야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2014년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(NRF-2014R1A1A2059288).

REFERENCES

1. Statistics Korea. 2015. 2014 Cause of death statistics. Statistics Korea, Daejeon, Korea.
2. Novotny L, Szekeres T. 2003. Cancer therapy: new targets for chemotherapy. *Hematology* 8: 129-137.
3. Gustin DM, Brenner DE. 2002. Chemoprevention of colon cancer: current status and future prospects. *Cancer Metastasis Rev* 21: 323-348.
4. Kim HS, Yu TS, Lee IS, Kim YW, Yeo SH. 2003. Screening of the antimicrobial and antitumor activity of *Xanthium strumarium* L. extract. *Korean J Biotechnol Bioeng* 18: 55-61.
5. Lee WK, Kim SJ. 2011. Sulforaphane-induced apoptosis was regulated by p53 and caspase-3 dependent pathway in human chondrosarcoma, HTB-94. *J Life Sci* 21: 851-857.
6. Lowe SW, Lin AW. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21: 485-495.
7. Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H. 2000. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 60: 3823-3831.
8. Song G, Mao YB, Cai QF, Yao LM, Ouyang GL, Bao SD. 2005. Curcumin induces human HT-29 colon adenocarcinoma cell apoptosis by activating p53 and regulating apoptosis-related protein expression. *Braz J Med Biol Res* 38: 1791-1798.
9. Park KU, Kim JY, Seo KI. 2009. Antioxidative and cytotoxicity activities against human colon cancer cells exhibited by edible crude saponins from soybean cake. *Korean J Food Preserv* 16: 754-758.
10. Boo YC, Jeon CO. 1993. Antioxidants of Theae Folium and Moutan Cortex. *J Korean Agric Chem Soc* 36: 326-331.
11. Do JR, Kim KJ, Jo JH, Kim YM, Kim BS, Kim HK, Lim SD, Lee SW. 2005. Antimicrobial, antihypertensive and anticancer activities of medicinal herbs. *Korean J Food Sci Technol* 37: 206-213.
12. Kwon DJ, Kim JK, Ham YH, Bae YS. 2007. Flavone glycosides from the aerial parts of *Lespedeza cuneata* G. Don. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 50: 344-347.
13. Numata A, Hokimoto K, Yamaguchi H. 1980. C-Glycosylflavones in *Lespedeza cuneata*. *Chem Pharm Bull* 28: 964-965.

14. Kim SJ, Kim DW. 2007. Antioxidative activity of hot water and ethanol extracts of *Lespedeza cuneata* seeds. *Korean J Food Preserv* 14: 332-335.
15. Kim MS, Min OJ, Rhyu DY. 2008. Effect of *Lespedeza cuneata* extracts on diabetes and diabetic nephropathy. *Korean J Plant Resour* 4: 83.
16. Choi JS, Cho CS, Kim CJ. 2010. Cytoprotective effect of *Lespedeza cuneata* extract on glucose toxicity. *J Korean Oriental Med* 31: 79-100.
17. Cho EJ, Ju HM, Jeong CH, Eom SH, Heo HJ, Kim DO. 2011. Effect of phenolic extract of dry leaves of *Lespedeza cuneata* G. Don on antioxidant capacity and tyrosinase inhibition. *Kor J Hort Sci Technol* 29: 358-365.
18. Jung HK, Choi MO, Kim BJ, Jo SK, Jeong YS. 2014. Improving the efficacy of *Lespedeza cuneata* ethanol extract on ultraviolet-induced photoaging. *Korean J Food Preserv* 21: 264-275.
19. Jung HK, Kim KS, Jung YS. 2014. Wound healing effects of *Lespedeza cuneata* extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 374-380.
20. Park HM, Hong JH. 2014. Physiological activities of *Lespedeza cuneata* extracts. *Korean J Food Preserv* 21: 844-850.
21. Baliga B, Kumar S. 2003. Apaf-1/cytochrome *c* apoptosome: an essential initiator of caspase activation or just a side-show?. *Cell Death Differ* 10: 16-18.
22. Donovan M, Cotter TG. 2004. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta* 1644: 133-147.
23. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. 1999. An APAF-1·cytochrome *c* multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274: 11549-11556.
24. Letai A. 2005. Pharmacological manipulation of Bcl-2 family members to control cell death. *J Clin Invest* 115: 2648-2655.
25. Bratton SB, Walker G, Srinivasula SM, Sun XM, Butterworth M, Alnemri ES, Cohen GM. 2001. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO J* 20: 998-1009.
26. Kim TH, Kim PH, Jeon BK, Yoon JR, Woo WH, Mun YJ, Lee JC, Lee BK, Park YG, Lim KS. 2011. Effect of *Anemarrhenae Rhizoma* ethanol extract on apoptosis induction of HT-29 human colon cancer cells. *J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol* 24: 16-24.
27. Lee JH, Jung SJ, Park YK. 2007. Effects of *Euphorbia lathyris* Semen on cell apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *Kor J Herbology* 22: 65-72.
28. Guon TE, Chung HS. 2014. Effects of *Nelumbo nucifera* root extract on proliferation and apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *J East Asian Soc Diet Life* 24: 20-27.
29. Jeong MW, Jeong JK, Kim SJ, Park KY. 2013. Fermentation characteristics and increased functionality of doenjang prepared with bamboo salt. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1915-1923.
30. Lee H, Jung JY, Hwangbo M, Ku SK, Kim YW, Jee SY. 2013. Anti-inflammatory effects of *Lespedeza cuneata* in vivo and in vitro. *Kor J Herbology* 28: 83-92.
31. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. 2003. Production of tumor necrosis factor- α , interleukin 1- β , interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides* 37: 355-361.
32. Hayden MS, Ghosh S. 2004. Signaling to NF- κ B. *Genes Dev* 18: 2195-2224.
33. Silverman N, Maniatis T. 2001. NF- κ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev* 15: 2321-2342.
34. Haigis MC, Guarente LP. 2006. Mammalian sirtuins—emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev* 20: 2913-2921.
35. Nam H, Kim MM. 2014. The effect of *Brunfelsia grandiflora* ethanol extract on the induction of autophagy in human lung fibroblasts. *J Life Sci* 24: 837-842.
36. Kim HG, Wang JH, Chae HS, Chin YW, Choi HS, Kim H. 2014. Screening of herbal medicines for synergistic effects of Metformin and herbal extracts combination in RAW 264.7 cells. *J Korean Med Obes Res* 14: 13-23.
37. Ding JL, Lim IJ, Lee HD, Cha WS. 2006. Analysis of minerals, amino acids and vitamin of *Lespedeza cuneata*. *Korean J Biotechnol Bioeng* 21: 414-417.