

Anti-cancer Effects of Cultivated *Orostachys japonicus* on Human Colon Cancer Cell Line SW480

Sookyoung Park^{1,2,3}, Jinyoung Won^{2,3,4}, Kanghui Park⁵ and Yonggeun Hong^{1,2,3,4*}

¹Department of Physical Therapy, College of Healthcare Medical Science & Engineering, Inje University, Gimhae 50834, Korea

²Biohealth Products Research Center (BPRC), Inje University, Gimhae 50834, Korea

³u-Healthcare & Anti-aging Research Center (u-HARC), Inje University, Gimhae 50834, Korea

⁴Department of Rehabilitation Science, Graduate School, Inje University, Gimhae 50834, Korea

⁵Department of Physical Therapy, Dong Ju College, Busan 49318, Korea

Received February 1, 2018 / Revised April 1, 2018 / Accepted April 27, 2018

Orostachys japonicus (OJ) is a medicinal herb with immunoregulatory, anti-aging, anti-oxidative, and many other therapeutic properties. The purpose of this study was to elucidate the anti-cancer property of cultivated OJ. SW480 cell viability was significantly reduced by cumulative exposure to OJ extract. We also observed inhibitory effects of OJ after 72 hr through the growth and migration of SW480 cells using scratch assay. SW480 cells in OJ-free medium began to move into the scratch site at 24 hr; however, cells in medium containing OJ did not migrate into the scratch site until 48 hr. Male C57BL/6 mice (4 weeks old) were orally administered OJ extract for 31 days before injection of SW480 cells. At 7, 14, and 28 days after subcutaneous injection of SW480 cells, tumor weight and volume were analyzed. The body weight of the OJ-treated group was continuously increased during administration of the OJ extract relative to the control group. Injection of SW480 cells caused a reduction in body weight in all groups; however, the OJ-treated group exhibited a significant increase in body weight after 14 days. Tumor weight and volume were lower in the OJ-treated group than in the control group after 28 days. Although these results suggest that OJ suppresses the proliferation and migration of human colon cancer cells, additional studies are required to provide preclinical evidence before launching clinical trials evaluating OJ as an anti-cancer biohealth product.

Key words : Anti-cancer effect, cancer cell migration, human colon cancer cells, *Orostachys japonicus*

서 론

대장암(Colorectal cancer)은 결장과 직장에 유발하는 가장 흔한 악성종양으로, 대장의 점막에서 발생하는 선암이 대부분이며[6], 2016년 대장암으로 인한 인구 10만명 당 사망률(16.5명)은 위암으로 인한 사망률(16.2명)보다 처음으로 높게 보고되었다[36]. 대장암은 연간 6.0%의 변화율(Annual Percent Change, APC)로 발생률이 점차 증가하는 추세를 보이고 있으며[10], 대장암으로 인한 사망률은 고령일수록 증가하므로[36], 국내 인구고령화 추세를 고려할 때 대장암으로 인한 사망률은 향후 더욱 증가할 것으로 예상된다. 최근 대장암 진단방법과 외과적 수술기법의 발전으로 근치적 절제율이 약 80%에 육박하고 있음에도 불구하고, 이 중 절반에 이르는 환자들이

국소재발 또는 원격전이에 의해 사망하고 있어 5년 생존율은 약 50% 정도로 보고되고 있다[35]. 또는 종양 부위를 외과적 처치방법으로 제거하더라도, 미세 전이병소가 이미 존재하거나, 후에 서서히 성장하여 전이병소로 뒤늦게 발견되는 경우는 치료가 불가능하므로 암전이의 억제와 효과적인 전이병소의 치료는 종양 관련 연구의 궁극적인 목표가 되고 있다[6, 35]. 이에 따라 대장암의 치료 및 재발과 전이 방지를 위해 다양한 치료기법과 항암제 개발에 대한 연구가 진행되고 있지만[6, 10, 35], 여전히 면역기능저하, 유전자 손상, 탈모 및 체중 감소와 같은 부작용을 동반하고 있으므로[13], 효과적인 치료에 많은 어려움이 있는 실정이다. 최근 들어, 안전하면서 동시에 항암 치료 효과가 높은 천연 항암제에 관한 관심이 증가하고 있으며, 현재 안전성이 높은 생리활성물질 발굴 및 이를 이용한 기능성 식품 및 의약품 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다[30].

와송(*Orostachys japonicus* A. Berher)은 둥근바위솔, 암송, 옥송, 등의 명칭으로 알려져 있는 돌나무과의 다년생 초본식물로서, 바위, 지붕, 및 고산지역의 암석 등에서 주로 발견되며, 오래된 기와지붕에 붙어서 자라는 소나무잎 또는 꽃과 유사하여 와송 및 와화라는 명칭을 가진다[7, 13, 23]. 와송에 함유되어 있는 다양한 phytochemical에는 벤조산 유도체인

*Corresponding author

Tel : +82-55-320-3681, Fax : +82-55-329-1678

E-mail : yonghong@inje.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.

methyl gallate 등의 페놀산류 4종, kaempferol, quercetin, iso-quercitrin, kaempferol-3-O- β -D-glucoside 등의 Flavonoid류 8종 등의 성분이 알려져 있으며[5, 29, 41], fatty acid ester [28], triterpene, friedelin, epi-friedelanol, glutinone, glutinol 등의 Triterpenoid류, β -sitosterol, campesterol 등의 Sterol류[8, 27] 및 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid 등의 Aromatic acid류, gallic acid 등의 Tannin 계열 성분들을 포함하고 있다[1, 40]. 와송은 이러한 다양한 생리활성 성분들 때문에 면역[17], 항산화[4, 12, 19, 21], 항균[40], 항고지혈증[15], 항비만[20], 항당뇨[22, 42], 항염증[18], 및 항암[39] 등의 약리적 효과를 가지고 있는 것으로 보고되고 있다. 또한 최근 연구에 따르면, 와송 추출물은 인체대장암세포주 HT-29 및 SW480에서 세포주기 억제와 세포사멸을 유도하여 암세포 증식을 저해하며[3, 13, 31], 인간 급성 전골수성백혈병세포주인 HL-60 세포에서 p53 단백질 발현을 통해 세포사멸을 유도하는 것으로 보고되고 있다[26]. 이외에도 위암, 간암, 자궁경부암 및 폐암 세포, 전립선암 등 다양한 암세포의 세포 성장 억제 효과 및 세포사멸 유도 효과에 대한 연구들이 보고되고 있다[14, 32, 33, 39]. 와송의 생리활성 성분 중, 항암효과와 밀접한 관련성을 가지는 대표적 물질로는 Triterpenoid계열의 triterpene과 Flavonoid가 알려져 있는데, 와송의 triterpene은 동맥경화를 예방하고, 해독 및 항암작용을 유도하며[5, 8, 27], Flavonoid는 항암 및 항염증 작용에 관여할 뿐만 아니라, 대사과정에서 발생하는 산화물질을 억제하는 항산화 작용과도 관련 있는 것으로 보고되고 있다[5, 29, 41]. 또한 Flavonoid류의 하나인 quercetin은 혈당강하에 효과적이며, 혈중 콜레스테롤 및 중성지방의 감소, 췌장으로부터 인슐린 분비를 촉진시키는 것으로 알려져 있다[25, 38]. 이와 같은 Flavonoid가 와송에 얼마나 함유되어 있는지 알아보기 위해, 와송을 용매별로 추출한 후 Flavonoid의 함량을 비교한 결과, 70% ethanol 추출물, 70% methanol 추출물, CM (Chloroform:Methanol, 2:1, v/v) 추출물, DW 추출물 순으로 높게 나타났으며, 와송추출물의 농도가 올라갈수록(0.2~0.6 mg/ml) 항산화 기능 역시 증가하였다[8]. Flavonoid는 Flavonol (quercetin, fisetin, kaempferol), Flavone, Isoflavone (daidzein, biochanin A), Flavanol (epicatechin 3-gallate) 등 여러 형태의 생리활성물질이 있어 용매에 따라 추출되는 정도가 다르다고 알려져 있지만[34], 물을 이용한 와송열수추출물 역시 Flavonoid 성분을 함유하고 있으며, 이는 식품 내 대표적인 발암물질로 알려진 NDMA 생성 억제 작용 및 전구물질인 아질산염 소거 작용을 나타내는 것으로 확인되었다[5]. 또한 국내의 자생식물 추출물에 대한 Flavonoid 함량을 비교했을 때, 울금, 범부채, 뽕나무, 민들레 등보다 와송의 함량이 유의하게 높게 확인됨으로써[11], 생약자원 및 천연 항산화제로 응용할 가능성이 높은 것으로 사료된다. 이와 같이 와송은 다양한 약리적 효과를 가진 천연 소재임에도 불구하고, 특이적 생육조건 및 환경오염 등

으로 인해 최근에는 야생 와송을 찾아보기가 쉽지 않다. 따라서 근래에는 대량으로 와송을 재배하여 제공하는 추세에 있지만, 재배 와송이 야생 와송과 같은 항암 및 생리활성작용을 가지는지에 대한 연구가 더욱 필요한 실정이다. 이에 본 연구에서는 인체대장암세포주 중의 하나인 SW480에서 재배 와송 열수추출물이 암세포 성장과 전이 억제에 어떠한 효능을 가지는지 알아보고자 하였다. 특히, 와송열수추출물을 사전에 섭취한 실험동물에게 피하로 대장암세포를 주입하였을 때 종양형성이 억제되는지 살펴봄으로써, 와송의 종양형성 억제효과를 검증하고자 하였다. 본 연구의 결과를 통해 효과적인 항암제로서 재배 와송의 이용 가능성을 검토하고, 암 예방을 위한 기능성 식품 개발에 활용할 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

와송 시료의 추출

본 실험에서 사용한 와송(*Orostachys japonicus* A. Berher)은 충청남도 논산에서 노지 재배한 것으로, 건조된 와송을 파쇄한 후, 90~100°C에서 3시간 동안 2회 반복하여 열수추출을 시행하였다. 상층의 추출물을 여과 및 농축 시킨 다음 동결건조하였고, 본 실험에서는 이상과 같이 정제수를 이용하여 추출한 와송열수추출물(갈마산 와송농장, 논산, 한국)을 구입하여 *In vitro* 실험과 *In vivo* 실험에 각각 시료로 사용하였다.

세포배양 및 시료의 처리

본 실험에서 사용한 인체대장암세포주 SW480은 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, KCLB)으로부터 분양받아 1% Penicillin/Streptomycin (Lonza, MD, USA)과 10% Fetal Bovine Serum (Hyclone, UT, USA)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Lonza, MD, USA)을 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하여 사용하였다. 세포 배양을 위해 Phosphate Buffered Saline (Lonza, MD, USA)을 이용하여 2일 간격으로 수세하였고, 세포의 Confluency가 80~90%에 도달하였을 때 Trypsin mixture (0.25% Trypsin, 0.53 mM EDTA) (Lonza, MD, USA)을 이용하여 계대 배양하여 사용하였다. 인체대장암세포주 SW480에 대한 와송의 효과를 알아보기 위하여, 와송열수추출물을 Whatman filter paper (GE Healthcare, PA, USA)로 1차 여과한 다음, 0.45 μ m pore의 Minisart® high flow syringe filters (Sartorius stedim, Germany)로 2차 여과 처리하였다. 여과된 와송열수추출물을 1 \times , 2 \times 의 농도로 SW480 세포에 24시간 간격으로 72시간까지 처리하였다(Fig. 1A).

대장암세포 사멸능 측정 및 형태학적 변화 관찰

인체대장암세포주 SW480에 대한 와송의 세포사멸능 효과를 알아보기 위해 6-well plate에 3 \times 10⁵개의 SW480 세포를 분

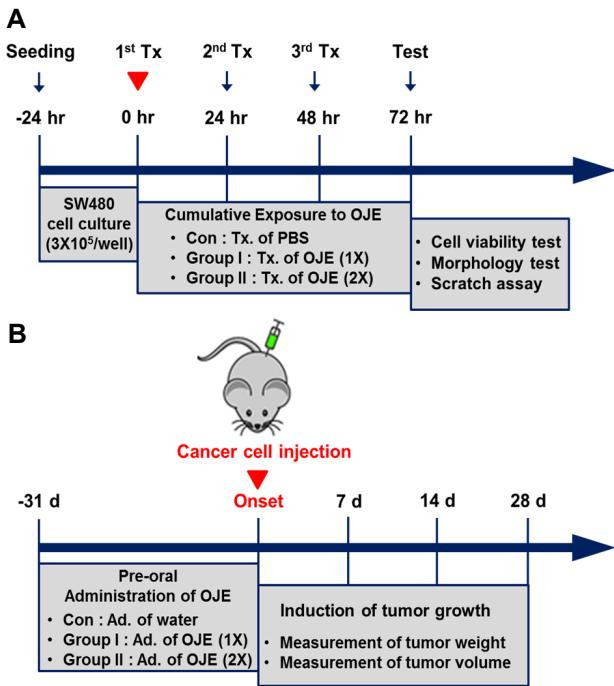


Fig. 1. Experimental scheme of the present study. (A) *In vitro* experimental design, and (B) *In vivo* experimental design.

주한 다음, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 1×, 2×의 외송열수추출물을 24시간 간격으로 누적 처리하여 72시간까지 반응시켰고, 대조군에는 같은 양의 PBS를 첨가하였다. 반응 종료 후 세포를 수거하여 원심분리한 다음, 0.4% Trypan blue (NanoEnTek, Seoul, Korea)로 염색하고 EVE™ Automatic Cell Counter (NanoEnTek, Seoul, Korea)에서 세포수를 측정하여 사멸능을 분석하였다. 외송에 의한 SW480 세포의 형태학적 변화는 0, 24, 48, 72시간에서 100×, 200× 배율의 광학현미경(CK2, Olympus, Japan)을 이용하여 관찰하고 촬영하였다.

세포 이동 분석(Cell migration assay)

인체대장암세포주 SW480의 증식 억제능에 대한 외송의 효과를 알아보기 위해 6-well plate에 3×10⁵개의 SW480 세포를 분주하고, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 다음, 0.5 mm tip size의 6-well plate Scratcher (Cat. No. 201906, SPL Scar™ Scratcher, Seoul, Korea)를 이용하여 직선의 스크래치를 만들었다. 이후 PBS로 세포를 수세한 다음, 1×, 2×의 외송열수추출물을 첨가한 DMEM에서 세포를 배양하였다. 외송열수추출물은 24시간 간격으로 누적 처리하여 72시간 동안 반응시켰고, 대조군에는 같은 양의 PBS를 첨가하였다. 스크래치 gap의 변화를 0, 24, 48, 72시간에서 40× 배율의 광학현미경으로 관찰 및 촬영한 다음, Image J program ver. 1.6 (NIH, Bethesda, MD, USA)을 이용하여 gap의 넓이 변화를 분석하였다.

실험동물 및 시료의 경구섭취

본 실험에서는 4주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 구입하여 (효창, 대구, 한국), 12시간 간격의 빛 주기(12 hr/12 hr, Light/Dark), 온도 및 습도가 조절되는 동물장에서 사육 및 관리하였다. *In vivo*에서 인체대장암세포주 SW480 증식에 대한 외송의 예방효과를 알아보기 위하여, SW480 세포 주사 전에 실험동물에게 외송열수추출물을 31일 동안 경구로 자유 섭취하게 하였다. 외송열수추출물은 체중 60 kg 성인에게 권장하는 하루 섭취량을 마우스의 체중에 대비하여 환산한 다음, 이를 마우스가 하루 평균 섭취하는 물의 양에 희석하여 제공하였다. 실험군 I은 하루 권장량(1×)을, 실험군 II는 하루 권장량의 두 배(2×)를 섭취하게 하였고, 대조군은 동량의 물을 제공하였다. 외송열수추출물을 섭취하는 31일 동안 2일 간격으로 체중의 변화를 측정하여 비교 분석하였다. 이후 생체 내 종양 유발을 위하여 인체대장암세포주 SW480을 피하로 주입하였고, 체중의 변화와 종양의 형성과정을 세포 주입 후 7일, 14일, 그리고 28일에서 확인 및 측정하였다(Fig. 1B). 본 연구의 계획과 방법은 인체대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)에서 제공하는 심의규정(승인번호 2016-22)에 준하여 진행되었다.

대장암세포 주사 및 종양의 형성

Isoflurane을 이용한 흡입 마취 하에서 양쪽 옆구리의 털을 제거하고 SW480 세포(1×10⁷개/100 μl)를 1cc 주사기(26-gage needle)에 넣은 다음, 피하로 주사하여 종양의 크기를 육안으로 확인할 수 있게 하였다. SW480 세포를 양쪽 옆구리에 주입하고 난 이후, 28일까지 종양의 형성과정을 관찰하였다. 미리 섭취한 외송이 종양의 유발을 억제하는 예방효과가 있는지 알아보기 위하여, 피하에 형성된 종양의 무게 및 부피를 SW 480 세포 주입 후 7, 14, 28일에서 실험동물을 희생하여 측정 및 분석하였다. 각 실험군에서 분리한 종양조직의 장축(Major axis), 단축(Minor axis) 및 높이를 microcaliper를 이용하여 측정하고 아래의 식에 따라 종양의 부피를 계산하였다[9, 37].

$$\text{Tumor volume (mm}^3\text{)} = (\text{Major axis}) \times (\text{Minor axis}) \times (\text{Height}) \times 0.52$$

통계처리

반복실험을 통해 얻어진 실험결과는 SPSS Version 20.0 (IBM SPSS Inc, Armonk, NY, USA)을 사용하여 분석하였고, One-way ANOVA와 Repeated two-way ANOVA를 통해 통계적 유의성을 p<0.05 수준에서 검증하였다. 실험군 간의 차이를 비교하기 위해, Duncan’s multiple range test를 실시하였고, 모든 결과는 평균 및 표준편차로 표시하였다.

결과 및 고찰

와송의 대장암세포 성장 억제 효과

와송의 SW480 세포 사멸 효과를 알아보기 위하여, SW480 세포에 와송열수추출물을 농도별로 처리하여 72시간까지 반응시킨 다음, 세포를 수거하여 trypan blue로 염색하고 세포수를 분석하였다. 와송열수추출물은 처리 농도에 비례하여 SW480 세포의 생존율을 유의하게 억제하였다($p=0.006$, $p<0.01$). 대조군의 생존율과 비교하였을 때, 실험군 I의 생존율은 86.8%로 유의하게 낮았고($p<0.05$), 실험군 II의 생존율은 82.7%로 더욱 유의하게 나타났다($p<0.05$)(Fig. 2A). 또한, 와송에 의한 SW480 세포의 형태학적 변화를 알아보기 위해, 와송열수추출물을 SW480 세포에 처리한 후 72시간 동안 24시간 간격으로 관찰 및 분석하였다. PBS를 처리한 대조군에서는 세포가 안정적으로 부착되어 정상적인 증식이 이루어진 모습을 보였

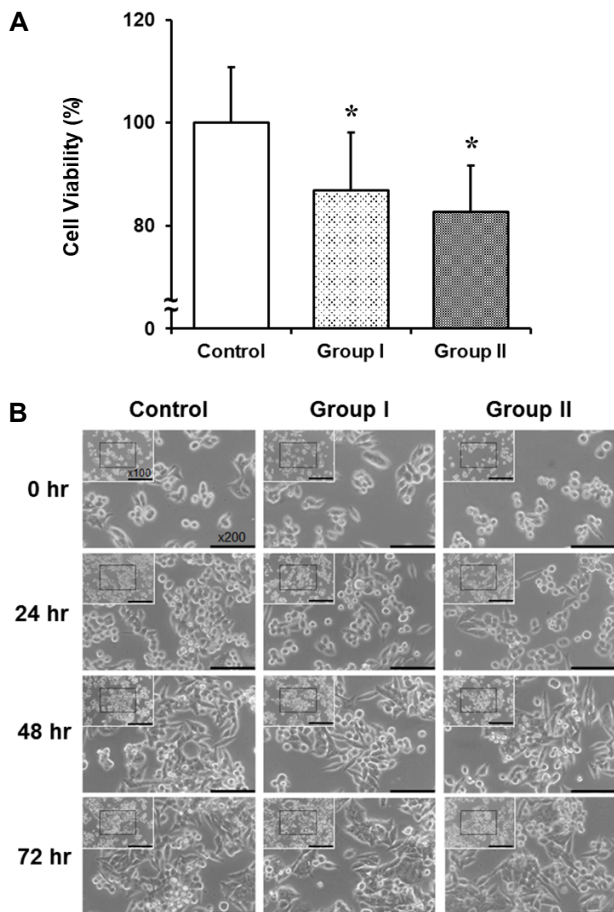


Fig. 2. Changes in human colon cancer cell viability and morphologic features induced by extract of OJ. (A) SW480 cancer cell viability was decreased by treatment with OJ extract for 72 hr with a dose-dependent manner. * $p<0.05$ compared with the control (B) Morphologic characteristics of SW480 cancer cells treated with OJ extract for 72 hr.

으나, 와송 혼합물을 72시간까지 처리한 실험군 I과 II에서는 부착되지 않고 부유하는 세포가 확인되었다(Fig. 2B). 이러한 결과는 인체 전립선암 세포에 대한 재배 와송의 암세포 성장 억제효과와 유사하게 나타났으며[39], 와송열수추출물과 메탄올 추출물이 NDMA 생성을 억제하고, 아질산염 소거작용에 관여함을 보고한 Choi 등(2008)의 연구와 유사하였다[5]. 와송열수추출물은 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 아질산염 소거능($53.8\pm 0.24\sim 68.2\pm 0.29\%$)을 나타내었고, NDMA 생성 억제 작용 역시, 농도가 높아질수록 유의적으로 증가하는 경향을 보였다[5]. 비록 열수추출물의 효과가 메탄올 추출물보다 낮게 나타났지만, 열수추출물 역시 total phenol 및 Flavonoid와 같은 생리활성 성분을 함유하고 있으므로, 이를 통해 암세포 성장 억제에 관여할 것으로 추측된다.

와송의 대장암세포 이주 억제 효과

와송에 의한 SW480 세포의 증식과 이주 억제 효과를 알아보기 위하여 Scratch assay를 실시하였다(Fig. 3A). 스크래치를 만든 직후(0시간)에는 대조군과 실험군 I, II 모두 gap의 넓이

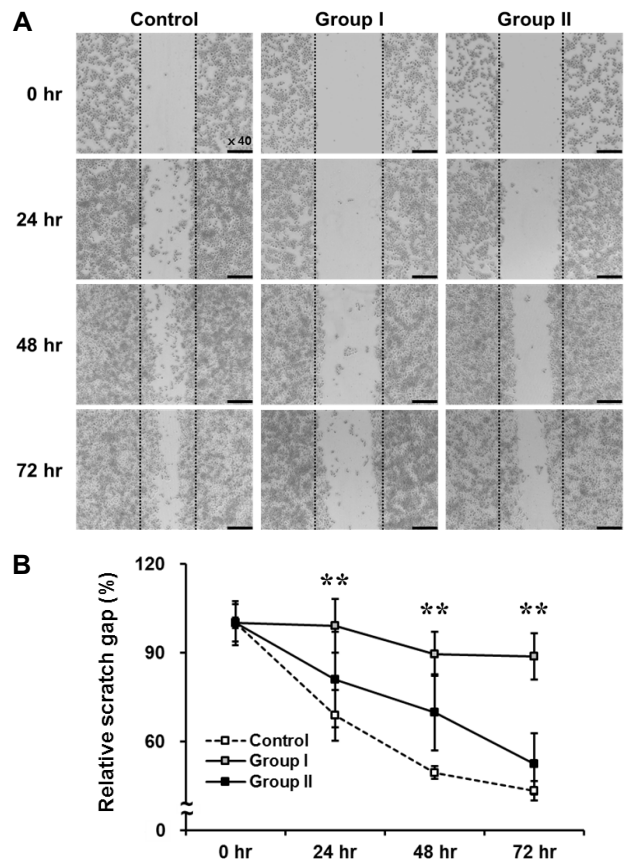


Fig. 3. Inhibition of migration of human colon cancer cells treated with extract of OJ. (A) Cancer cell migration and adhesion evaluated by scratch assay. (B) OJ treatment suppressed the migration of SW480 cells to the scratch site. ** $p<0.01$ compared with the control.

가 일정하고 깨끗하게 관찰되었지만, 대조군에서는 24시간부터 세포의 이주(migration)가 나타나기 시작하여, 48시간과 72시간에서 gap의 넓이가 유의하게 감소하는 것으로 나타났다($p<0.05$). 반면, 와송을 처리한 실험군 I과 II에서는 스크래치 gap으로 이동하는 세포가 대조군에 비해 적게 관찰되었으며, 24시간, 48시간, 그리고 72시간 모두에서 대조군에 비해 gap이 유의하게 넓게 나타났다($p<0.01$). 특히 실험군 I은 실험군 II보다도 gap 쪽으로 이주해오는 세포군이 적게 나타나 gap의 간격이 유의하게 크게 나타났으며, 실험군 간의 이러한 차이는 72시간까지 지속되었다($p<0.05$)(Fig. 3B). 와송열수추출물을 처리한 실험군에서 스크래치 gap 간격이 좁아지지 않고, 대조군에 비해 넓게 확인되는 결과를 통해 와송이 인체대장암 세포주 SW480의 증식을 억제하는 효과를 가지는 것으로 생각된다. 이러한 결과는 Flavonoid 계열의 isoquercitrin이 SW480 cells과 같은 colon cancer cells의 성장과 이주를 억제한다고 보고한 Amado 등(2014)의 결과와 일치하였다[2]. Isoquercitrin의 억제효과는 non-tumor IEC-18 cell에서는 유의하게 나타나지 않았다.

대장암세포 주입에 대한 와송의 효과: 체중의 변화

본 연구에서 천연 항암후보물질로서 사용한 와송은 많은 생리활성성분을 함유하고 있고, 이로 인해 다양한 약리적 효과를 가진다. 따라서 장기간 와송을 섭취하는 동안 체중의 변화를 모니터링 하는 것은 와송이 생리학적으로 생체에 미치는 영향을 이해하는 것을 의미하며, 인체대장암세포주 SW480 세포 주입 후 체중의 변화를 모니터링 하는 것은 와송이 부작용 없는 안전한 천연 항암제인지를 확인하는데 있어 꼭 필요한 과정 중 하나라고 할 수 있다. 종양형성에 대한 와송의 예방적 효과를 알아보기 위해, SW480을 실험동물에게 주입하기 전, 와송열수추출물을 경구로 자유 섭취하게 하고, 섭취 기간 동안 실험군 I과 II의 체중을 측정하여 대조군과 비교하였다. 1일에서 측정된 각 군의 체중은 대조군(27.2 ± 0.589 g), 실험군 I(28.3 ± 0.884 g), 그리고 실험군 II(28.5 ± 1.692 g) 사이에 유의한 차이가 없었으나, 와송열수추출물을 섭취하는 동안 실험군 I과 II의 체중은 대조군보다 증가하는 것으로 나타났다($p<0.05$). 특히 와송열수추출물을 섭취하고 25일 이후부터, 실험군 I, II의 체중은 대조군보다 유의하게 증가하는 것으로 확인되었다($p<0.05$)(Fig. 4A).

SW480 세포 주입에 의한 체중의 변화를 관찰한 결과, 31일 동안 와송을 섭취했던 실험군 I, II의 체중은 대조군에 비해 크게 나타났다($p<0.05$). SW480 세포를 주입한 이후 대조군과 실험군 I, II 모두 체중이 감소하였으나, 14일부터 실험군 I과 II의 체중은 대조군에 비해 다시 유의하게 증가하였고($p<0.05$), 특히 28일에서 실험군 I의 체중은 대조군 보다 유의하게 높게 나타났다($p<0.05$)(Fig. 4B). 고지방식을 통해 비만이 유도된 실험동물에서 와송추출물은 혈청 내 지질성분 수준과 지방축

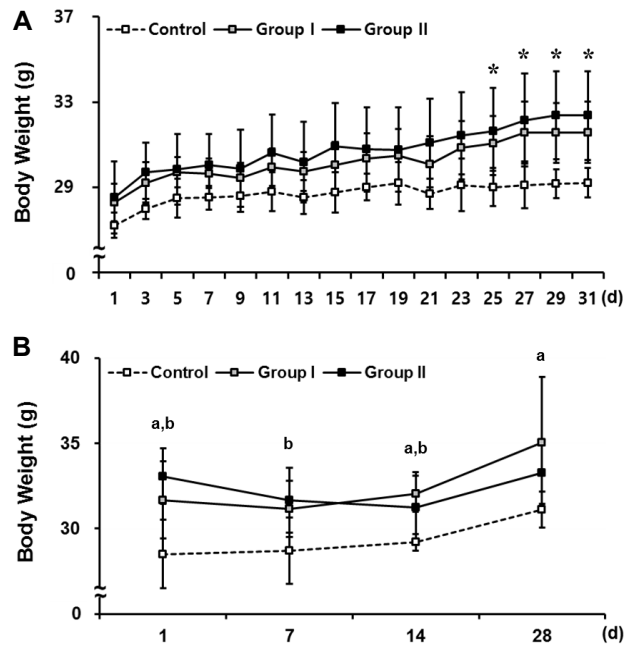


Fig. 4. Physiological effects of extract of OJ. (A) Increase in body weight following oral administration of OJ extract. * $p<0.05$ compared with the control (B) OJ extract increased body weight after injection of SW480 cells. ^a $p<0.05$ control compared with group I, ^b $p<0.05$ control compared with group II.

적을 감소시키며, 체중증가를 억제하는 것으로 보고되고 있지만[20], 비만이 당뇨 등이 유도되지 않은 일반적 상태에서 와송추출물은 체중에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다[16]. 하지만, 종양세포를 이용한 Xenograft model에서 와송의 효능 및 생리학적인 효과를 검증하기 위해서는 보다 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

대장암세포 주입에 대한 와송의 효과: 종양 무게 및 부피의 변화

와송이 종양의 유발과 형성을 억제하는지 알아보기 위해, SW480 세포 주입 후 7일, 14일, 28일에서 실험동물을 희생시켜 종양 조직을 확인하고 분리하였다. 실험동물의 피하에서 분리한 좌우 종양 조직의 무게를 평균하여 실험군 간의 차이를 비교 분석하였고, 좌우 종양 조직의 부피를 계산한 다음 평균하여 실험군 간의 차이를 비교 분석하였다.

7일과 14일에서 실험군 I과 II의 종양 무게는 대조군보다 크게 나타났으나, 28일에서는 대조군보다 감소하는 것으로 나타났다($p<0.05$). 특히, 실험군 II는 28일에서 종양의 무게가 7일과 14일에 비해 유의하게 낮은 것으로 확인되었다($p<0.05$)(Fig. 5A). 각 실험군에서 측정된 종양조직의 부피를 비교 분석한 결과, 대조군에서는 종양 조직의 부피가 지속적으로 유의하게 증가하는 반면($p<0.05$), 와송을 섭취한 실험군에서는 종양 조직의 부피가 커지는 것이 억제되거나, 감소하였다($p<$

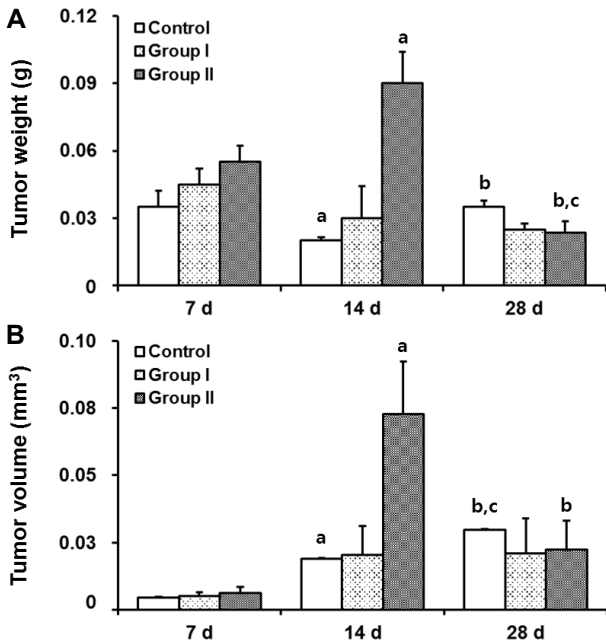


Fig. 5. Preventive effects of extract of OJ on tumorigenesis. A high dose of OJ extract reduced (A) tumor weight, and (B) volume after 28 days. ^a*p*<0.05 7 versus 14 days; ^b*p*<0.05 14 versus 28 days; ^c*p*<0.05 7 versus 28 days.

0.05). 특히, 실험군 II는 종양 조직의 부피가 14일에서 크게 증가하였으나, 28일에서 유의하게 감소하는 것으로 확인되었다(*p*<0.05)(Fig. 5B). 와송추출물 성분 중 Flavonoid는 생체 내에서 human hepatocellular carcinoma의 종양형성을 효과적으로 억제하는데, 저농도(125 mg/kg) 보다는 고농도(500 mg/kg)에서 보다 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다[24]. 본 연구에서도 고농도의 와송을 섭취한 마우스에서 종양의 형성이 유의하게 억제되었다. 고농도의 Flavonoid를 주입한 마우스에서 형성된 종양조직을 분석한 결과, HIF-1 α , VEGF 발현이 유의하게 감소되었는데[24], hypoxia는 solid tumor micro-environment로 알려져 있다[43]. 이와 같은 결과를 통해 Flavonoid가 종양세포의 사멸을 유도하고, 종양조직의 혈관생성을 억제함으로써 강한 항암 효과를 가짐을 알 수 있다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단(2014R1A1A3051724, 2017EG054010112)의 지원에 의해 수행 되었으며, 이에 감사드립니다.

References

1. Ahn, H. Y., Choe, D. J. and Cho, Y. S. 2015. Antioxidant activity and chemical characteristics of *Orostachys malacophyllus* and fermented *Orostachys malacophyllus*. *J. Life Sci.* **25**, 577-584.
2. Amado, N. G., Predes, D., Fonseca, B. F., Cerqueira, D. M.,

- Reis, A. H., Dudenhoefter, A. C., Borges, H. L., Mendes, F. A. and Abreu, J. G. 2014. Isoquercitrin suppresses colon cancer cell growth *in vitro* by targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **289**, 35456-35467.
3. Choi, S. D. and Nam, S. H. 2005. Cytotoxicities of *Orostachys japonicus* A. Berger against cancer cell lines. *J. Industrial Technology Res. Inst.* **12**, 25-30.
4. Choi, S. Y., Chung, M. J. and Sung, N. J. 2008. Studies on the antioxidative ability of methanol and water extracts from *Orostachys japonicus* A. Berger according to harvest times. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **21**, 157-164.
5. Choi, S. Y., Kim, J. G. and Sung, N. J. 2008. Studies on the physicochemical characteristics and NDMA formation of *Orostachys japonicus* A. Berger. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **21**, 148-156.
6. Im, S. J., Kim, J. H. and Kim, M. Y. 2014. Endogenous nitric oxide strengthens Doxorubicin-induced apoptosis in human colorectal cell lines. *J. Life Sci.* **24**, 1137-1143.
7. Jeong, K. J., Chon, Y. S., Ha, S. H. and Yun, J. G. 2013. Optimum light intensity, media and fertilization for potted *Orostachys malacophyllus* from Taebaek. *Flower Res. J.* **21**, 46-51.
8. Jin, D. H., Kim, H. S., Seong, J. H. and Chung, H. S. 2016. Comparison of total Phenol, Flavonoid contents, and antioxidant activities of *Orostachys japonicus* A. Berger extracts. *J. Environ. Sci. Int.* **25**, 695-703.
9. Ju, S. A., Park, S. M., Lee, Y. S., Bae, J. H., Yu, R., An, W. G., Suh, J. H. and Kim, B. S. 2012. Administration of 6-gingerol greatly enhances the number of tumor-infiltrating lymphocytes in murine tumors. *Int. J. Cancer* **130**, 2618-2628.
10. Jung, K. W., Won, Y. J., Oh, C. M., Kong, H. J., Lee, D. H., Lee, K. H. and Community of Population-Based Regional Cancer Registries. 2017. Cancer statistics in Korea: Incidence, mortality, survival, and prevalence in 2014. *Cancer Res. Treat.* **49**, 292-305.
11. Kim, E. J., Choi, J. Y., Yu, M., Kim, M. Y., Lee, S. and Lee, B. H. 2012. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **44**, 337-342.
12. Kim, H. J., Lee, J. Y., Kim, S. M., Park, D. A., Jin, C., Hong, S. P. and Lee, Y. S. 2009. A New epicatechin gallate and calpain inhibitory activity from *Orostachys japonicus*. *Fito-terapia* **80**, 73-76.
13. Kim, J. Y., Jung, E. J., Won, Y. S., Lee, J. H., Shin, D. Y. and Seo, K. I. 2012. Cultivated *Orostachys japonicus* induces apoptosis in human colon cancer cells. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **44**, 317-323.
14. Kim, K. H., Kim, E. Y., Kim, Y. O., Baek, G. O., Kim, H. B. and Lee, D. S. 2004. Studies on biological activities of the polysaccharides and oligosaccharides of *Orostachys japonicus*. *Kor. J. Microbiol.* **40**, 334-341.
15. Kim, S. G., Choi, J. W., Park, H. J., Lee, S. M. and Jung, H. J. 2009. Anti-hyperlipidemic effects of the flavonoid-rich fraction from the methanol extract of *Orostachys japonicus* in rats. *Kor. J. Pharmacogn.* **40**, 51-58.
16. Kim, S. H., Ryu, D. S., Lee, H. S., Shin, H. R., Kwon, J.

- H. and Lee, D. S. 2014. Acute oral toxicity of the ethyl acetate fraction of *Orostachys japonicus* in mice. *Pharm. Biol.* **52**, 1345-1350.
17. Kwon, J. and Han, K. S. 2004. Effects of *Orostachys japonicus* A. Berger on the immune system. *Kor. J. Med. Crop. Sci.* **12**, 315-320.
 18. Lee, H. S., Ryu, D. S., Lee, G. S. and Lee, D. S. 2012. Anti-inflammatory effects of dichloromethane fraction from *Orostachys japonicus* in RAW 264.7 cells: suppression of NF- κ B activation and MAPK signaling. *J. Ethnopharmacol.* **140**, 271-276.
 19. Lee, J. H., Lee, S. J., Park, S., Kim, H. K., Jeong, W. Y., Choi, J. Y., Sung, N. J., Lee, W. S., Lim, C. S., Kim, G. S. and Shin, S. C. 2011. Characterisation of flavonoids in *Orostachys japonicus* A. Berger using HPLC-MS/MS: Contribution to the overall antioxidant effect. *Food Chem.* **124**, 1627-1633.
 20. Lee, K. S. and Lee, H. S. 2017. Anti-obesity effects of the water extract from *Orostachys japonicus* in high-fat diet-fed mice. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **45**, 284-290.
 21. Lee, S. J., Seo, J. K., Shin, J. H., Lee, H. J. and Sung, N. J. 2008. Antioxidant activity of wa-song (*Orostachys japonicus* A. Berger) according to drying methods. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 605-611.
 22. Lee, S. J., Shin, J. H., Ju, J. C., Kang, S. K. and Sung, N. J. 2013. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Orostachys japonicus* with medicinal herbs in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **42**, 587-594.
 23. Lee, S. J., Song, E. J., Lee, S. Y., Kim, K. B. W. R., Kim, S. J., Yoon, S. Y., Lee, C. J. and Ahn, D. H. 2009. Antioxidant activity of leaf, stem and root extracts from *Orostachys japonicus* and their heat and pH stabilities. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 1571-1579.
 24. Li, H., Jiang, D., Zhang, L. and Wu, J. 2017. Inhibition of tumor growth of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells in a nude mouse xenograft model by the total flavonoids from *Arachniodes exilis*. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2017**, 5310563.
 25. Lü, H., Chen, J., Li, W. L., Ren, B. R., Wu, J. L. and Zhang, H. Q. 2009. Hypoglycemic effect of the total flavonoid fraction from folium *Eriobotryae*. *Phytomedicine* **16**, 967-971.
 26. Oh, C. H., Bae, J. B., Kim, N. S., Jeon, H. and Han, K. S. 2009. Effect of *Orostachys japonicus* A. Berger on apoptosis induction of human leukemia HL60 Cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **40**, 118-122.
 27. Park, H. J., Lim, S. C., Lee, M. S. and Young, H. S. 1994. Triterpene and steroids from *Orostachys japonicus*. *Kor. J. Pharmacogn.* **25**, 20-24.
 28. Park, H. J., Young, H. S., Kim, J. O., Rhee, S. H. and Choi, J. S. 1991. A study on the chemical constituents of *Orostachys japonicus* A. Berger. *Kor. J. Pharmacogn.* **22**, 78-84.
 29. Park, J. G., Park, J. C., Hur, J. M., Park, S. J., Choi, D. R., Shin, D. Y., Park, K. Y., Cho, H. W. and Kim, M. S. 2000. Phenolic compounds from *Orostachys japonicus* having anti-HIV-1 protease activity. *Nat. Prod. Sci.* **6**, 117-121.
 30. Park, K. U., Kim, J. Y. and Seo, K. I. 2009. Antioxidative and cytotoxicity activities against human colon cancer cells exhibited by edible crude saponins from soybean cake. *Kor. J. Food Preserv.* **16**, 754-758.
 31. Ryu, D. S., Baek, G. O., Kim, E. Y., Kim, K. H. and Lee, D. S. 2010. Effects of polysaccharides derived from *Orostachys japonicus* on induction of cell cycle arrest and apoptotic cell death in human colon cancer cells. *BMB. Rep.* **43**, 750-755.
 32. Ryu, D. S., Kim, S. H., Kwon, J. H. and Lee, D. S. 2014. *Orostachys japonicus* induces apoptosis and cell cycle arrest through the mitochondria-dependent apoptotic pathway in AGS human gastric cancer cells. *Int. J. Oncol.* **45**, 459-469.
 33. Ryu, D. S., Lee, H. S., Lee, G. S. and Lee, D. S. 2012. Effects of the ethylacetate extract of *Orostachys japonicus* on induction of apoptosis through the p53-mediated signaling pathway in human gastric cancer cells. *Biol. Pharm. Bull.* **35**, 660-665.
 34. Seo, D. J., Jeon, S. B., Oh, H., Lee, B. H., Lee, S. Y., Oh, S. H., Jung, J. Y. and Choi, C. 2016. Comparison of the antiviral activity of flavonoids against murine norovirus and feline calicivirus. *Food Control* **60**, 25-30.
 35. Shin, S., Kim, Y. J., Song, K. S., Jing, K., Kim, N., Jeong, S., Park, J. H., Seo, K. S., Heo, J. Y., Kwon, H. J., Park, J. I., Park, S. K., Kweon, G. R., Yoon, W. H., Hwang, B. D. and Lim, K. 2010. Mechanism of anti-invasive action of Docosahexaenoic Acid in SW480 human colon cancer cell. *J. Life Sci.* **20**, 561-571.
 36. Statistics Korea. 2017. Causes of death statistics in 2016, pp. 1-56.
 37. Takabayashi, K., Kashiwagi, K., Kawata, T., Sato, T., Mat-suoka, K., Hisamatsu, T., Takaishi, H., Hibi, T., Ogata, H., Yahagi, N., Kitagawa, Y., Shigematsu, N. and Kanai, T. 2014. Continuous low-dose irradiation by I-125 seeds induces apoptosis of gastric cancer cells regardless of histological origin. *Cancer Biol. Ther.* **15**, 81-88.
 38. Vessal, M., Hemmati, M. and Vasei, M. 2003. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **135**, 357-364.
 39. Won, Y. S., Lee, J. H., Kwon, S. J., Ahn, D. U., Shin, D. Y. and Seo, K. I. 2014. Anticancer effects of cultivated *Orostachys japonicus* on human prostate cancer cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **43**, 67-73.
 40. Yoon, S. Y., Lee, S. Y., Kim, K. B. W. R., Song, E. J., Kim, S. J., Lee, S. J., Lee, C. J. and Ahn, D. H. 2009. Antimicrobial activity of the solvent extract from different parts of *Orostachys japonicus*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 14-18.
 41. You, E. A., Lee, S. J., Lee, S. K., Kang, J. H. and Shin, J. C. 2006. Total phenol contents and antioxidant activity in *Orostachys japonicus* A. Berger grown under various cultivation conditions. *Kor. J. Med. Crop. Sci.* **14**, 234-238.
 42. Zhang, G. F. 2008. Anti-diabetic potential of *Orostachys japonicus* in streptozotocin induced diabetes mellitus rats. MS thesis, Gyeongsang National University, Jinju, Korea.
 43. Zhou, J., Schmid, T., Schnitzer, S. and Brüne, B. 2006. Tumor hypoxia and cancer progression. *Cancer Lett.* **237**, 10-21.

초록 : 인체대장암세포주 SW480에 대한 재배 외송의 항암효과 연구

박수경^{1,2,3} · 원진영^{2,3,4} · 박강희⁵ · 홍용근^{1,2,3,4*}

(¹인제대학교 보건의료융합대학 물리치료학과, ²인제대학교 u-항노화헬스케어연구소(u-HARC), ³인제대학교 바이오헬스소재연구센터(BPRC), ⁴인제대학교 대학원 재활과학과, ⁵동주대학교 물리치료과)

외송(둥근바위솔, *Orostachys japonicus*, OJ)은 면역조절, 항노화, 항산화, 독성제거 등의 치료적 효과를 가진 약용식물로 알려져 있는데, 본 연구에서는 인체대장암세포에 대한 재배 외송의 항암효과를 규명하고자 하였다. 인체대장암세포주 SW480에 외송열수추출물을 72시간 동안 처리한 결과, 대장암세포의 생존율은 농도-의존적으로 유의하게 감소하였다. 또한, 외송은 SW480 세포의 증식과 이주를 억제하는 것으로 나타났는데, 대조군의 스크래치 gap은 24시간부터 유의하게 감소하는 반면, 외송열수추출물을 처리한 실험군 I과 II의 스크래치 gap은 48시간부터 감소하기 시작하였다. 특히 실험군 I의 스크래치 gap은 72시간까지 유의하게 유지되었다. 외송이 생체 내에서 종양의 형성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 대장암세포 주사 전, 31일 동안 수컷 C57BL/6 마우스(4주령)에게 외송열수추출물을 경구로 자유 섭취하게 하였다. 이후 SW480 세포(1×10^7 cells/100 μ l)를 피하로 주입한 후 7일, 14일 그리고 28일에서 종양의 형성을 관찰하였고, 각 실험동물을 희생하여 종양의 무게와 부피(mm^3)를 측정하여 비교 분석하였다. 외송열수추출물을 섭취하는 동안 실험군 I, II의 체중은 대조군에 비해 지속적으로 유의하게 증가하였다. SW480 세포 주입 이후 모든 실험군의 체중은 감소하였으나, 세포 주입 후 14일부터 외송 섭취 실험군의 체중은 유의하게 증가하는 것으로 나타났다. 대장암세포 주입 후 7일과 14일에서 외송을 섭취한 실험군의 종양 무게와 부피는 대조군보다 높았으나, 28일에서는 대조군보다 낮게 나타났고, 특히 실험군 II에서 종양 무게와 부피는 유의하게 감소하는 것으로 확인되었다. 이상의 결과를 통해 외송이 인체 대장암세포의 성장, 증식 및 이주를 억제하며, 생체 내 종양형성(tumorigenesis)을 예방적으로 억제함을 알 수 있었다. 따라서, 재배 외송은 천연 항암제 소재로서 활용될 가능성을 가지는 것으로 보이며, 이에 대한 심층적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.