한국식생활문화학회지 34(1): 84-92, 2019
J. Korean Soc. Food Cult. 34(1): 84-92, 2019
본 논문의 저작권은 한국식생활문화학회에 있음.
Copyright © The Korean Society of Food Culture

ISSN 1225-7060(Print)
ISSN 2288-7148(Online)
https://doi.org/10.7318/KJFC/2019.34.1.84

지방세포 3T3-L1과 대장암세포 SW-480에서 메밀 성분인 rutin의 항염증 효과

이승림 · 서은영[1,*]
상지영서대학교 식품조리과, [1]장안대학교 식품영양과

Effects of Rutin on Anti-inflammatory in Adipocyte 3T3-L1 and Colon Cancer Cell SW-480

Suenglim Lee, Eunyoung Seo[1,*]
Department of Food and Cooking, Sangji Youngseo College
[1]*Department of Food and Nutrition, Jangan University*

Abstract

Purpose: The objective of this study was conducted to investigate the effects of rutin, buckwheat components on cell growth and anti-inflammation in adipocyte 3T3-L1 and human colon cancer cell SW-480. Methods: We cultured 3T3-L1 adipocyte and SW-480 colon cancer cell to confluence, at which time starvation was induced with SFM for 1 day. Cells were then cultured in medium containing 0, 25, 50, or 100 μmol/mL of rutin 3T3-L1 or 0, 10, 20, or 40 μmol/mL SW-480. Cell viability was measured using a cell viability kit. In addition, we examined the expression of mRNA related to inflammation. RT-PCR was used to quantity tumor necrosis factor (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), IL-6, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA levels. Results: Rutin significantly inhibited 3T3-L1 and SW-480 cell proliferation in a dose and time dependent manner. Rutin also significantly reduced the mRNA expression of IL-1β, IL-6 and TNF-α at the highest dose. In addition, rutin treatment caused a significant reduction in COX-2 and iNOS mRNA levels compared to the control group. Conclusion: Overall, our results suggest that rutin has the potential to reduce inflammation, and that these effects are greater during tissue-damaging inflammatory conditions.

Key Words: Buckwheat, rutin, 3T3-L1, SW-480, cell growth, anti-inflammatory

I. 서 론

염증(inflammation)은 감염, 독소 노출, 세포 손상이 발생된 부위로부터 자극이나 손상인자를 제거하기 위한 생체방어기전으로 손상 부위에 면역세포(주로 T cell, 단핵구, 대식세포), 혈관내피세포(vascular endothelial cells), 염증성 전구물질(proinflammatory mediators) 등이 관여하는 반응이며(Kundu JK & Surh YJ. 2008), 일반적으로 신체 항상성 유지를 위해 이루어진다(Tracey KJ. 2002). 그러나 계속적인 자극원에 대한 공격을 받은 신체는 만성적인 염증을 유발하게 되며, 이러한 염증 반응이 지속적으로 진행되면 암, 당뇨병, 비만 등의 질병으로 표현되거나(Nathan C. 2002), 질병의 상태를 악화시키는 체내 환경으로 변화하게 된다(Terzié et al. 2010). 만성 전신성 염증반응으로 인한 체내 환경 변화는 인슐린 저항성을 증가시켜(Park CY & Yoo HJ. 2004), 제2형 당뇨병, 동맥경화증 등의 비만 관련 질환 발병률을 상승시키고(Lumeng et al. 2007), 지방조직에서는 tumor necrosis factor alpha (TNF-α) 등의 염증성 사이토카인이 과다하게 분비되는 환경으로 변화되게 된다(Visser M et al. 1999). 이러한 환경에서 비만이 악화될수록 C-reactive protein (CRP), TNF-alpha, interleukin-6 (IL-6) 등의 염증성 사이토카인 단백질 농도는 증가되고, necrosis factor-kappa B (NF-κB) 등의 염증성 신호 전달 물질도 활성화시킨다(Weisberg et al. 2006).

비만은 만성 전신성 염증반응으로 지방조직의 비대나 지방세포의 크기가 증가함에 따라 지방조직으로 대식세포의 수가 비례적으로 증가한다(Lagathu et al. 2003). 비만에 따른 지방세포 비대는 지방세포 기능 변화와 염증 관련 단백질 분비를 증가시킨다(Ouchi et al. 2003). 비만으로 유도된 염증은 일반적인 염증반응과 유사하지만, 지방조직의 세포 구성

*Corresponding author: Eunyoung Seo, Department of Food and Nutrition, Jangan University, Hwasung, Gyeonggi-do 445-756, Korea
Tel: +82-31-299-3664 Fax: +82-31-299-3609 E-mail: e.young719@jangan.ac.kr

을 변화시켜 증가된 염증성 전구물질(pro-inflammatory mediators)의 수준과 염증성 신호전달 활성화에 복합적으로 관여하게 된다(Cook et al. 2000). 일반적으로 면역반응은 자가 제한적이며 감염에 대한 저항 및 조직 재생을 증진시켜 항상성을 유지하게 되지만 과도한 염증반응과 만성적 염증은 비만의 원인으로 작용되거나 비만 촉진자 역할을 하게 된다(Nanji et al. 2003).

대장암 또한 만성 전신성 염증반응으로 유도되는 질병으로 한국인의 경우 열량섭취가 증가되고, 동물성 식품의 섭취가 늘어나면서 발병률과 사망률이 상승하고 있는 암의 종류이며(Koh SJ & Kim JS. 2010), 다른 종류의 암보다도 식사 내용과 발병률의 상관성이 높은 암으로 알려져 있다(Park & Choi. 1997). 그러므로, 대장암의 원인은 고지방식사나 비만과 높은 관련성이 있다고 밝혀져 있다(Armstrong B & Doll R. 1975). 체내 과잉의 지방조직이 염증 유전자들의 발현을 증가시켜, 대장암 환자들의 혈청 내에서 염증을 유발하는 tumor necrosis factor-α (TNF-α), inducible nitric oxide synthase (iNOS), interlukin-1β (IL-1β), interlukin-6 (IL-6), cyclooxygenase-2 (COX-2) 유전자가 높은 수준으로 관찰되고 있다는 것이 보고되고 있다(Park et al. 2009).

메밀은 한국에서는 구황작물로 사용하였으며, 최근에는 막국수, 메밀전병, 메밀묵 등의 가공식품으로 이용되고 있다. 한국은 경제성장 이후 식생활의 서구화로 인한 만성퇴행성 질환 발병률과 사망률 증가에 따른 건강식에 대한 요구로 메밀에 대한 생산과 소비가 증가되고 있다(Cui et al. 2008; Kim et al. 2000; Pomeranz Y. 1983). 메밀은 다른 곡류군에 비해 K, Mg, Ca, P 등의 무기질 함량이 높으며(Lee et al. 1991), rutin, quercetin 등의 생리활성 물질이 포함되어 있다. 그 중 flavonoid 물질인 rutin (quercetin-3-O-rutinoside)은 식물의 이차대사물이며, quercetin의 글루코시드 유도체 중 하나이다(Pomeranz Y. 1983). 메밀의 폴리페놀 성분인 rutin은 메밀이외에도 자연계에 널리 분포되어 있으며, rutoside, quercetin-3-rutinoside 또는 sophorin, quercetin에 rutoside가 결합된 성분으로 메밀 싹 추출물을 이용한 항산화, 항균 활성 효과와 메밀 추출물의 항곰팡이와 항고혈압 효과가 보고되어 있다(Hwang et al. 2006; Do et al. 2006; Lee HH, 2008). 최근 연구에서는 rutin의 처리가 알츠하이머와 관련된 유전자 발현을 억제시키는 효과가 발표되었으며, 간 내 지질 수준과 고지방식이로 유도된 간조직의 산화적 손상을 회복시켜 비알코올성 지방간이 효과적으로 개선되었다고 하였다(Chen et al. 2012; Aischer RG and Hess JL. 1993; Yu et al. 2003; Lee et al. 2001). 또한 rutin과 관련된 현재까지의 연구들은 주로 고혈압, 동맥경화증, 뇌출혈 등의 심혈관질환이나 백혈병 등에서 의미 있는 효과가 발표되었다(Griffith et al. 1995; Alonso-Castro et al. 2013; Choi et al. 2014; Lapa et al. 2011; Lin et al. 2012; Wang et al. 2012). 그러므로, 본 연구에서는 메밀 성분 rutin의 처리가 만성 염증성 질환 중 고지방식이와 상관성이 높은 질병인 비만에 효과를 관찰해보기 위해 3T3-L1 세포와 대장암 세포인 SW-480 세포를 이용하여 실험을 진행하였다. Rutin의 처리 농도에 따라 각각의 세포의 성장과 항염증성 효과를 통해 메밀 성분 rutin이 고지방식사와 관련이 있는 비만, 대장암 치료나 질병의 악화를 지연시키거나 차단하는데 어떠한 효과를 나타내는지 관찰해보았다.

II. 재료 및 방법

1. 시료의 준비

본 실험에 사용된 메밀 성분 rutin은 Sigma (Sigma Chemical Co. St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다. 구입한 rutin은 dimethyl sulphoxide (DMSO) (Sigma Chemical Co. St. Louis, USA)에 녹여 40 mM의 stock을 만들어 냉동 보관하여 각 실험마다 세포 배양액에 희석하여 사용하였다.

2. 세포 배양과 지방세포로의 분화

실험에 사용된 지방세포 mouse fibroblast 3T3-L1 preadipocyte와 인체대장암세포 SW-480은 모두 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포는 습윤한 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 지방세포는 3T3-L1은 Seo EY(2018)의 실험방법에 따라 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (WelGENE, Daegu, Korea), 10% bovine calf serum (BCS) (WelGENE), 100 μg/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin (WelGENE)가 포함된 배양액에서 배양하였다. 대장암 세포 SW-480은 Choi OS and Kim WK(2004)의 실험방법에 따라 10% fetal bovine serum (FBS) (WelGENE), 100 μg/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin (WelGENE)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 (DMEM/F12) (WelGENE, Daegu, Korea)에서 배양하였다. 두 세포종 모두 70% 정도 confluent되면 phosphatate buffered saline solution (PBS)으로 2번 씻어내고 trypsin-EDTA (WelGENE)를 처리하여 세포를 모은 후 계대 배양하고 배양액은 2일마다 교환하였다. 3T3-L1 세포는 지방세포로의 분화를 위해 10% fetal bovine serum (FBS, WelGENE), 10 μg/mL insulin (Sigma, St Louis, MO, USA), 1 μmol dexamethasone (Dex) (Sigma), 0.5 mM isobuthylmethylxanthine (IBMX) (Sigma), 100 units/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin를 넣은 DMEM 배양액으로 교체하였다. 세포 분화 후에는 10% BCS, 100 units/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin을 넣은 DMEM 배양액으로 분화 상태를 유지하였다. 지방세포는 분화 후에 rutin을 배양액에 농도별로 처리하여 실험하였고, 대장암 세포는 배양액에 serum 성분이 포함되지 않은 DMEM/F12 배양액에 rutin을 처리하여 실험하였다. 실험

은 크게 두 가지로 진행하였는데, 처리 조건을 정하기 위해 rutin 성분이 두 가지 세포 종에서 세포증식에 미치는 영향에 대해 먼저 관찰하였다. 이 실험을 통해 3T3-L1과 SW-480세포에서 세포증식을 억제하는 처리 농도를 확인한 후, rutin을 처리한 세포에서 RNA를 분리하여 항염증인자들의 발현을 RT-PCR (real time-polymer chain reaction)을 통해 관찰하였다.

3. 세포증식

Rutin의 처리에 따른 두 가지 세포의 증식 효과를 알아보기 위해 3T3-L1은 96 well plate에 0.5×10^4 cells/mL, SW-480은 1×10^4 cells/mL로 plating 하고, 48시간 후에 confluence 되면 BCS가 포함된 배양액에 5 μg/mL transferrin, 5 ng/mL selenium, 1,000 units/mL penicillin, 1,000 μg/mL streptomycin (WelGENE)으로 배양액을 교환하였고, 농도별 rutin을 세포에 첨가한 후 24시간마다 같은 조건의 배양액으로 교체하면서 시간 경과에 따라 세포의 증식을 관찰하였다. Cell viability 측정은 cell viability assay kit (Daeil Lab, Seoul, Korea)를 이용하였다. 살아있는 세포만을 염색하는 용액을 처리한 후, 3시간 후 490 nm에서 spectrophotometer (Tecan Austria GmbH, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 모든 실험은 독립적으로 3번 이상 같은 조건에서 실험하였으며, 3번의 독립적인 결과를 통계 처리하여 관찰하였다(Seo EY. 2015)

4. 염증유전자의 mRNA 발현

항염증 관련 유전자의 mRNA발현을 확인하기 위해 Real time quantitative PCR을 실시하였다. 실험진행은 Seo et al.(2015)의 방법에 따라 항염증 관련 유전자로는 tumor necrosis factor-α (TNF-α), inducible nitric oxide synthase (iNOS), interlukin-1β (IL-1β), interlukin-6 (IL-6), cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현을 관찰해보았다. 실험을 위해 3T3-L1은 3×10^4 cells/mL, SW-480은 5×10^4 cells/mL의 농도로 plating 하였다. 48시간 후에 rutin을 3T3-L1에는 0, 50, 100, 200 μg/mL, SW-480에는 0, 10, 20, 40 μg/mL 농도로 처리하여 배양하였다. Rutin의 처리는 24시간 마다 처리하였고, 최종 처리 24시간 후에는 농도별로 처리한 세포에 배양액을 제거한 후 TRI-reagent (Sigma)를 0.5 mL/well 넣어 RNA를 추출하였다. 0.2 mL의 chloroform을 넣어 4°C, 10,500 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 얻어진 상층액은 동량의 isopropanol을 넣은 후 상온 방치 후 4°C, 10,500 rpm에서 원심분리 하였다. 얻어진 pallet은 70% ethanol로 세척한 후 충분히 건조시켰다. 건조시킨 pallet은 RNasefree dH_2O/0.1 mM EDTA에 용해한 후 260, 280 nm에서 흡광도를 측정하여 OD260/OD280 ratio로 RNA의 purity를 알아보고 OD260 값으로 RNA를 정량하였다. 정량된 RNA, oligo DT, Depc water를 첨가하여 42°C에서 1시간 45분, 70°C에서 15분간 incubation하여 cDNA를 합성하였다. Detector로 SYBR green Master Mix (Applied biosystems, CA, USA), forward/reverse primer <Table 1>, Depc Water를 넣어 Applied Biosystem StepOne (Applied biosystems, CA, USA) software v2.1을 사용하여 real time PCR을 수행하였다. Data는 Applied Biosystems StepOne soft v2.1에 내장되어 있는 프로그램을 이용하여 ΔΔCT 방법으로 분석하였으며, 3회 반복 실험하였다. 각 유전자의 Real time PCR을 위한 primer는 Table 1 (Seo et al. 2015)에 제시하였다.

<Table 1> Primer sequences used for realtime PCR

Protein	Primer	Sequence
β-actin	Forward	5'-GTT TGA GAC CTT CAA CAC CCC-3'
	Reverse	5'-GTG GCC ATC TCC TGC TCG AAG TC-3'
IL-1β	Forward	5'-TTG ACG GAC CCC AAA AGA T-3'
	Reverse	5'-GAA GCT GGA TGC TCT CAT CTG-3'
IL-6	Forward	5'-ATC TGC CCT TCA GGA ACA GC-3'
	Reverse	5'-AGC CTC CGA CTT GTG AAG TG-3'
TNF-α	Forward	5'-TCT CTT CAA GGG ACA AGG CTG-3'
	Reverse	5'- ATA GCA AAT CGG CTG ACG GT-3'
iNOS	Forward	5'-GAC CAG ATA AGG CAA GCA C-3'
	Reverse	5'-CTT GTC TTT GAC CCA GTA GC-3'
COX-2	Forward	5'-ATG CTC CTG CTT GAG TAT GT-3'
	Reverse	5'-CAC TAC ATC CTG ACC CAC TT-3'

T : Thymine, A : Adenin, C : Cytosine, G : Guanin

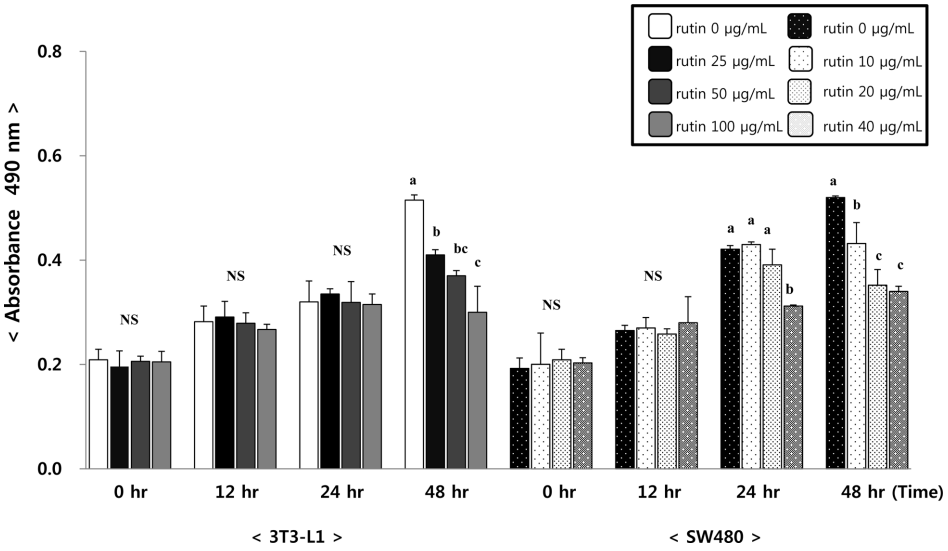
5. 통계 처리

본 연구의 실험으로 얻어진 결과는 통계프로그램 SPSS (SPSS ver 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 각 대조군과 실험군의 평균과 표준 편차로 계산되었고, 각 군 간의 차이는 ANOVA 분석 후 α=0.05 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하여 유의성을 검증하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 세포증식에 미치는 영향

본 실험은 메밀 성분인 rutin을 지방세포인 3T3-L1에 0, 25, 50, 100 μg/mL, 대장암 세포인 SW-480에는 0, 10, 20, 40 μg/mL로 각각 처리한 후 0, 12, 24, 48 시간마다 두 세포 종에서 rutin이 세포 증식에 미치는 영향에 대해 관찰해보았다. 실험결과는 <Figure 1>($p<0.05$)과 같이 rutin을 처리하지 않은 대조군에 비해 rutin을 처리한 실험군에서 지방세포 3T3-L1에서는 처리 후 48시간, 처리 농도 25 μg/mL에서부터 유의적으로 세포의 성장이 감소되는 것이 관찰되었다. 이 결과는 대조군에 비해 rutin을 25, 50, 100 μg/mL로 처리한 실험군에서 20.4, 28.2, 41.7%로 세포의 성장이 유의적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 대장암 세포인



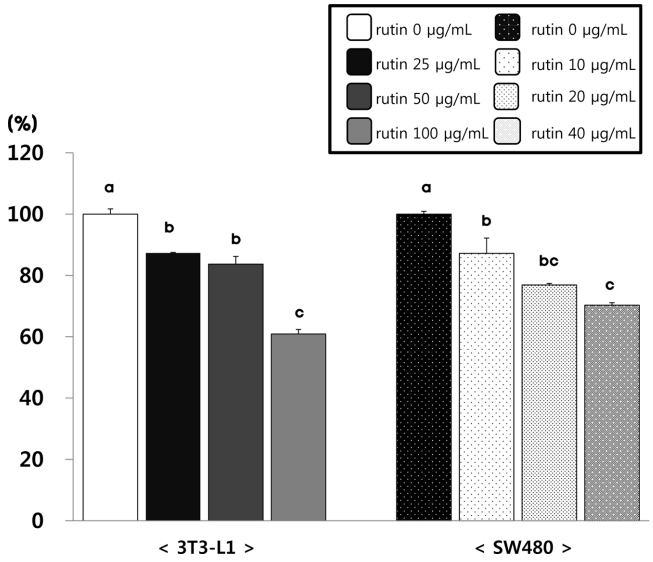
<Figure 1> Effects of rutin on cell proliferation in 3T3-L1 and SW-480 cells.
Each bar represents the mean±SD from three independent experiments. Comparisons among different concentration of rutin that yielded significant difference ($p<0.05$) are indicated by different letters above each bar.

SW-480에서는 rutin을 처리한 24시간 후부터 처리농도 40 μg/mL에서부터 세포성장이 억제되었으며, 처리시간 48시간 후부터는 처리 농도 가장 낮은 10 μg/mL에서부터 세포성장이 유의적으로 감소되었다<Figure 1>($p<0.05$). 이러한 결과는 대장암세포에 rutin을 처리하지 않은 대조군에 비해 rutin을 10, 20, 40 μg/mL로 처리하였을 때 암세포의 성장이 83.1, 67.7, 65.4%으로 둔화되었다는 것을 의미한다. Cho & Choi(2015)에 따르면 rutin, apigenin, naringenin, myricetin 등의 flavonoid를 인체 대장암 세포인 HT-29에 동일하게 100 μM 로 처리한 후, 세포 성장 억제 효과를 관찰하기 위해 MTT assay를 실시한 결과, 각각 75.8, 62.7, 74.2, 77.6%로 대장암의 세포 성장이 유의적으로 억제되었다고 하였다. Hwang et al.(2006) 등도 위암 세포 SNU-601에서 rutin을 800 μg/mL 농도로 세포에 처리하였을 때 대조군에 비해 실험군에서 85.3% 세포 성장이 감소되었다고 보고하였다. 또 다른 연구에서도 rutin을 대장암 세포(HCT-116)에 처리한 결과 세포생존율이 크게 억제되었는데, 처리 농도 0, 62.5, 125, 250, 500 μg/mL으로 처리하였을 때 91.9, 90.1, 64.5, 57.3%로 세포 성장이 유의적으로 억제되었다(Asfour and Mohsen. 2018; Gosmann et al. 2012)의 연구 결과에 따르면 3T3-L1에 rutin을 50 μg/mL 처리하였을 때 지방세포 성장과 관련하여 지방세포 내 triglyceride 축적이 유의적으로 억제되었다고 하였다. Choi et al.(2006)도 rutin의 처리가 3T3-L1 세포에서 지방세포의 성장과 관련이 있는 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) 활성을 억제시켰으며, C57BL/6 mice에 64.4% 지방이 함유된 고지방식이와 함께 rutin을 경구로 제공하였을 때 4주 후의 지방량 감소를 통해 체중감소가 관찰되었다고 하였다. 이상의 결과들과 비교해보면 rutin의 처리가 고지방식사와 관련이 높은 비만과 관계된 지방세포나 대장암 세포의 성장을 효과적으로 억제한다는 것이 관찰되었으며, 이러한 결과는 rutin의 처리가 고지방식이와 관련된 질병 세포들의 성장을 억제시키거나 둔화시켜 병으로의 진행이나 증상으로 표현되는 것을 차단하는데 효과가 있다고 할 수 있다.

2. 염증매개 사이토카인 mRNA 유전자 발현에 미치는 영향

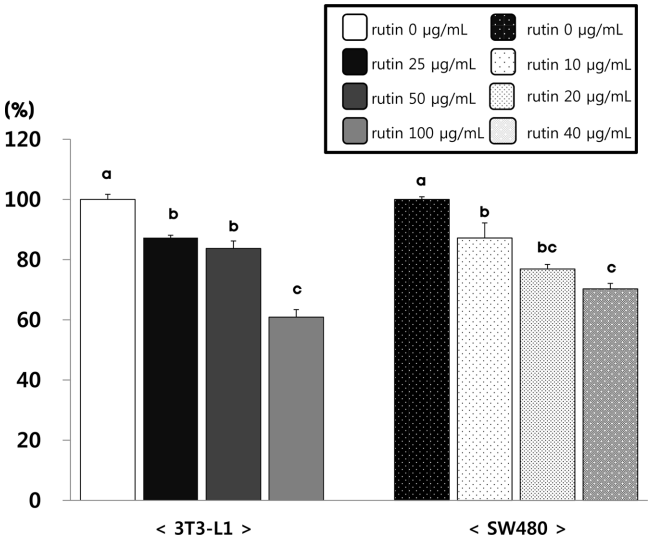
Rutin의 항염증 효과를 관찰하기 위해서 지방세포와 대장암세포에 각 농도별 rutin을 처리한 다음, 염증을 매개하는 사이토카인들의 mRNA 유전자 발현을 관찰해 봄으로써 rutin의 함염증 효과를 관찰하였다. 실험 결과로는, 3T3-L1에 rutin을 25 μg/mL 이상 처리하였을 때 대조군에 비해 IL-1β mRNA 유전자 발현이 12.7% 억제되었으며, 처리 농도가 증가할수록 농도 의존적으로 17.3, 39.1% 로 유전자 발현이 감소되는 것을 확인하였다<Figure 2>($p<0.05$). 대장암 세포 SW-480에서도 IL-1β 유전자 발현은 rutin 처리 20 μg/mL에서 유전자의 발현이 감소되었으며, rutin의 농도를 2배로 증가시킨 40 μg/mL에서는 rutin을 처리하지 않은 대조군에 비해 26.7% 발현이 유의적으로 억제되었다<Figure 2>($p<0.05$).

IL-6 유전자 발현은 지방세포인 3T3-L1에 rutin 50 μg/mL 이상, 대장암 세포 SW-480에서는 좀 더 낮게 처리된 농도인 10 μg/mL에서부터 IL-6 단백질 유전자 발현이 유의적으로 억제되는 것을 관찰하였다<Figure 3>($p<0.05$). 이는 대조군과 비교하였을 때 3T3-L1은 50, 100 μg/mL에서 유전자 발현이 83.7, 60.9%로 낮아졌으며, SW-480에서는 10, 20, 40 μg/mL에서 각각 12.8, 23.1, 29.7%로 염증 유도 유전자 발현이 감소되었다<Figure 3>($p<0.05$). Pro-inflammatory cytokine인 IL-1β, IL-6 는 대장암 발생과 진행 과정에 가장 상관성이 높은 cytokine (Reinecker et al. 1993)으로 메밀이



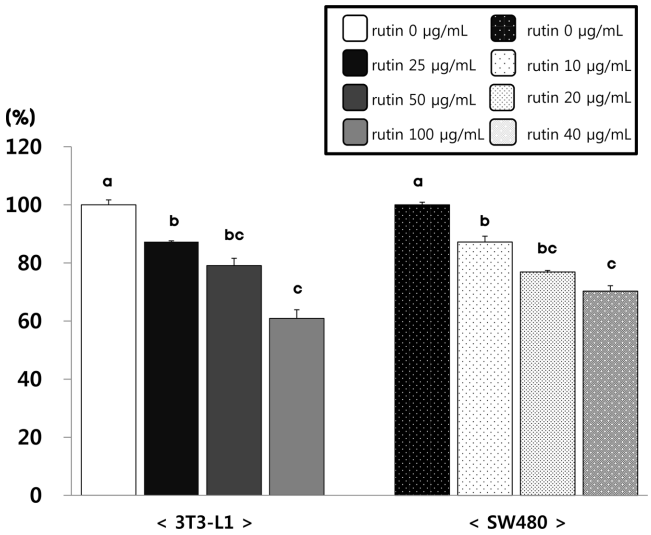
<Figure 2> Effects of rutin on IL-1β mRNA expression in 3T3-L1 and SW-480 cells.

Values not sharing the same perscript letter are statistically different by Duncan's multiple range test in the same type of rutin treatment ($p<0.05$).



<Figure 3> Effects of rutin on IL-6 mRNA expression in 3T3-L1 and SW-480 cells.

Values not sharing the same perscript letter are statistically different by Duncan's multiple range test in the same type of rutin treatment ($p<0.05$).

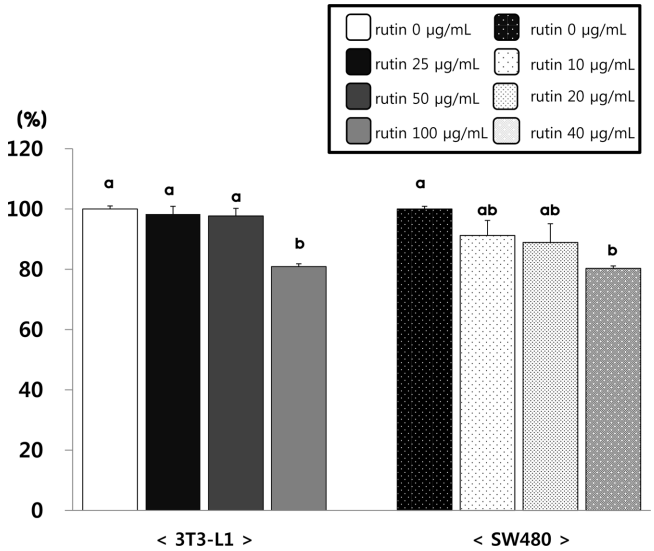


<Figure 4> Effects of rutin on TNF-α mRNA expression in 3T3-L1 and SW-480 cells.

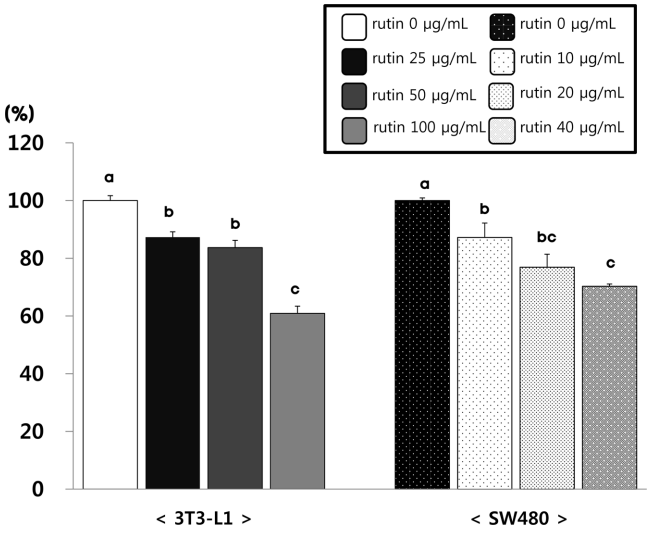
Values not sharing the same perscript letter are statistically different by Duncan's multiple range test in the same type of rutin treatment ($p<0.05$).

첨가된 생식을 대장암이 유도된 mouse에게 제공하였을 때, 메밀 생식을 70% 첨가한 실험군에서 대조군에 비해 IL-1β 유전자 발현이 55%로 낮아졌다고 하였으며, IL-6 유전자의 경우는 대조군에 비해 메밀 생식을 제공한 실험군이 60.7% 유의적으로 유전자의 발현이 억제되었다고 하였다(Cuellar-Nuñez et al. 2018). CH Park & Yoo HJ.(2004) 연구에 따르면 비만은 사이토카인 생산의 이상, 급성기작용 물질의 증가, 염증 신호전달체계의 활성화된 상태를 나타나는 이유로 만성 염증상태와 관련이 있다고 하였으며, 지방세포에서 IL-6 유전자의 발현이 증가되어 있고 전신순환으로의 분비도 증가되어 있다고 하였다. 이번 연구 결과에서도 만성 염증과 관련된 대장암과 비만에서 높게 나타났던 IL-1β, IL-6 mRNA 유전자 발현이 메밀 성분 rutin 처리에 의해 유의적으로 억제되었다는 것은 rutin의 처리가 항염증 효과를 통해 대장암이나 비만이라는 질병을 치료하고 악화되는 것을 지연시키는데 효과적인 결과를 가져올 수 있다는 것을 시사한다고 하겠다.

인슐린 저항성을 유도하고, 혈중 내 지질 수준을 악화시켜 HDL-C (high density lipoprotein cholesterol)을 감소하고 혈관내피세포 기능 저하를 유도해서 비만, 우울증, 당뇨, 동맥경화 등의 심혈관질환을 유발하는 인자로 알려져 있는 TNF-α (Jin et al. 2010; Storck et al. 1994) 유전자 발현에도 rutin의 처리가 유의적으로 감소하였다<Figure 4> ($p<0.05$). 3T3-L1 세포에도 rutin을 25 μg/mL로 처리하였을 때에는 TNF-α mRNA 유전자 발현 수준에는 영향을 미치지 않았으나, 처리 농도를 2배로 증가시킨 50 μg/mL에서는 rutin을 처리하지 않은 군에 비해 17.3% 발현이 유의적으로 억제되었다. 또한 대장암세포에서는 10 μg/mL 농도에서부터 TNF-α mRNA 유전자 발현이 감소되었으며, 처리 농도가 증가할수록 농도 의존적으로 발현 감소가 유의적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다. Uysal et al.(1998) 등은 비만 시 지방세포에서 과도하게 분비되는 TNF-α가 인슐린 저항성을 유발하며, TNF와 TNFR1이 결손된 실험쥐 에서는 고지방식이나 비만으로 인해 유도되는 인슐린 저항성이 나타나지 않았다고 하였다. Tilg H & Moschen AR.(2008) 연구에서도



<Figure 5> Effects of rutin on Cox-2 mRNA expression in 3T3-L1 and SW-480 cells.
Values not sharing the same perscript letter are statistically different by Duncan's multiple range test in the same type of rutin treatment ($p<0.05$).



<Figure 6> Effects of rutin on iNOS mRNA expression in 3T3-L1 and SW-480 cells.
Values not sharing the same perscript letter are statistically different by Duncan's multiple range test in the same type of rutin treatment ($p<0.05$).

비만 시 지방세포에서는 염증성 사이토카인이 인슐린 신호체계를 방해하여 염증성 매개자인 TNF-α, IL-6, IL-8, CRP와 같은 비특이적 급성기 염증 반응 물질의 혈중 내 수준을 증가시켰다고 하였다. Reinecker et al.(1993)의 연구에서는 Pro-inflammatory cytokine인 IL-1β, IL-6, TNF-α의 수준 증가가 대장염, 대장암 발생 및 진행과정과 가장 관련성이 높다고 하였으며, Lee et al.(2016)의 연구에 따르면 흑메밀 에탄올 추출물을 신경교세포인 BV-2세포와 대식세포 RAW 264.7에 처리하였을 때 10 μg/mL 때부터 control군과 비교하였을 때 nitric oxide (NO) 생성과 DPPH radical 저해 능력이 흑메밀 에탄올 추출물을 첨가한 실험군에서 농도 의존적으로 소거되었다고 하였다.

체내 여러 염증 인자들 중에서 iNOS는 NO와 COX-2 유전자 생성과 분비를 유도하며, PGE2 등의 염증반응 전사인자는 NF-κB를 활성화시킨다. 그 결과 NO와 PGE2를 생성하여 염증 환경으로 변화되게 된다(Dubois et al. 1998). 또한 염증인자에는 TNF-α, IL-1β 등도 포함되어 염증의 악화를 초래하게 된다(Grabowski et al. 1997; Kang et al. 1996). 그러므로 본 연구에서도 rutin 처리 후 Cox-2, iNOS 유전자들의 mRNA 수준에서 미치는 영향에 대해서도 실험하였다. Cox-2 mRNA 유전자의 발현은 3T3-L1에서는 처리농도 100 μg/mL에서 유의적으로 발현이 감소되었으며, SW-480 대장암세포에서는 40 μg/mL에서 억제되었다<Figure 5> ($p<0.05$). iNOS 유전자의 경우는 지방세포에서는 rutin의 처리농도 25 μg/mL에서 유의적인 발현 억제가 관찰되었으며, 이 결과는 대조군에 비해 25, 50, 100 μg/mL 농도에서 12.7, 19.3, 39.1% 발현 억제를 의미하며, 대장암 세포에서도 rutin을 10, 20, 40 μg/mL 처리한 실험군이 대조군에 비해 87.2, 76.9, 70.3%로 발현이 낮아지는 것이 관찰되었다 <Figure 6> ($p<0.05$). 이러한 결과들을 종합해 볼 때 메밀의 기능적인 성분인 rutin을 지방세포와 대장암세포에 처리하는 것이 염증과 관련된 유전자들의 발현에 매우 효과적인 억제가 관찰되었다. 염증과 관련된 많은 사이토카인 중에서 만성 염증성 질환 유발인자로 가장 강력하게 촉진되는 NF-κB는 염증 유발 촉진자 역할을 하는 IL-1β, IL-6, TNF-α 유전자의 발현을 자극한다(Lagathu et al. 2003). 또한 NF-κB 유전자는 adhesion molecules, iNOS, COX-2와 같은 염증 유발 촉진 유전자의 생성과 분비를 자극하는 역할도 한다. iNOS는 사이토카인, 바이러스, lipopolysaccharide (LPS) 등의 자극에 의해 유전자 발현이 유도되어, 대량의 nitric oxide (NO)를 생성한다. NO의 생성 증가는 세포증식, 세포 침식의 원인이 되며, 일부조직이나, 신체 전반에 걸친 염증질환을 유발하는 것으로 알려져 있다(Weisberg SP. 2006). COX-2는 염증매개체인 prostaglandinE2 (PGF2) 생성을 자극하는 역할도 하는데(Ouchi et al. 2003), 이러한 결과가 염증 반응으로 유발되는 비만과 일부 암 발생을 예방하거나 치료하는 물질로의 이용 가능성을 보여주는 것이라 사료된다.

이번 연구는 *in vitro*에서 진행된 실험으로 실제 *in vivo*에서도 같은 활성을 나타내는지 확인할 필요가 있으며, 더 나아가 메밀을 식품으로 섭취했을 때의 생리적인 효능이 어떤 기전으로 일어나는지에 대한 더 깊이 있고 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각되어진다.

Ⅳ. 요약 및 결론

본 연구에서는 항균, 항산화, 항염증 효과 등이 보고되어 있는 메밀의 대표적인 기능성 생리활성 성분인 rutin을 고지방식이와 상관성이 높은 질병으로 한국에서 발병률과 사망률이 꾸준히 증가되고 있는 비만과 대장암에서의 세포 성장과 항염증 효과를 관찰하고자 실험하였다. 비만을 유도하는 지방세포인 3T3-L1과 고지방식사로 유도되는 대장암 세포, SW-480세포에 rutin을 농도별로 처리한 후, 세포의 성장과 항염증인자들의 mRNA 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. 지방세포인 3T3-L1에서는 rutin을 처리한 48시간 후에 지방세포의 성장이 억제되었으며, 처리 농도가 25 μg/mL에서부터 유의적으로 성장이 감소되었다. 염증과 관련된 IL-1β, IL-6, TNF-α 유전자 발현에도 rutin의 처리 농도가 증가할수록 유전자의 발현은 감소되었고, COX-2, iNOS의 발현은 각각 50, 25 μg/mL 농도에서 유전자 발현이 낮아졌다. 인체 대장암 세포인 SW-480의 경우도 지방세포와 유사한 결과를 보였으며, 암세포의 성장은 rutin을 처리한 24시간부터 처리 농도 40 μg/mL에서 억제되었다. 대장암세포에서는 rutin의 처리시간, 농도 의존적으로 암세포의 성장을 유의적으로 억제하는 것도 관찰하였다. 또한, 염증 유발인자 IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, iNOS 유전자의 mRNA 발현에도 메밀 성분 rutin의 처리가 10, 10, 10, 40, 10 μg/mL에서 각 유전자 mRNA발현이 효과적으로 낮아지는 것도 확인되었다. 따라서 메밀 성분 rutin는 염증과 관련된 비만이나 암 등의 많은 질병을 치료하거나 억제하는 예방적인 차원에서 기능성 식품이나 비만과 암의 치료제로의 개발가능성이 관찰되었고, 이를 위해서 동물과 인체를 대상으로 하는 더 깊이 있고 폭넓은 임상 연구나 독성에 대한 안정성 연구가 진행되어질 것이 요구된다. 또한 본 연구 결과는 rutin을 이용한 *in vitro*실험에서 실험조건을 계획하는 과정에서 활용도가 높을 것이며, 이러한 결과는 *in vivo* 실험에서 임상적인 허용 범위를 계획하는데, 기초 자료로 활용되어질 것으로 기대해본다.

Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

References

Artwohl M, Muth K, Kosulin K, de Martin R, Hölzenbein T, Rainer G, Freudenthaler A, Huttary N, Schmetterer L, Waldhäusl WK, Baumgartner-Parzer SM. 2007. R-(+)-alpha-lipoic acid inhibits endothelial cell apoptosis and proliferation: involvement of Akt and retinoblastoma protein/E2F-1. Am J Physiol Endocrinol Metab., 293(3):E681-689

Asfour MH, Mohsen AM. 2018. Formulation and evaluation of pH-sensitive rutin nanospheres against colon carcinoma using HCT-116 cell line. J Advanced Res., 9:17-26

Breithaupt-Grögler K, Niebch G, Schneider E, Erb K, Hermann R, Blume HH, Schug BS, Belz GG. 1999. Dose-proportionality of oral thioctic acid—coincidence of assessments via pooled plasma and individual data. Eur J Pharm Sci., 8(1):57-65

Brooks GA, Casey MD, Timothy PW. 1984. Estimation of anaerobic energy production and efficiency in rat during exercise. J Appl Physiol, 56:520-525

Cho Y, Choi MY. 2015. Inhibitory effects of flavonoids on growth of HT-29 human colon cancer cells. J korean Soc Food Sci and Nutri., 44(3):338-346

Chu SK, Seo EY, Kim WK, Kang NE. 2008. Effect of cyanidin on cell motility and invasion in MDA-MB-231 human breast cancer cells. Korean J Nutr., 41(8): 711-717

Cui CB, Lee EY, Ham SS, Lee DS. 2008. Antimutagenic and cytotoxic effects of an ethanol extract of buckwheat sprout. J Korean Soc. Appl. Biol. Chem., 51(3):212-218

Davis GDJ, Masilamoni JG, Arul V, Sakthivelu IV, Kumar MSM, Baraneedharan U, Paul SFD. 2009. Radioprotective effect of DL-α-lipoic acid on mice skin fibroblasts. Cell Biol Toxicol., 25:331-340

Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. 1998. Cyclooxygenase in biology and disease. FASEB J., 12:1063-1073

Ghibu S, Richar C, Delemasure S, Vergely C, Mogosan C, Muresan A. 2008. An endogenous dithiol with antioxidant properties: Alpha-lipoic acid, potential uses in cardiovascular disease. Elsevier Masson SAS., 57:161-165

Grabowski PS, Wright PK, Van't Hof RJ, Helfrich MH, Ohshima H, Ralston SH. 1997. Immunolovalization of inducible nitric oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Br J Rheumatol., 36:651-655

Green H, Kehinde O. 1975. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. Cell., 5(1):19-27

Griffith JQ, Couch JF, Lindauer MA. 1995. Effect of rutin on increased capillary fragility in man. Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 55:228-229

Hahm JR, Noh HS, Ha JH, Roh GS, Kim DR. 2014. Alpha-lipoic acid attenuates adipocyte differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 cells vi dependent autophagy. Life science., 100(2):124-132

Han D, Sen CK, Roy S, Kobayashi MS, Tritschler HJ, Packer L. 1997. Protection against glutamate-induced cytotoxicity in

C6 glial cells by thiol antioxidants. Am J Physiol., 273: R1771-R1778

Hirsch J, Batchelor B. 1976. Adipose tissue cellularity in human obesity. Clin Endocrinol Metab., 5(2):299-311

Hwang EJ, Lee SY, Kwan SJ, Park MH, Bu HO. 2006. Antioxidative, antimicrobial and cytotoxic activities of fagopyrum esculentum moench extract in germinate. Korean J Med Cor Sci.,14(1):1-7

Jin HJ, Kim JS, Kang SS, Son KH, Chang HW, Kim HP. 2010. Anti-inflammatory and anti-arthritic activity of the roots of Sophora flavescens. J Ethnopharmacol., 127(3):589-295

Jordan SW, Cronan JE Jr. 1997. Biosynthesis of lipoic acid and posttranslational modification with lipoic acid in Escherichia coli. Methods Enzymol., 279:176-183

Kang RY, Freire-Moar J, Sigal E, Chu CQ, 1996. Expression of cyclooxygenase-2 in human and an animal model of rheumatoid arthritis. Br J Rheumatol., 35:711-718

Kim DM, Ahn CW, Nam SY. 2005. Prevalence of obesity in Korea. Obes Rev., 6(2):117-121

Kim MS, Park JY, Namkoong C, Jang PG. 2004. Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. Nature medicine., 10(7):727-733

Koh JM, Lee YS, Byun CH, Chang EJ, Kim H, Kim YH, Kim HH, Kim GS. 2005. Alpha-lipoic acid suppresses osteoclastogenesis despite increasing the receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoprotegerin ratio in human bone marrow stromal cells. J Endocrinol. 185(3):401-413

Kundu JK, Surh YJ. 2008. Inflammaton: gearing the journey to cancer. Mutat Res., 659(1-2):15-30

Lagathu C, Bastard JP, Aclair M, Macchi M, Capeau J, Caron M. 2003. Chronic interleukin-6(IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistence in adipocyte: prevention by rosiglitazone. Biochem Biophys Res Commun., 311:372-379

Lee HH, 2008. A study on the utilization of functional cosmetics materials using the bioactive compounds from Buckwheat. Kor. J. Aesthet. Cosmetol., 6(2):1-7

Lee MS, Kim CT, Kim CJ, Cho YJ, Kim YH. 2006. Efeects of Portulaca Oleracea L. Extract on lipolysis and hormone sensitive lipase (HSL) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Korean J Nutr., 39(8):742-747

Lee WJ, Lee IK, Kim HS, Kim YM, Koh EH, Won JC, Han SM, Kim MS, Jo I, Oh GT, Park IS, Youn JH, Park SW, Lee KU, Park JY. 2005. Alpha-lipoic acid prevents endothelial dysfunction in obese rats via activation of AMP-activated protein kinase. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 25(12):2488-2494

Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. J Clin invest., 117:175-184

Maliska D, Winiarska K, 2005. Lipoic acid: characteristic and therapeutic application. Postepy Hig Med Dosw., 59:535-543

Nanji AA, Jokelainen K, Tipoe GL, Rahemtulla A, Thomas P, Dannenberg AJ. 2003. Curcumin prevents alcohol-induced liver disease in rats by inhibiting the expression of NF-kappaB-dependent genes. Am J Physiol Gastointest Liver Physiol., 284:G321-327

Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K. 2003. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. Curr Opin Lipid 14:561-566

Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. 1995. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. Free Radic Biol Med., 19:227-250

Pari L, Murugavel P. 2004. Protective effect of alpha lipoic acid against chloroquine-induced hepatotoxicity in rats. J Appl Toxicol., 24:21-26

Park HS, Choi JS, 1997. Effects of dietary fat and fiber on biomarkers of colon cancinogenesis in rats. Korean Society for lipid and Atherosclerosis., 7(2):103-124

Park SK, Jeen YT, Lee KG, Kim JH, Hyun JJ, Kim ES, Park SH, Keum BR, Seo YS, Kim YS, Chun HJ, Um SH, Choi JH, Kim CD. 2009. Clinical significance of serum C-reactive protein in patients with cololectal cancer. Intest Res., 7(2):93-99

Prieto-Hontoria PL, Fernandez-Galilea M, Perez-Matute P, Martinez JA, Moreno-Aliaga M. 2013 Lipoic acid inhibits adiponectin production in 3T3-L1 adipocyte. J Physiol and Biochem., 69(3):595-600

Reed LJ. 1957. The chemistry and function of lipoic acid. Adv Enzymol Relat Subj Biochem., 18:319-347

Reinecker HC, Steffen M, Witthoeft T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP, Readler A. 1993. Enhanced secretion of tumor necrosis factor-α, IL-6, and IL-1β by isolate Lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. Clin Exp Immunol., 94:174-181

Rosenberg HR, Culik R. 1959. Effect of alpha-lipoic acid on vitamin C and vitamin E deficiencies. Arch Biochem Biophys., 80-86

Saengsirisuwan V, Perez FR, Sloniger JA, Maier T, Henriksen EJ. 2004. Interactions of exercise training and alpha-lipoic acid on insulin signaling in skeletal muscle of obese Zucker rats. Am J Physiol Endocrinol Metab., 287(3):E529-536

Seo EY. 2015. Effects of (6)-gingerol, ginger component on adipocyte development and differentiation in 3T3-L1. J Nutri Health., 48(4):327-334

Storck M, Schilling M, Burkhardt K, Prestel R, Abendroth D, Hammer C. 1994. Production of proinflammatory cytokine and adhesion molecules in ex-vivo xenogeneic kidney perfusion. Transpl Int., 7(1):647-649

Teichert J, Kern J, Tritschler HJ, Ulrich H, Preiss R. 1998. Investigations on the pharmacokinetics of alpha-lipoic acid in healthy volunteers. Int J Clin Pharmacol Ther., 36(12):625-628

Terzié J, Grivennikov S, Karin M. 2010. Inflammation and colon cancer. Castroenterology., 136(6):2101-2114.e5

Tilg H, Moschen AR. 2008. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistence. Mol Med., 14:222-231

Uysal KT, Wiesbrock SM, Hotamisligil GS. 1998. Functional analysis of tumor necrosis factor (TNF) receptor in TNF-alpha-mediated insulin resistance in genetic obesity. Endocrinology., 139:4832-4838

Wada H, Shintani D, Ohlrogge J. 1997. Why do mitochondria synthesize fatty acids? Evidence for involvement in lipoic acid production. Proc Natl Acad Sci USA., 18;94(4):1591-1596

Weisberg SP. 2006. CCCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. J Clin Invest., 116:115-124

Yeh WC, Cao Z, Classon SL, McKnight SL. 1995. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three member of the C/EBP family of leucin zipper proteins. Gene., 9:168-181

Yi X, Pashai A, Xia M, Moreau R. 2013. Reveral of obesity-induced hypertriglyceridemia by (R)-α-lipoic acid in ZDF (fa/fa) rats. Biochem Biophys Res Commun., 439(3):390-395

Received December 5, 2018; revised January 24, 2019; accepted February 21, 2019