

Effect of Tetrodotoxin on the Proliferation and Gene Expression of Human SW620 Colorectal Cancer Cells

Yun-Ho Bae*, Hun Kim* and Sung-Jin Lee†,**

Department of Applied Animal Science, College of Animal Life Sciences,
Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

Tetrodotoxin (TTX) is a natural neurotoxin found in several species of puffer fish belonging to *Tetraodon* fugu genus and has been reported to affect processes such as proliferation, metastasis and invasion of various cancer cells. However, it was not revealed which genes were influenced by these reactions. In this experiment, it was examined in human SW620 colorectal cancer cells. The proliferation of SW620 cells was significantly reduced when treated with 0, 1, 10 and 100 μ M TTX for 48 h. It was confirmed using Annexin V-propidium iodide staining that some apoptosis was induced. Differentially expressed genes (DEGs) affecting cell proliferation through RNA sequencing (RNA-seq) were selected. The expression change of DEGs was confirmed by conducting quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). As a result, the mRNA expression of *FOS* and *WDR48* genes was found to be increased in the 100 μ M TTX treatment group compared to the control group. On the other hand, the mRNA expression of *ALKBH7*, *NDUFA13*, *RIPPLY3* and *SELENOM* genes was found to be reduced, and in the case of the *ALKBH7* gene was identified to show significant differences. This experiment suggests that TTX can be used as an important fundamental data to elucidate the mechanism that inhibits the proliferation of SW620 cells.

Key Words: Tetrodotoxin (TTX), Human SW620 colorectal cancer cells, Cell proliferation, Differentially expressed gene (DEG), RNA sequencing (RNA-seq), Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

서 론

Statistics Korea (2021)에서 제공하는 암 발생 및 사망 현황에 따르면, 대장암의 조발생률은 최근 10여 년 동안 감소하는 추세를 보이고 있으나, 2019년 기준 조사망률은 폐암과 간암 다음으로 여전히 높은 것으로 나타났다. 이러한 대장암은 적색육과 가공육의 높은 섭취량과 섬유질이 풍부한 과일, 채소, 곡물 및 유제품의 낮은 섭취량, 지나친 음주량 및 운동 부족 등의 원인으로 인해 발생한다

(Shannon et al., 1996; Corpet, 2011; Bouvard et al., 2015; Friedenreich et al., 2016; Na and Lee, 2017; Gianfredi et al., 2018).

지금까지 수술적 절제술, 화학요법, 면역치료 및 방사선치료 등과 같은 여러 치료 방법들의 발달로 인해 대장암 환자들의 5년 생존율은 증가되었으며, 수술에 따른 사망률과 합병증은 감소되었다(David et al., 2010; Jeong, 2010). 하지만, 대장암 치료를 받은 환자들의 대다수가 재발에 대한 두려움과 후유증을 겪고 있으며, 수술을 하는 동안 암세포가 다른 기관으로 전이되거나 침윤이 될 수 있고,

Received: February 10, 2022 / Revised: March 28, 2022 / Accepted: March 29, 2022

* Graduate student, ** Professor.

† Corresponding author: Sung-Jin Lee. Department of Applied Animal Science, College of Animal Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea.

Tel: +82-33-250-8636, Fax: +82-33-259-5574, e-mail: sjlee@kangwon.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©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.

암의 성장과 혈관신생 등의 부작용으로 인해 보다 나은 치료 방법을 찾는 과정이 필요하다(Ceelen et al., 2014; Dariya et al., 2018).

복어독으로 알려진 tetrodotoxin (TTX)은 *Tetraodon*의 복어 속에 속하는 몇몇 종의 복어들로부터 발견되는 천연 신경독이며, 나트륨 이온 채널의 차단제로 알려져 있다(Hagen et al., 2008). 인간에 대한 TTX의 최소치사량은 약 10,000 MU이며, 이는 약 2 mg에 해당되는 양이다(Noguchi and Ebesu, 2001). 이처럼 TTX는 인간이 섭취할 경우 사망에 이를 정도의 맹독이지만, 극소량의 경우에는 강력한 진통 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Lyu et al., 2000; Marcil et al., 2006; González-Cano et al., 2021). 또한, 다양한 암들에 대한 선행 연구들을 통해 TTX가 암세포의 증식, 전이 및 침윤 등의 과정들에 영향을 미친다는 것이 입증되었다(Cho et al., 2015; Yang et al., 2017). 이와 더불어 이러한 과정들에 관여하는 나트륨 이온 채널이 무엇인지 확인하기 위한 연구들이 현재 진행 중에 있다(Xiao, 2014).

하지만, 장기간에 걸쳐 많은 연구들이 진행되었음에도 불구하고 TTX를 치료제로 사용하기 위한 정보들은 아직 부족하며, TTX의 처리가 어떤 유전자들의 발현에 변화를 일으킴으로써 이러한 반응들을 유도하는지에 대한 연구 또한 이루어지지 않았다. 따라서, 본 실험에서는 SW620 세포에 TTX를 처리하였을 시 관여하는 메커니즘이 무엇인지를 확인하기 위해 유세포 분석(FACS), RNA 염기서열 분석(RNA-seq) 및 실시간 정량적 PCR (qRT-PCR)을 진행함으로써 암에 대한 치료제로써 TTX의 활용 가능성을 평가하였다.

재료 및 방법

Tetrodotoxin (TTX)

TTX는 Abcam (Cambridge, UK)에서 구입하였으며, sodium citrate (BioShop, Burlington, ON, Canada)를 pH 4.8, 20 mM의 농도로 3차 멸균수에 용해시켜 얻어진 buffer에 녹여 10 mM 농도의 저장액을 만들었다. 만들어진 저장액은 aliquot하여 -20°C에서 보관하였다.

세포 배양

SW620 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA), 100 units/mL penicillin 및 100 mg/mL streptomycin (Welgene, Daegu, Korea)

이 함유된 Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640, Welgene) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 세포배양기에서 배양하였다. SW620 세포를 이용한 실험들은 강원대학교 생명윤리위원회의 심의면제승인(KNUIRB-2022-03-010)을 받았다.

MTT assay

MTT assay는 CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하였으며, Lee 등 (2018)이 사용한 방법을 일부 수정하여 진행하였다. 먼저, 1차 배양에서 얻은 세포를 96-well cell culture plate (SPL Life Sciences, Seoul, Korea)에 2×10^4 cells/well의 농도로 seeding하여 24시간 동안 배양하였다. 세포가 plate에 부착되면 배지를 제거하고, TTX가 0, 1, 10 및 100 μ M의 농도로 함유된 새로운 배지를 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. 배양 48시간 후에 다시 배지를 제거하고, 새로운 배지 50 μ L와 dye solution 15 μ L를 첨가하여 다시 4시간 동안 배양하였다. 그 후, solubilization/stop solution 100 μ L를 각 well에 첨가한 다음 1시간 동안 추가로 배양하였다. SpectraMax M4 microplate reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)로 570nm의 파장에서 흡광도를 측정함으로써 SW620 세포의 증식을 계산하였다.

Annexin V-propidium iodide staining을 통한 apoptosis 관찰

다양한 FACS 기술 중 annexin V-propidium iodide staining 방법을 통해 apoptosis를 관찰하였다. 실험은 eBioscience™ Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC (eBioscience, Ltd., San Diego, CA, USA)를 사용하여 진행하였다. 먼저, 세포를 6-well cell culture plate (SPL Life Sciences)에 2×10^5 cells/well의 농도로 seeding하여 24시간 동안 배양하였다. 세포가 plate에 부착되면 배지를 제거하고, TTX가 0 및 100 μ M의 농도로 함유된 새로운 배지를 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. 48시간 동안 배양을 한 후 세포를 harvest한 다음 원심분리하여 상등액을 제거하고, Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS, Welgene)으로 세척을 진행하였다. 그 후, 1X annexin V binding buffer에 부유시킨 다음 annexin V FITC와 propidium iodide staining solution을 첨가한 후 암실에서 15분 동안 반응시켰다. 반응시킨 세포는 BD FACSaria II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 사용하여 annexin V-positive apoptotic cell의 비율을 측정하였다.

Table 1. Information and sequence of functional primers for qRT-PCR

Genes	Sequence	Tm (°C)	Product size (bp)	Accession No.
<i>FOS</i>	F: GGGCAAGGTGGAACAGTTAT R: AGTTGGTCTGTCTCCGCTTG	60	138	NM_005252.4
<i>NDUFA13</i>	F: TTGCCACTGTTACAGGCAGA R: AACACAGACTCCCCACCTT	60	119	NM_015965.7
<i>RIPPLY3</i>	F: GCAGAACTTGATGCTGTCCA R: GCCTCTAGCCTCTGCACAC	60	159	NM_001317777.1
<i>SELENOM</i>	F: AGAGGAACTTCGGACCACG R: CGGCTCTCAGCAAGAGAAGT	60	128	NM_080430.4
<i>WDR48</i>	F: AGAAGTACAACCGAAATGGAGTC R: ACAATGTCGTTACCCAATCAGT	60	169	NM_020839.4
<i>ALKBH7</i>	F: GGCTCCGAGAGACAGAGAA R: GCAGAACTTGATGCTGTCCA	62	171	NM_032306.4
<i>GAPDH</i>	F: CTGCACCACCAACTGCTTAG R: GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT	60~62	108	NM_002046.7

RNA 추출 및 sequencing 분석

RNA-seq을 위해 100 mm cell culture dish (SPL Life Sciences)에 2×10^6 cells/dish의 농도로 세포를 seeding한 후 24시간 동안 배양한 후 세포가 dish에 부착되면 배지를 제거하고, 48시간 동안 0 및 100 μ M 농도의 TTX가 함유된 새로운 배지를 첨가하여 배양하였다. 그 다음, 세포를 harvest한 후 원심분리하여 상등액을 제거하고, DPBS로 세척을 진행하였다. Total RNA는 TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 추출하였으며, 이에 대한 염기서열 분석은 LAS Biotechnology (Seoul, Korea)에 의뢰하여 수행하였다.

qRT-PCR을 통한 mRNA 발현 분석

Total RNA는 위와 동일한 조건으로 세포를 배양한 후 TRIzol[®] Reagent를 사용하여 추출하였다. 추출된 RNA의 농도와 순도는 NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 측정하였다. iScript[™] cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 500 ng의 total RNA로부터 cDNA를 합성하였으며, PowerUP[™] SYBR[™] Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific)와 0.4 pM의 기능성 유전자에 대한 특이적 프라이머들을 사용하여 20 μ L의 reaction volume에서 qRT-PCR을 진행하였다. 사용했던 프라이머들에 대한 정보는 Table 1에 제시하였다. 분석은 Applied Biosystems 7500 Real-Time

PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 수행하였다. *ALKBH7* 유전자를 제외한 일반적인 qRT-PCR의 반응 조건은 다음과 같다: 초기 변성단계 50°C에서 2분, 95°C에서 2분 후 변성단계 95°C에서 15초 및 결합과 신장단계 60°C에서 1분 과정 40회 반복. *ALKBH7* 유전자의 qRT-PCR의 반응 조건은 다음과 같다: 초기 변성단계 50°C에서 2분, 95°C에서 2분 후 변성단계 95°C에서 15초 및 결합단계 62°C에서 30초와 신장단계 72°C에서 30초 과정 40회 반복. 두 경우 모두 해리곡선의 조건은 95°C에서 15초, 60°C에서 1분 및 95°C에서 15초를 진행하였으며, 관심 있는 유전자들의 mRNA 발현을 정규화하기 위한 기준으로 *GAPDH* 유전자의 표준곡선을 사용하였다. 해당 유전자들의 상대적인 mRNA 발현은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 사용하여 계산하였다.

통계 분석

모든 실험들은 세 번씩 반복 진행하였으며, 이에 대한 결과는 평균 ± 표준오차(SEM)로 계산하였다. TTX 미처리군(대조군)과 TTX 처리군 간의 차이는 SAS software ver. 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA)의 분산분석(ANOVA), 일반선형모형(GLM) 및 Duncan 다중범위검정을 사용하여 결정하였으며, *P*-value가 0.05 미만일 경우 통계적으로 유의미하다고 판정하였다. 도표는 GraphPad Prism ver. 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)을 사용하여 작성하였다.

결과 및 고찰

TTX가 SW620 세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해 TTX를 48시간 동안 각각 0, 1, 10 및 100 μM 농도로 처리한 후 MTT assay를 진행하였으며, 그 결과를 Fig. 1에 제시하였다. SW620 세포의 증식은 1 μM 농도에서 88.35% ($P < 0.05$), 10 μM 농도에서 85.36% ($P < 0.01$) 및 100 μM 농도에서 74.56% ($P < 0.001$)로 농도의존적으로 유의미하게 감소되는 것으로 확인되었다.

TTX의 처리에 의해 SW620 세포의 증식이 감소되는 것

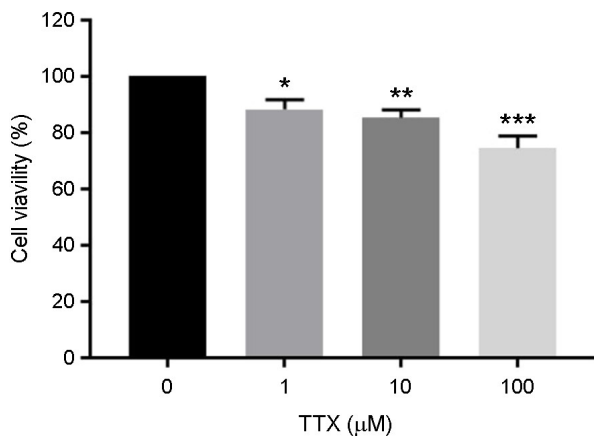


Fig. 1. Effect of TTX on the proliferation of SW620 cells in vitro using MTT assay. SW620 cells have cultured with 0, 1, 10 and 100 μM TTX for 48 h. Data are expressed as percentage of 0 μM (control), are the mean \pm standard error of means (SEM) of three separate experiments. * $P < 0.05$ vs control, ** $P < 0.01$ vs control, *** $P < 0.001$ vs control.

으로 확인되었기 때문에 세포증식의 감소가 apoptosis의 유도와 연관이 있을 것으로 기대되어 annexin V-propidium iodide staining을 진행하였다. 48시간 동안 TTX를 0 및 100 μM 의 농도로 처리한 후 annexin V-positive apoptotic cell들의 비율을 측정하였다. 대조군에 비해 100 μM 농도의 TTX 처리군에서 apoptosis가 시작된 세포들의 비율은 5.205%에서 6.605%로, apoptosis가 진행되어 죽은 세포들의 비율은 7.335%에서 8.23%로 증가되는 것으로 확인되었으나, 유의미한 차이는 나타나지 않았다(Fig. 2). 따라서, TTX의 처리는 apoptosis를 유도하여 SW620 세포의 증식에 영향을 미치는 것은 하지만, 이보다는 다른 메커니즘에 의한 영향을 더 많이 받는 것으로 판단하여 RNA-seq을 진행함으로써 TTX를 처리하였을 시 나타나는 차등발현 유전자(differentially expressed gene, DEG)들을 확인하였다.

대조군과 TTX 처리군의 RNA-seq을 통해 확인된 유전자들의 수는 총 19,389개였다. 이 중, q -value ≤ 0.01 의 조건에서 총 16개의 유의미한 차이를 나타내는 DEG들이 확인되었다. 대조군에 비해 100 μM 농도의 TTX 처리군에서 5개의 상향조절되는 DEG들(*FOS*, *ZFAND4*, *FAM8A1*, *WDR48* 및 *ZC3HAV1*)과 11개의 하향조절되는 DEG들(*HBA1*, *CAMK2B*, *CCDC88B*, *RIPPLY3*, *ALKBH7*, *TMEM256*, *SELENOM*, *NDUFA13*, *HBA2*, *CLDN2* 및 *TNNI2*)이 유의미한 차이를 나타내는 것으로 확인되었다(Table 2).

또한, 모든 DEG들에 대한 유전자 온톨로지(gene ontology, GO) 기능 분석을 진행한 결과, DEG에 풍부한 것으로 밝혀진 GO term은 biological process의 경우 'oxygen transport', 'gas transport', 'hydrogen peroxide catabolic process', 'antibiotic catabolic process', 'bicarbonate transport', 'response to

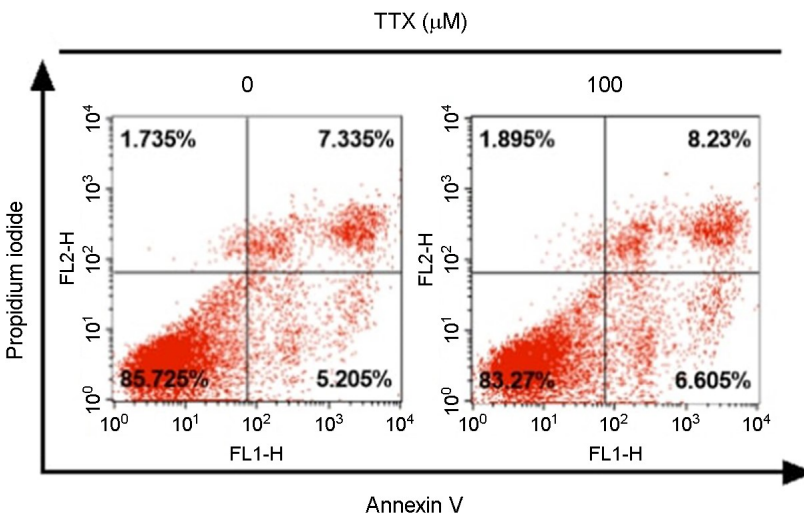


Fig. 2. Effect of TTX on annexin V-positive apoptotic cell numbers in SW620 cells. SW620 cells were treated with TTX (0 and 100 μM) for 48 h. Apoptosis was measured by annexin V and propidium iodide double staining. Apoptotic cells were analyzed by flow cytometry.

Table 2. UP- and down-regulated genes in 100 μ M TTX-treated SW620 cells compared with control

Official gene symbol	Full description	Log2FC	P-value	q-value
Up				
<i>FOS</i>	Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3796]	1.102	0.00005	0.00295
<i>ZFANDA</i>	Zinc finger AN1-type containing 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:23504]	1.082	0.00005	0.00295
<i>FAM8A1</i>	Family with sequence similarity 8 member A1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16372]	1.03	0.00005	0.00295
<i>WDR48</i>	WD repeat domain 48 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30914]	1.008	0.00005	0.00295
<i>ZC3HAV1L</i>	Zinc finger CCCH-type containing, antiviral 1 like [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:22423]	1.648	0.00025	0.00976
DOWN				
<i>HBA1</i>	Hemoglobin subunit alpha 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4823]	-3.312	0.00005	0.00295
<i>CAMK2B</i>	Calcium/Calmodulin dependent protein kinase II beta [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1461]	-2.189	0.00005	0.00295
<i>CCDC88B</i>	Coiled-coil domain containing 88B [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:26757]	-1.128	0.00005	0.00295
<i>RIPPLY3</i>	Ripply transcriptional repressor 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3047]	-1.039	0.00005	0.00295
<i>ALKBH7</i>	AlkB homolog 7 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:21306]	-1.027	0.00005	0.00295
<i>TMEM256</i>	Transmembrane protein 256 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:28618]	-1.014	0.00005	0.00295
<i>SELENOM</i>	Selenoprotein M [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30397]	-1.01	0.00005	0.00295
<i>NDUFA13</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A13 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17194]	-1.007	0.00005	0.00295
<i>HBA2</i>	Hemoglobin subunit alpha 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4824]	-6.617	0.00015	0.0068
<i>CLDND2</i>	Claudin domain containing 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:28511]	-1.392	0.00015	0.0068
<i>TNNI2</i>	Troponin I2, fast skeletal type [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11946]	-1.128	0.0002	0.00832

inorganic substance' 및 'hydrogen peroxide metabolic process' 가, cellular component의 경우에는 'haptoglobin-hemoglobin complex', 'hemoglobin complex', 'endocytic vesicle lumen' 및 'cytosolic small ribosomal subunit'이, molecular function의 경우에는 'haptoglobin binding', 'oxygen carrier activity', 'oxygen binding', 'molecular carrier activity', 'peroxidase activity' 및 'oxidoreductase activity, acting on peroxide as acceptor'로 확인되었다(Fig. 3). 하지만, 본 실험에서는 어떤 유전자들의 발현 변화가 세포증식의 억제를 유도하는지를 확인하는 것에 중점을 두었기 때문에 유의미한 차이를 나타내

는 것으로 확인된 16개의 DEG들 중 발현이 증가되었을 시 세포증식을 활성 시키는 것으로 알려진 유전자(*FOS*, *RIPPLY3* 및 *SELENOM*)와 세포증식을 억제시키는 것으로 알려진 유전자(*ALKBH7*, *NDUFA13* 및 *WDR48*)를 선별한 후 RNA-seq 결과를 검증하기 위해 qRT-PCR을 진행하였다.

TTX를 0 및 100 μ M의 농도로 처리하여 qRT-PCR을 진행한 결과, Fig. 4와 5에 제시된 바와 같이 RNA-seq 결과와 유사하게 *FOS* 및 *WDR48* 유전자의 mRNA 발현은 증가되는 것으로 확인되었으며, *ALKBH7*, *NDUFA13*, *RIPPLY3*

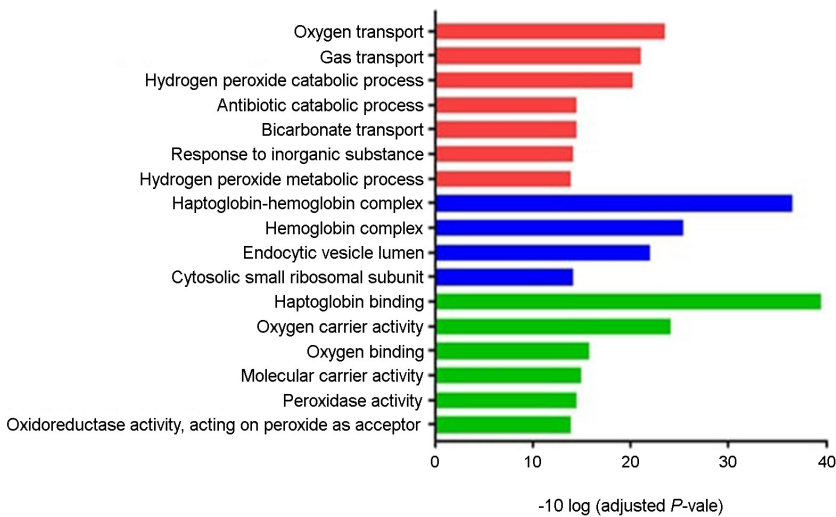


Fig. 3. GO functional analysis of DEGs in SW620 cells. GO analysis based on the treatment of TTX (0 and 100 μ M) for 48 h was performed by g:Profiler ver. 0.6.7. The 10 singular enrichment analysis terms related to biological process (red), cellular component (blue) and molecular function (green) are presented. All adjusted statistically significant values of the GO terms were $-\log_{10}$ converted.

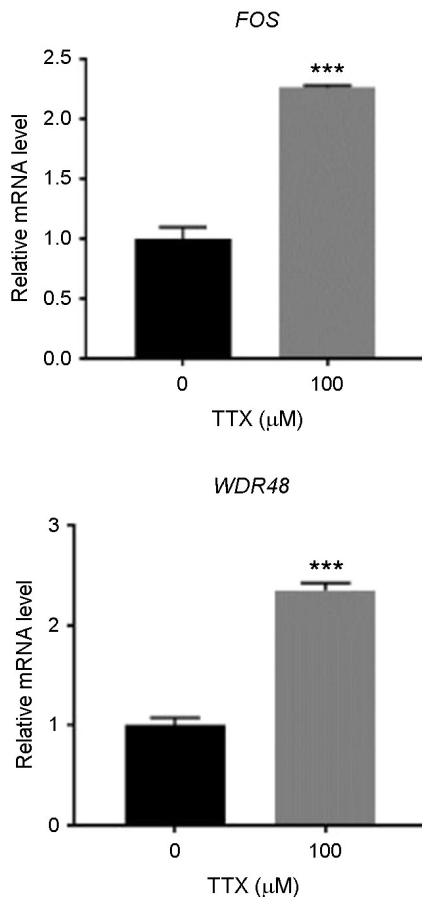


Fig. 4. Quantification of the mRNA profile of up-regulated genes in RNA-seq. SW620 cells incubated with each concentration of TTX (0 and 100 μ M) for 48 h. TTX exposure affected the mRNA abundance of certain genes in the cells. The mRNA level of both genes was normalized to the GAPDH gene. Data are expressed as the mean \pm SEM. All experiments were repeated at least three times. *** $P < 0.001$ vs control.

및 *SELENOM* 유전자의 mRNA 발현은 감소되는 것으로 확인되었다. 또한, *ALKBH7*, *FOS* 및 *WDR48* 유전자의 유전자의 경우 유의미한 차이를 나타내는 것으로 확인되었다.

SW620 세포에 TTX를 처리하였을 시 세포증식이 억제된다는 선행 연구(Xiao, 2014)와 유사하게 본 실험에서도 MTT assay 결과 세포증식이 억제되는 것으로 확인되었다 (Fig. 1). 하지만, 세포증식을 억제하는 메커니즘은 RNA-seq과 qRT-PCR 결과에서도 명확하게 나타나지 않았다. 다만, 이러한 결과가 나타난 이유는 본 실험에서 세포증식을 억제시키는 것으로 확인된 *WDR48* 유전자의 기능이 세포증식을 활성화 시키는 것으로 확인된 *ALKBH7* 및 *FOS* 유전자의 기능보다 더 크게 작용했거나 한두 개의 유전자들에 의해서가 아니라 여러 개의 유전자들이 복합적으로 작용했기 때문인 것으로 판단된다.

결론적으로, TTX의 처리는 인간 SW620 대장암 세포의 증식을 억제시키는 데 효과가 있으며, 이러한 세포증식의 억제는 *WDR48* 유전자의 발현 증가를 통한 apoptosis의 영향도 일부 있지만, 다른 메커니즘에 의한 영향도 존재할 것으로 추정된다.

따라서, TTX가 SW620 세포의 증식에 영향을 미치는 메커니즘을 정확하게 밝히기 위해서는 추후 보다 더 다양한 DEG 분석 및 mRNA와 단백질 수준에서의 발현 변화를 추가적인 실험들을 통해 확인하는 과정이 필요할 것으로 생각된다. 또한, 본 실험이 이를 밝히는 데 중요한 기초자료로써 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

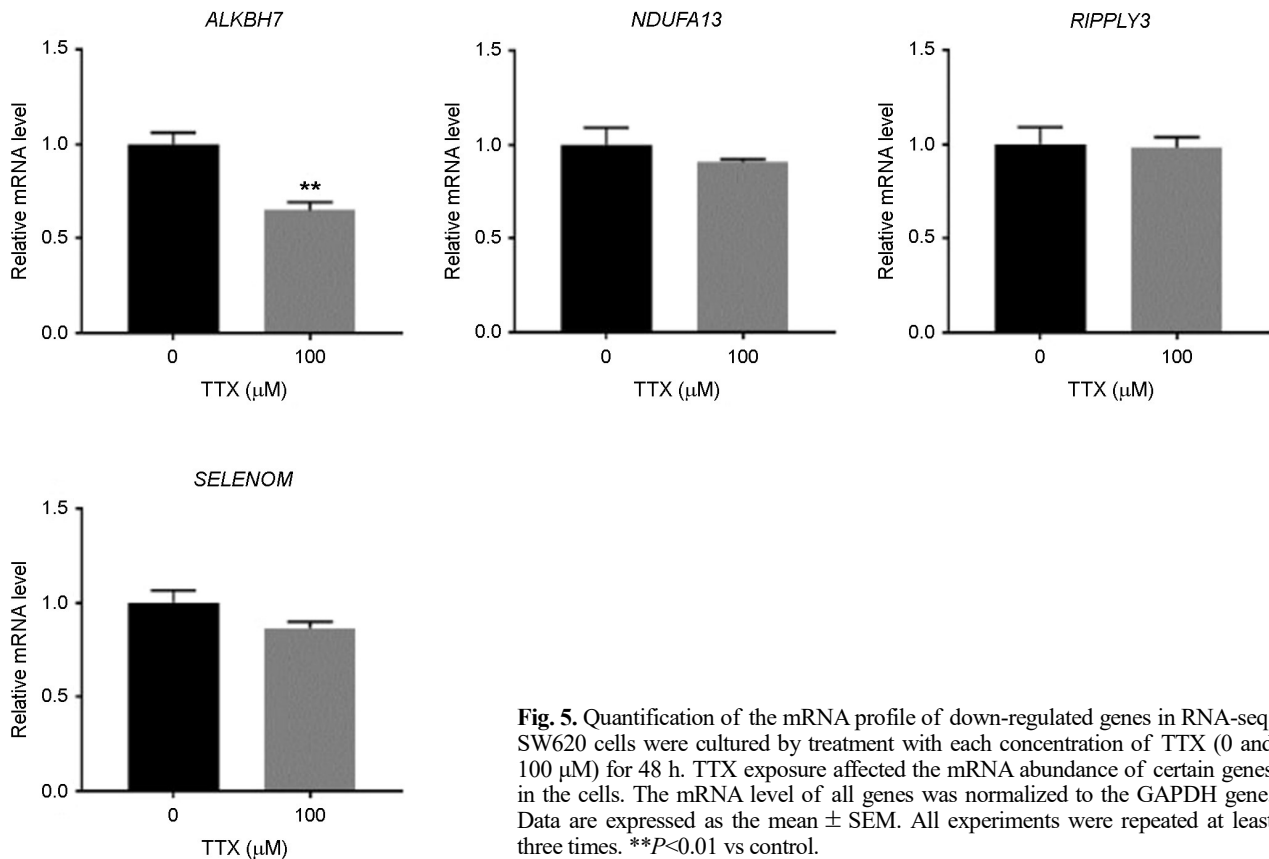


Fig. 5. Quantification of the mRNA profile of down-regulated genes in RNA-seq. SW620 cells were cultured by treatment with each concentration of TTX (0 and 100 μM) for 48 h. TTX exposure affected the mRNA abundance of certain genes in the cells. The mRNA level of all genes was normalized to the GAPDH gene. Data are expressed as the mean ± SEM. All experiments were repeated at least three times. ** $P < 0.01$ vs control.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by National Research Foundation of Korea (Project number: 2017R1A2B2012125).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ, et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol.* 2015. 16: 1599-1600.
- Ceelen W, Pattyn P, Mareel M. Surgery, wound healing, and metastasis: Recent insights and clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2014. 89: 16-26.
- Cho YE, Lee S, Yoon K, et al. The antitumor mechanism and effects of tetrodotoxin: A literature review. *J Acupunct Res.* 2015. 32: 97-107.
- Corpet DE. Red meat and colon cancer: should we become vegetarians, or can we make meat safer?. *Meat Sci.* 2011. 89: 310-316.
- Dariya B, Merchant N, Aliya S, Alam A, Nagaraju GP. EGFR and FGFR in growth and metastasis of colorectal cancer. Role of Tyrosine Kinases in Gastrointestinal Malignancies. 2018. pp. 141-170. Springer, Singapore.
- David C, Wendy A, Heinz-Josef L, et al. Colorectal cancer. *Lancet Oncol.* 2010. 375: 1030-1047.
- Friedenreich CM, Neilson HK, Farris MS, Courneya KS. Physical activity and cancer outcomes: A precision medicine approach. *Clin Cancer Res.* 2016. 22: 4766-4775.
- Gianfredi V, Salvatori T, Villarini M, et al. Is dietary fibre truly protective against colon cancer? A systematic review and meta-analysis. *Int J Food Sci Nutr.* 2018. 69: 904-915.
- González-Cano R, Ruiz-Cantero MC, Santos-Caballero M, et al. Tetrodotoxin, a potential drug for neuropathic and cancer pain relief?. *Toxins (Basel).* 2021. 13: 483.
- Hagen NA, du Souich P, Lapointe B, et al. Tetrodotoxin for moderate to severe cancer pain: A randomized, double blind, parallel design multicenter study. *J Pain Symptom Manage.* 2008. 35: 420-429.

- Jeong SY. Surgical management of colorectal cancer. J Korean Am Med Assoc. 2010.
- Lee YS, Lee SH, Yang BK. Effects of bisphenol S on viability and reactive oxygen species of the sperm and ovarian granulosa cells in pigs. Ann Anim Resour Sci. 2018. 29: 166-171.
- Lyu YS, Park SK, Chung K, Chung JM. Low dose of tetrodotoxin reduces neuropathic pain behaviors in an animal model. Brain Res. 2000. 871: 98-103.
- Marcil J, Walczak JS, Guindon J, et al. Antinociceptive effects of tetrodotoxin (TTX) in rodents. Br J Anaesth. 2006. 96: 761-768.
- Na HK, Lee JY. Molecular basis of alcohol-related gastric and colon cancer. Int J Mol Sci. 2017. 18: 1116.
- Noguchi T, Ebesu JS. Puffer poisoning: Epidemiology and treatment. J Toxicol Toxin Rev. 2001. 20: 1-10.
- Shannon J, White E, Shattuck AL, Potter JD. Relationship of food groups and water intake to colon cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1996. 5: 495-502.
- Statistics Korea. Trends in cancer incidence and mortality. 2021. https://www.index.go.kr/potal/main/EachDtlPageDetail.do?idx_cd=2770
- Xiao Z. Biosynthetic studies of tetrodotoxin and its anticancer activities assessment *in vitro*. MS thesis. Hong Kong Baptist University. 2014. Hong Kong, China.
- Yang Y, Luo Z, Hao Y, et al. mTOR-mediated Na⁺/Ca²⁺ exchange affects cell proliferation and metastasis of melanoma cells. Biomed Pharmacother. 2017. 92: 744-749.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2022.28.1.42>

Cite this article as: Bae YH, Kim H, Lee SJ. Effect of Tetrodotoxin on the Proliferation and Gene Expression of Human SW620 Colorectal Cancer Cells. Biomedical Science Letters. 2022. 28: 42-49.