

연근(*Nelumbo nucifera* Root) 추출물의 HT-29 인체 대장암세포 증식 억제 및 사멸 효과

권태은·정하숙*

덕성여자대학교 식품영양학과

Effects of *Nelumbo nucifera* Root Extract on Proliferation and Apoptosis in HT-29 Human Colon Cancer Cells

Tae-Eun Guon and Ha Sook Chung[†]

Dept. of Food and Nutrition, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

Abstract

Our study is investigated the effects of *Nelumbo nucifera* root extract on HT-29 colon cancer cells. The anti-proliferative effect of 70% ethanol extract from *Nelumbo nucifera* root on HT-29 colon cancer cells was identified based on cell viability, Hoechst 33342 nuclear staining, apoptosis analysis, Western blotting and RT-PCR analyses. In our study, *Nelumbo nucifera* root extract inhibited the growth of HT-29 colon cancer cells in a dose-dependent manner. Concomitant activation of the mitochondria-dependent apoptotic pathway of HT-29 colon cancer cells by *Nelumbo nucifera* root extract occurred via modulation of Bax and Bcl-2 expressions, which activated cleavage of caspases-3 and -9. The findings of this study indicate that *Nelumbo nucifera* root extract induces apoptosis in HT-29 colon cancer cells, and this phenomenon is occurs via the death receptor-mediated and mitochondria-mediated apoptotic pathways.

Key words: *Nelumbo nucifera* root extract, HT-29 cells, colon cancer, proliferation, apoptosis

서론

전 세계적으로 가장 흔하게 나타나는 악성종양 중 하나인 대장암은 일반적으로 서양에서 높은 발생률을 보이고 있는 것으로 알려져 있지만, 우리나라의 경우에도 1980년대 이후 대장암의 발병률 및 대장암으로 인한 사망률이 눈에 띄게 증가하고 있다(Shin *et al* 2004). 대장암의 발병 및 사망률의 증가는 유전적 요인 이외에 환경적 요인, 즉, 생활양식 및 식생활의 변화와 같은 다양한 요인들에 의해서 나타나는 것으로 알려져 있다(Sandler & Drossman 1987, Krishnaswamy & Raghuramulu 1998). 특히, 우리나라에서 대장암의 발병이 급증하는 원인으로는 동물성 지방의 과다 섭취 및 섬유질 섭취 부족, 설탕 등 정제 당질의 과다 섭취 등 서구화된 식생활과 과다한 스트레스 및 운동 부족과 밀접한 관련이 있다고 발표(Chae *et al* 2011)하였다.

오늘날 대장암의 선별 검사가 증가하면서 대장암의 조기 진단이 상당한 효과를 거두고 있으나, 진단 시에 이미 병이 진행되어서 수술로 완치가 불가능한 경우가 많으며, 이러한 경우 항암제나 방사선 치료 등을 시도하고 있으나, 현재 사용되고 있는 항암제는 암세포 뿐 아니라, 정상 세포에도 영

향을 미쳐 다양한 부작용을 초래한다(Kim *et al* 2007). 따라서 부작용이 적은 항암제 개발을 위해 천연 소재로부터 항암 성분을 찾는 연구가 세계적으로 활발히 이루어지고 있으며, 양배추, 컬리플라워, 브로콜리, 토마토, 사과, 포도, 베리류 등 채소, 과일의 섭취량이 많을수록 대장암 발병을 감소시킨다(Rajamanickam & Agarwal 2008).

우리나라에서도 최근 다양한 약초 및 채소 등 천연 재료를 소재로 하여 대장암 세포에 대한 항암 효과 연구가 많이 이루어지고 있으며, 특히 버섯, 해조류, 녹차, 인삼, 꾸지뽕나무, 산초, 후추 등 천연소재를 이용한 연구가 이루어져 다양한 효능이 있는 것으로 확인되었다(Shin *et al* 2009, Kim *et al* 2009a, Kim *et al* 2009b, Hwang *et al* 2003, Han *et al* 2011, Lee *et al* 2009).

연(*Nelumbo nucifera*)은 아시아 남부 및 북호주가 원산지인 쌍떡잎식물로 수생 식물 중 부엽 식물에 속하는 다년생 식물(Kasumi & Sakuma 1998)로, 뿌리의 마디가 이어져 있는 형태에서 연이라는 이름이 유래되었다고 한다. 연의 주성분은 탄수화물이며, 상처 부위를 수렴시키고, 식이 섬유소가 풍부하여 장내의 활동을 촉진시키는데 도움이 되며(Kim *et al* 2002), Jung *et al*(2003)은 hyperoside, kaempferol, quercetin 등의 flavonoid가 연 뿌리에 함유되어 있는 것으로 보고하였다.

예로부터 연근은 한방에서 잎, 뿌리, 씨 등 모든 부위가 치

[†] Corresponding author : Ha Sook Chung, Tel/Fax : +82-2-901-8593, E-mail : hasook@duksung.ac.kr

료 목적으로 이용되어 왔으며, 맛은 달고 짭고, 어혈을 풀어 주며, 신경통과 피로 회복 그리고 병후 회복, 위장과 폐가 약하거나 설사가 잦은 사람, 스트레스와 초조감, 출혈성 위궤양이나 위염에 효과가 있으므로 오래전부터 널리 애용되고 있다(Ko *et al* 2006). 연근은 또한 혈압 강하(Park *et al* 2005), 신장 보호(Cho & Kim 2003), 고지혈증 예방(Lee *et al* 2006) 및 심혈관계 질환 예방(Cho & Kim 2003) 등의 효과가 보고되었으나, 대장암 등 암과 관련된 효능 연구는 아직 미흡하다.

이에 따라 본 연구는 인체 암세포 증식을 저해시키는 천연 소재 발굴을 목적으로, 선행 연구에서 효능이 확인된 연근 추출물의 HT-29 대장암 세포 증식 억제 및 세포 사멸을 확인하였다. 또한 FACS, Western blotting 및 RT-PCR 실험을 통해 암세포 사멸 기전을 규명하여 인체 대장암세포 성장 저해제로서의 연근의 활용 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 배지

실험에 사용된 배지 RPMI 1640과 fetal bovin serum(FBS), penicillin-streptomycin(PS), Trypsin-EDTA는 GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였고, DMSO, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), Phosphate buffered saline(PBS) 등의 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

2. 시료 준비

실험 재료인 연근은 2012년 5월, 양재동 소재 농협 하나로 마트에서 구매하여 사용하였다. 깨끗이 씻은 연근을 껍질을 벗기지 않은 상태로 상온에서 2일 동안 건조시킨 후, 건조물 10g을 70% ethanol로 80°C water bath에서 1시간 동안 추출하고, 이 과정을 3회 반복하였다. 추출액은 여과지(Whatman No. 1, England)와 초원심 분리기(Sorvall Instruments, USA)를 사용하여 여과하였다. 여과된 추출액을 rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan)로 감압 농축한 후 -80°C에서 동결 건조(Opreon, Korea)하였다. 분말 시료를 제조하여 건조물의 무게를 측정 후(수득량 : 1.6435 g), 100% 증류수에 녹여 실험에 사용하였다.

3. 세포 주 및 세포 배양

대장 정상 세포(FHC, CRL-1831TM) 및 Human colon epithelial cell인 HT-29, HCT116 세포는 ATCC(USA) 및 Korea Cell Line Bank(Seoul, Korea)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 분주 받은 세포주를 10% heat-inactivated FBS와 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 RPMI-1640 배지를 사용하여 5%

CO₂를 함유한 37°C 배양기(Sanyo, Japan)에서 2주 이상 계대 배양하여 배양 환경에 충분히 적응시킨 후, 세포 밀도가 70~80% 정도 포화되면 0.05% Trypsin-EDTA 용액을 사용하여 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 모든 시료는 증류수에 녹여 일정 농도로 희석한 후 사용하였다.

4. 세포 증식 실험(MTT Assay)

HT-29 및 HCT116 세포의 증식 정도를 MTT assay로 측정하였다. 세포를 96 well plate에 1×10^4 cells/cm² 밀도가 되도록 분주하여 시료를 0, 1, 3, 5 mg/mL 농도로 24시간 배양한 후 MTT 시약을 2 mg/mL 농도로 50 μ L를 각 well에 처리하여 37°C에서 4시간 반응시킨 후 배지를 제거하고 DMSO를 넣어 형성된 formazan 크리스탈을 용해시켜 540 nm에서 Microplate reader(Bio-Rad, USA)로 흡광도를 측정하였다. 세포 증식률은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었고, 실험은 각 실험군마다 3 wells의 흡광도를 각각 측정하여 평균값을 계산하였고, 3회 반복 실시하였다(Ryu *et al* 2013).

5. Hoechst 33258 염색

HT-29 세포를 6 well plate에 3×10^5 cells/cm² 밀도로 분주하여 24시간 배양한 후 시료를 0, 1, 3, 5 mg/mL 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 PBS로 2회 세포 단층을 씻어낸 후 methanol로 실온에서 30분 동안 세포를 고정하고, PBS로 2회 세척하였다. Hoechst 33342 최종 농도가 2 μ g/mL가 되도록 PBS에 희석하여 세포에 첨가하고, 15분 동안 어두운 곳에서 염색한 후 형광 현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다(Ryu & Chung 2011).

6. Fluorescence Activated Cell Sorting(FACS) Analysis

HT-29 세포의 apoptosis 비율을 측정하기 위해 flow cytometry 실험을 수행하였다. HT-29 세포를 6 well plate에 1×10^6 cells/cm² 밀도로 분주하여 24시간 배양한 후, 시료 추출물을 0, 1, 3, 5 mg/mL 농도로 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 세포 단층을 PBS로 2회 씻어낸 후 trypsin-EDTA로 처리하여 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하고, 세포들을 수집한 후 Annexin V와 Propidium Iodide로 염색한 후, FACS analysis(Beckman Coulter, USA)를 통해 apoptotic cell 수를 측정하였다(Ryu & Chung 2011).

7. 단백질 발현 실험(Western Blotting Analysis)

세포 사멸과 증식과 관련된 특정 단백질의 발현을 western blot을 실시하여 확인하였다. HT-29 세포를 1×10^6 cells/mL 농도로 6 well plate에 분주하고, 시료 추출물을 0, 1, 3, 5 mg/

mL 농도로 첨가하여 24시간 동안 배양한 후 sample을 모아 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 protein lysis buffer를 넣어 세포를 파괴한 후 4°C, 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 모아 시료로 사용하였다. 12% gradient SDS-PAGE에서 동량의 단백질을 loading하여 단백질을 분리한 후, nitrocellulose membrane에 1차 antibody를 4°C, overnight 반응시키고, TBST로 15분간 3회씩 세척한 후 다시 2차 goat anti-rabbit IgG-HRP(Santa Cruz Biotech Inc., USA)로 1시간 동안 반응시키고, TBST로 15분간 3회씩 씻어낸 후, ECL solution으로 확인하였다(Ryu *et al* 2014).

8. mRNA 발현 실험(RT-PCR)

1) Total RNA 분리

RT-PCR은 Ryu *et al* (2013) 방법에 의해 수행되었다. HT-29 세포의 증식 억제 및 사멸 유도 효과가 mRNA 수준에서도 영향을 미치지 알아보기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 세포를 6 well plate에 3×10^5 cells/cm² 밀도로 분주한 후, 시료를 농도별로 처리하고, 24시간 후 scraper로 sample을 모은 후 Trizol reagent 1 mL를 첨가하여 3분간 실온에 방치하였다. 여기에 chloroform 200 μ L를 첨가하여 충분히 섞어 준 후에 10분간 방치하고, 4°C, 13,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층에 isopropanol 500 μ L를 첨가하여 상온에서 10분간 방치하고, 다시 4°C, 13,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층을 제거하고, 상온에서 건조시킨 후 diethylpyrocarbonate water로 용해시켜 사용하였다.

2) cDNA 합성

정량한 RNA sample 양이 1,000 ng이 되도록 tube에 준비하고, 10 mM dNTP mix, Random hexamers(50 ng/ μ L)를 포함하여 총량이 10 μ L가 되도록 diethylpyrocarbonate water를 첨가하였다. 시료를 70°C에서 10분간 incubation하고, 여기에 reaction buffer(5 \times first standard buffer 4 μ L, 0.1 M DTT 2 μ L, 10 mM NTP 1 μ L) 7 μ L를 첨가하여 42°C에서 5분간 incubation하고, superscript II reverse transcriptase 0.5 μ L를 첨가하여 42°C에서 105분, 70°C에서 15분간 incubation시킨다. 여기서 RNase 0.5 μ L를 넣고 37°C에서 1시간 incubation 후, diethylpyrocarbonate water를 80 μ L를 넣어 -20°C에서 보관하여 사용하였다.

3) Polymerase Chain Reaction으로 DNA 증폭

준비된 sample에 2.5 mix buffer(10 \times PCR buffer, 50 mM MgCl₂, 10 mM NTP mix, autoclave water)와 sense, antisense primer Taq polymerase를 혼합하여 cycle을 실행하며, ethidi-

um bromide로 염색한 1% agarose gel로 전기영동을 실시하고, Gel Documentation System(Bio-Rad, USA)으로 밴드 결과를 확인하였다.

9. 통계 처리

실험 결과는 SPSS 12.0 프로그램을 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차로 계산하고, ANOVA 분석 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하여 대조군과 처리군 간의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 대장 정상 세포의 독성 분석

대장 정상 세포(FHC)를 이용하여 시료의 세포 독성을 확인한 결과, 시료 농도가 0, 1, 3, 5 mg/mL에서 FHC가 증식되는 것이 확인되었으므로(Fig. 1), 이후 실험에 사용되는 시료 농도를 0~5 mg/mL로 설정하였다.

2. 시료에 의한 HT-29, HCT116 세포 생존율

HT-29 및 HCT116 세포에 연근 추출물을 0, 1, 3, 5 mg/mL 농도로 처리하고, 각각을 24시간 동안 배양하여 MTT 시약을 첨가한 후 살아있는 세포의 미토콘드리아 탈수소 효소 반응에 의해 형성되는 보라색 formazan을 확인하고, 이를 DMSO로 용해시켜 흡광도를 측정하였다. 실험 결과, 대조군에서는 모든 세포에서 진한 보라색의 formazan이 형성되었으나, 연근 추출물을 처리한 군에서는 시료 농도가 증가함에 따라 모든 세포에서 보라색이 감소하였고, 시료 농도 의존적으로 세포 사멸이 증가함을 확인할 수 있었다. 특히 시료의 최고 농도인 5 mg/mL 처리 시, HT-29 세포에서는 48.8%,

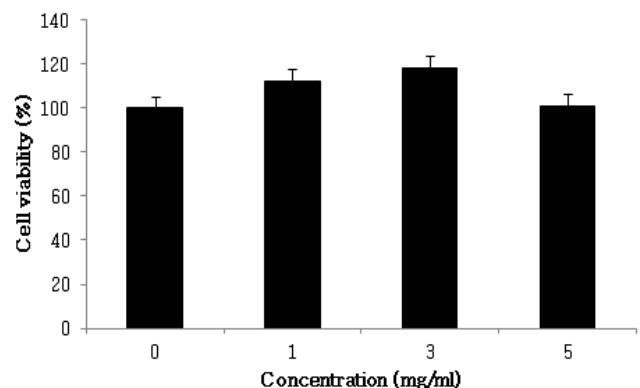


Fig. 1. Effects of *Nelumbo nucifera* root extract on cell viability in FHC cells.

The cells were incubated in serum-deprivation medium containing 0, 1, 3, 5 mg/mL of *Nelumbo nucifera* root extract for 24 hr.

HCT116 세포에서는 56.2%의 세포 생존율을 나타내었다. (Fig. 2). 이는 선행 연구(Chung HS 2013)에서 연근 추출물을 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 mg/mL 처리 시 72시간에 HT-29 생존율이 66.5, 69.6, 58.7, 52.7%인 것과 비교할 때 다소 상승하였다.

3. 시료에 의한 HT-29 세포의 형태 변화

HT-29 및 HCT116 세포에 연근 추출물을 처리하였을 때 세포 증식이 감소하였으며, 이 중 효능이 다소 높은 것으로 확인된 HT-29 세포의 형태학적인 변화를 살펴보기로 하였다. 시료를 처리하지 않은 대조군의 경우 plate 바닥에 세포가 안정적으로 부착되어 정상적인 증식이 이루어진 모습이 관찰되었으나, 시료를 처리한 시험군의 경우, 농도별로 세포 증식이 감소하였고, plate로 부터 세포가 분리되어 배양액에 부유한 모습이었다. 또한 시료 농도 3 mg/mL에서 세포 형태가 변화하기 시작하였으며, 5 mg/mL 처리 시 세포 응축현상이 나타나기 시작하고, 부유한 세포들 중 일부는 세포막이 파괴되어 세포사멸이 이루어짐을 알 수 있었다(Fig. 3).

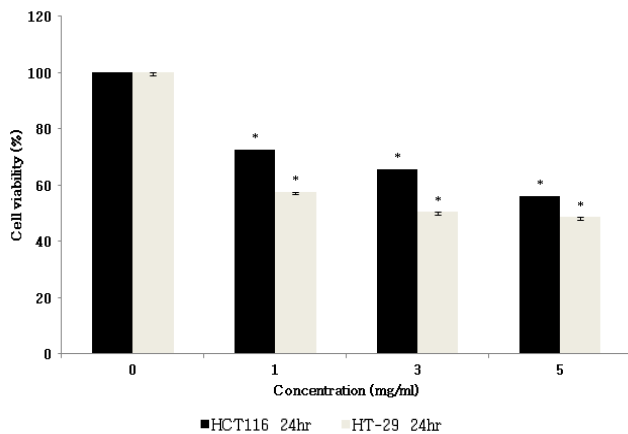


Fig. 2. Effects of *Nelumbo nucifera* root extract on cell viability in HT-29 and HCT116 cells.

* $p < 0.05$, significantly different of control cells.

The cells were incubated in serum-deprivation medium containing 0, 1, 3, 5 mg/mL of *Nelumbo nucifera* root extract for 24 hr.

4. 시료에 의한 HT-29 세포핵의 형태 변화

HT-29 대장암 세포에 시료를 처리하였을 때 농도가 증가할수록 세포 성장이 감소하였으며, 현미경 관찰에서도 세포 형태가 변하는 것이 확인되었으므로, HT-29 세포에 연근 추출물을 농도별로 처리하였을 때 apoptosis를 나타내는 형태학적 변화를 관찰하기 위하여, DNA에 특이적으로 결합하는 형광 색소인 Hoechst 33342 용액으로 염색한 후 형광 현미경에서 관찰하였다. 핵 염색으로 조사한 결과, 시료를 처리하지 않은 대조군에서는 HT-29 세포핵은 아무런 손상 없이 둥근 모양으로 일정한 반면, 연근 추출물을 1, 3, 5 mg/mL 처리한 모든 군에서 HT-29 세포 수가 감소하였으며, 세포의 핵이 손상되어 절편이 되었고, 세포 크기도 감소하는 등 형태학적 변화들이 뚜렷하게 관찰되었다. 특히 시료 농도가 3 mg/mL에서부터 세포핵의 변화를 관찰할 수 있었으며, 시료 농도가 증가할수록 apoptosis 소체 수가 증가되는 것이 확인되었다. 이를 통해 연근 추출물에 의한 HT-29 세포 사멸은 apoptosis에 의한 것임을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 세포 사멸 과정에서 세포는 세포 외 기질에 대한 세포막 수용체인 인테그린과의 결합력 약화로 인한 focal adhesion complex의 분해 때문에 일차적으로 평평한 모양에서 둥근 형태로 모양이 변하고, 세포 내 골격 단백질의 변화로 인한 세포 수축, 염색사 응축, 핵의 붕괴, DNA 분해 등과 같은 다양하고 특이한 형태적, 생화학적인 변화를 일으키는 것으로 알려져 있다(Reed JC 1998a). 이번 실험에서는 연근 추출물을 처리할 때 대장암 세포 사멸에 의한 형태적 변화가 일어나고 있는 것이 확인되었고, 이는 연근 추출물이 HT-29 세포의 생존율 감소 및 형태 변화에 영향을 미치는 것으로 추정되며, 추후 세포핵의 붕괴 및 DNA 분해와 관련된 보다 추가적인 대사 연구가 필요한 것으로 사료된다.

5. 시료에 의한 HT-29 세포 사멸 유도

HT-29 세포의 증식 억제가 apoptosis 또는 necrosis에 기인하는지 확인하기 위해 Flow cytometry 분석을 수행하였다. Apoptosis가 일어나면 세포막을 조성하는 인지질의 안쪽에

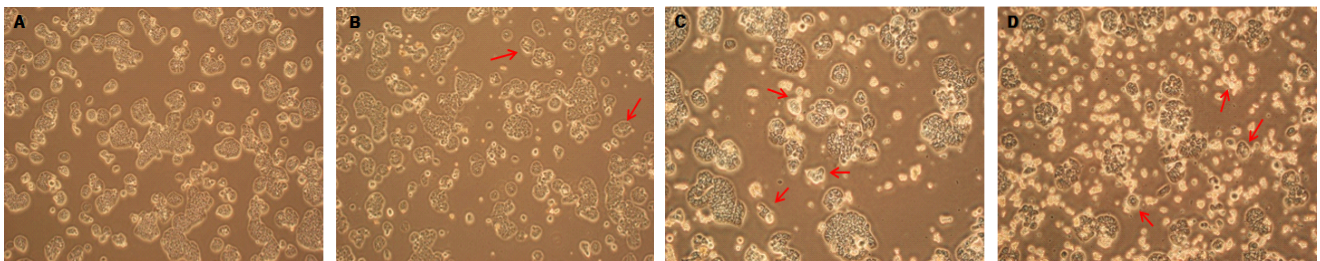


Fig. 3. Photomicrograph of morphological change in HT-29 cells treated with *Nelumbo nucifera* root extract.

Nelumbo nucifera root extract exposed cells undergoing apoptosis are shown by their characteristically shrunken cellular shape by microscopy at $\times 40$ magnification(A : 0 mg/mL, B : 1 mg/mL, C : 3 mg/mL, D : 5 mg/mL).

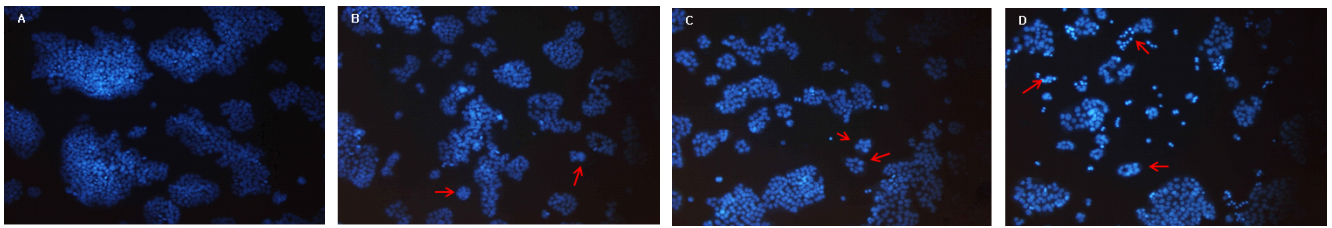


Fig. 4. Effects of *Nelumbo nucifera* root extract on cell death by apoptosis in HT-29 cells.

HT-29 cells were incubated in the absence or presence of various concentrations for 24 hr, stained with Hoechst 33342 dye, and observed under a fluorescent microscope (magnification, $\times 40$) (A : 0 mg/mL, B : 1 mg/mL, C : 3 mg/mL, D : 5 mg/mL).

위치한 phosphatidyl serine(PS)이 세포막 밖으로 이동하는 원리를 이용한 방법으로 PS에 특이적으로 결합하는 Annexin V와 popidium iodidie(PI)의 세포막 투과성을 이용하여 세포 중의 early apoptosis(Annexin V-FITC positive, PI negative), late apoptosis(Annexin V-FITC positive, PI positive)의 비율을 확인하였다. 실험 결과, 시료를 처리하지 않은 대조군에서 early apoptosis 13.1%, late apoptosis가 8.4% 발생되어, 총 진행된 세포 사멸이 21.5%이었으며, 1 mg/mL 농도에서는 early apoptosis 21.3%, late apoptosis 9.9%로 세포 사멸이 총 31.2%로 나타났고, 3 mg/mL 농도에서는 early apoptosis 37.7%, late apoptosis 10.9%로 총 48.6%이며, 5 mg/mL 농도에서는 early apoptosis 52.3%, 그리고 late apoptosis 14.2%로 세포 사멸이 총 66.5%로 시료 처리 농도에 비례하는 것으로 확인되었다 (Fig. 5).

6. 시료가 세포 사멸에 미치는 영향

미토콘드리아 외막에 존재하는 Bcl-2 family 단백질은 cytochrome c의 방출을 조절함으로써 apoptosis를 조절하며(Reed JC 1998b, Korsmeyer SJ 1995), caspase는 initiator caspase와 effector caspase로 구분되며, 세포 사멸 조절 인자로 작용하는데, 이 중 caspase-9은 apoptosis initiator로 작용하며, 미토콘드리아 막의 투과성이 증가되어 세포질로 방출된 cytochrome c에 의해 활성화되고(Cory *et al* 2003), apoptosis의 형태학적 특징에 관여하는 PARP에 영향을 주어(Villa *et al* 1997) apoptosis를 유도한다(Chae *et al* 2011, Debatin KM 2004). 본 연구에서는 HT-29 세포에서 세포 사멸을 유도한 연근 추출물이 caspase의 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위해, caspase 활성화 형태인 cleaved caspase들의 단백질 수준을 관찰하기 위해, Western blot을 시행하였다. HT-29 세포에 연근 추출물을 처리한 뒤 control로 사용된 β -actin과 비교하였을 때 Bcl-2 밴드가 감소하였고, 반면에 Bax 밴드가 증가됨을 확인할 수 있었다. 또한 cleaved caspase-3와 cleaved caspase-9이 증가하였고, 분절된 PARP도 시료 농도에 의존적으로 증가하였다 (Fig. 6). 즉, 연근 추출물 처리에 의한 initiator caspase인 cleaved caspase-9의 발현은 처리 농도에 의존적으로 증가되

었고, 활성화된 cleaved caspase-9에 의해 effector caspase인 cleaved caspase-3를 활성화하여 세포 사멸을 유도한 것임을 확인하였다. 이는 caspases 활성이 연근 추출물에 의한 세포 사멸 과정에 중요한 조절 인자로 작용했음을 확인할 수 있었다. 따라서 연근 추출물은 caspase-9의 경로를 통해 apoptosis가 일어나는 것이 확인되었다.

7. Bcl-2와 Bax의 mRNA 발현

HT-29 세포에 연근 추출물을 0, 1, 3, 5 mg/mL 농도로 24 시간 처리하여 대조군과 비교하였을 때, 시료 농도가 증가할수록 세포 증식이 유의적으로 감소되고, 세포 사멸은 증가되는 실험 결과를 근거로, 연근 추출물이 HT-29 대장암 세포의

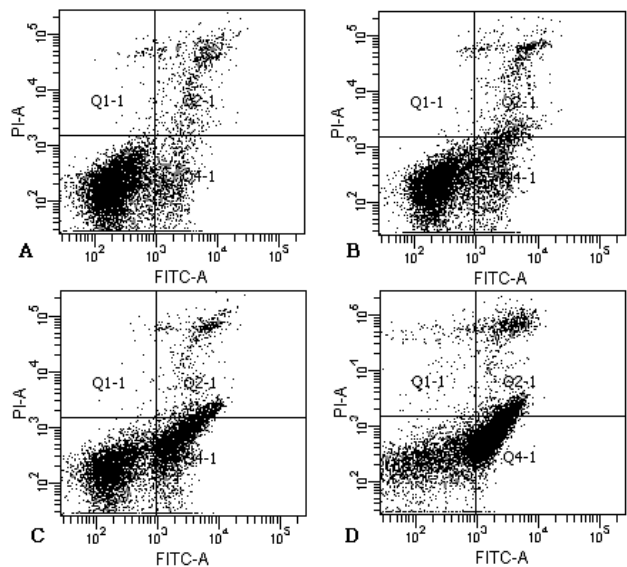


Fig. 5. Flow cytometric analyses treated with *Nelumbo nucifera* root extract in HT-29 cells.

The cells were incubated in serum-deprivation medium containing 0, 1, 3, 5 mg/mL of *Nelumbo nucifera* root extract for 24 hr. The dual parameter dot plots combining annexin-V-FITC and PI fluorescence show the viable cell population in the lower left quadrant, apoptotic cells in the lower right quadrant and upper right quadrant and necrotic cells in the upper left quadrant (A : 0 mg/mL, B : 1 mg/mL, C : 3 mg/mL, D : 5 mg/mL).

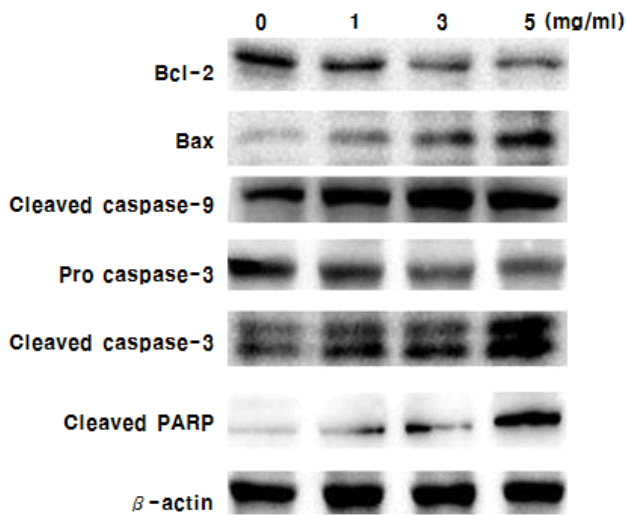


Fig. 6. Effects of *Nelumbo nucifera* root extract on the protein expression levels of Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3, caspase-9, pro caspase-3 and PARP in HT-29 cells.

mRNA 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위해 세포 사멸과 관련된 유전자를 이용하여 실험하였다. 세포 사멸을 억제하는 유전자인 Bcl-2와 사멸을 유도하는 Bax를 통해 대조군인 β -actin과 비교 분석하였다. 실험 결과, 연근 추출물의 농도가 증가할수록 Bcl-2의 mRNA 발현이 농도 의존적으로 감소하였으며, 반대로 Bax의 발현은 증가되었다(Fig. 7). Bcl-2 family는 미토콘드리아의 막 투과성과 cytochrome C를 통해 세포 사멸을 조절하는 것으로 알려져 있다. 이에 속하는 Bcl-2는 anti-apoptotic 분자로 미토콘드리아로부터 cytochrome C의 방출을 억제하는 역할을 하고, Bax는 pro-apoptotic 분자로 미토콘드리아의 막전위를 감소시켜 세포질로 cytochrome C를 방출시키므로 세포 사멸을 촉진시킨다. 이 둘은 서로 dimer로 존재하며 균형을 이루고 있지만, 균형이 깨어지게 되면 미토콘드리아로부터 cytochrome C의 방출이 증가되어 caspase cascade의 활성화를 통해 세포 사멸을 유도하게 된다(Adams & Cory 1998). 본 실험에서 연근 추출물을 처리하였을 때 암 억제 유전자인 Bax의 mRNA 발현은 증가하였고, Bcl-2의 발현은 감소되었으므로 연근 추출물이 HT-29 세포

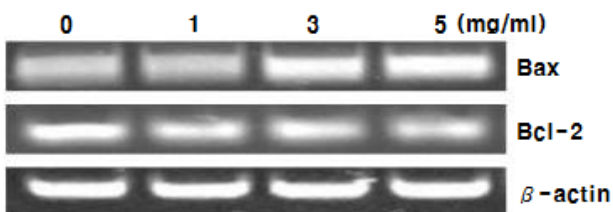


Fig. 7. Effects of *Nelumbo nucifera* root extract on Bax and Bcl-2 expressions in HT-29 cells.

사멸을 유발시키는 것으로 확인되었다. 이는 연근 추출물이 MDA-MB-231 세포 증식을 억제한다는 보고(Rajendra *et al* 2008)와 함께 연근 추출물이 *in vitro*에서 특정 암세포의 성장을 억제시키는 것으로 확인되었으며, 본 연구에서도 연근 추출물 농도가 높을수록 HT-29 세포 생존율이 유의적으로 감소되었으며, 특히 3 mg/mL의 농도에서 약 50%의 감소가 확인되었다($P < 0.05$). 따라서 연근 추출물에 함유된 활성물질을 규명을 목적으로 단일 화합물 분리를 수행하여, 활성을 규명하는 중이다.

요약 및 결론

인체대장암 세포인 HT-29 및 HCT116에 연근 70% 에탄올 추출물을 0, 1, 3, 5 mg/mL 농도로 처리하여 세포 증식을 확인한 결과, 모든 세포에서 농도 의존적으로 생존율이 감소하였고, 최고 농도인 5 mg/mL에서 HT-29, 48.8% 및 HCT116, 56.2%의 세포 생존율을 나타내었다. 연근 추출물에 의한 세포 형태는 연근 추출물의 농도가 증가할수록 세포 증식이 감소하고, 세포가 배양액에 부유한 양상을 보여주었고, 시료 농도 3 mg/mL 부터 세포 형태가 변화하기 시작하였으며, 시료 최고 농도인 5 mg/mL에서는 세포의 응축현상과 일부 부유한 세포 중 세포막이 파괴되어 세포의 사멸이 이루어짐을 알 수 있었다. 또한 Hoechst 33342 용액으로 염색한 결과, 시료 농도 의존적으로 세포수가 감소되었고, apoptotic body 등과 같은 형태학적 변화들을 관찰할 수 있었다.

연근 추출물에 대한 HT-29 대장암 세포의 증식 억제가 apoptosis에 의한 것인지를 확인하기 위하여 Annexin V-PI staining을 통해 apoptosis로 사멸하는 세포의 비율이 시료 농도가 증가할수록 비례적으로 증가하는 것이 확인되었다. 연근 추출물 처리에 따른 apoptosis 조절인자들의 영향을 western blot과 RT-PCR을 통하여 관찰하였다. 실험 결과, Bcl-2는 연근 추출물의 농도가 증가할수록 밴드가 감소하는 것으로 나타났고, Bax는 농도 의존적으로 증가하는 것으로 확인되었다. 연근 추출물을 농도별로 처리하였을 때 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2가 감소하고, pro-apoptotic 단백질인 Bax가 증가하였으므로, 이는 미토콘드리아 막 투과성을 조절하는 Bcl-2 family에 의해 cytochrome c의 방출이 증가하면서 apoptosis가 조절되는 것으로 추정할 수 있다(Koelmeyer *et al* 1993). 또한 cleaved caspase-3와 cleaved caspase-9, 그리고 PARP의 밴드가 증가하고, pro caspase-3는 감소되었다.

본 실험을 통해 연근 추출물이 HT-29 대장암 세포의 증식을 억제하고, 세포 사멸을 유도하는 것을 확인할 수 있었으며, 시료의 항대장암 효능을 입증하기 위하여 추후 동물 실험 및 활성물질의 기전 규명 등의 추가적인 연구가 필요할

것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 덕성여자대학교 교내연구비에 의해 수행되었으며, 감사드립니다.

문헌

- Adams JM, Cory S (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Sci* 281: 1322-1326.
- Chae YH, Shin DY, Park C, Lee YT, Moon SG, Choi YH (2011) Induction of apoptosis in human colon carcinoma HCT116 cells using a water extract of *Lepidium virginicum* L. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 649-659.
- Cho SI, Kim HW (2003) Beneficial effect of *Nodus neoumbinis* rhizomatis extracts on cisplatin-induced kidney toxicity in rats. *J Korean Herbology* 18: 127-134.
- Chung HS (2013) Identification of functionalities of HANSIK with cytoprotective activities on human colon cancer cell and standardization of recipes. Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea. pp 28-34.
- Cory S, Huang DC, Adams JM (2003) The Bcl-2 family: Roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22: 8590-8607.
- Debatin KM (2004) Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 53: 153-159.
- Han W, Hu WC, Lee YM (2011) Anticancer activity of human colon cancer(HT-29) cell line from different fraction of *Zanthoxylum schinifolium* fruits. *Korean J Pharmacog* 42: 282-287.
- Hwang YJ, Nam HK, Chang MJ, Noh GW, Kim SH (2003) Effect of *Lentinus edodes* and *Pleurotus eryngii* extracts on proliferation and apoptosis in human colon cancer cell lines. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 217-222.
- Jung HA, Kim JE, Chung HY, Choi JS (2003) Antioxidant principles of *Nelumbo nucifera* stamens. *Arch Pharm Res* 26: 279-285.
- Kasumi M, Sakuma F (1998) Flowering, pollination, fertilization, and seed formation in lotus rhizome plant. *Japan J Soc Horticult Sci* 67: 595-599.
- Kim EJ, Park HS, Shin MJ, Shin HK, Yoon Park-JH (2009a) Induction of apoptosis in HT-29 human colon cancer cells by the pepper component piperine. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 442-450.
- Kim EJ, Park SY, Hong JU, Shin MJ, Lim SS, Shin HK, Park HY (2007) Inhibitory effect of the methanol extract of *Symphocladia latiuscula* on the growth of HT-29 human colon cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 431-438.
- Kim MS, Kim IA, Ko YJ, Jeong JA, Kim JE, Song BJ, Won WB, Lim HS, Park JI, Kim SY, Choi HR, Kim OJ (2009b) Methanol extract of leaves from *Cudrania tricuspidata* effects in HT-29 colorectal adenocarcinoma. *Korean J Oral Maxillofacial Pathology* 3: 9-26.
- Kim YS, Jeon SS, Jung ST (2002) Effect of lotus root powder on the baking quality of white bread. *J Korean Soc Food Cookery Sci* 18: 413-425.
- Ko, BS, Jun DW, Jang JS, Kim JH, Park S (2006) Effect of *Sasa borealis* and white lotus roots and leaves on insulin action and secretion *in vivo*. *J Korean Food Sci Technol* 38: 114-120.
- Koesmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN (1993) Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant patyway and cell death. *Semin Cancer Biol* 4: 327-332.
- Korsmeyer SJ (1995). Regulators of cell death. *Trends in Genetics* 11: 101-105.
- Krishnaswamy K, Raghuramulu N (1998) Bioactive phytochemicals with emphasis on dietary practices. *Indian J Med Res* 108: 167-181.
- Lee, JJ, Park SE, Lee MY (2006) Effects of lotus root(*Nelumbo nucifera* G.) on lipid metabolism in rats with diet-induced hypercholesterolemia. *J Korean Food Preservation* 13: 634-642.
- Lee YJ, Hwang IG, Joung EM, Kim-HY, Park ES, Woo KS, Jeong HS (2009) Physiological activity and antiproliferation effects of citron seed extracts on cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1672-1678.
- Park, SH, Hahm TS, Han JH (2005) Effects of ethanol-extract of lotus root on the renal function and blood pressure of fructose-induced hypertensive rats. *J East Asian Soc Dietary Life* 15: 165-170.
- Rajamanickam S, Agarwal R (2008) Natural products and colon cancer: Current status and future prospects. *Drug Dev Res*. 69: 460-471.
- Rajendra K, Rhyu DY, Kim DW (2008) Effect of *Nelumbo nucifera* on proliferation, migration and expression of MMP-2 and MMP-9 of rSMC, A431 and MDA-MB-231. *J Korean Plant Res* 21: 96-102.

- Reed JC (1998a) Dysregulation of apoptosis in cancer. *Cancer J Sci Am Suppl* 1: S8-14.
- Reed JC (1998b) Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17: 3225-3236.
- Ryu MJ, Chung HS (2011) Effects on hot water extract of *Schizandra chinensis* on colon cancer cell line. *Food Eng Prog* 15: 64-69.
- Ryu MJ, Kim AD, Kang KA, Chung HS, Suh IS, Chang WY, Hyun JW (2013) The green algae *Ulva fasciata* Delile extract induces apoptotic cell death in human colon cancer cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 49: 74-81.
- Ryu MJ, Kang KA, Piao MJ, Kim KC, Zheng J, Yao CW, Cha JW, Chung HS, Kim SC, Jung ES, Park DH, Chae SW, Hyun JW (2014) 7,8-Dihydroxyflavone protects human keratinocytes against oxidative stress-induced cell damage via the ERK and PI3K/Akt-mediated Nrf2/HO-1 signaling pathways. *Inter J Mol Med* 33: 964-970.
- Sandler RS, Drossman DA (1987) Bowel habits in young adults not seeking health care. *Dig Dis Sci* 32: 841-845.
- Shin HR, Jung KW, Won YJ, Park JG (2004) 2002 Annual report of the Korea Central Cancer Registry: Based on registered data from 139 hospitals. *Cancer Res Treatment* 36: 103-114.
- Shin JH, Jung KM, Lee SJ, Yang SM, Rue GH, Sung NJ (2009) Biological activities of dried garlic, red ginseng and their mixture. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1633-1639.
- Villa P, Kaufmann SH, Earnshaw WC (1997) Caspases and caspase inhibitors. *Trends in Biochem Sci* 22: 388-393.

접 수: 2014년 1월 16일
 최종수정: 2014년 1월 28일
 채 택: 2014년 2월 15일