pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 34, No. 5, pp. 495~501 (2019)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2019.34.5.495

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

인간 대장암 세포 HT-29에서 Aloin에 의한 Apoptosis 유도

유은선 · 우중석 · 김성현 · 이재한 · 한소희 · 정수현 · 박영석 · 김병수 · 김상기 · 박병권 · 정지윤*
공주대학교 특수동물학과

Induction of Apoptosis in HT-29 Human Colorectal Cancer by Aloin

Eun-Seon Yoo, Joong-Seok Woo, Sung-Hyun Kim, Jae-Han Lee, So-Hee Han, Soo-Hyun Jung, Young-Seok Park, Byeong-Soo Kim, Sang-Ki Kim, Byung-Kwon Park, Ji-Youn Jung*
Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, Yesan, Korea

(Received August 16, 2019/Revised September 1, 2019/Accepted September 5, 2019)

ABSTRACT - Aloin [1,8-Dihydroxy-10-(β-*D*-glucopyranosyl)-3-(hydroxymethyl)-9(10*H*)-anthracenone], is a natural anthraquinone from aloe. It has been shown to have antioxidant and anticancer effects in various types of human cancer cells, but the anticancer effects of aloin in human colorectal cancer cells HT-29 have not been elucidated. In this study, possible mechanisms by which aloin exerts its apoptotic action in cultured human colorectal cancer HT-29 cells were investigated. The results of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay shows that treatment with aloin (0, 100, 200, 300 and 400 μM) reduced cell viability in a concentration-dependent manner in HT-29 and showed no effects on cell proliferation in A375SM and AGS cells. In addition, it was confirmed that apoptotic body was significantly increased as shown by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining, and increased apoptosis rate by flow cytometry in HT-29 cells treated with aloin (0, 200 and 400 μM). We confirmed by western blotting that aloin activated Bax (pro-apoptotic), cleaved-poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) and caspase-3, -8 and Bcl-2 (anti-apoptotic) were not changed compared with the control. Aloin induced up-regulation of phospho-p38 and down-regulation of phospho-extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2. Therefore, aloin suppressed the growth inhibitory effects by the induction of apoptosis in human colorectal cancer cells and has potential as a cancer preventive medicine.

Key words : Aloin, Apoptosis, HT-29, p38 MAPK pathway, Anticancer

암은 전 세계적으로 생명을 위협하는 주요 질병으로 인구 증가와 노화로 인해 빠르게 증가하고 있다[1]. 우리나라 통계청에 의하면 10대 사망원인 중 3대 사인인 암, 심장질환, 뇌혈관 질환은 전체 사인의 46.8%를 차지하며, 그 중 암은 1위를 기록했다. 대장암은 통계 작성 이래 처음으로 사망률이 위암보다 높아져 3위를 차지했고 외과적 수술 후에도 병기에 따라 방사선요법, 항암 화학요법과 같은 추가적인 치료과정이 있으나, 치료의 부작용으로 인해 암 환자들이 정상적인 사회생활을 유지하기 어렵다[2,3]. 또한 위암은 동아시아에서 발병률이 두 번째로 높으며, 우리나라의 위암 발생률은 일본, 중국보다 높은 것으로 알려져 있다. 위암의 치료 방법으로 주로 위절제술이 시행되고 있으나, 위암 2기 혹은 3기인 경우 위 절제 이후에 재발하기도 하는데 수술 후 재발을 개선하기 위해 다양한 보조 치료 전략이 형성되었고, 그 중 화학요법은 위암 환자의 전반적인 생존율을 향상시킨다고 보고되었다[4,5]. 그리고 지난 10년 동안 지속적으로 발병률이 증가하고 있는 피부암 중에서도 가장 악성인 흑색종은 나쁜 예후와 화학요법 및 면역 요법에 부작용이 있어 피부 질환으로 인한 사망의 주요 원인이다. 전이성 흑색종 환자의 화학요법에서는 강한 독성과 부작용 및 약물 내성을 나타냈고 이로 인해 안전성과 항암효과가 높은 천연자원 소재의 항암제에 대한 개발이 요구되고 있으며 현재 천연물에서 추출한 물질은 오늘날 신약 개발에 막대한 기여를 하고 있다고 보고되었다[6,7].

Barbaloin으로도 알려진 aloin (Fig. 1)은 알로에 gel의 주요 성분으로 천연 안트라퀴논이다[8]. Aloin은 항산화, 항염

*Correspondence to: Ji-Youn Jung, Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, Yesan-eup, Yesan-gun, Chungcheongnam-do, 32439, Koera.
Tel: 82-41-330-1526, Fax: 82-41-330-1529
E-mail: wangza@kongju.ac.kr

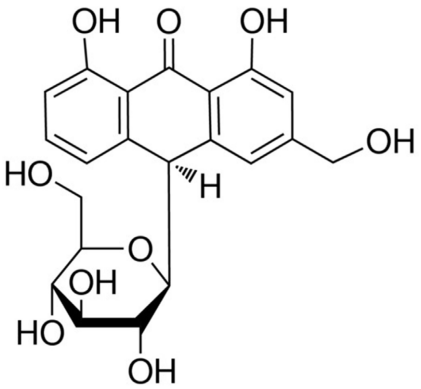

Fig. 1. Chemical structure of aloin.

증 및 항증식효과를 나타냈다[9]. 지난 연구에서 aloin은 인간 폐암세포에서 농도 의존적으로 세포자멸사를 유도했으며, HeLaS3세포에서 항증식효과와 세포 사멸을 증가시켰다고 보고되었다[8,10]. 또한 인간 난소암에서 S기에 cell cycle arrest를 일으키고 STAT3 활성화를 차단함으로써 종양 혈관 신생 및 성장을 억제할 수 있고 인간 대장암 세포에서 생체 내에서 종양 부피 및 중량을 실질적으로 감소시켰다고 보고되었다[11,12]. 따라서 aloin은 여러 암에서 암의 증식과 전이를 억제하며 항암제로서의 가능성을 보여주고 있지만 항암 효과의 기전에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

세포자멸사(apoptosis)란 비정상적인 세포의 신호 전달로 인해 세포가 스스로 자멸해 항상성을 유지하게 해주는 예정된 세포사멸(programed cell death, PCD)중 하나이다. 세포자멸사는 암세포가 다른 정상적인 세포에게 영향을 주지 않기 때문에 자극을 받으면 세포내 물질을 누출시켜 조직의 염증을 유발하는 necrosis와 차이가 있다[13]. 세포자멸사는 물리적이나 화학적 자극을 받게 되면 DNA 손상이나 산소 스트레스에 의하여 Bcl-2 family, MAPK(mitogen-activated protein kinase) pathway, XIAP(X-linked inhibitor of apoptosis protein), poly ADP ribose polymerase(PARP) 등 여러 pathway를 통해 진행되는데, 그 중 MAPK는 serine/threonine protein kinase 단백질로 세포 외부로부터 신호를 핵 내로 전달하여 세포의 성장, 분화 및 사멸을 조절하는 신호전달분자로서 암세포에서 세포자멸사를 일으키는 주요 기전이다. MAPK는 반응하는 기질에 따라 ERK(extracellular signal-regulated kinases), JNK(c-Jun N-terminal kinase), p38로 분류할 수 있다[14-17].

본 실험은 대장암 세포인 HT-29, 위암세포 AGS, 흑색종세포 A375SM에 각 농도별로 aloin을 처리했을 때, 각 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보았다. 또한 aloin이 대장암세포에서 세포자멸사를 유도하는 많은 경로 중 MAPK pathway를 통해 세포자멸사를 유도하는지 확인하였다.

Materials and Methods

세포 및 재료

본 실험에 사용한 대장암 세포 HT-29, 흑색종 세포 A375SM, 위암 세포 AGS는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 세포배양에 사용한 RPMI-1640, fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)은 Welgene (Gyeongsan, Korea)에서 구입하였으며, streptomycin/penicillin은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. 본 실험에 사용된 aloin과 일반적인 시약들은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Mo, USA)에서 구입하였고, anti-rabbit IgG, anti-caspase-3, anti-caspase-8, anti-Bcl-2, anti-Bax, anti-PARP, anti-p-ERK1/2, anti-ERK1/2, anti-p-p38, anti-p38, anti-β-actin는 Cell signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다.

Cell culture

대장암 세포 HT-29, 위암 세포 AGS는 5% FBS, 1% streptomycin/penicillin이 포함된 RPMI-1640 배지를 사용하고, 흑색종 세포 A375SM은 DMEM 배지를 사용하였다. 각 세포는 37°C, 5% CO_2 가 유지되는 incubator에서 배양하였고, flask에서 80-90%가 되었을 때 계대배양하였다. 배지 교체는 2-3일 간격으로 진행하였다.

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

HT-29, A375SM, AGS에서의 aloin에 의한 세포 성장 억제를 확인하기 위해 MTT assay를 실시하였다. 96-well plate에 HT-29, A375SM, AGS를 2×10^4 cells/mL로 분주한 후 24시간동안 배양하였다. 그 후 aloin을 0, 100, 200, 300, 400 μM의 농도로 각각 처리하여 72시간동안 배양하였다. 72시간 후 배지를 제거하고 40 μL씩 MTT solution을 처리한 후 1시간 30분동안 CO_2 incubator에서 배양하였다. 1시간 30분 후 MTT solution을 제거한 뒤 DMSO를 100 μL씩 처리하여 well에 생성된 formazan을 녹인 후, ELISA reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining

세포자멸사의 특이적으로 나타나는 핵의 형태학적인 변화를 관찰하기 위해 DAPI staining을 진행하였다. HT-29 세포를 60-dish에 3×10^5 cells/mL로 분주하고 24시간동안 배양하였다. 그 후 세포에 aloin을 0, 200, 400 μM의 농도로 처리하여 72시간동안 CO_2 incubator에 배양하였다. 72시간 후 배지를 제거하고 PBS로 두 번 세척한 다음 4% paraformaldehyde solution으로 15분간 고정시켰다. 그 후 paraformaldehyde를 제거하고 남아있는 고정액을 제거하기

위해 PBS로 세척하였다. 세척 후 DAPI solution을 2 mL씩 처리하여 형광현미경(Zeiss fluorescence microscope, Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA)으로 200배 시야에서 관찰하고 DAPI-positive cells을 정량화하여 분석하였다.

Flow cytometry

세포자멸사를 확인하기 위해 annexin-V staining kit (BD Pharmingen™, San Diego, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. HT-29 cell을 25-cm^2 flask에 배양하여 24시간동안 배양한 후 aloin을 0, 200, 400 μM의 농도로 처리하여 CO_2 incubator에 배양하였다. 72시간 후 cell scraper를 이용해 세포를 부유 상태로 만든 후 원심 분리(1200 rpm, 5 min, 4°C)하여 pellet을 얻었다. Cell pellet을 얻은 후 1X annexin buffer를 이용해 희석하여 HT-29 cell을 1×10^6 cells/mL로 현탁하였다. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated annexin-V와 phycoerythrin (PE)-conjugated propidium iodide (PI)를 첨가시켜 15분간 반응시킨 후 유세포분석을 통해 측정하였다.

Western blotting

Aloin에 의한 세포자멸 관련 단백질의 발현량을 보기 위해 western blot을 수행하였다. 75-cm^2 flask에 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양시킨 HT-29 cell에 aloin 0, 200, 400 μM의 농도로 처리하고 72시간 배양하였다. 72시간 후 cell scraper를 이용해 세포를 부유 상태로 만든 후 원심분리(1200 rpm, 5 min, 4°C)하였다. 원심분리 하여 얻은 cell pellet에 cell lysis buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 첨가하여 4°C에서 20분간 반응시켰다. 그 후 13000 rpm에서 5분 동안 원심분리 하여 얻은 상등액을 cell lysate로 사용하였다. 추출한 단백질의 농도는 Bradford protein assay를 이용하여 정량하였다. 단백질을 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 크기별로 분리 후 nitrocellulose membrane (Bio-Rad)으로 이동시켰다. Membrane은 5% skim milk로 2시간동안 blocking 후 anti-Bcl-2, anti-Bax, anti-PARP, anti-p-ERK1/2, anti-ERK1/2, anti-p-p38, anti-p38, anti-β-actin을 첨가하여 4°C에서 overnight하였다. 그 후 TBS-T로 세척하고 anti-rabbit IgG를 첨가하여 2시간동안 반응시킨 후 ECL detection reagents (Promega, Madison, WI, USA)를 이용해 실험 결과를 보았다.

통계처리

본 연구에서 얻은 실험결과는 3회 반복하였으며 모든 실험 결과는 평균치와 표준오차를 사용하여 나타내고 one-way ANOVA에 이은 각 군간 비교는 Dunnett's *t*-test 분석을 실시하였다. 대조군과 비교하여 *P* 값이 0.05 미만일 때를 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

Results and Discussion

Aloin이 암세포의 성장에 미치는 영향

Aloin이 대장암 세포 HT-29, 흑색종 세포 A375SM, 위암 세포 AGS의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해 각각 0, 100, 200, 300, 400 μM의 농도로 72시간 처리한 후 MTT assay를 통해 세포 생존율을 측정하였다. HT-29에서 세포 생존율은 200 μM에서 64.6%, 300 μM에서 49.9%, 400 μM에서 41.1%로 농도 의존적으로 감소하는 경향을 볼 수 있으나(Fig. 2A) A375SM과 AGS는 aloin 처리군과 처리하지 않은 대조군을 비교하였을 때 세포 생존율에서 유의적인 차이가 없는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2B, C).

이러한 결과는 Pan 등[12]의 연구에 따르면 대장암 세포 SW620과 HCT116에 aloin 0, 80, 120, 160, 200, 240 μM을 72시간 처리했을 때, 두 세포 모두 세포 생존율을 농도의존적으로 감소시켰다고 보고되었다. 또한 Esmat 등[18]

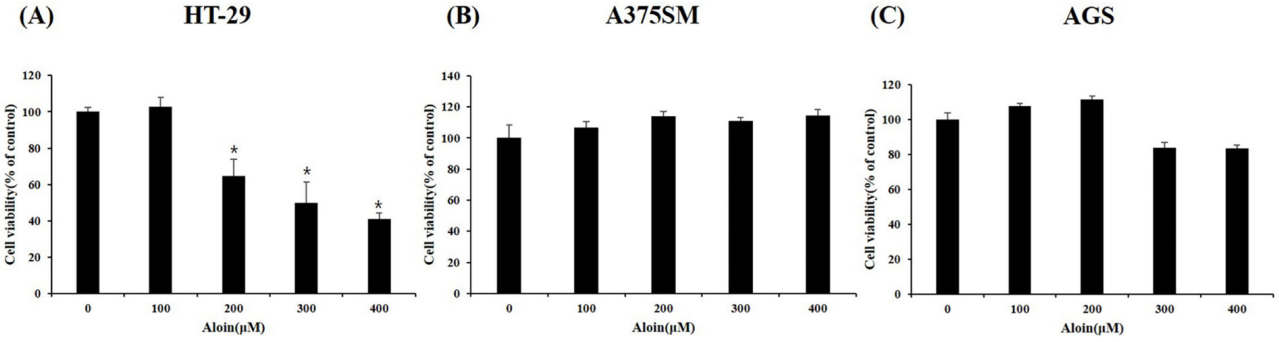

Fig. 2. The effect of aloin on cell viability. (A) HT-29, (B) A375SM and (C) AGS were treated with aloin (0, 100, 200, 300, 400 μM) for 72 h, and cell viability determined by MTT assay. The results are shown as means±standard error (SE) of three independent experiments performed in triplicate. Significance wes determined by Dunnett's *t*-test with *P<0.05 considered as statistically significant compared with non-treated controls.

의 연구에 따르면 유방암 세포 MCF-7, SKBR-3에 aloin 0, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 300 μg/mL을 96시간 처리하였을 때, 두 세포 모두 용량 의존적으로 세포 생존율이 감소했다고 보고되었는데, 이는 본 논문에서 HT-29의 결과와 유사한 것으로 확인하였다. 한편, Tabolacci 등[19]의 연구에 따르면, 흑색종 세포 B16-F10에서 aloin 0, 25, 50, 100, 500 μM을 72시간 동안 처리하였을 때, 농도 유의적으로 세포 생존율을 현저하게 감소시켰는데 본 논문에서는 인간 흑색종 세포 A375SM에서 aloin 0, 100, 200, 300, 400 μM을 72시간동안 처리하였을 때에는 세포 생존율이 감소하지 않았다. 이는 같은 흑색종 세포라 할지라도 세포의 기원이 다르기 때문에 이와 같은 차이를 보이는 것으로 여겨진다. Wang 등[20]의 연구에 따르면 위암 세포 MKN-28, HGC-27 세포에 aloin 0, 25, 50, 100, 200, 300, 400 μg/mL을 24시간동안 처리하였을 때 세포 생존율이 두 세포 모두 농도 의존적으로 감소시켰는데 본 연구에서는 위암세포 AGS에 aloin을 처리하였을 때, 세포 생존율이 감소하지 않았다. 이는 같은 위암세포라도 돌연변이가 발생하는 위치가 다르기 때문에 나타난 결과라고 생각된다. 결과적으로 aloin은 대장암세포 HT-29에서 농도에 따라 유의적으로 세포 증식에 영향을 미치는 것을 확인하였는데 이는 A375SM, AGS와 HT-29의 돌연변이가 일어난 위치의 차이에 따른 결과라고 생각한다.

Aloin 처리에 의한 세포자멸사 유도

세포자멸사는 일반적으로 발달과 노화 그리고 조직에서 세포 집단을 유지하기 위한 항상성 기전으로 일어나고 세포가 질병이나 유해 물질에 의해 손상될 때와 같은 방어기작으로 발생한다. 세포자멸이 일어나면 세포 수축과 함께 세포 기관은 더 단단해지는데, 이것은 염색질 응축의 결과이며 이것은 세포 사멸의 특징이다[21].

MTT assay 결과에 따라 세포 생존율이 유의하게 감소한 대장암 세포 HT-29 세포에 aloin 0, 200, 400 μM의 농도로 향후 실험을 진행하였다. Aloin 처리에 의한 세포 생존율 감소가 세포자멸사에 의한 것인지 확인하기 위해 DAPI staining과 flow cytometry를 실시하였다. HT-29에서 0, 200, 400 μM의 농도로 aloin을 처리한 후 DAPI staining을 진행하였을 때, 대조군에서는 apoptotic body가 보이지 않았지만 aloin 200, 400 μM에서 apoptotic body가 증가하는 것이 관찰되었고(Fig. 3A, B), 또한 DAPI staining과 마찬가지로 HT-29에 aloin을 농도별(0, 200, 400 μM)로 처리하고 flow cytometry로 세포자멸사를 측정한 결과, 대조군과 비교했을 때 aloin 400 μM을 처리한 세포에서 유의적으로 apoptotic cell이 증가하였다(Fig. 4A, B).

Lee 등[8]의 연구에 따르면 폐암세포 A549와 H1299에서 aloin 0, 100, 200 μM을 72시간동안 처리 후 DAPI를 측정한 결과 apoptotic body가 관찰되었고, flow cytometry로 세포자멸사를 측정한 결과 시간 및 농도에 따라 세포자멸사가 유의적으로 증가한 것이 보고되었다. 또한 Wang 등[20]의 연구에서는 위암 세포 MKN-28, HGC-27에 aloin 0, 100, 200, 400 μg/mL을 24시간동안 처리 후 DAPI와 flow cytometry를 측정한 결과, 각 세포에서 DNA 단편화가 관찰되었고, MKN-28, HGC-27 세포 모두 농도 의존적으로 apoptotic cell이 유의적으로 증가했다고 보고되었다.

본 연구에서 aloin 0, 200, 400 μM을 대장암세포 HT-29에 72시간동안 처리하였을 때, DAPI를 통해 apoptotic body가 관찰되었으며, flow cytometry를 이용하여 annexin-V, PI를 측정하였을 때 농도 의존적으로 apoptotic cell이 증가하였는데 이 결과는 Lee 등[8]의 연구와 Wang 등[20]의 연구 결과와 유사한 결과를 보였다. 이것은 다양한 암세포에서 aloin에 의한 항암효과가 세포자멸사에 의한 것으로 여겨지고 본 실험에서 적용한 대장암세포 HT-29에서도 세포자멸에 의한 항암효과가 있는 것으로 나타났으며, 이는 aloin이 여러 암에서 항암 효과를 나타낼 수 있는 천연 물

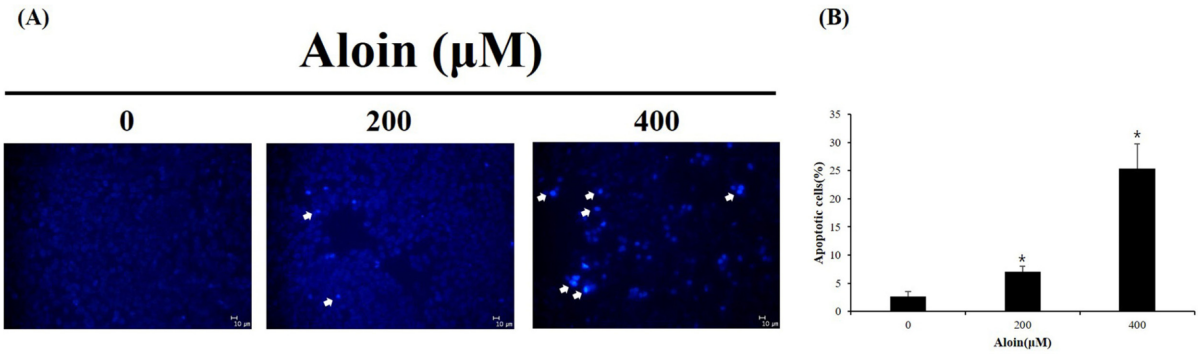

Fig. 3. The effect of aloin on DAPI staining. HT-29 cells were treated with aloin (0, 200, 400 μM) for 72 h, and apoptotic body stained with DAPI. The arrows chromatin condensation in the HT-29 cells(A) and apoptotic cell express for graph(B). Cleaved nuclei were examined using a fluorescence microscope (X200). Indicated bar is 10 μm. Significance wes determined by Dunnett's *t*-test with **P*<0.05 considered as statistically significant compared with non-treated controls.

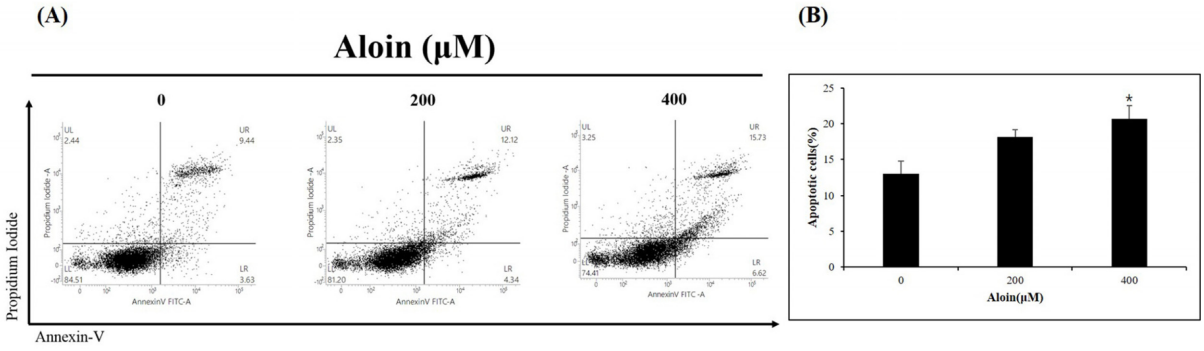

Fig. 4. Effect of aloin annexin-positive apoptotic cells numbers in HT-29 cells. HT-29 cells were treated with aloin (0, 200, 400 μM) for 72 h, apoptosis was measured by annexin-V and PI double staining. Apoptotic cells were analyzed by flow cytometry. The results are shown as means±standard error (SE) of two independent experiments performed in triplicate. Significance wes determined by Dunnett's *t*-test with **P*<0.05 considered as statistically significant compared with non-treated controls.

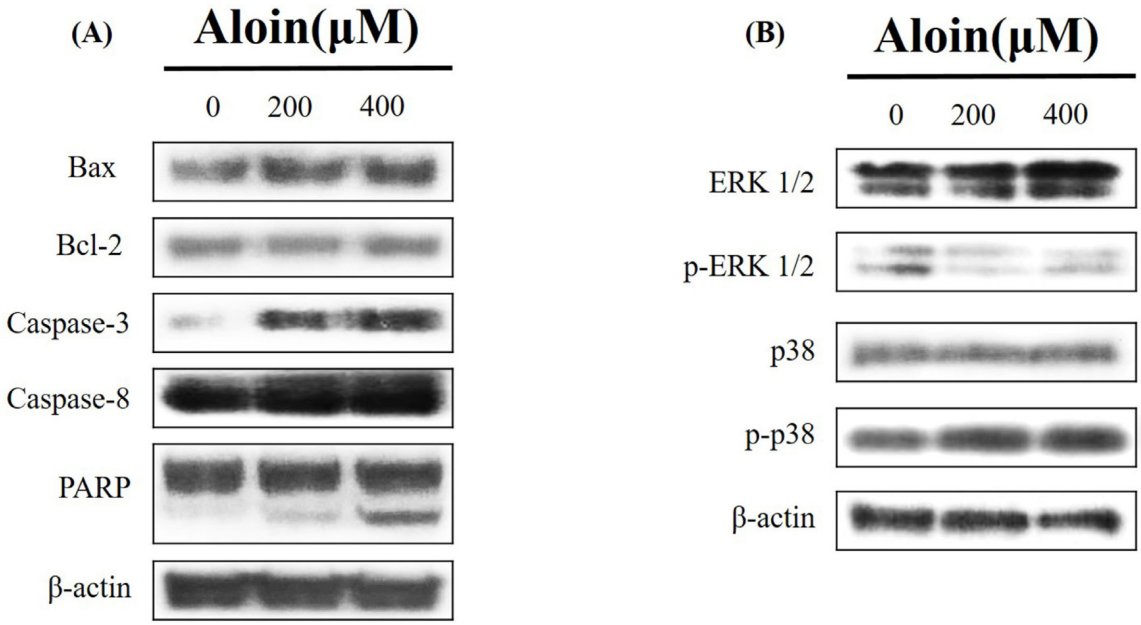

Fig. 5. The effect of aloin on apoptosis protein in HT-29 cells. HT-29 cells were treated with aloin (0, 200 and 400 μM) for 72 h and cells harvested to measure protein levels of PARP, Bax, Bcl-2, caspase-8, caspase-3, p-ERK1/2, p-p38, ERK1/2, p38 by western blotting. The blots were probed with anti-β-actin antibodies to confirm equal sample loading.

질로서의 가능성을 제시하였다. 따라서 aloin이 대장암세포 HT-29에서 세포사멸을 유도하는 것으로 사료된다.

Aloin이 세포사멸 관련 단백질 발현에 미치는 영향

Aloin이 세포사멸 관련 단백질에 미치는 영향을 확인하기 위해 HT-29에 aloin 0, 200, 400 μM을 72시간동안 처리한 후 western blot을 진행하였다. 세포 사멸 관련 단백질 중 pro-apoptotic protein인 Bax는 농도 의존적으로 증가하였으며, anti-apoptotic protein인 Bcl-2는 대조군과 비교하였을 때, 농도에 따라 변함이 없었다. 세포자멸사의 핵심 단백질인 caspase-3, -8은 증가하였고, DNA 수리에 관여하는 cleaved-PARP은 증가하였다(Fig. 5A).

Wang 등[20]의 연구에 따르면 aloin 0, 100, 200, 400 μg/mL을 24시간동안 처리하였을 때 대조군과 비교 시 cleaved-PARP이 증가하였고, Wan 등[22]의 연구에 따르면 폐암세포 A549에 48시간동안 0, 100, 200, 300, 400 μM을 처리하였을 때, 대조군과 비교하여 Bax, cleaved caspase-3, -9을 증가시켰다. 또한, Zhang 등[23]의 연구에 따르면 폐암세포 A549에 다양한 농도의 aloin (0, 50, 100 μM)으로 처리하였을 때, caspase-3, -8의 발현을 증가시켰는데 이와 유사하게 본 연구에서 대장암세포 HT-29에 aloin을 처리하였을 때, 내인성 경로의 대표적인 단백질 Bax와 외인성 경로

의 caspase-8 그리고 cleaved-PARP, caspase-3이 증가하는 것으로 보아 aloin은 세포 사멸의 내인성 및 외인성 경로를 통해 세포 사멸을 유도하는 것으로 생각된다. 따라서 aloin은 대장암 세포 HT-29에서 Bax, PARP, caspase cascade를 조절하여 세포자멸사를 유도하는 것으로 사료된다.

Aloin이 MAPK pathway 관련 단백질 발현에 미치는 영향

MAPK (mitogen activated protein kinase)는 표적 단백질 기질의 특정 세린 및 트레오닌을 인산화시키고 유전자 발현, 유사 분열, 대사 및 프로그램된 죽음에 이르는 세포 활동을 조절한다. MAPK 중 ERK1/2는 광범위하게 발현되며 세포의 분열, 유사 분열 등 조절에 관여하고, p38은 많은 사이토카인의 발현을 조절하고 호르몬 및 삼투압 쇼크 같은 스트레스를 비롯한 많은 다른 자극에 의해 활성화된다[24]. Aloin으로 인해 유도된 세포자멸사의 기전을 알아보기 위해 MAPK pathway에 속한 ERK1/2, p-38의 발현정도를 관찰하였다. MAPK pathway에서 p-ERK1/2는 대조군과 비교하였을 때 감소하였고, p-p38은 유의적으로 증가하였다(Fig. 5B).

Wang 등[20]의 연구에 따르면 aloin 0, 100, 200, 400 μg/mL을 24시간동안 위암세포 MKN-28, HGC-27에 처리하였을 때 대조군과 비교 시 p-ERK는 감소하고 p-p38은 증가했다고 보고되었으며, Wan 등[22]의 연구에 따르면 폐암세포 A549에서 aloin 0, 100, 200, 300, 400 μM을 48시간 처리하였을 때 대조군과 비교하여 p-ERK는 감소하고 p-p38은 증가했다고 보고되었는데 이는 본 연구와 유사한 결과를 나타냈다. 이와 반대로, Zhang 등[23]의 연구에 따르면, A549 cell에 다양한 농도의 aloin(0, 50, 100 μM)으로 처리하였을 때 p-p38의 발현은 감소하였고, p38의 하위 인자인 p-Cdc25B, p-Hsp 27의 발현도 감소하여 본 논문과 p-p38의 결과가 다른데 Wang 등[20]이 연구한 위암세포 MKN-28, HGC-27과 Wan 등[22]이 연구한 폐암세포 A549 cell에서 p-p38이 증가한 것으로 보아, 이는 암세포 종이 달라 다른 결과가 나타난 것으로 생각된다. 종합하였을 때, Aloin은 세포 자멸사 경로 중 p38 MAPK 경로를 통해 세포자멸사를 유도하는 것으로 사료된다.

Acknowledgement

이 논문은 2017년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(NRF-2017R1A2B4005516).

국문요약

Aloin [1,8-Dihydroxy-10-(β-*D*-glucopyranosyl)-3-(hydroxymethyl)-9(10*H*)-anthracenone]은 알로에에서 추출한 천연 안트라퀴논이다. 다양한 유형의 인간 암세포에서 항산화, 항암 효과가 있는 것으로 밝혀졌지만 인간 대장암 세포 HT-29에서 aloin의 항암 효과는 밝혀지지 않았다. 본 연구에서는 aloin이 인간 대장암 HT-29 세포에서 세포 사멸 작용을 발휘할 수 있는 메커니즘을 조사하였다. Aloin이 세포 생존율에 영향을 미치는지 알아보기 위해 대장암 세포 HT-29, 흑색종 세포 A375SM, 위암 세포 AGS를 aloin(0, 100, 200, 300 및 400 μM)으로 처리하였을 때, HT-29에서는 농도 의존적으로 세포 생존율을 감소시켰고, A375SM과 AGS 세포에서는 암세포 생존율의 감소가 보이지 않았다. 이러한 HT-29에서의 세포 생존율 감소가 세포자멸사로 인한 감소인지 확인하기 위해 DAPI stain과 flow cytometry를 실시한 결과 apoptotic body가 유의적으로 증가하고 세포 자멸사가 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과를 바탕으로 aloin이 대장암 세포 HT-29에서 세포 사멸 관련 단백질 발현 양상에 미치는 영향을 확인하기 위해 western blotting을 실시하였다. Aloin은 Bax, PARP의 분절을 농도 의존적으로 증가시켰고, caspase-3, -8을 활성화시켰지만, Bcl-2는 대조군에 비해 변화가 없었다. Aloin에 의해 유도된 세포자멸사 기전을 확인하기 위해 MAPK pathway 중 p-p38과 p-ERK의 발현을 확인한 결과, p-p38을 up-regulation시키고 p-ERK의 down-regulation을 유도했다. 따라서, aloin은 인간 대장암에서 암세포 성장 억제 효과 및 암세포 사멸 유도로 암예방 약제로서의 개발 가능성이 있다고 사료된다.

References

1. Statistics Korea. 2016 Cause of death statistics. Available from, http://www.kostat.go.kr/portal/korea/kor_nw/1/6/2/index.board?bmode=read&bSeq=&aSeq=363268&pageNo=1&rowNum=10&navCount=10&currPg=&sTarget=title&sTxt=.
2. Jeong, G., Kim, K., Kwak, Y., Quality of life in colorectal cancer patients according to the severity of symptom clusters classification. *Asian Oncol. Nurs.,* **14**, 74-83 (2014).
3. Cho, Y., Choi, M.Y., Inhibitory Effects of Flavonoids on growth of HT-29 human colon cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.,* **44**, 338-346 (2015).
4. Noh, S.H., Park, S.R., Yang, H.K., Chung, H.C., Chung, I.J., Kim, S.W., Kim, H.H., Choi, J.H., Kim, H.K., Yu, W., Lee, J.I., Shin, D.B., Ji, J., Chen, J.S., Lim, Y., Ha, S., Bang, Y.J., Adjuvant capecitabine plus oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): 5-year follow-up of an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.,* **15**, 1389-1396 (2014).
5. Sasako, M., Sakuramoto, S., Katai, H., Kinoshita, T., Furukawa, H., Yamaguchi, T., Nashimoto, A., Fujii, M., Nakajima, T., Ohashi, Y., Five-year outcomes of a randomized phase III trial comparing adjuvant chemotherapy with S-1 versus surgery alone in stage II or III gastric cancer. *J. Clin. Oncol.,* **29**, 4387-4393 (2011).

6. Chen, J., Peng, H., Ou-Yang, X., He, X., Research on the antitumor effect of ginsenoside Rg3 in B16 melanoma cells. *Melanoma Res.*, **18**, 322-329 (2008).
7. Da, Rocha A.B., Lopes, R.M., Schwartsmann, G., Natural products in anticancer therapy. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **1**, 364-369 (2001).
8. Lee, M.C., Liao, J.D., Huang, W.L., Jiang, F.Y., Jheng, Y.Z., Jin, Y.Y., Tseng, Y.S., Aloin-induced cell growth arrest, cell apoptosis, and autophagy in human non-small lung cancer cells. *Biomarkers Genomic Med.*, **6**, 144-149 (2014).
9. Hamiza, O.O., Rehman, M.U., Khan, R., Tahir, M., Khan, A.Q., Lateef, A., Sultana, S., Chemopreventive effects of aloin against 1, 2-dimethylhydrazine-induced preneoplastic lesions in the colon of Wistar rats. *Hum. Exp. Toxicol.,* **33**, 148-163 (2014).
10. Niciforovic, A., Adzic, M., Spasic, S.D., Radojcic, M.B., Antitumor effects of a natural anthracycline analog (aloin) involve altered activity of antioxidant enzymes in HeLaS3 cells. *Cancer Biol. Ther.,* **6**, 1211-1216 (2007).
11. Esmat, A.Y., El-Gerzawy, S.M., Rafaat, A., DNA ploidy and S phase fraction of breast and ovarian tumor cells treated with a natural anthracycline analog (aloin). *Cancer Biol. Ther.,* **4**, 115-119 (2005).
12. Pan, Q., Pan, H., Lou, H., Xu, Y., Tian, L., Inhibition of the angiogenesis and growth of aloin in human colorectal cancer in vitro and *in vivo*. *Cancer cell Int.,* **13**, 69 (2013).
13. Han, S.I., Kim, Y.S., Kim, T.H., Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. *BMB Rep.,* **41**, 1-10 (2008).
14. Boulares, A.H., Yakovlev, A.G., Ivanova, V., Stoica, B.A., Wang, G., Lyer, S., Smulson, M., Role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J. Biol. Chem.,* **274**, 22932-22940 (1999).
15. Donovan, M., Cotter, T.G., Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim. Biophys. Acta.,* **1644**, 133-147 (2004).
16. Yang, W.Z., Zhou, H., Yan, Y., XIAP underlies apoptosis resistance of renal cell carcinoma cells. *Mol. Med. Rep.,* **17**, 125-130 (2018).
17. Seth, A., Gonzalez, F.A., Gupta, S., Raden, D.L., Davis, R.J., Signal transduction within the nucleus by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.,* **267**, 24796–24804 (1992).
18. Esmat, A.Y., Tomasetto, C., Rio, M.C., Cytotoxicity of a natural anthraquinone (aloin) against human breast cancer cell lines with and without ErbB-2-Topoisomerase IIα coamplification. *Cancer Biol. Ther.,* **5**, 97-103 (2006).
19. Tabolacci, C., Rossi, S., Lentini, A., Provenzano, B., Turcano, L., Facchiano, F., Beninati, S., Aloin enhances cisplatin antineoplastic activity in B16-F10 melanoma cells by transglutaminase-induced differentiation. *Amino Acids,* **44**, 293-300 (2013).
20. Wang, Z., Tao, H., Ma, Y., Tang, T., Zhang, Q., Jiang, Q., Qi, S., Li, J., Qi, Z., Aloin induces apoptosis via regulating the activation of MAPKs signaling pathway in human gastric cancer cells in vitro. *J. South. Med. Univ.,* **38**, 1025-1031 (2018).
21. Elmore, S., Apoptosis, A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.,* **35**, 495-516 (2007).
22. Wan, L., Zhang, L., Fan, K., Wang, J., Aloin promotes A549 cell apoptosis via the reactive oxygen species-mitogen activated protein kinase signaling pathway and p53 phosphorylation. *Mol. Med. Rep.,* **16**, 5759-5768 (2017).
23. Zhang, Z., Rui, W., Wang, Z.C., Liu, D.X., Du, L., Anti-proliferation and anti-metastasis effect of barbaloin in non-small lung cancer via inactivating p38MAPK/Cdc25B/Hsp27 pathway. *Oncol. Rep.,* **38**, 1172-1180 (2017).
24. Johnson, G.L., Lapadat, R., Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK and p38 protein kinases. Science, **298**, 1911-1912 (2002).